



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**COMUNICACIÓN FUNCIONAL ENTRE CANALES DE Ca^{2+}
TIPO L y CANALES DE Ca^{2+} ACTIVADOS POR
RESERVORIOS, Y SU REGULACIÓN DEL TONO
VASCULAR**

Trabajo de investigación presentado por

JAVIER ÁVILA MEDINA

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017



Dr. Tarik Smani Hajami, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla y Co-Investigador Responsable en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y Dr. Antonio Ordoñez Fernández, Catedrático de la Universidad de Sevilla y responsable del área de Fisiopatología Cardiovascular/Investigador Responsable en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

Certifican que:

D. Javier Ávila Medina, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su supervisión y revisión, el trabajo titulado: “Comunicación funcional entre canales de Ca^{2+} tipo L y canales de Ca^{2+} activados por reservorios, y su regulación del tono vascular” que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Tarik Smani Hajami

Fdo. Dr. Antonio Ordoñez Fernández

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, parte de los resultados, y otros, han dado lugar a publicaciones en revistas internacionales y comunicaciones en congresos.

ARTICULOS EN REVISTAS *PEER REVIEW*

Smani, T., Gallardo-Castillo, I., **Avila-Medina, J.**, Jimenez-Navarro, MF., Ordoñez, A. y Hmadcha, A. "Impact of diabetes on cardiac and vascular disease: Role of calcium signaling." *Curr Med Chem*. EN PRENSA (BSP-CMC-2016-H137-1).

Avila-Medina, J., Calderon-Sanchez, E., Gonzalez-Rodriguez, P., Monje-Quiroga, F., Rosado, J. A., Castellano, A., . . . Smani, T. (2016). "Orai1 and TRPC1 Proteins Co-localize with CaV1.2 Channels to Form a Signal Complex in Vascular Smooth Muscle Cells." *J Biol Chem* 291(40): 21148-21159.

Smani, T., Dominguez-Rodriguez, A., Callejo-Garcia, P., Rosado, J. A. y **Avila-Medina, J.** (2016). "Phospholipase A2 as a Molecular Determinant of Store-Operated Calcium Entry." *Adv Exp Med Biol* 898: 111-131.

Rodriguez-Moyano, M., Diaz, I., Dionisio, N., Zhang, X., **Avila-Medina, J.**, Calderon-Sanchez, E., . . . Smani, T. (2013). "Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation." *Cardiovasc Res* 100(2): 297-306.

ARTICULOS EN REVISION

Díaz, I., Calderón-Sánchez, E., Toro, R., Sánchez de Rojas-de Pedro, E., Domínguez-Rodríguez, A., **Ávila, J.**, . . . Smani, T. "miR-125a, miR-139 and miR-324 contribute to Urocortin protection against myocardial ischemia-reperfusion injury". *Sci Rep* EN REVISIÓN Editorial.

Domínguez-Rodríguez, A., Díaz, I., Sánchez de Rojas-de Pedro, E., Mayoral-Gonzalez, I., Calderón-Sánchez, E., **Avila-Medina, J.**, . . . Ordóñez, A. "Urocortin-2 prevents the altered Ca²⁺ homeostasis during early adverse cardiac remodeling after ischemia and reperfusion". EN REDACCIÓN.

Calderón-Sánchez, E., **Avila-Medina, J.**, Callejo-Garcia, P., Smani-Hajami, T. y Ordóñez-Fernandez, A. "Endothelin-1 induced post ischemic microvascular obstruction. Role of SOC and L-type Ca²⁺ channels". EN REDACCIÓN.

ARTICULOS EN REVISTAS DE CONGRESOS

Avila-Medina, J., Gonzalez, P., Rosado, J., Castellano-Orozco, A., Ordóñez-Fernandez, A. y Smani, T. (2014). "Functional crosstalk between L-type Ca²⁺ and Orai1 channels and their regulation of vascular tone." *Acta Physiologica* 211: 93.

Calderón-sánchez, E., Callejo-Garcia, P., **Avila-Medina, J.**, Smani-Hajami, T. y Ordonez-Fernandez, A. (2014). "Role of store operated calcium and L-type calcium channels in coronary artery hypercontraction after ischemia and reperfusion process." *Acta Physiologica* 211: 88.

Rodríguez-Moyano, M., Díaz-Carrasco, I., Dionisio, N., **Ávila-Medina, J.**, Calderón-Sánchez, E., Rosado, J. A., . . . Smani, T. (2014). "Urotensin-II Induces Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Creb Phosphorylation Through Store Operated Calcium Entry and EGFR Transactivation." *Biophysical Journal* 106(2): 318a.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Javier Ávila-Medina, Eva Calderón-Sánchez, Paula Callejo-García, Juan Antonio Rosado, Antonio Ordoñez-Fernández, Tarik Smani. (2016). "Orai1 and TRPC1 interact with CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels in mouse and rat vascular smooth muscle cells". *XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)*. Zaragoza (Spain). Póster.

Javier Ávila-Medina, Eva Calderón-Sánchez, Paula Callejo-García, Patricia González-Rodríguez, Juan Antonio Rosado, Antonio Castellano, Tarik Smani. (2015). "Vasoactive agonists enhance the interaction between Orai1 and CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle cells". *RECI V – 5th Spanish Ion Channel Network Meeting*. Barcelona (Spain). Póster.

Javier Ávila-Medina, Patricia González, Juan Antonio Rosado, Antonio Castellano, Tarik Smani. (2014). "Functional crosstalk between L-type Ca²⁺ and Orai1 channels and their regulation of vascular tone". *Joint Meeting of Federation of European Physiological Societies (FEPS) & the Hungarian Physiological Society*. Budapest (Hungary). Póster.

EM Calderon-Sanchez, P Callejo-Garcia, **J Avila-Medina**, T Smani-Hajami, A Ordonez-Fernandez. (2014). "Role of store operated calcium and L-type calcium channels in coronary artery hypercontraction after ischemia and reperfusion process". *Joint Meeting of Federation of European Physiological Societies (FEPS) & the Hungarian Physiological Society*. Budapest (Hungary). Póster.

Ávila J, González P, Rosado JA, Castellano A, Ordóñez A, Smani T. "Role of L-type calcium and Orai1 channels regulation of vascular smooth muscle tone". (2014). *XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)*. Granada (Spain). Póster.

J.Ávila, P. González, A. Castellano, A. Ordóñez, T. Smani. (2013). "Functional communication between L-Type Ca²⁺ and Store Operated Ca²⁺ Channels and their regulation of vascular tone". *International Ionic Channels Meeting. New Horizons in Ionic Channels Research*. Cuenca (Spain). Póster.

J.Ávila, P. González, A. Castellano, A. Ordóñez, T. Smani. (2012). "The interplay between L-Type Ca²⁺ and Store Operated Ca²⁺ Channels and their regulation of vascular tone". *Federation of European Physiological Societies (FEPS) Congress*. Santiago de Compostela (Spain). Póster.

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la financiación concedida en convocatorias públicas competitivas de los siguientes proyectos de investigación:

- Regulación de la entrada de calcio en células excitables y papel de proteínas Stim, Orai y TRP en la proliferación celular y en el remodelado vascular (2014-2016). Ministerio de Economía y Competitividad (Plan Estatal). **BFU2013-45564-C2-2-P**; 193.600,00€. Categoría: Investigador. IP: Tarik Smani Hajami.
- Implicación de la Urocortina en la lesión de la microvasculatura coronaria tras angioplastia primaria y su influencia en el remodelado cardiaco (2012-2015). Junta de Andalucía, Conserjería de Salud y Bienestar Social. **PI-0108-2012**; 51.30,00€. Categoría: Investigador. IP: Eva María Calderón Sánchez.
- Regulación de la entrada de calcio por STIM, Orai, y proteínas TRPC en células eléctricamente excitables (2010-2013). Ministerio de Ciencia e Innovación (Plan Nacional). **BFU2010-21043-CO2-2**; 145.200 €. Categoría: Investigador. IP: Tarik Smani Hajami.



ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS

II. ÍNDICE DE TABLAS

III. ABREVIATURAS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Sistema vascular.	3
1.1.1	Estructura de las arterias.	3
1.1.2	Ultraestructura del músculo liso vascular.	6
1.2	Función del músculo liso vascular.	12
1.2.1	Contracción músculo liso vascular.	12
1.2.2	Acoplamiento excitación-contracción.	14
1.3	Regulación del tono vascular.	16
1.3.1	Homeostasis del Ca^{2+} intracelular.....	17
1.3.2	Mecanismos de sensibilización a Ca^{2+}	22
1.3.3	Factores extrínsecos e intrínsecos y regulación del tono vascular.	23
1.4	Canales iónicos y regulación del tono vascular	27
1.4.1	Canales K^+ y Cl^-	28
1.4.2	Canales de Ca^{2+}	30
1.5	Entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios o SOCE.....	36
1.5.1	Componentes moleculares.	37
1.5.2	Mecanismos de activación.....	41
1.5.3	Papel fisiopatológico de SOCE en el sistema vascular.	44
2	MAT. Y MÉTODOS.....	47
2.1	Equipamiento.....	49
2.1.1	Miógrafo multicanal.	49
2.1.2	Sistema de microfluorimetría de Ca^{2+}	50
2.1.3	Microscopía.	52
2.1.4	Criostato.	53
2.2	Soluciones.....	53
2.2.1	Solución para registro de la contractilidad arterial.	53
2.2.2	Solución para aislamiento de CMLVs.....	54
2.2.3	Solución para registro de la $[Ca^{2+}]_i$	54
2.2.4	Soluciones Western Blot.....	55
2.2.5	Soluciones inmunofluorescencia.	56
2.3	Farmacología.	57
2.4	Metodología.	58
2.4.1	Modelo animal.....	58

2.4.2	Registro de la contractilidad arterial.	60
2.4.3	Aislamiento de CMLVs.	61
2.4.4	Registro de la $[Ca^{2+}]_i$	62
2.4.5	Transferencia de anticuerpos en anillos arteriales.	63
2.4.6	Inmunofluorescencia.	65
2.4.7	Extracción de proteína y Western Blot.	71
2.4.8	PCR cuantitativa (RT-qPCR, quantitative Reverse Transcription PCR).	72
2.4.9	Análisis estadístico.	75
3	OBJETIVOS.....	77
4	RESULTADOS.....	81
4.1	Caracterización de la respuesta contráctil inducida por agonista en aorta.	83
4.1.1	Contracción inducida por agonista: papel de los LTCCs y los SOCCs.	83
4.1.2	Participación de los LTCCs y SOCCs en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$	87
4.2	Vasoconstricción inducida mediante la activación específica de los SOCCs en aorta.....	90
4.2.1	Contracción inducida por TG.	90
4.2.2	Papel de los LTCCs y SOCCs en la respuesta de Ca^{2+} a la TG.	90
4.3	Caracterización de SOCE en ratones knock-out del canal $Ca_v1.2$....	91
4.3.1	Determinación de la expresión y funcionalidad de los LTCCs en ratones $Ca_v1.2^{KO}$	91
4.3.2	SOCE no compensa la pérdida de función de los canales $Ca_v1.2$	94
4.4	Efecto de la modificación del potencial de membrana sobre la respuesta contráctil y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5-HT y TG.	98
4.4.1	La hiperpolarización inducida por valinomicina atenúa la vasoconstricción y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por agonista y TG.	98
4.4.2	La hiperpolarización inducida por cromakalim también atenúa la vasoconstricción y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5-HT.	101
4.4.3	Potenciación de la función de los LTCCs sobre la contracción inducida por 5-HT y TG.....	103
4.5	Caracterización del papel de $Orai1$ y $TRPC1$ en la contracción inducida por 5-HT.....	105
4.5.1	Participación de $Orai1$ en la contracción inducida por 5-HT.	105
4.5.2	Participación de $TRPC1$ en la contracción inducida por 5-HT.	108
4.6	Distribución endógena de $Orai1$, $TRPC1$ y $Ca_v1.2$.	108
4.6.1	Distribución endógena de $Orai1$ y $Ca_v1.2$	108
4.6.2	Colocalización de $Orai1$, $Ca_v1.2$ y $TRPC1$ en condiciones basales.....	110
4.6.3	Colocalización de $Orai1$, $Ca_v1.2$ y $TRPC1$ en presencia de agonistas.	110
5	DISCUSIÓN.....	115
5.1	Métodos de estudio de SOCE en músculo liso vascular.	118

5.2	Inhibidores de SOCCs y su controversia	119
5.3	SOCCs y LTCCs en la respuesta mediada por agonista.	121
5.4	SOCE en ratones knock-out del canal Cav1.2.....	123
5.5	Repercusión de la manipulación del potencial de membrana sobre la respuesta contráctil.....	124
5.6	Activación o inactivación secundaria de los LTCCs.	126
5.7	Caracterización del papel de Orai1 y TRPC1 en la contracción inducida por 5-HT.....	127
5.7.1	Orai1 participa en la vasoconstricción inducida por agonista.	127
5.7.2	Papel de TRPC1 y Orai3 en la vasoconstricción inducida por agonista..	128
5.8	Distribución endógena de Orai1, TRPC1 y Cav1.2.	128
5.9	Papel fisiopatológico de SOCE.....	130
5.9.1	Perspectivas futuras.	132
6	CONCLUSIONES	135
7	BIBLIOGRAFÍA	139

I. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estructura de los vasos sanguíneos (arteria)</i>	4
<i>Figura 2: Organización de las capas en distintos tipos arteriales</i>	5
<i>Figura 3: Organización jerárquica del tejido vascular</i>	6
<i>Figura 4: Contracción de CMLVs</i>	7
<i>Figura 5: Filamentos gruesos o filamentos de miosina</i>	8
<i>Figura 6: Maquinaria contráctil de las CMLVs</i>	9
<i>Figura 7: Caveolas</i>	10
<i>Figura 8: Esquema de las principales proteínas del RS</i>	11
<i>Figura 9: Formación de puentes cruzados en la contracción del músculo liso</i>	13
<i>Figura 10: Regulación de la contracción en CMLVs</i>	14
<i>Figura 11: Acoplamiento excitación-contracción en CMLVs</i>	15
<i>Figura 12: Mecanismos envueltos en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} en CMLVs</i> ..	17
<i>Figura 13: Mecanismos de extrusión de Ca^{2+} citoplasmático</i>	20
<i>Figura 14: Mecanismo de sensibilización a Ca^{2+} en CMLVs</i>	22
<i>Figura 15: Esquema resumido de la respuesta miogénica en la microcirculación</i>	24
<i>Figura 16: Sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio</i>	25
<i>Figura 17: Micrografía electrónica de una arteria de pequeño calibre</i>	26
<i>Figura 18: Canales de K^+ y tono vascular</i>	28
<i>Figura 19: Canales de Cl^- y tono vascular</i>	29
<i>Figura 20: Estructura del LTCC</i>	31
<i>Figura 21: Dominios estructurales de la subunidad α_1 del LTCC</i>	32
<i>Figura 22: Entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios</i>	37
<i>Figura 23: Estructura molecular de STIM1</i>	39
<i>Figura 24: Estructura molecular de Orai1</i>	40
<i>Figura 25: Mecanismo de acción de la taspigargina</i>	42
<i>Figura 26: Mecanismo de activación de SOCE</i>	43
<i>Figura 27: Miógrafo de Mulvany</i>	49
<i>Figura 28: FURA-2</i>	50
<i>Figura 29: Espectro de fluorescencia FURA-2</i>	51
<i>Figura 30: condiciones PCR convencional para el genotipado de ratones $Ca_v1.2^{KO}$</i>	60
<i>Figura 31: CMLVs aisladas de aorta de ratón</i>	62
<i>Figura 32: Fluorescencia medida a 340 y 380 nm</i>	63
<i>Figura 33: Protocolo resumido de la transferencia de anillos arteriales mediante Chariot</i> .	64
<i>Figura 34: Placa de IBIDI "μ-Slide VI 0.4" con 6 canales</i>	65
<i>Figura 35: Metodología en placas de IBIDI "μ-Slide VI 0.4"</i>	65
<i>Figura 36: Esquema del protocolo de inmunocitofluorescencia con las Placa de IBIDI "μ-Slide VI 0.4"</i>	66
<i>Figura 37: Protocolo resumido del ensayo in situ PLA</i>	67
<i>Figura 38: Protocolo de retrotranscripción de ARN</i>	73
<i>Figura 39: Esquema resumiendo el mecanismo de la tecnología TaqMan</i>	74
<i>Figura 40: Protocolo RT-qPCR</i>	75
<i>Figura 41: Esquema de la entrada de Ca^{2+} regulada por los reservorios</i>	83
<i>Figura 42: Vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos con y sin endotelio</i>	84
<i>Figura 43: Efecto de inhibidores de LTCCs y SOCCs sobre la contracción inducida por 5-HT en anillos aórticos</i>	84

Figura 44. Vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos pretratados con nifedipina.....	85
Figura 45. Efecto de inhibidores de LTCCs y SOCCs sobre la contracción inducida por Phe en anillos aórticos.	86
Figura 46: Efecto de inhibidores LTCCs y SOCCs sobre la contracción inducida por ET-1 en arteria coronaria de rata.	86
Figura 47: Efecto de inhibidores de LTCCs y SOCCs sobre la vasoconstricción inducida por KCl en anillos aórticos.....	87
Figura 48: Componentes de la respuesta de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ originada por 5-HT en CMLVs aisladas de aorta de ratón.....	88
Figura 49: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por 5-HT en CMLVs aisladas de aorta de ratón.....	88
Figura 50: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ promovidos por ET-1 en CMLVs aisladas de coronaria de rata.....	89
Figura 51: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por KCl en CMLVs aisladas de aorta de ratón. ...	89
Figura 52: Vasoconstricción inducida por TG en anillos aórticos.	90
Figura 53: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por TG en CMLVs aisladas.....	91
Figura 54: Expresión de ARNm del canal $Ca_v1.2$ en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	92
Figura 55: Expresión del canal $Ca_v1.2$ en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	92
Figura 56: Vasoconstricción inducida por KCl y cafeína en anillos aórticos de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	93
Figura 57: Incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	93
Figura 58: Inmunohistofluorescencia de aorta de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	94
Figura 59: Expresión de ARNm de <i>Orai1</i> en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	95
Figura 60: Expresión de <i>Orai1</i> en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	95
Figura 61: Vasoconstricción inducida por 5-HT y TG en anillos aórticos de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	96
Figura 62: Inhibición de la vasoconstricción inducida por 5-HT y TG en anillos aórticos de ratones $Ca_v1.2^{KO}$	97
Figura 63: Incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 5-HT y TG en CMLVs aisladas de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$	97
Figura 64: La valinomicina atenúa la contracción inducida por KCl y cafeína en anillos aórticos de ratón.	98
Figura 65: La valinomicina atenúa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por KCl, pero no por cafeína, en CMLVs aisladas de aorta de ratón.	99
Figura 66: La valinomicina disminuye la vasoconstricción en anillos aórticos y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de aorta de ratón inducidos por 5-HT.....	100
Figura 67: La valinomicina disminuye la vasoconstricción en anillos aórticos y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de aorta de ratón inducidos por TG.	100
Figura 68: El cromakalim atenúa la vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos de ratón, pero no afecta a la producida por KCl o cafeína.	Error! Marcador no definido.
Figura 69: El cromakalim afecta al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5-HT en CMLVs aisladas de aorta de ratón, pero no por KCl o cafeína.....	102
Figura 70: El cromakalim atenúa la vasoconstricción en anillos aórticos de ratón y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de aorta de ratón inducidos por TG.	103
Figura 71: Efecto del BayK sobre la vasoconstricción en anillos aórticos de ratón inducida por 5-HT y KCl.	104
Figura 72: Efecto del BayK sobre la vasoconstricción inducida por TG en anillos aórticos de ratón.....	105
Figura 73: Transferencia de anticuerpo anti- <i>Orai1</i> en anillos aórticos mediante Chariot...	106

<i>Figura 74: La transferencia del anticuerpo anti-Orai1 mediante Chariot atenúa la vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos de ratón.</i>	107
<i>Figura 75: La transferencia del anticuerpo anti-Orai1 mediante Chariot no afecta a la vasoconstricción producida por KCl o cafeína en anillos aórticos de ratón.</i>	107
<i>Figura 76: La transferencia de anticuerpo anti-Orai3 y anti-TRPC1 mediante Chariot no afecta a la vasoconstricción producida por 5-HT en anillos aórticos de ratón.</i>	108
<i>Figura 77: Distribución endógena y colocalización de Orai1 y Cav1.2 en CMLVs aisladas de aorta de ratón y coronaria de rata.</i>	109
<i>Figura 78: Orai1 y Cav1.2 colocalizan en CMLVs aisladas de aorta de ratón.</i>	111
<i>Figura 79: TRPC1 y Cav1.2 colocalizan en CMLVs aisladas de aorta de ratón.</i>	112
<i>Figura 80: Orai1 y Cav1.2 aumentan su colocalización en CMLVs aisladas de aorta de ratón tras estimulación con agonista.</i>	113
<i>Figura 81: TRPC1 y Cav1.2 aumentan su colocalización en CMLVs aisladas de aorta de ratón tras estimulación con agonista.</i>	114
<i>Figura 82: Modelo esquemático que resume la coactivación de SOCCs y Cav1.2 tras la estimulación con agonista.</i>	117

II. ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: composición de la solución de Krebs.</i>	53
<i>Tabla 2: composición de SD.</i>	54
<i>Tabla 3: composición de PSS.</i>	54
<i>Tabla 4: composición de PSS 70K.</i>	55
<i>Tabla 5: composición de las soluciones para Western Blots.</i>	55
<i>Tabla 6: composición geles de acrilamida.</i>	56
<i>Tabla 7: composición de la solución de bloqueo en Inmuncitofluorescencia.</i>	56
<i>Tabla 8: composición de los tampones de lavado PLA.</i>	56
<i>Tabla 9: composición de la solución de bloqueo en inmunohistofluorescencia.</i>	57
<i>Tabla 10: Oligonucleótidos utilizados en el genotipado de ratones Cav1.2^{KO}.</i>	60
<i>Tabla 11: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmudetección múltiple.</i>	66
<i>Tabla 12: Anticuerpos primarios y condiciones utilizados en el ensayo in situ PLA Cav1.2 - Orai1.</i>	68
<i>Tabla 13: Anticuerpos primarios y condiciones utilizados en el ensayo PLA Cav1.2 - TRPC1.</i>	68
<i>Tabla 14: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistofluorescencia.</i>	70
<i>Tabla 15: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western Blot.</i>	72
<i>Tabla 16: referencia de las sondas TaqMan utilizadas para detectar la expresión de Orai1, Cav1.2 y β-actina.</i>	74

III. ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: concentración de Ca²⁺ intracelular.

2APB: 2-aminoetoxi-difenil borato.

5-HT: Serotonina (5-hidroxitriptamina).

70K: KCl a 70 mM.

AA: Ácido Araquidónico.

Ach: acetilcolina.

ADP: adenosin difosfato (*Adenosine Diphosphate*).

Ang: angiotensina.

APS: persulfato de amonio (*Ammonium Persulfate*).

ARC: canal de Ca²⁺ regulado por el AA.

ATP: adenosin trifosfato (*Adenosine Triphosphate*).

BayK: BayK-8644.

BK_{ca}: canal de K⁺ sensible a Ca²⁺ de gran conductancia.

Ca²⁺: Ion calcio.

CAD: *CRAC Activation Domain*.

Caf: cafeína.

CaM: calmodulina.

Ca_v: canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje.

Ca_v1.2^{ko}: ratón knock-out del canal Ca_v1.2.

CDI: inactivación dependiente de Ca²⁺ (*Ca²⁺ Dependent Inactivation*).

cGMP: guanosina monofosfato cíclica (*cyclic Guanosine Monophosphate*).

CICR: liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (*Ca²⁺ Induce Ca²⁺ Release*).

CIF: *Ca²⁺ influx Factor*.

Cl⁻: Ion cloro.

Cl_{ca}: canal de Cl⁻ dependiente de Ca²⁺.

Cl_{vol}: canal de Cl⁻ regulado por volumen.

CMLV: célula de músculo liso vascular.

CPA: ácido ciclopiazónico (*Cyclopiazonic Acid*).

Crom: cromakalim.

Cx: conexina.

DAG: diacilglicerol.

DTT: ditioneitol.

ECC: entrada capacitativa de Ca²⁺.

EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

ET-1: endotelina.

FBS: suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*).

Gd³⁺: gadolinio.

Gli: glibenclamida.

GPCR: receptor acoplado a proteína G (*G Protein Coupled Receptor*).

GSK: GSK-7975A.

H₂O: agua.

H₂O₂: agua bidestilada.

I_{CRAC}: corrientes de Ca²⁺ activadas por liberación de Ca²⁺ (*Ca²⁺ Release Activated Ca²⁺*).

ID: dominio inhibitorio de STIM (*Inhibitory Domain*).

IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R: receptor de inositol 1,4,5-trifosfato o IP₃.

I_{SOCC}: corrientes a través de los canales regulados por los reservorios (*Store Operated Channel*).

K⁺: Ion potasio.

K⁺_{ATP}: canal de K⁺ dependiente de ATP.

K⁺_{IR}: canal de K⁺ rectificador entrante.

K⁺_v: canal de K⁺ dependiente de voltaje.

KCl: cloruro potásico.

Ki: knock-in.

KO: knock-out.

La³⁺: lantano.

LTCC: canal de Ca²⁺ tipo L (*L-type Ca²⁺ Channel*).

M.p.: membrana plasmática.

MHC: cadena pesada de la miosina (*Myosin Heavy Chain*).

MLC: cadena ligera de la miosina (*Myosin Light Chain*).

MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina (*Myosin Light Chain Kinase*).

MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (*Myosin Light Chain Phosphatase*).

Na⁺: Ion sodio.

NCX1: intercambiador Na⁺/Ca²⁺.

Nif: nifedipina.

NO: óxido nítrico (*Nitric Oxide*).

NSSC: canal catiónico no selectivo (*Non-Selective Cationic Channel*).

OASF: *Orai1-Activating Small Fragment*.

OCT: *Optimum Cutting Temperature*.

PCC: coeficiente de correlación de Pearson (*Pearson's Correlation Coefficient*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*).

Phe: fenilefrina.

PKA: proteína quinasa A (*Protein kinase A*).

PKC: proteína quinasa C (*Protein Kinase C*).

PLA: *Proximity Ligation Assay*.

PLC: fosfolipasa C.

PMCA: ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática (*Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase*).

PSS 70K: solución salina fisiológica (*Physiological Salt Solution*) con KCl a 70 mM.

PSS: solución salina fisiológica (*Physiological Salt Solution*).

RE (ER): Reticulo Endoplásmico (*Endoplasmic Reticulum*).

ROCC: canal de Ca^{2+} regulado por receptor (*Receptor Operated Ca^{2+} Channel*).

ROCE: entrada de Ca^{2+} regulada por receptor (*Receptor Operated Ca^{2+} Entry*).

ROCK: Rho quinasa (*RhoA/Rho Kinase*).

RS (SR): Reticulo Sarcoplásmico (*Sarcoplasmic Reticulum*).

RT-qPCR: PCR cuantitativa con retrotranscripción (*quantitative Reverse Transcription PCR*).

RyR: receptor de rianodina.

SAM: *Sterile Alpha Motif*.

SARAF: factor regulador asociado a SOCE (*SOCE-Associated Regulatory Factor*).

SCID: inmunodeficiencia combinada severa (*Severe Combined Immunodeficiency*).

SD: solución de dispersión.

SDS: dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*).

SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del reticulo sarco/endoplásmico. (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*).

SHR: rata espontáneamente hipertensas (*Spontaneously Hypertensive Rat*).

SOAR: *STIM-Orai Activating Region*.

SOCC: canal de Ca^{2+} regulado por reservorios (*Store Operated Ca^{2+} Channel*).

SOCE: entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios (*Store Operated Ca^{2+} Entry*).

STIM: *Stromal Interaction Molecule*.

T^a: temperatura.

TBS: *Tris-Buffered Saline*.

TBS-T: *TBS-Tween*.

TCA: tricloroacético.

TG: tapsigargina.

TRP: receptor de potencial transitorio (*Transient Receptor Potential*).

TRPA: *TRP Ankyrin*.

TRPC: *TRP Canonical*.

TRPM: *TRP Melastatin*.

TRPP: *TRP Polycystin*.

TRPV: *TRP Vanilloid*.

TTCC: canal de Ca^{2+} tipo T (*T-type Ca^{2+} Channel*).

Val: valinomicina.

VDCC: canal de Ca^{2+} voltaje dependiente (*Voltage Dependent Calcium Channel*).

WT: wild type.

α -SMA: α -actina de músculo liso (*α -Smooth Muscle Actin*).

I INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema vascular.

La principal función del sistema vascular es transportar y distribuir las sustancias necesarias a todos los tejidos del cuerpo y eliminar los productos de desecho del organismo. También nos permite mantener la homeostasis de todos los tejidos del cuerpo, asegurar un funcionamiento óptimo y la supervivencia de todas las células.

El sistema vascular está formado por una gran cantidad de vasos sanguíneos que pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Arterias elásticas: son arterias de conductancia que tienen grandes dimensiones y desempeñan la función de transportar sangre a altas presiones y velocidades, por lo que presentan paredes vasculares gruesas conteniendo una alta proporción de fibras elásticas en su túnica media.
- Arterias musculares: son arterias de resistencia que tienen un calibre pequeño y la capacidad de regular el flujo sanguíneo en respuesta a las necesidades del organismo, ya que pueden modificar el diámetro interno rápidamente gracias a que poseen una importante capa muscular y menos fibras elásticas que las anteriores. Son los conductos que comunican con arteriolas y capilares.
- Arteriolas: son las arterias de menor tamaño y se encargan de controlar y regular la cantidad de sangre que llega a los tejidos. Comunican directamente con los capilares.
- Capilares: son los encargados de intercambiar los nutrientes y sustancias que circulan por la sangre con el fluido intersticial gracias a que poseen una pared muy fina y permeable.
- Vénulas: se encargan de recoger la sangre de los capilares para conducirla a venas de mayor calibre.
- Venas: su función principal es la de transportar de nuevo la sangre al corazón, además de funcionar como reservorios de sangre ya que poseen una gran distensibilidad.

El estudio de la estructura del sistema vascular y su función ha sido, y seguirá siendo, muy importante para el entendimiento de la fisiología del organismo, sistemas, órganos, tejidos y células. Aunque se están conociendo cada vez más observaciones anatómicas del organismo, todavía se conoce poco a nivel molecular por lo que cualquier avance sobre las estructuras moleculares puede ayudarnos a entender mejor su función (Ratz, 2016). Por ese motivo, el objetivo de esta tesis se centrará en el análisis de la función del músculo liso vascular, la activación de la contracción, el proceso de relajación y el papel que juegan algunos tipos de canales iónicos en la regulación de la contracción y el tono vascular.

1.1.1 Estructura de las arterias.

El sistema vascular, a pesar de las complejas diferencias que existen entre órganos y regiones, comparte una organización histológica común. La mayoría de los vasos sanguíneos contienen tres regiones histológicamente diferentes con distintos componentes celulares basándose en la función fisiológica que los vasos desempeñan como tejido. Cada

región se denomina capa o túnica y anatómicamente se designan túnica adventicia, túnica media y túnica íntima. A nivel fisiológico, las **arterias** son más importantes debido a las funciones que desempeñan como veremos más adelante, por lo que nos centraremos en el estudio de éstas (Figura 1).

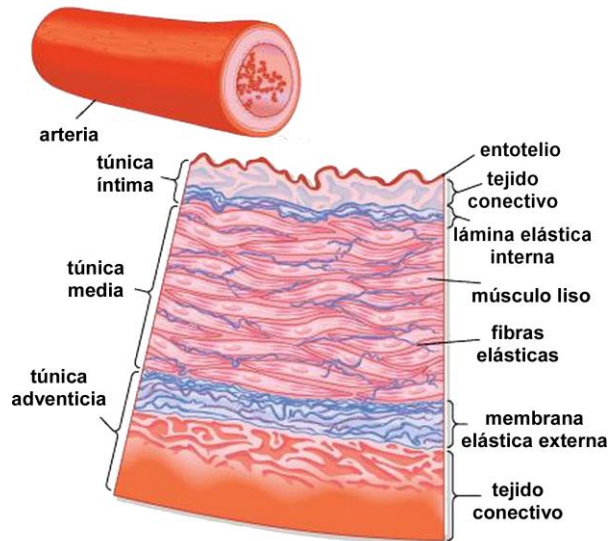


Figura 1: Estructura de los vasos sanguíneos (arteria).

Representación de la estructura de una arteria compuesta por 3 capas: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia. *Modificado de Enciclopedia británica, Inc (2008).*

A. Capa adventicia.

Es la capa más externa y funciona como soporte, ya que está compuesta de tejido conectivo principalmente y una capa de elastina denominada membrana elástica externa. No forma unidad con la estructura vascular, sin embargo, tiene un papel fisiológico importante ya que contiene el *vasa vasorum* y *nervi vasorum* con funciones nutricionales y de control, respectivamente. Además, interviene en los cambios en la conducta elástica y viscosa de la pared arterial a través de una regulación de la función muscular lisa (Fischer, 2008).

B. Capa íntima.

Es la capa más interna y cercana a la luz de los vasos por donde fluye la sangre. Contiene un revestimiento de epitelio simple compuesto por células endoteliales, llamado endotelio, una membrana basal y una capa de tejido elástico llamada lámina elástica interna compuesta por elastina. Es una capa continua de células que reviste la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, por lo que suele ser el único tejido que tiene contacto con la sangre (Levick, 2013).

C. Capa media.

La túnica media contiene principalmente células de músculo liso y fibras de elastina, adoptando una disposición concéntrica y facilitando la difusión de sustancias. Esta capa es la más gruesa y tiende a ser más organizada en vasos de gran calibre, debido a su función de transportar grandes volúmenes de sangre a altas presiones. Gracias a su contenido en fibras elásticas, las arterias poseen alta distensibilidad, estirándose con facilidad en respuesta a leves incrementos de presión. Por este motivo, esta capa es la responsable de la vasoconstricción y vasodilatación en respuesta a estímulos regulando así el tono vascular (Levick, 2013).

Las arterias elásticas y las arterias musculares de mayor tamaño poseen una túnica media muy estructurada, en cambio, las arterias musculares de pequeño o mediano tamaño, no presentan esta complejidad y poseen una túnica media prominente o relativamente gruesa en relación a la adventicia (Figura 2).

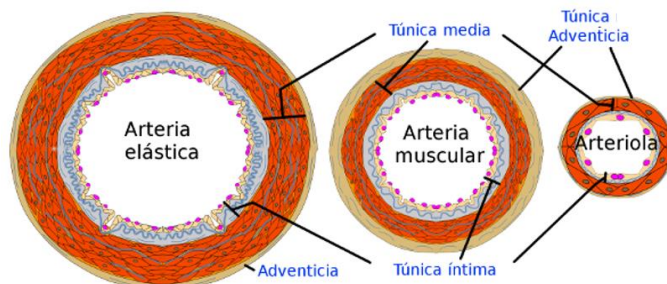


Figura 2: Organización de las capas en distintos tipos arteriales.

Organización de las distintas capas que componen las arterias elástica, muscular y las arteriolas. *Modificado de (Molist y cols., 2011).*

En el sistema vascular podemos encontrar los dos tipos de músculo liso existentes: el unitario o visceral y el multiunitario. El primero está presente en vasos sanguíneos de pequeño calibre y se caracteriza por el acoplamiento eléctrico entre sus células por medio de uniones GAP, funcionando como un sincitio. El multiunitario, en cambio, está presente en vasos sanguíneos de mayor diámetro. Ambos tipos de músculo liso son involuntarios y están inervados por el sistema nervioso autónomo.

De cualquier forma, las células del músculo liso de los vasos sanguíneos o células de músculo liso vascular (CMLVs), serán las encargadas en último término de la regulación del tono vascular. La contracción y relajación de las CMLVs a nivel arterial controla el diámetro luminal vascular y la presión arterial y, por consiguiente, el flujo sanguíneo, de manera que participan activamente en la fisiopatología cardiovascular, motivo por el que serán el principal objeto de estudio de este trabajo (Katz, 2005).

1.1.2 Ultraestructura del músculo liso vascular.

La estructura y función del músculo liso vascular engloba varios órdenes de magnitud espacial, que van desde la escala de centímetros de longitud de los vasos sanguíneos hasta la escala nanométrica de las proteínas del citoesqueleto (Figura 3).

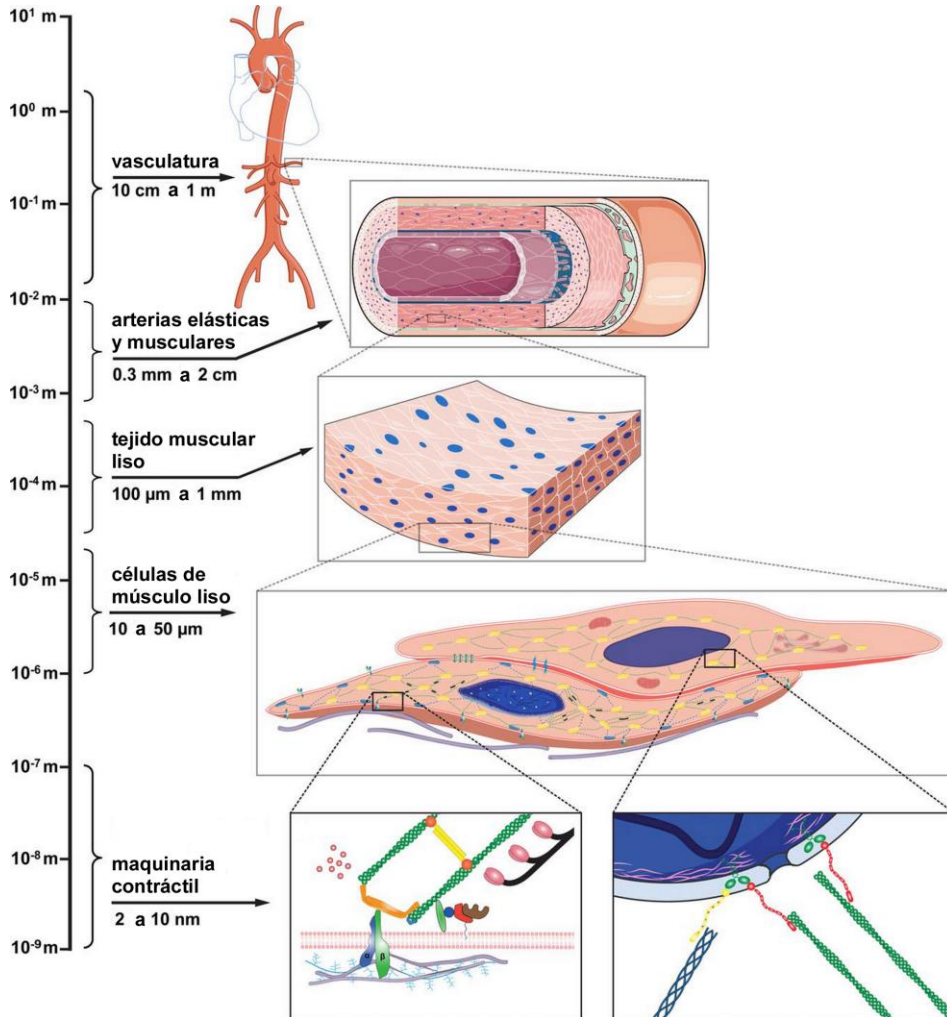


Figura 3: Organización jerárquica del tejido vascular.

Las células de músculo liso se encuentran unidas entre sí en el tejido muscular, que forma la capa media de arterias elásticas y musculares. Tienen forma de huso y engloban distintos complejos de proteínas a escala nanométrica (maquinaria contráctil) que les permite responder mecánicamente a señales en el microambiente celular. La imagen muestra la organización jerárquica del tejido vascular desde una escala de centímetros o metros en la vasculatura, a una escala nanométrica en la maquinaria contráctil. *Modificado de [Ye y cols., 2014].*

A. Maquinaria contráctil.

La maquinaria contráctil de las CMLVs está formada por dos proteínas contráctiles principalmente, actina y miosina, que polimerizan para formar los filamentos delgados (actina) y gruesos (miosina). La proporción actina:miosina es de 15:1, por lo que la presencia de filamentos delgados es mayor (Stromer y Bendayan, 1988), siendo la actina la proteína más abundante del citoesqueleto y constituyendo el 20% del contenido total de proteínas (Kim y cols., 2008). Gracias a esta proporción, las CMLVs pueden contraerse más de la mitad de su tamaño original (Figura 4).

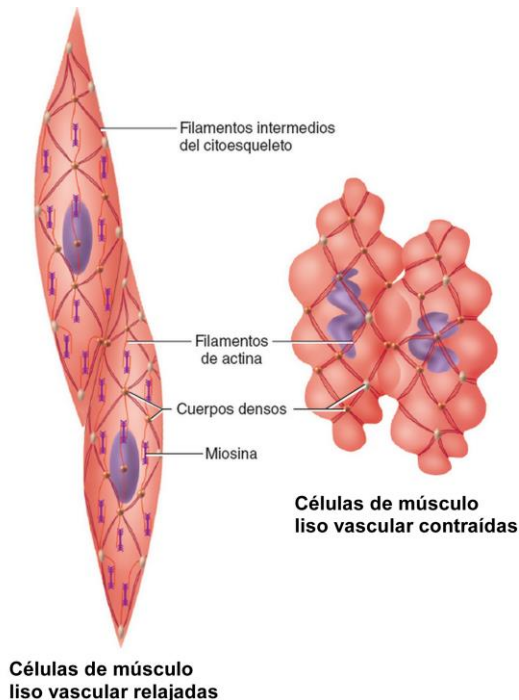


Figura 4: Contracción de CMLVs.

Diferencia de tamaño entre CMLV relajada y CMLV contraída. Modificado de (Saladin, 2013).

Los **filamentos de actina** o filamentos delgados están compuestos de varias subunidades de la proteína globular G-actina (42KDa) y otras proteínas accesorias. En estos filamentos, los monómeros de G-actina polimerizan formando hebras conocidas como F-actina. Dos de estas hebras lineales enrolladas forman una estructura helicoidal que dará lugar a un filamento delgado (King, 1996). En CMLVs se encuentran 4 de las 6 isoformas presentes en vertebrados: alfa actina de músculo liso (α -SMA, α -Smooth Muscle Actin), beta actina citoplasmática (β -actina), gamma actina de músculo liso (γ -SMA) y gamma actina citoplasmática (γ -actina). Además, los filamentos de actina poseen tropomiosina, pero no contienen troponina, una proteína reguladora sensible a calcio presente en músculo esquelético. En su lugar, hay grandes cantidades de otra proteína reguladora llamada calmodulina (CaM).

Los **filamentos de miosina** o filamentos gruesos se unen a la actina y poseen actividad ATPasa. Estos filamentos están formados principalmente por múltiples miosinas tipo II (Eddinger y Meer, 2007), una molécula hexamérica compuesta de dos cadenas pesadas

de 200KDa (MHC, *Myosin Heavy Chain*) y dos pares de cadenas ligeras (MLC, *Myosin Light Chain*), denominadas cadena ligera reguladora (MLC20, 20KDa) y cadena ligera esencial (MLC17, 17KDa). Los hexámeros contienen tres regiones diferenciadas. El extremo C terminal de las MHC conforman una cola helicoidal cuya agregación será el principal constituyente de los filamentos gruesos de miosina. El extremo N terminal de cada MHC conforman una cabeza globular que sobresalen lateralmente del filamento, constituyendo el dominio motor al ser el sitio de unión a la actina y poseer capacidad para hidrolizar adenosin trifosfato (ATP, *Adenosine Triphosphate*), es decir, es el dominio que proporciona la energía necesaria para generar fuerza (Figura 5). Los dos pares de MLC ligan las cadenas pesadas en la tercera región denominada “cuello”, entre la cabeza y la cola, mediante enlaces no covalentes (Sellers y cols., 1982). Las regiones cabeza y cuello, que sobresalen de los filamentos gruesos, se conocen como zona “bisagra”, reflejando su función como la zona del filamento grueso que interacciona con los filamentos de actina durante la actividad contráctil.

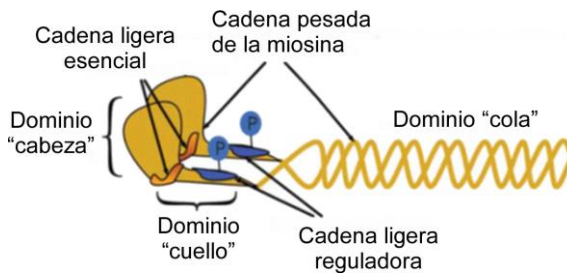


Figura 5: Filamentos gruesos o filamentos de miosina.

Disposición de los filamentos de miosina o filamentos gruesos. El extremo C terminal de las MHCs conforman la cola helicoidal, mientras que el extremo N terminal, la cabeza globular. Los dos pares de MLCs se unen a las cadenas pesadas en el dominio “cuello”. *Modificado de (Boron y Boulpaep, 2012).*

Además de los filamentos de actina y filamentos de miosina, las CMLVs poseen otros filamentos que no están implicados en la contracción necesariamente, **los filamentos intermedios**. En la mayoría de tipos celulares, estos filamentos están compuestos de un gran número de proteínas del citoesqueleto, siendo la desmina y la vimentina los principales constituyentes. Sin embargo, en CMLVs se expresa principalmente vimentina en lugar de desmina. La vimentina está ampliamente distribuida en varios vasos sanguíneos, desde las arterias elásticas hasta las microarterias, mientras que la desmina, apenas es detectada en grandes arterias como la aorta, pero sí está presente en pequeñas arterias (Tang, 2008).

En el músculo liso, los filamentos formados por todas estas proteínas contráctiles no se organizan en forma de sarcómera como en el músculo estriado o cardíaco, sino que tienen una estructura más desorganizada. Los filamentos de actina se unen a los **cuerpos densos** en el citoplasma, que son agregados de la proteína α -actinina y análogos a las líneas Z en músculo esquelético o cardíaco. Estas estructuras no están alineadas a lo largo de

citoplasma y sirven como puntos de anclaje de los filamentos delgados, de modo que sobre ellos se ejerce la fuerza necesaria para el acortamiento celular durante la contracción. Además, se asocian a otras proteínas del citoesqueleto como la β -actina, de forma que contribuyen al mantenimiento de la estructura celular (Aguilar y Mitchell, 2010). Las **placas densas** se asocian a la membrana plasmática y están compuestas de varias proteínas incluyendo α -actinina, vinculina, actina... Son el punto de unión entre filamentos de actina y citoesqueleto, lo que permite transmitir la fuerza desde la maquinaria contráctil a la membrana plasmática.

Todos estos elementos constituirían el aparato contráctil. Gracias a éste, los estímulos mecánicos provenientes del sistema cardiovascular pueden propagarse al interior de la célula o entre células (Figura 6). Por ejemplo, las integrinas conectan directamente la matriz extracelular con los filamentos de actina, de forma que la fuerza mecánica puede

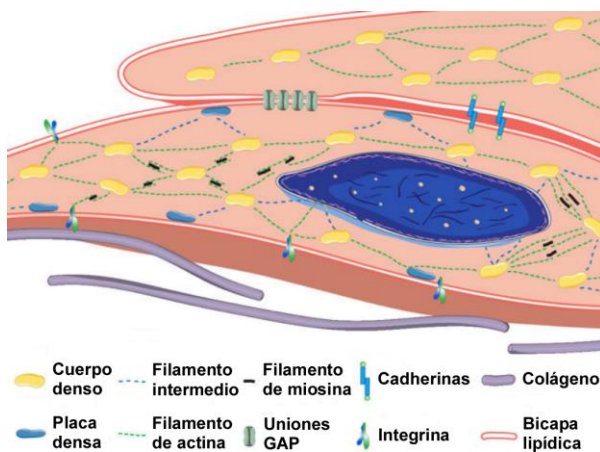


Figura 6: Maquinaria contráctil de las CMLVs.

Componentes del citoesqueleto que conforman la maquinaria contráctil de las CMLVs junto con otras proteínas de adhesión y comunicación celular. *Modificado de (Ye y cols., 2014).*

ser transmitida desde el exterior hacia el interior celular. Las cadherinas unen directamente CMLVs adyacentes y propagan señales mecánicas de una célula a otra. Ya en el interior celular, los filamentos de actina, miosina y filamentos intermedios, propagan las señales mecánicas por medio de las placas y cuerpos densos. Todo esto demuestra la importancia de los componentes del citoesqueleto celular, ya que puede modular múltiples funciones celulares en respuesta a estímulos extracelulares (Ye y cols., 2014).

B. Caveolas.

El sarcolema de la CMLV contiene invaginaciones, denominadas **caveolas**, que pueden ser análogas a los túbulos T del sarcolema cardiaco. Tienen un tamaño de entre 8 y 20 nm y hacen que el área superficie celular se incremente en hasta un 75%. El principal componente de las caveolas es la caveolina, una proteína de anclaje, además de colesterol y esfingomielina. Normalmente se encuentran próximas al retículo sarcoplásmico (RS) (Figura 7), por lo que están implicadas en el transporte de calcio y el tráfico de proteínas. Las caveolas desempeñan un papel importante en varias funciones del musculo liso como la contracción (Gutierrez-Pajares y cols., 2015) o la proliferación (Huang y cols., 2015).

Recientemente se ha descubierto otra proteína asociada a la caveolina, denominada cavina, cuyo papel específico en el músculo liso todavía no está claro, siendo su presencia determinante para la expresión de caveolina y la formación de caveolas. La falta de esta proteína implica la formación de una pared vascular más gruesa y una mayor reactividad frente a agonistas (Brozovich y cols., 2016), lo que podría afectar a la función vascular.

A pesar de todo ello, todavía se sigue estudiando la función concreta de las caveolas en el músculo liso vascular, ya que en ellas se encuentran multitud de proteínas de membrana y moléculas de señalización, como receptores acoplados a proteína G, canales iónicos, adenilato ciclasa, proteína quinasa C... siendo una región de la célula que integra múltiples rutas bioquímicas (Sanon y cols., 2015).

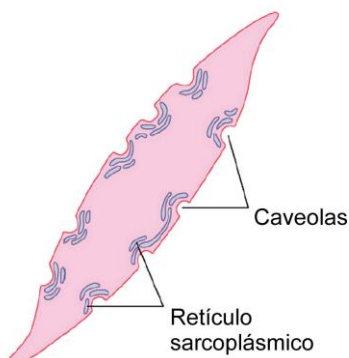


Figura 7: Caveolas.

Caveolas y túbulos sarcoplásmicos en CMLVs. Modificado de (Guyton, 2011).

C. Uniones GAP.

Las CMLVs están eléctricamente conectadas mediante las **uniones gap**, que son sistemas de comunicación de la membrana celular que une los citoplasmas de células adyacentes, constituidos por canales que permite sincronizar respuestas mediante intercambio directo de iones o pequeñas moléculas. Las uniones GAP están compuestas por proteínas transmembrana denominadas conexinas (Cx), que en grupo de seis rodean un poro en la membrana formando un “hemicanal” o conexón. Dos conexones de células adyacentes se anclan y alinean entre sí formando una unión GAP e interconectando los citoplasmas de las dos células (Suárez y Bravo, 2006). En la musculatura lisa de la pared vascular se ha detectado la presencia de Cx37, Cx40, Cx43 y Cx45 (Evans y Martin, 2002).

Estas zonas comunicantes son regiones de poca resistencia lo que permite la propagación rápida de respuestas a lo largo de los vasos sanguíneos, por lo que una despolarización eléctrica y contracción en un punto de una arteria, puede resultar en la despolarización y contracción de un punto alejado en el mismo vaso, demostrando la propagación célula a célula de corrientes iónicas, no sólo entre células de músculo liso y mismo tipo celular (Levick, 2013), sino también entre distintos tipos celulares, como células endoteliales y CMLVs (de Wit y cols., 2008).

La función de las uniones GAP es dependiente de las interrelaciones que mantienen con otras proteínas, como cadherinas, caveolinas u otras proteínas mecánicas y de adhesión al citoesqueleto celular (Ismat y cols., 2005; Li y cols., 2005).

D. Retículo sarcoplásmico.

En las células de músculo liso, los depósitos intracelulares de Ca^{2+} son una fuente importante de Ca^{2+} necesario para la contracción muscular entre otras funciones. El

principal reservorio de Ca^{2+} en la célula es el RS, aunque también se han propuesto como reservorios la mitocondria, el aparato de Golgi y la envoltura nuclear (Sanders, 2001).

El RS se caracteriza por la presencia de proteínas de recaptación como la ATPasa de Ca^{2+} del Reticulo Sarco/Endoplásmico (SERCA, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*), de almacenamiento (calsecuestrina, calreticulina) y de liberación (receptor de rianodina, RyR; y receptor inositol 1,4,5-trifosfato, IP_3R) de Ca^{2+} , lo que refleja su importante participación en la homeostasis de Ca^{2+} en la célula (Figura 8). Puede localizarse en regiones cercanas a las caveolas, anteriormente descritas, formándose acoplamiento de unos 10-12 nm, en regiones equivalentes a los túbulos T en músculo estriado y cardiaco. Más adelante analizaremos en profundidad la contribución del RS a la homeostasis del Ca^{2+} en CMLVs.

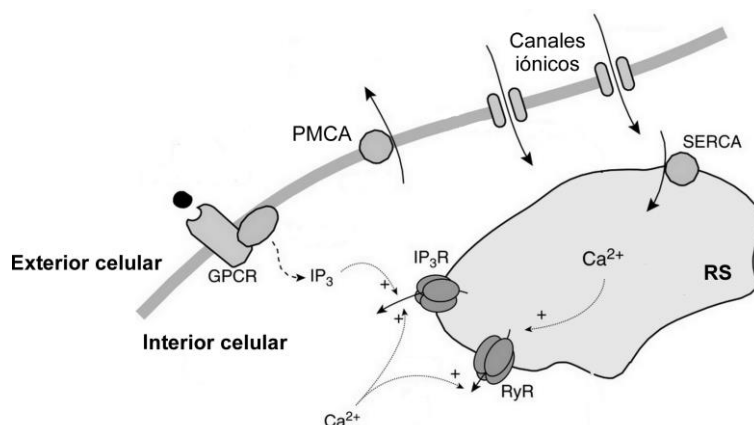


Figura 8: Esquema de las principales proteínas del RS.

Representación de las proteínas más importantes presentes en el RS. La estimulación de receptores de superficie puede inducir la liberación de Ca^{2+} del RS a través de los IP_3R y RyR. El Ca^{2+} presente en el citosol puede ser eliminado mediante ATPasas de membrana o la bomba de recaptación SERCA. RS: retículo sarcoplásmico. IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; IP_3R : receptor de IP_3 . SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico. GPCR: receptor de membrana acoplado a proteína G; PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática. *Modificado de (Croisier y cols., 2015).*

E. Mitocondria.

La regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es un proceso complejo que engloba, la liberación y recaptación de Ca^{2+} del RS y el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. En CMLVs se ha demostrado que otros reservorios también intervienen en esta regulación, como la **mitocondria**. Se ha determinado que un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede conllevar un incremento en el Ca^{2+} mitocondrial, necesario para la síntesis de ATP, de forma que un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimularía la síntesis de ATP (Delmotte y cols., 2014). Existen estudios que han demostrado que los cambios en la regulación del Ca^{2+} mitocondrial pueden alterar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugiriendo la estrecha relación que existe entre las señales de Ca^{2+} y los mecanismos de regulación del mismo (Brookes y cols., 2004). De esta forma, la mitocondria y el RS contribuirían conjuntamente a minimizar los incrementos de Ca^{2+} que puedan producirse en el citosol.

Existen dos rutas de extrusión de Ca^{2+} en la mitocondria, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCXm) y el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Poburko y cols., 2004). Además, también se pueden encontrar transportadores de Ca^{2+} unidireccionales que permiten la entrada de este ion cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el espacio intermembranario alcanza niveles superiores a $3 \mu\text{M}$ (Gunter y cols., 1994).

1.2 Función del músculo liso vascular.

Las CMLVs se encargan de proporcionar la integridad estructural a los vasos sanguíneos y de regular el tono vascular y la presión sanguínea. Las arterias normales tienen unas CMLVs con un fenotipo contráctil o quiescente, mientras que en las arterias que presentan alguna patología (arterioesclerosis, hipertensión, reestenosis...) este fenotipo cambia a uno sintético o proliferativo, precedido de múltiples cambios en la homeostasis de Ca^{2+} que contribuyen al remodelado vascular (Marchand y cols., 2012).

El papel más importante del Ca^{2+} en las CMLVs en un fenotipo contráctil es participar en el acoplamiento excitación-contracción (EC), que será el proceso encargado de regular la contractilidad de las CMLVs.

1.2.1 Contracción músculo liso vascular.

La contracción de las CMLVs depende de la formación de puentes cruzados entre los filamentos de miosina y los filamentos de actina, de manera que el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los filamentos gruesos es lo que provoca el acortamiento celular y, por tanto, la contracción del músculo (Figura 9A). Esta contracción depende principalmente de la $[\text{Ca}^{2+}]$, que puede incrementarse debido a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o por la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios (p.ej., RS). El Ca^{2+} , ya en el medio intracelular, se une y activa a la CaM (une 4 iones Ca^{2+}), formando un complejo Ca^{2+} -CaM que activa directamente a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK, *Myosin Light Chain Kinase*). Esta quinasa será la que active directamente a la miosina mediante fosforilación de la cadena ligera reguladora (MLC20), gracias a la hidrólisis de ATP donador del grupo fosfato, provocando un cambio conformacional en la proteína (Figura 9B). De este modo, tendrá lugar la formación de los puentes cruzados entre ambos tipos de filamentos y la activación de la maquinaria contráctil (Somlyo y Somlyo, 2003). Así, en el músculo liso el interruptor que inicia el ciclo de puentes cruzados es la miosina y no la actina como ocurre en otros músculos (Aguilar y Mitchell, 2010).

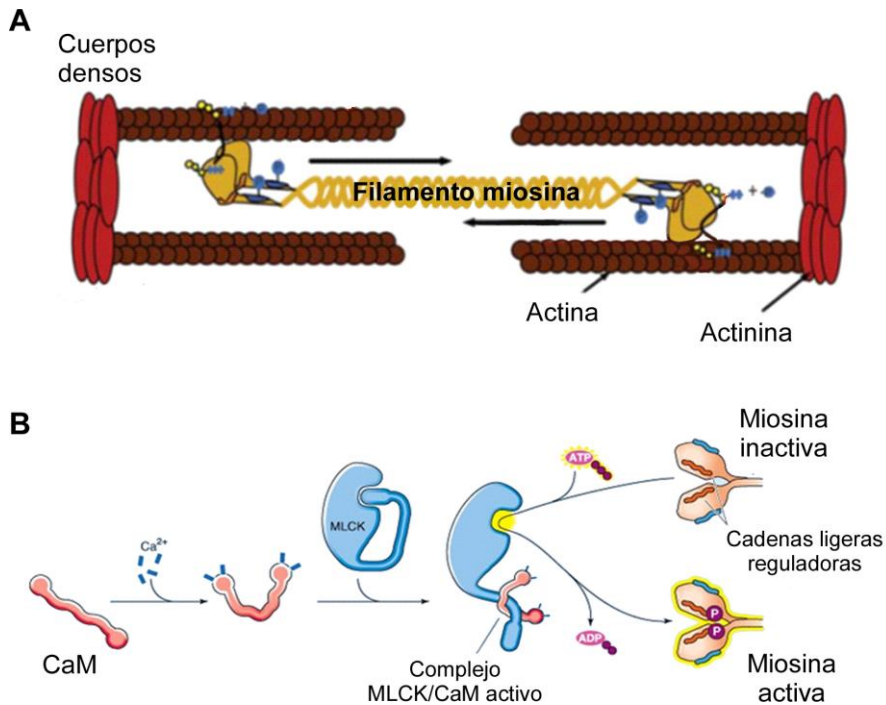


Figura 9: Formación de puentes cruzados en la contracción del músculo liso.

A. Puentes cruzados entre filamentos de actina y miosina que permite la contracción en músculo liso. Los filamentos de actina se anclan a los cuerpos o placas densas mientras que los filamentos de miosina se deslizan sobre éstos permitiendo el acortamiento celular. **B.** Iniciación de la formación de puentes cruzados. El complejo MLCK/CaM activo inducirá el cambio conformacional en la miosina activando la maquinaria contráctil. CaM: calmodulina; MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina. *Modificado de (Boron y Boulpaep, 2012).*

La relajación vascular tiene lugar cuando la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP, *Myosin Light Chain Phosphatase*) promueve la desfosforilación de la cadena ligera de la miosina. Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye, la MLCK cesa su actividad y la MLCP la incrementa, eliminando el grupo fosfato de la miosina, lo que hace detener el ciclo de los puentes cruzados, produciéndose la relajación de la célula e induciendo la vasodilatación (Blaustein y cols., 2011).

Mientras la cadena ligera de la miosina esté fosforilada, los puentes cruzados se mantienen y también la contracción, de forma que el grado de contracción de las CMLVs está regulado por un balance entre MLCK y MLCP (Figura 10). Si cuando los puentes cruzados están todavía acoplados se produce la desfosforilación de la cadena ligera de la miosina, el desacople de los mismo tiene lugar de forma lenta. Esto puede contribuir al mantenimiento de la contracción tónica y la fuerza del músculo liso con un mínimo consumo de energía en forma de ATP. Para este proceso se requiere Ca^{2+} , ya que si la $[Ca^{2+}]_i$ no se mantiene, los puentes cruzados formados previamente se desacoplarán (Blaustein y cols., 2011). Además, existen otros mecanismos independientes de Ca^{2+} que pueden alterar la maquinaria contráctil: la modificación de la actividad de MLCP (Martinez-Lemus y cols.,

2009), el remodelado dinámico de la actina del citoesqueleto (Cipolla y cols., 2002) y la eliminación de la regulación de los filamentos delgados (Tanaka y cols., 1990).

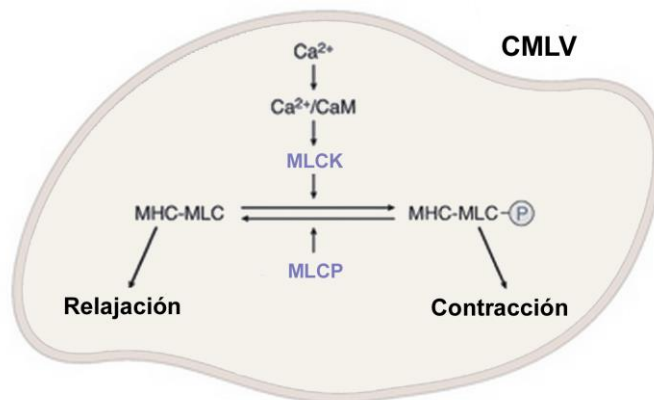


Figura 10: Regulación de la contracción en CMLVs.

El grado de contracción en las CMLVs está regulado por un balance entre MLCK y MLCP. Cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, se activa la MLCK que fosforila la MLC, iniciando la formación de puentes cruzados y la contracción. Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye, la MLCP desfosforila la MLC y tiene lugar la vasodilatación. CaM: calmodulina; MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; MHC: cadena pesada de la miosina; MLC: cadena ligera de la miosina.

1.2.2 Acoplamiento excitación-contracción.

La contracción del músculo liso vascular puede ser iniciada mediante estímulos eléctricos, químicos o mecánicos (Davis y Hill, 1999), de manera que se han propuesto tres mecanismos para explicar el acoplamiento excitación-contracción: acoplamiento electromecánico, acoplamiento farmacomecánico y el acoplamiento mecánico propiamente dicho.

A. Acoplamiento electromecánico.

Es un mecanismo que causa la contracción y relajación a través de potenciales de acción o cambios rítmicos en el potencial de membrana modulando el flujo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (VDCCs, *Voltage Dependent Calcium Channels*). El potencial de membrana de las CMLVs en reposo está en torno a -40 a -60 mV, rango en el que la probabilidad de apertura de los VDCCs es alta, de manera que pequeñas variaciones en el potencial de membrana cambia el flujo de Ca^{2+} a través de estos canales drásticamente (Nelson y Quayle, 1995). La despolarización y/o potenciales de acción causan un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y disparan la contracción. La hiperpolarización de la membrana da origen a la relajación por disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, debido al cierre de los VDCCs (Somlyo y Somlyo, 1994).

El potencial de membrana depende de la actividad de muchos mecanismos de transporte de iones activos y pasivos en la membrana celular, como ATPasas, canales de K^+ , canales

de Cl^- ... Sin embargo, el simple hecho de la despolarización no es suficiente para activar la contracción de las CMLVs y se necesita la liberación de Ca^{2+} del RS. Esto se consigue gracias a la modulación de la activación del RyR mediada por Ca^{2+} , amplificando la señalización de este ion en un proceso similar al que tiene lugar en músculo esquelético o cardíaco que se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, *Calcium Induce Calcium Release*) (Somlyo y Somlyo, 1994; Kotlikoff, 2003). Este Ca^{2+} libre en el citosol puede activar a su vez otros canales iónicos que den como resultado una hiperpolarización (canales de K^+) o despolarización (canales de Cl^-) (Smani y cols., 2001), que también pueden ser activados por la acción directa de hormonas o neurotransmisores o mediante la acción de segundos mensajeros (Somlyo y Somlyo, 1994), induciendo relajación o contracción respectivamente (Figura 11A).

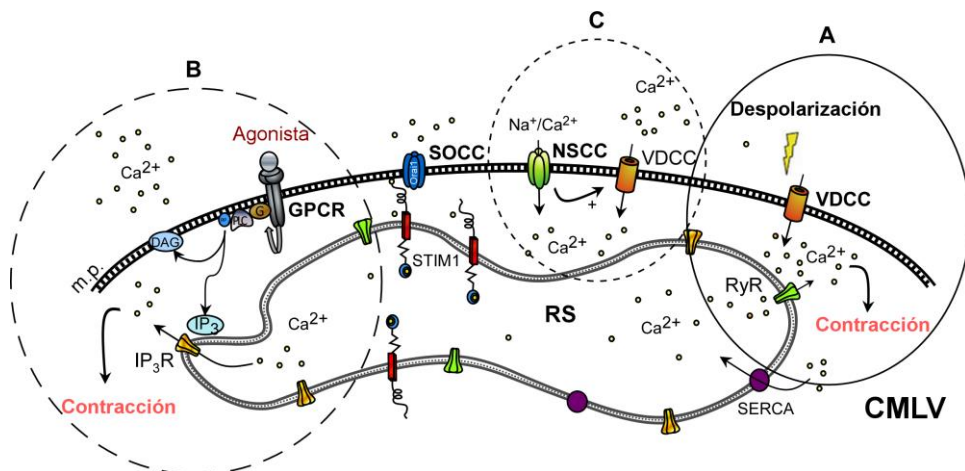


Figura 11: Acoplamiento excitación-contracción en CMLVs.

A. Acoplamiento electromecánico. Pequeñas despolarizaciones de membrana pueden activar los VDCCs, provocando entrada de Ca^{2+} . Este Ca^{2+} estimula los RyRs e induce la liberación de Ca^{2+} del RS, aumentando así la $[\text{Ca}^{2+}]$. **B.** Acoplamiento farmacomecánico. La activación de un GPCR mediante agonista induce la producción de IP_3 y la liberación de Ca^{2+} del RS tras la activación de los IP_3 Rs. **C.** Acoplamiento mecánico. La activación de canales catiónicos no selectivos (NSCCs) mediante cambios en la tensión o aumento del volumen celular permite el influjo de Ca^{2+} y Na^+ , contribuyendo a la respuesta contráctil al inducir despolarización y activación de VDCCs. GPCR: receptor acoplado a proteína G; m.p.: membrana plasmática; IP_3 : inositol 1,4,5-trisfosfato; IP_3 R: receptor de IP_3 ; SOCC: canal de Ca^{2+} regulado por reservorios; VDCC: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje; RS: retículo sarcoplásmico; RyR; receptor de rianodina.

B. Acoplamiento farmacomecánico.

Consiste en un mecanismo de contracción y relajación que no está mediado por cambios en el potencial de membrana. Este mecanismo se desencadena mediante la unión de diferentes agonistas (hormonas, neurotransmisores, péptidos...) a su receptor de membrana específico iniciando una cascada de señalización que induce la contracción o relajación. Esta ruta, por tanto, implica la activación de receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCRs, *G Protein Coupled Receptors*) y la consiguiente generación de segundos mensajeros como el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) o el AMPc, entre otros. El mayor mecanismo de acoplamiento farmacomecánico es la liberación de Ca^{2+} mediante IP_3 .

generado en la cascada del fosfatidilinositol (Devine y cols., 1972; Somlyo y Somlyo, 1994) (Figura 11B).

La activación de un GPCR mediante agonista promueve la liberación del factor soluble IP_3 mediante la activación de fosfolipasa C (PLC), que hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) produciendo IP_3 y diacilglicerol (DAG). Este IP_3 soluble difunde a la región del RS más cercana, donde se encuentran los IP_3 Rs que actúan como canales de liberación de Ca^{2+} , mientras que el DAG permanece en la membrana desencadenando otras vías de señalización mediante la activación de moléculas como la proteína quinasa C (PKC, *Protein Kinase C*) (Taylor y cols., 2004; Chalmers y cols., 2006). IP_3 , por tanto, libera Ca^{2+} del RS incrementando la concentración de este ion en el citoplasma celular y con ello, el tono vascular (Lin y cols., 2016).

C. Acoplamiento mecánico.

Por último, el acoplamiento mecánico es un mecanismo de contracción que implica una distorsión física de la membrana celular, activando cascadas de señalización de segundos mensajeros y la activación de canales iónicos, como los canales de receptor de potencial transitorio o TRP (*Transient Receptor Potential*), que se han propuesto como mecanosensores respondiendo a cualquier tensión, flujo o cambio en el volumen celular, contribuyendo a la respuesta contráctil (Sharif-Naeini y cols., 2008). Algunos canales TRP actúan como canales catiónicos no selectivos (NSCCs, *Non Selective Cationic Channels*) de manera al ser activados permiten el flujo de Ca^{2+} y Na^+ al interior celular, contribuyendo a la despolarización celular y activación de VDCCs (Figura 11C).

1.3 Regulación del tono vascular.

La regulación de la actividad contráctil del músculo liso vascular en la circulación sistémica depende de una compleja interacción de estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores producto de las hormonas circulantes, neurotransmisores, moléculas derivadas del endotelio y la presión sanguínea, que serán integrados por las CMLVs determinando la contractilidad de las mismas, el diámetro y la resistencia de los vasos.

Los vasos sanguíneos presentan normalmente un estado basal de contracción parcial denominada tono basal, el cual puede verse modificado dependiendo de las necesidades del organismo y su demanda de sangre.

Como ya hemos visto, la contracción del músculo liso vascular está estrechamente relacionada con el potencial de membrana, aumentando por despolarización e inhibiéndose mediante hiperpolarización (Haeusler, 1983). Cualquier factor que modifique el potencial de membrana va a afectar a la contractilidad del músculo liso, aunque también puede verse alterada por factores que afecten a las proteínas contráctiles o bien a la sensibilidad a Ca^{2+} de la unidad contráctil (Horowitz y cols., 1996). Sin embargo, debido a que la principal causa de la contracción es el aumento de $[Ca^{2+}]_i$, nos centraremos

principalmente en estudiar los mecanismos que se encargan de regular los niveles citoplasmáticos de este ion.

1.3.1 Homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLVs está en torno a 100 - 300 nM, bastante menos concentrado que en el medio extracelular. Mantener el gradiente electroquímico de este ion supone un gasto energético importante para la célula, pero a cambio, ésta emplea el Ca^{2+} para multitud de procesos biológicos como la excitación, proliferación, transcripción y contracción. Por este motivo, la célula necesita regular los niveles de Ca^{2+} intracelular mediante diferentes factores y mecanismos situados a distintos niveles en la misma, por medio de la entrada/extrusión del ion desde el medio extracelular y/o la liberación/recaptación desde los reservorios (Marín y cols., 1999) (Figura 12).

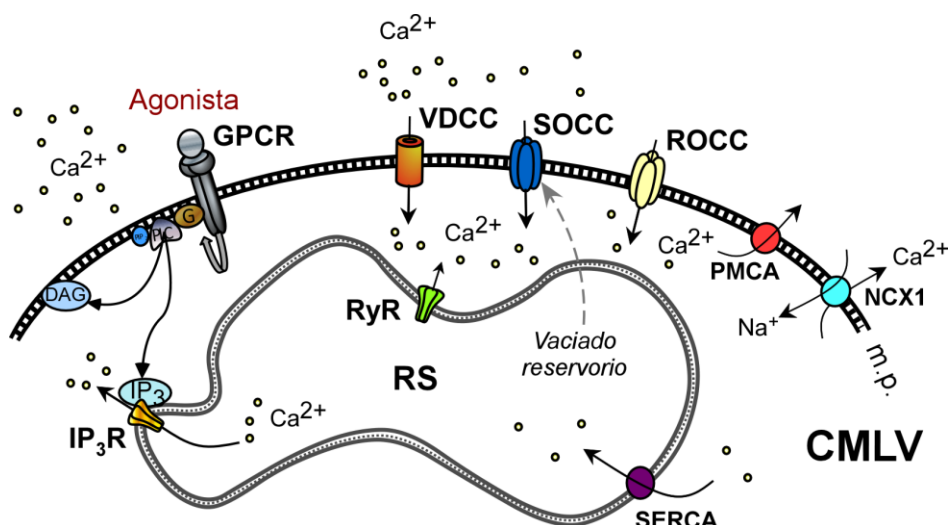


Figura 12: Mecanismos envueltos en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} en CMLVs.

Un agonista, tras su unión a su GPCR, puede mediar la formación de DAG e IP_3 en CMLVs. El DAG puede activar ROCCs permitiendo la entrada de Ca^{2+} en las células, mientras que el IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} del RS a través de los IP_3 Rs. Este vaciado de los reservorios, incita la entrada de Ca^{2+} a través de los SOCCs. Algunos ligandos abren los ROCCs, canales no selectivos a Ca^{2+} e inducen despolarización. Esta despolarización de la m.p. activa los VDCCs y provoca el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pudiendo disparar la liberación de Ca^{2+} a través de los RyRs gracias a la CICR. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ global se mantiene en unos niveles basales bajos gracias a las ATPasas de Ca^{2+} del RS (SERCA) y de la m.p. (PMCA) y al intercambiador NCX1. m.p.: membrana plasmática; GPCR: receptor acoplado a proteína G; DAG: diacilglicerol; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; IP_3 R: receptor de IP_3 ; RS: retículo sarcoplásmico; SOCC: canal de Ca^{2+} regulado por los reservorios; ROCC: canal de Ca^{2+} regulado por receptor; VDCC: canal de Ca^{2+} voltaje dependiente; RyR: receptor de rianodina; SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del RE/RS; PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la m.p.; NCX1: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

A. Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

El potencial de membrana es el primer determinante de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático y el tono vascular, por medio de la activación de los VDCCs. La despolarización de la

membrana abre estos canales e induce vasoconstricción, mientras que la hiperpolarización los cierra y origina vasodilatación (Hermsmeyer, 2013).

Dentro de los VDCCs, como más adelante veremos más en detalle, existen varios subtipos, siendo los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCCs, *L-type Ca²⁺ Channels*) los más importantes en CMLVs. Estos canales son la principal entrada de Ca^{2+} , sin embargo, no son los únicos canales de Ca^{2+} que contribuyen al aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sino que también participan otros canales no dependientes de voltaje, destacando los canales de Ca^{2+} regulados por receptores (ROCCs, *Receptor Operated Ca²⁺ Channels*) y los canales de Ca^{2+} regulados por reservorios (SOCCs, *Store Operated Ca²⁺ Channels*). Tanto la entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios (SOCE, *Store Operated Calcium Entry*) como la entrada de Ca^{2+} regulada por receptores (ROCE, *Receptor Operated Calcium Entry*) implican un proceso altamente dinámico y regulado mediante varias proteínas y canales iónicos que funcionan como complejos macromoleculares, algunos de los cuáles posteriormente intentaremos describir, a pesar de existir todavía gran controversia sobre los mismos (Marin y cols., 1999).

B. Liberación de Ca^{2+} del RS.

Los canales de liberación de Ca^{2+} del RS tienen un papel esencial en la homeostasis del Ca^{2+} y, por tanto, en la excitabilidad celular y la reactividad vascular en CMLVs. Los dos canales principales de liberación de Ca^{2+} en estas células son los receptores para rianodina y para IP_3 .

Receptor de rianodina (RyR).

El RyR está compuesto por varias subunidades de gran tamaño (500 KDa) constituyendo tetrámeros. En CMLVs se expresan tres isoformas distintas (RyR1, RyR2, RyR3). RyR1 y RyR2, se han identificado en células de músculo liso de la vena portal (Coussin y cols., 2000), sin embargo, RyR2 predomina en arterias de resistencia y pequeñas arterias (McCarron y cols., 2016).

Estos receptores son activados farmacológicamente por cafeína (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997), por rianodina a concentraciones menores de $10 \mu\text{M}$ (Guerrero-Hernandez y cols., 2002) o cuando los niveles de Ca^{2+} de RS exceden los valores fisiológicamente normales (McCarron y cols., 2016). Además, en reposo los RyRs pueden llevar a cabo liberaciones espontáneas de Ca^{2+} , llamadas *sparks*, que incrementan las concentraciones de Ca^{2+} localmente (Nelson y cols., 1995).

Varios estudios sugieren que, a pesar de no existir un acoplamiento con los VDCCs, y más concretamente con los LTCCs, éstos pueden modular indirectamente los RyRs, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la carga de Ca^{2+} del RS, amplificando la señalización de Ca^{2+} (Essin y cols., 2007) en un mecanismo similar a la CICR que tiene lugar en músculo estriado o cardíaco (Hamilton, 2005).

Por otro lado, en el músculo liso vascular, los RyRs participan en la excitabilidad de forma indirecta modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana plasmática. Se ha

descrito que la actividad de los RyRs puede despolarizar la membrana de CMLVs mediante la activación de canales de Cl⁻ sensibles a Ca²⁺ (Cl_{Ca}) (Saleh y Greenwood, 2005) o activar canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) promoviendo hiperpolarización y relajación de músculo liso vascular (Perez y cols., 1999), lo que refleja la importancia del RyR, al menos de forma indirecta, en la regulación de la excitabilidad del músculo liso vascular.

Receptor inositol trifosfato (IP₃R).

El IP₃R es una proteína transmembrana que actúa como canal de Ca²⁺ activado por IP₃. Pertenece a una familia de receptores-canal compuesto por cuatro subunidades con seis dominios transmembrana cada uno, presente no sólo en el RS, sino también en otros reservorios celulares, como el núcleo. Existen tres subtipos diferentes (IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3) en mamíferos y todos se expresan en diferentes tipos de arterias, aunque presentan distribuciones diferentes dentro de las mismas, siendo el subtipo IP₃R1 el más prevalente en CMLVs y los subtipos IP₃R2 y IP₃R3 en células endoteliales (Grayson y cols., 2004; Narayanan y cols., 2012). Los IP₃R se regulan por IP₃ y también por los niveles de Ca²⁺ citoplasmáticos (Grayson y cols., 2004).

En muchas regiones de la célula, la membrana plasmática se aproxima al RS (alrededor de 15 nm de separación) facilitando la liberación de Ca²⁺ de los reservorios mediante agonistas, como la noradrenalina, endotelina-1 (ET-1) o serotonina (5-HT) (Berridge, 2008). La activación de un GPCR mediante agonista promueve la liberación de IP₃ y el aumento del tono vascular mediante el acoplamiento farmacomecánico (ver apartado 1.2.2B), por lo que el IP₃R tiene un papel crítico en la contracción celular además de otros procesos biológicos (Lin y cols., 2016).

Recientemente se ha descrito que la señalización mediada por el IP₃R puede contribuir a la patología vascular. Se ha demostrado que ratones hipertensos inducidos por angiotensina II o ratas espontáneamente hipertensas muestran una mayor expresión de IP₃R1, asociándose con una mayor sensibilización a la liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃ y, por tanto, a una vasoconstricción incrementada en respuesta a agentes vasoactivos (Abou-Saleh y cols., 2013). Además, se ha descrito que defectos en la expresión o función de los IP₃R pueden contribuir a una disfunción vascular durante la diabetes y la aterosclerosis (Ghosh y cols., 2017). Por ese motivo, la liberación de Ca²⁺ del RS mediada por el IP₃R también puede deteriorar la función del músculo liso vascular durante condiciones patológicas.

C. Extrusión de Ca²⁺ citoplasmático.

La [Ca²⁺]_i está altamente regulada principalmente por dos bombas, SERCA, que se encarga de la recaptación de Ca²⁺ citoplasmático hacia el RS, y la ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA, *Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase*), que se encarga de la extrusión de Ca²⁺ desde el citoplasma hacia el medio extracelular. Además, también es relevante la participación de intercambiadores iónicos como el de Na⁺/Ca²⁺ o NCX1 (Brini y Carafoli, 2011; Zhang y Kwan, 2016) (Figura 13), de manera que así se disminuyen los niveles de Ca²⁺ intracelulares previniendo la activación de procesos dependientes de Ca²⁺ como la apoptosis, entre otros.

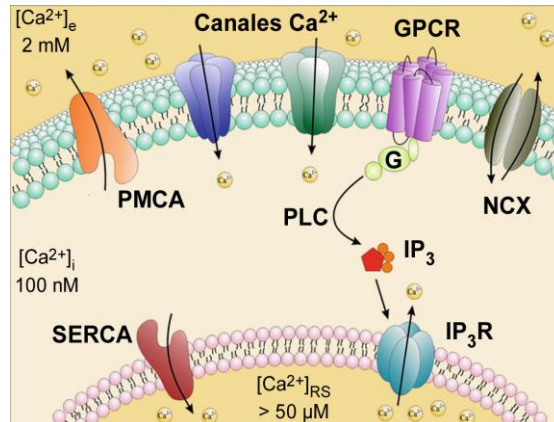


Figura 13: Mecanismos de extrusión de Ca^{2+} citoplasmático.

Los niveles de Ca^{2+} intracelular se mantienen a una concentración de 100 nM aprox. gracias a la extrusión de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática mediante PMCA y NCX. Además, el Ca^{2+} es secuestrado en el RS mediante SERCA. Por medio de canales iónicos o la señalización inducida por la activación de un GPCR, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede aumentar drásticamente, por lo que la acción de estos mecanismos de extrusión es muy importante. PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática; SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del RE/RS; PLC: fosfolipasa C; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; IP_3R : receptor de IP_3 ; NCX: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; GPCR: receptor acoplado a proteína G. *Modificado de (Vetter, 2012).*

ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA).

La SERCA es el único transportador de Ca^{2+} activo en el RS y su principal función es la de mantener la homeostasis de Ca^{2+} , necesario para distintas funciones metabólicas como la proliferación, crecimiento, apoptosis... En células musculares, la SERCA tiene además un papel dual, por un lado controla la cantidad de Ca^{2+} del RS que puede ser movilizado durante la contracción, y por otro, disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para permitir la relajación muscular (Chemaly y cols., 2013).

Debido a que existe un flujo de Ca^{2+} pequeño pero continuo a través de diferentes canales iónicos, la SERCA toma un papel relevante a la hora de mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles bajos, introduciendo Ca^{2+} en el interior del RS en contra de gradiente (mantiene unas 10.000 veces el gradiente de concentración entre RS y citosol), convirtiendo a este reservorio en el principal almacén de Ca^{2+} en el músculo liso. Esto es posible gracias a que introduce 2 iones de Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada (Grover y Samson, 1986) y tiene asociada las proteínas calsecuestrina y calreticulina que desde el interior del RS se unen con iones libres de Ca^{2+} . Esta ATPasa puede estar regulada positivamente por la CaM quinasa y por la proteína fosfolamban (Grover y cols., 1997) e inhibidas por tapsigargina (TG) (Thastrup y cols., 1990) y por ácido ciclopiazónico (CPA, *Cyclopiazonic Acid*) (Darby y cols., 1996).

La SERCA pertenece a una familia de bombas iónicas tipo P y se han identificado hasta 14 isoformas diferentes, pertenecientes a tres familias (SERCA1, 2 y 3), específicas de especie, tipo celular y estado del desarrollo (Chemaly y cols., 2013). De todas ellas, se han

detectado 5 isoformas en corazón y aorta de ratón (SERCA2a, -2b, -3a, -3b, and -3c). En aorta, la isoforma más abundante es la SERCA2a, que representa el 91% de la cantidad total de SERCA, aunque en CMLVs también se expresa SERCA2b y SERCA3b, pero en menor proporción. Esta proporción puede cambiar en patologías como la aterosclerosis, diabetes o infarto cardiaco (Davies, 2015).

ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).

La PMCA es una ATPasa que intercambia un ion Ca^{2+} del interior celular por un ion H^+ del medio extracelular, siendo compensado por la extrusión de H^+ mediante el intercambiador H^+/Na^+ de la membrana plasmática. La PMCA está presente en todas las células eucariotas y es clave en el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Es regulada por quinasas, proteínas de señalización y la CaM, de forma que, cuando aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se forma el complejo Ca^{2+} -CaM promoviendo la activación de la bomba por fosforilación de su dominio autoinhibitorio, responsable del estado inactivo. Esta activación hace que la PCMA incremente hasta 10 veces la afinidad por el Ca^{2+} (Zhang y Muallem, 1992). La actividad de la PMCA también se ha implicado en la vasodilatación producida por donadores de óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*) (Cogolludo y cols., 2001).

Hay 4 isoformas de PMCA, codificadas por distintos genes y específicas de tejido. La PCMA1 y 4 se expresan en todos los tejidos, mientras que PCMA2 y 3 se expresan en algunos tipos de tejidos especializados (Brini y Carafoli, 2011). Se ha descrito la presencia de PCMA1 y 4 en células de músculo liso, siendo la isoforma 4 determinante para la progresión del ciclo celular en CMLVs (Afroze y cols., 2014), sugiriendo un papel para esta ATPasa en la regulación de la proliferación celular.

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) es una proteína transportadora ubicada en la membrana plasmática que permite tanto la entrada como la salida de Ca^{2+} , intercambiando 1 ion Ca^{2+} por 3 iones Na^+ , aprovechando la energía cedida por la entrada a favor de gradiente de los iones Na^+ . El intercambiador toma un papel relevante cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es superior a $1 \mu\text{M}$, ya que disminuye los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos que pueden ser tóxicos y favorece la relajación vascular (Brini y Carafoli, 2011). Además de ser transportados, los iones Na^+ y Ca^{2+} pueden regular la actividad del intercambiador, de manera que cuando se une Ca^{2+} a los sitios de unión en el lado citosólico, el intercambiador se activa, mientras que si se une Na^+ , el intercambiador se desactiva. Sin embargo, todavía se desconoce el papel fisiológico y los mecanismos moleculares de esta regulación.

En algunas ocasiones, el funcionamiento del NCX1 puede ser reversible, dependiendo del gradiente electroquímico de los iones Na^+ y Ca^{2+} . Esto ocurre cuando, por ejemplo, disminuye la concentración de Na^+ en el exterior o aumenta en el citosol (Matlib y cols., 1986; Rembold y cols., 1992) o cuando la liberación de Ca^{2+} del RS y otros canales iónicos están inhibidos.

1.3.2 Mecanismos de sensibilización a Ca^{2+} .

Como ya hemos visto, la contracción en el músculo liso vascular se inicia por un incremento de Ca^{2+} , que puede ser debido al flujo desde el medio extracelular a través de canales iónicos de la membrana plasmática y/o a la liberación desde el RS (Somlyo y Somlyo, 1994).

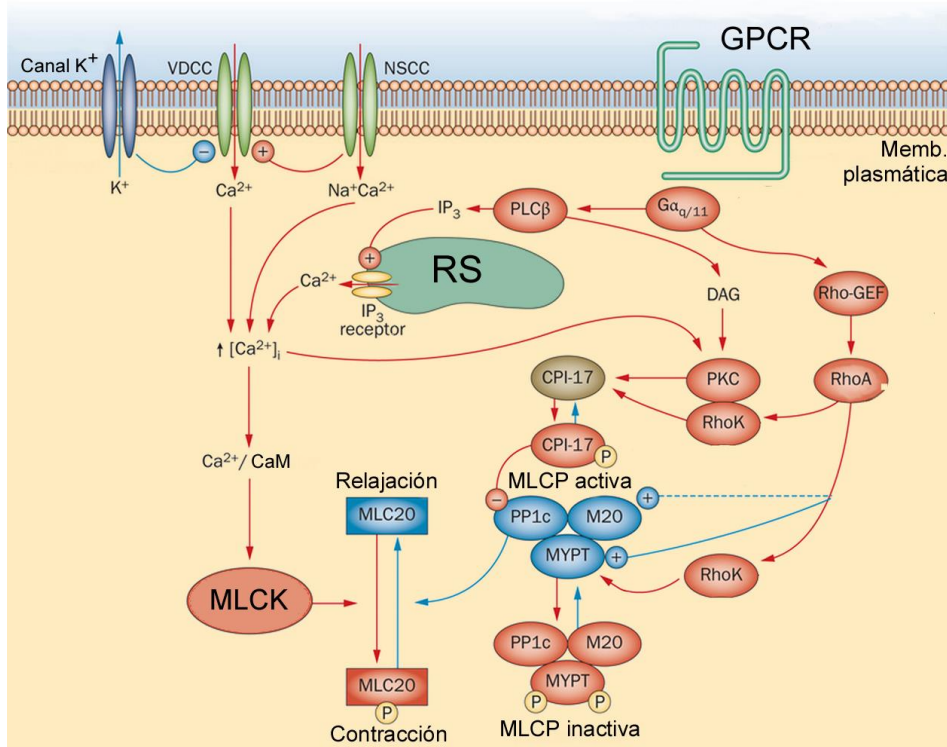


Figura 14: Mecanismo de sensibilización a Ca^{2+} en CMLVs.

El Ca^{2+} requerido para la contracción puede entrar en la célula a través de los VDCCs o NSCCs. Esta entrada puede verse suplementada por la liberación de Ca^{2+} del RS a través de los receptores IP_3 , sintetizado por la PLC en respuesta a la unión de un agonista a su GPCR. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hace que se una a la CaM y active la MLCK promoviendo la contracción tras la fosforilación de MLC20. La desfosforilación de MLC20 mediante MLCP induciría relajación, por lo que la inhibición de esta fosfatasa incrementaría la contracción y aumentaría la sensibilidad a Ca^{2+} . Una ruta que aumentaría esa sensibilización al Ca^{2+} tendría lugar mediante la activación de un GPCR y la regulación del factor de intercambio GDP-GTP (Rho-GEF), que activaría a RhoA y ésta a RhoK. Tanto RhoK como PKC pueden fosforilar a CPI-17, que inhibiría a MLCP al activarse. Por otro lado, RhoK también puede fosforilar la subunidad reguladora de la MLCP, MYPT, disminuyendo la actividad de la fosfatasa e impidiendo la desfosforilación de MLC20. VDCC: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje; NSCC: canales catiónico no selectivo; RS: retículo sarcoplásmico; IP_3 : inositol 1,4,5-trisfosfato; PLC: fosfolipasa C; GPCR: receptor acoplado a proteína G; CaM: calmodulina; MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina; MLC20: cadena ligera de la miosina de 20kDa; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; RhoK: Rho quinasa; DAG: diacilglicerol. *Modificado de (Sanders y cols., 2012).*

El inicio de la contracción depende del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, pero en su mantenimiento en el tiempo participan diferentes mecanismos. Durante este mantenimiento de la contracción o modulación de fuerza contráctil del músculo liso vascular tendría lugar mediante lo que se conoce como sensibilización al Ca^{2+} . La sensibilización al Ca^{2+} implica la inhibición de la MLCP de forma que la célula mantendría sus niveles de fosforilación sin necesidad de más Ca^{2+} citosólico o la activación de la MLCK. Cuando la proteína RhoA se une a GTP, ésta activa a Rho quinasa (ROCK, *RhoA/Rho Kinase*) que fosforila e inhibe la subunidad de unión a la miosina de la MLCP (MYPT1) (Figura 14). Adicionalmente, PKC fosforila a la proteína inhibidora de la miosina fosfatasa, CPI-17, la cual se une e inhibe a MLCP (Li y cols., 1998). La implicación de esta ruta moduladora todavía no está estudiada en profundidad, sin embargo, se sabe que contribuye al mantenimiento del tono vascular (Fernandez-Tenorio y cols., 2012; Ets y cols., 2016).

1.3.3 Factores extrínsecos e intrínsecos y regulación del tono vascular.

Los factores que regulan el tono vascular los podemos clasificar en dos grupos principales: factores intrínsecos, aquellos que se generan en el propio órgano o tejido, o factores extrínsecos, aquellos que se producen en otro órgano distinto.

A. Factores intrínsecos.

Respuesta miogénica.

El tono vascular de los vasos de resistencia posee la capacidad de autorregulación mecánica del flujo sanguíneo debido a cambios en la presión sanguínea. Tradicionalmente, un incremento en la presión sanguínea a nivel arteriolar se relaciona directamente con un incremento en el tono del músculo liso vascular, con la finalidad de mantener el flujo sanguíneo constante hacia los órganos y que no se vea afectada su función. La caída de la presión tiene el efecto contrario. Como vemos en la Figura 15, de manera convenientemente resumida, cuando se produce un estiramiento de la microvasculatura debido a un aumento de presión, se induce el flujo de iones (Na^+ y Ca^{2+}) a través de canales iónicos mecanosensibles, produciendo la contracción de las CMLVs debido a despolarización y la apertura de VDCCs. Esta respuesta puede verse inhibida mediante antagonistas de canales de Ca^{2+} (Jacob y cols., 2016).

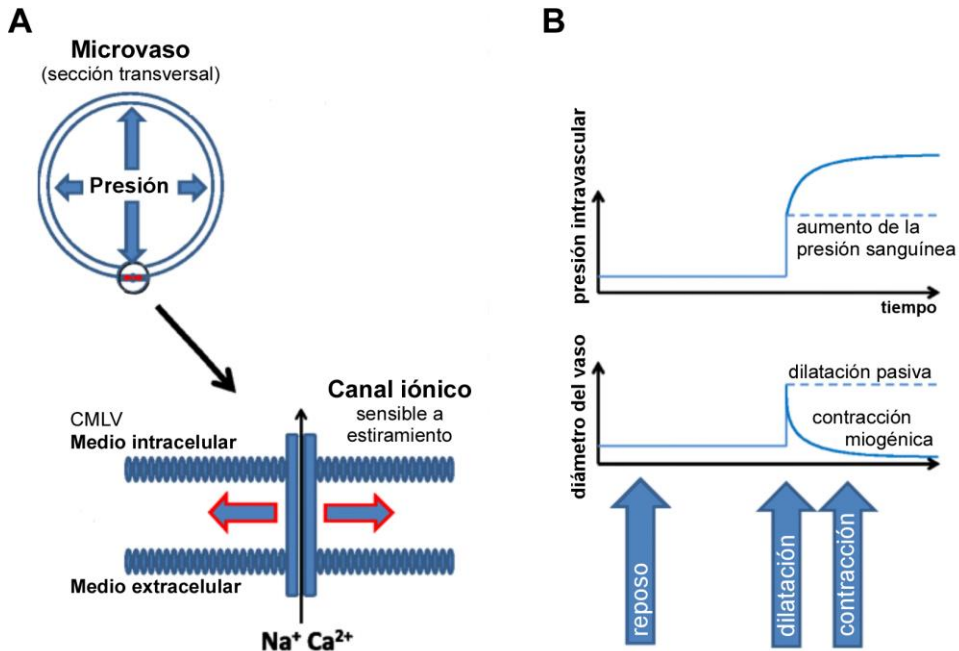


Figura 15: Esquema resumido de la respuesta miogénica en la microcirculación.

A. Representación del flujo de iones Na^+ y K^+ a través de canales sensibles a estrechamiento inducido por la dilatación de un microvaso, lo que provocará despolarización y contracción a través de VDCCs. **B.** Resumen del impacto del incremento de la presión sanguínea en un vaso con respuesta miogénica (línea continua) o sin ella (línea discontinua). *Modificado de (Jacob y cols., 2016).*

Mecanismos dependientes de endotelio.

El endotelio vascular produce sustancias tanto vasoconstrictoras como vasodilatadoras que actúan localmente. De esta forma, esta capa juega un papel muy importante en la regulación del tono vascular y, por tanto, en el mantenimiento de la presión arterial.

Actualmente, se conoce que la estimulación de las células endoteliales mediante neurotransmisores, hormonas, sustancias derivadas de plaquetas e incluso estrés mecánico, pueden provocar la liberación de estos factores vasodilatadores o vasoconstrictores (Kang, 2014).

➤ Sustancias vasodilatadoras

Una de las principales sustancias vasodilatadoras es el NO, sintetizado a partir de la L-arginina mediante la enzima NO-sintasa endotelial (eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthase*). Esta enzima puede activarse directamente por cambios en el flujo sanguíneo o bien estimularse por la acción de agonistas como la acetilcolina o mediadores inflamatorios. Las principales funciones del NO son: vasodilatación del músculo liso vascular e inhibición de la agregación plaquetaria, así como del crecimiento y la proliferación de las CMLVs (Esteller Pérez, 2005). La vasodilatación puede producirse

mediante dos mecanismos: la difusión rápida del NO a la CMLV para inducir la producción de la guanosina monofosfato cíclica (cGMP, *cyclic Guanosine Monophosphate*) y promover la relajación vascular o la activación de ciertos canales de K^+ en la CMLV, como los canales K^+_{ATP} (Wu y cols., 2004) o canales BK_{Ca} , que hiperpolarizarán la membrana e inducirán vasodilatación (Figura 16).

De igual forma, el endotelio es capaz de producir otras sustancias que producen hiperpolarización y relajación de músculo liso vascular, como las prostaciclina o el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (Kang, 2014) (Figura 16).

➤ Sustancias vasoconstrictoras

Entre las sustancias vasoconstrictoras dependientes de endotelio podemos encontrar: ET-1, angiotensina II, tromboxano A_2 (TXA_2), prostaglandina H_2 (PGH_2) y especies reactivas del oxígeno (ROS). Todos estos factores provocan, directa o indirectamente, contracción de músculo liso además de otras funciones (Luscher y Barton, 1997) (Figura 16).

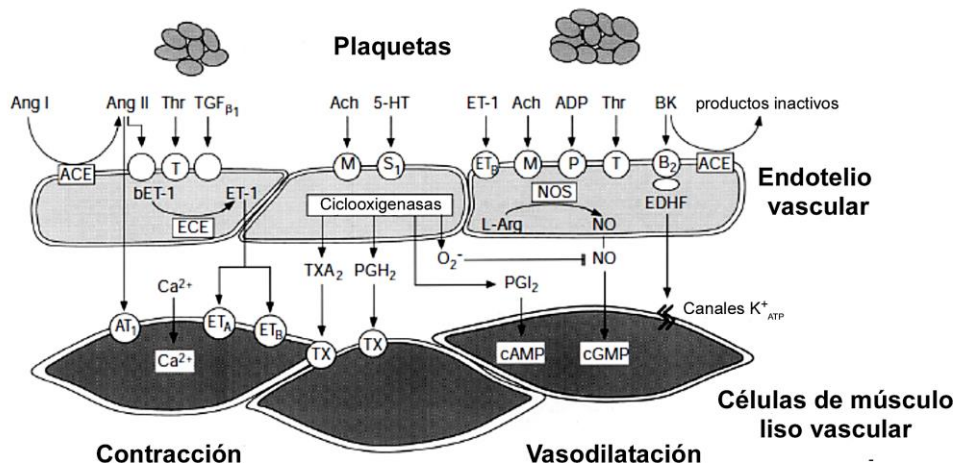


Figura 16: Sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio.

El endotelio produce sustancias que promueven tanto la vasoconstricción (izqda.), como la relajación (drcha.). Ang: angiotensina; ACE: enzima convertidora de Ang; Ach: acetilcolina; ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; BK: bradiquinina; cAMP/cGMP: adenosina/guanosina monofosfato cíclica; ECE: enzima convertidora de endotelina; EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio; ET-1: endotelina-1; 5-HT: serotonina; L-Arg: L-arginina; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintasa; O $_2^-$: ion superóxido; PGH $_2$: prostaglandina H_2 ; PGI $_2$: prostaciclina; TGF β_1 : factor de crecimiento transformante b1; Thr: trombina; TXA $_2$: tromboxano A_2 . Los círculos representan receptores (AT: angiotensinérgico; B: bradiquinérgico; ET: receptor de ET-1; M: muscarínico; P: purinérgico; S: serotoninérgico; T: receptor de Thr; TX: receptor de tromboxanos). Modificado de (Luscher y Barton, 1997).

Mecanismos independientes de endotelio

En el organismo podemos encontrar moléculas denominadas autacoides, sustancias de estructura y actividades farmacológicas muy diversas descritas como hormonas locales o agentes autofarmacológicos. Estos autacoides son sustancias paracrin, agentes

vasoactivos, que pueden ser vasoconstrictores (serotonina, ET-1, angiotensina II, factor activador de plaquetas, leucotrienos y otros derivados de ácido araquidónico (AA), etc.) o vasodilatadores (badriquinina, sustancia P, etc.).

Entre ellos, podemos destacar la **serotonina (5-HT o 5-hidroxitriptamina)**, un neurotransmisor que actúa como potente vasoconstrictor. Este autacoide, contenido en las plaquetas en grandes cantidades, puede liberarse ante factores como la hipoxia crónica, hipertensión, disfunción endotelial, etc., actuando sobre sus receptores (mayoritariamente el receptor 5-HT_{2A}) y provocando la contracción de músculo liso vascular. Se han propuesto varias vías de señalización activadas por la 5-HT; sin embargo, una de las más importantes es la vía de la PLC, ya que el receptor 5-HT_{2A} es un receptor de membrana acoplado a proteína Gq/11 que activa esta enzima, incrementando el IP₃ y aumentando la [Ca²⁺]_i como hemos visto anteriormente. Estos efectos pueden dar como resultado la activación de SOCCs y LTCCs (Nagatomo y cols., 2004; Avila-Medina y cols., 2016), produciendo vasoconstricción.

Existen otras condiciones, como la hipoxia (Crawford y cols., 2006) o la acidosis (Lindauer y cols., 2003), que son capaces de producir vasodilatación independiente de endotelio, ya que el NO u otras sustancias derivadas de endotelio no contribuyen, al menos en su totalidad, a esta vasodilatación, que se debe principalmente a la activación de canales de K⁺ dependientes de ATP (K⁺_{ATP}) o canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) que inducen hiperpolarización (Lindauer y cols., 2003). Por el contrario, situaciones isquémicas pueden inducir vasoconstricción independiente de endotelio ya que, a partir de sufrir disfunción endotelial, se producen cambios estructurales en la pared vascular (Kitamura y Yamazaki, 2001).

B. Factores extrínsecos

Sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo es el sistema principal para controlar la presión sanguínea y la resistencia periférica. La mayoría de las arterias de resistencia y pequeñas arterias están inervadas por este sistema nervioso (Figura 17), sin embargo, las arteriolas están controladas por factores intrínsecos.

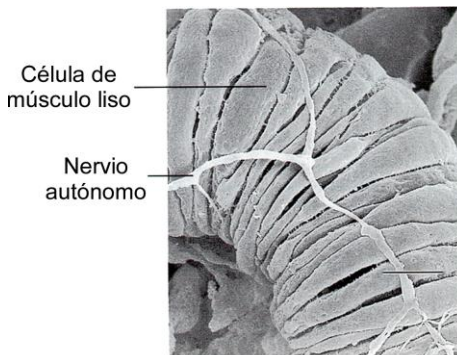


Figura 17: Micrografía electrónica de una arteria de pequeño calibre.

Micrografía que muestra las células de músculo liso en una arteria y el nervio autónomo que la inerva. *Modificado de (Levy y cols., 2005).*

En la capa muscular de las arterias se pueden encontrar terminaciones adrenérgicas de las fibras nerviosas simpáticas, por el contrario, las terminaciones colinérgicas de las fibras nerviosas parasimpáticas se pueden encontrar tanto en la capa muscular como en la endotelial. Esta inervación, por tanto, contribuye al mantenimiento del tono basal, de forma que una caída de la actividad vasomotora simpática originaría vasodilatación y un aumento en la actividad simpática induciría vasoconstricción, aumentando la presión sanguínea (Amiya y cols., 2014).

Sistema humoral

Las principales hormonas vasoactivas del sistema cardiovascular son: angiotensina, vasopresina, catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y péptido natriurético auricular. Todas poseen una acción directa o indirecta sobre las CMLVs.

La angiotensina II es un péptido vasoconstrictor cuya participación es esencial en el eje renina-angiotensina-aldosterona, motivado por una caída de la presión sanguínea. La secreción de aldosterona evoca una vasoconstricción aumentando la actividad simpática. La vasopresina, hormona antidiurética, también es un potente vasoconstrictor; al igual que ocurre con la adrenalina y noradrenalina, que producen contracción arterial tras su unión a receptores α -adrenérgicos. El péptido natriurético auricular, en cambio, es un potente vasodilatador producido en la aurícula en respuesta a la dilatación.

1.4 Canales iónicos y regulación del tono vascular

Los canales iónicos juegan un papel esencial en el control y la regulación del tono vascular.

En CMLVs existen varios tipos de canales iónicos, que iremos describiendo detalladamente en los siguientes apartados:

- Canales de K^+ : se han identificado hasta 4 tipos de canales de K^+ , como los activados por voltaje (K^+_{v}), los sensibles a Ca^{2+} de gran conductancia (BK^+_{ca}), los rectificadores entrantes (K^+_{ir}) y los dependientes de ATP (K^+_{ATP}) (Ko y cols., 2008).
- Canales de Cl^- : se expresan dos tipos de canales, canales de Cl^- sensibles a Ca^{2+} (Cl^-_{ca}) y canales de Cl^- regulados por volumen (Cl^-_{vol}) (Kitamura y Yamazaki, 2001; Zhang y cols., 2013)
- Canales de Ca^{2+} : se pueden diferenciar dos grandes grupos.
 - o Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (VDCCs o Ca_v), entre los que podemos distinguir el canal de Ca^{2+} tipo L (LTCC) y el canal de Ca^{2+} tipo T (TTCC, *T-type Ca^{2+} Channels*) (Ghosh y cols., 2017),
 - o Canales de Ca^{2+} no dependientes de voltaje, como los SOCCs o los ROCCs. Dentro de este grupo podríamos englobar otros canales catiónicos como los canales TRP.

1.4.1 Canales K⁺ y Cl⁻.

A. Canales de K⁺.

En CMLVs se han detectado varios tipos de canales de K⁺. Los canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv) se abren tras una despolarización de la membrana plasmática, permitiendo el flujo de iones K⁺ hacia el exterior y la consiguiente repolarización de la membrana hasta valores de reposo. Los cambios en la [Ca²⁺]_i y la despolarización de la membrana también estimulan canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BK_{Ca}), que tienen un papel importante en el mantenimiento del potencial de membrana y de la respuesta miogénica.

Los canales de K⁺ sensibles a ATP (K⁺_{ATP}) que se abren cuando aumentan los niveles de adenosín difosfato (ADP, *Adenosine Diphosphate*) debido al uso de ATP por el metabolismo celular. Por ello, los canales K⁺_{ATP} destacan el vínculo funcional tan estrecho que existe entre el metabolismo celular y la excitabilidad de la membrana. Su bloqueo da como resultado una despolarización y vasoconstricción en diversos tipos de músculo liso vascular.

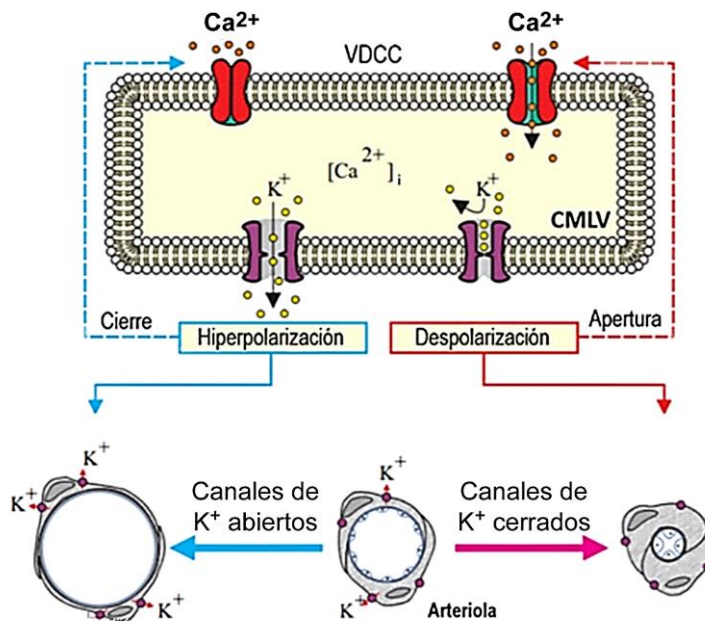


Figura 18: Canales de K⁺ y tono vascular.

Esquema de una CMLV y secciones representativas de una arteriola. La apertura de los canales de K⁺ facilita el eflujo de este ion, provocando hiperpolarización de la membrana, cierre de VDCCs y disminución de la [Ca²⁺]_i, induciendo la vasodilatación. La inactivación de los canales induce el efecto contrario. VDCC: canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje. *Modificado de (Firth y cols., 2011).*

Los canales de K⁺ con rectificación interna (K⁺_{IR}), que se expresan en arterias de pequeño calibre, también contribuyen al mantenimiento del tono basal y al potencial de membrana

de reposo. Su activación puede llegar a incrementar la concentración de K^+ extracelular hasta 10-15 nM, dando como resultado una vasodilatación (Ko y cols., 2008).

Todos estos canales de K^+ responden a diferentes estímulos vasoconstrictores, a través de PKC, y vasodilatadores, a través de proteína quinasa A (PKA, *Protein Kinase A*), por lo que tienen un papel muy importante en la regulación del tono vascular que podríamos resumir de manera esquematizada en la Figura 18 (Jackson, 2000). El deterioro de la función de estos canales se ha relacionado con numerosas condiciones patológicas que pueden inducir, en último término, vasoconstricción.

B. Canales de Cl^- .

Se han detectado al menos dos tipos de canales de Cl^- en CMLVs: los canales de Cl^- sensibles a Ca^{2+} (Cl_{Ca}^-) y canales de Cl^- sensibles a volumen (Cl_{Vol}^-). La activación de estos canales, ya sea debido al incremento de Ca^{2+} mediado por agonista o por el incremento del volumen/estrechamiento de la membrana respectivamente, provoca un flujo de Cl^- hacia el exterior que despolariza la membrana e incrementa la probabilidad de apertura de los canales Ca_v , dando como resultado un influjo de Ca^{2+} (Figura 19).

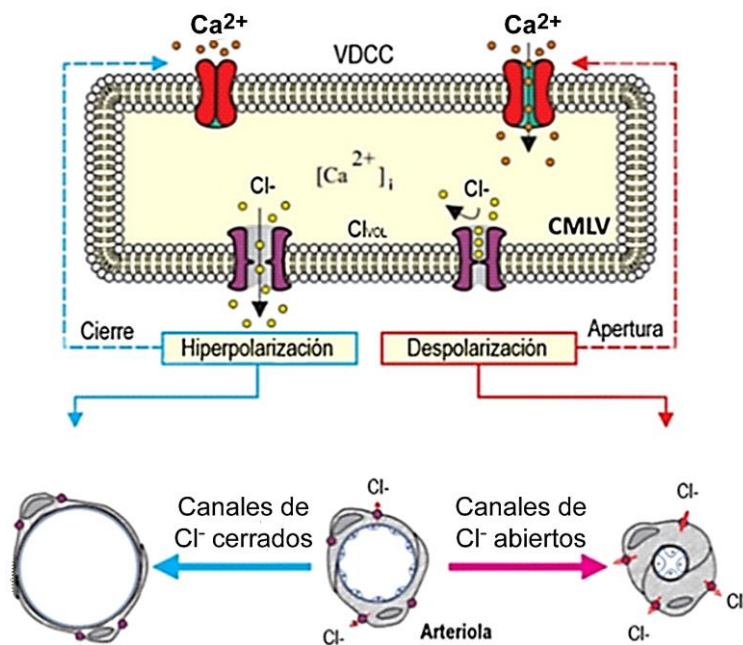


Figura 19: Canales de Cl^- y tono vascular.

Esquema de una CMLV y secciones representativas de una arteriola. La apertura de los canales de Cl^- facilita el eflujo de este ion, provocando despolarización de la membrana, apertura de VDCCs e incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, induciendo vasoconstricción. La inactivación de los canales provoca hiperpolarización y cierre de los VDCCs, provocando vasodilatación. VDCC: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje. *Modificado de (Jackson, 2000; Firth y cols., 2011).*

La inactivación de los canales, provoca el efecto opuesto, por tanto, las corrientes de Cl^- están estrechamente relacionadas con la regulación de la contracción en CMLVs y relacionadas con procesos como la proliferación o la apoptosis (Jackson, 2000; Zhang y cols., 2013).

1.4.2 Canales de Ca^{2+} .

A. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje o VDCCs.

Los VDCCs se expresan ampliamente en células excitables, aunque también en células no excitables (Badou y cols., 2013), mostrando diversas propiedades electrofisiológicas y participando en diferentes funciones fisiológicas (Catterall, 2011).

Estos canales median un flujo de entrada de Ca^{2+} en la célula tras su activación por estímulos despolarizantes o potenciales de acción, actuando como segundo mensajero e iniciando diferentes eventos en la célula. En músculo liso, la activación de los VDCCs inicia la contracción directamente mediante el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ e indirectamente mediante la activación de la liberación de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} a través de los RyRs en el RS (Ghosh y cols., 2017).

La familia de VDCC, también llamados canales Ca_v , comprende 10 genes, por lo que existen muchos subtipos que median distintas corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con diferentes propiedades fisiológicas, farmacológicas y reguladoras. Desde el punto de vista funcional, dependiendo del voltaje necesario para su activación, podemos distinguir los canales de bajo umbral de activación o TTCCs, que presentan unas corrientes más débiles y transitorias a potenciales más negativos; y los canales de alto umbral de activación, donde hay varios subtipos: canales de Ca^{2+} tipo L, N, P, Q y R.

Canales de Ca^{2+} tipo L o Ca_v1 .

Los LTCCs o Ca_v1 están codificados por 4 de los 10 genes de la familia de VDCCs y se denominan $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v1.4$. Se pueden diferenciar de los otros 6 por su sensibilidad selectiva a 3 tipos de antagonistas (dihidropiridinas, benzodiazepinas y fenilalquilaminas) y por su característica inactivación lenta de las corrientes de Ca^{2+} (Liao y cols., 2005). En esta tesis, nos centraremos en el estudio de los **canales $Ca_v1.2$** ya que son los principales LTCCs ampliamente expresados en CMLVs.

Los Ca_v1 son complejos de proteínas heterooligoméricas compuestas por una subunidad α_1 , que forma el poro de selectividad iónica, en asociación con subunidades accesorias β , $\alpha_2\delta$ y/o γ (Figura 20).

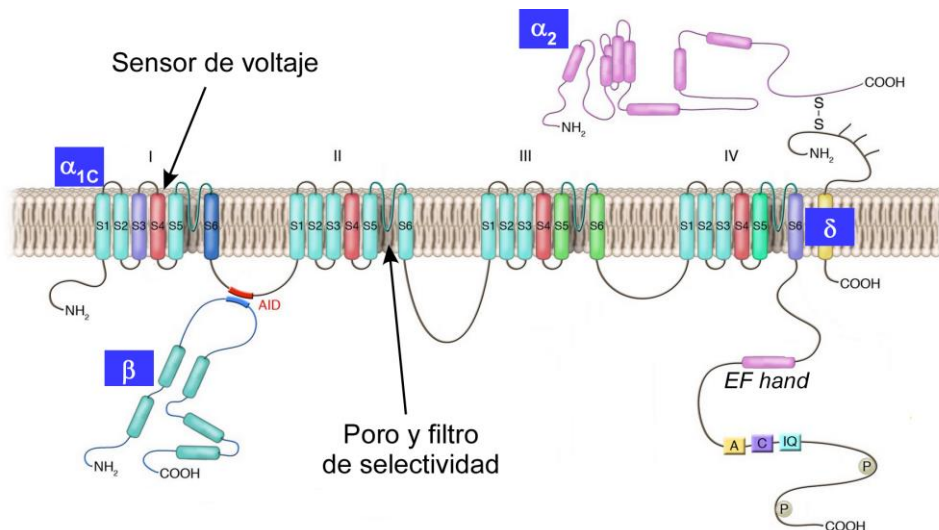


Figura 21: Dominios estructurales de la subunidad α del LTCC.

La subunidad α está compuesta por 4 dominios (I - IV) con 6 segmentos transmembrana cada uno (S1 - S6). En el S4 de cada dominio se encuentra el sensor de voltaje ya que contiene residuos con carga positiva. Entre el S5 y S6 se encuentra la región del poro y filtro de selectividad. Los sitios de interacción con las subunidades accesorias β y $\alpha_2\delta$ están indicados. En esta subunidad se encuentran los múltiples sitios de regulación que posee el LTCC. Los dominios *EF hand*, "A", "C" e "IQ", representan secuencias peptídicas específicas relacionadas con la unión a CaM. "P" indica los sitios de fosforilación de caMKII y PKA. *Modificado de (Bodi y cols., 2005).*

El resto de subunidades accesorias en los LTCC (β , $\alpha_2\delta$, γ), no desempeñan un papel principal en la función del canal, sin embargo, son importantes ya que pueden modular las propiedades biofísicas y fisiológicas del mismo. Además, se han relacionado con diversas patologías, ya que se ha descrito que el aumento de expresión de la subunidad β y $\alpha_2\delta$, incrementa la expresión y función de los LTCCs, contribuyendo a una mayor vasoconstricción durante la hipertensión (Bannister y cols., 2012).

Las propiedades estructurales de la subunidad $\alpha_{1.2}$ del LTCC, proporcionan a estos canales unas características necesarias para la contracción del músculo liso a potenciales fisiológicos. Estos canales muestran un umbral de activación en torno a -40 o -30 mV y se activan completamente a los 0 mV. La inactivación es claramente dependiente de voltaje, pero también muestra un componente dependiente del Ca^{2+} intracelular. En comparación con los canales de Ca^{2+} análogos en corazón, la activación dependiente de voltaje de los $\text{Ca}_v1.2$ de músculo liso presenta un desplazamiento a un umbral más hiperpolarizado, en torno a -15 mV. Estas propiedades de activación más hiperpolarizadas de los canales $\text{Ca}_v1.2$ en el músculo liso vascular permitiría la activación de los canales con leves despolarizaciones fisiológicas del potencial de membrana, generando así una tensión suficiente en los vasos para mantener el tono vascular, ya que si los potenciales de activación dependientes de voltaje de los LTCCs de músculo liso vascular fueran similares

al de los canales $Ca_v1.2$ cardiacos o neuronales, la tensión que se generaría sería mínima (Liao y cols., 2004).

Se ha demostrado que el canal $Ca_v1.2$ es de vital importancia para la función del músculo liso empleando un modelo de ratón knock-out condicional específico de tejido para el gen que codifica la subunidad $\alpha_1.2$ del canal LTCC (Moosmang y cols., 2005). Estos ratones morían a los 21 días de inducir la pérdida del gen y, por tanto, la expresión de un canal $Ca_v1.2$ funcional. Presentaban parálisis intestinal, disminución de la presión sanguínea, disminución de reactividad vascular, obstrucción urinaria, etc., lo que nos hace deducir que el canal $Ca_v1.2$ es crítico para la función contráctil de varios tipos de músculo liso (Moosmang y cols., 2003). En este sentido, se conoce que el flujo de Ca^{2+} que entra a través de los LTCC, especialmente los canales $Ca_v1.2$, es la principal vía por la que aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula induciendo la contracción, por lo que tienen una gran relevancia en la reactividad del músculo y el tono vascular. Es por ello que, para abordar determinadas patologías en clínica como la hipertensión, angina de pecho, cardiomiopatía hipertrófica, taquicardia..., se utilizan tratamientos que actúan sobre estos canales.

Como hemos nombrado anteriormente, existen 3 clases de bloqueantes de canales de Ca^{2+} , y todos pueden unirse a la subunidad α_1 de los canales $Ca_v1.2$. Sin embargo, existe una respuesta muy variable en el bloqueo de canales $Ca_v1.2$ entre el tejido muscular cardiaco y liso. Estas diferencias se deben, además de a las distintas propiedades de los canales, a las estructuras moleculares que tienen lugar por *splicing* alternativo en ambos tejidos, lo que ha llevado a desarrollar nuevos bloqueantes con más selectividad y con menos efectos secundarios, como las dihidropiridinas de 2^o y 3^o generación con gran selectividad vascular y menos efecto inotrópico y activación simpática. Sin embargo, las respuestas en los pacientes siguen siendo muy variables (Liao y Soong, 2010), debido a la gran diferencia en la estructura y función que pueden presentar los canales $Ca_v1.2$ en distintos individuos. Por esto, existe la necesidad de abordar rutas alternativas de entrada de Ca^{2+} por otros canales iónicos y estudiar cómo se relacionan con los canales $Ca_v1.2$ para regular la función vascular.

Entre las posibles interacciones que pueden existir entre los canales $Ca_v1.2$ y otras proteínas, destacan las que tienen lugar entre éstos y TRPC1, pudiendo formar complejos macromoleculares funcionales en los que TRPC1 actuaría como un regulador de los canales $Ca_v1.2$ mediante interacción directa o indirecta (Sabourin y cols., 2011). Por otro lado, interesantemente también se han relacionado los canales $Ca_v1.2$ con *Orai1*, componente principal de los SOCCs, indicando la posibilidad de que estos dos canales se encuentren estrechamente conectados, tanto espacial como funcionalmente, mostrando evidencias de nuevos mecanismos de regulación de la señalización de Ca^{2+} (Park y cols., 2010; Wang y cols., 2010).

Canales de Ca^{2+} tipo T o Ca_v3 .

Las corrientes de Ca^{2+} a través de los TTCCs son corrientes de Ca^{2+} más débiles y transitorias, activándose por pequeñas despolarizaciones desde potenciales muy negativos (-70 a -60 mV) e inactivándose rápidamente. No son sensibles a dihidropiridinas como la

nifedipina (a bajas concentraciones) y no se han purificado todavía subunidades accesorias como en los LTCCs.

Existen 3 tipos de TTCCs (Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v3.3), siendo los tipos Ca_v3.1 y Ca_v3.2, los que se expresan principalmente en el sistema cardiovascular. El papel funcional de estos canales en las CMLVs todavía no está muy claro. Sin embargo, se conoce que los TTCCs no están implicados en la vasoconstricción, aunque sí parecen ser importantes en la regulación de la respuesta miogénica. Algunos estudios en ratones knock-out para canales Ca_v3.1 y Ca_v3.2 han descrito que no existían cambios en la presión arterial de los animales ni en las respuestas contráctiles registradas en arterias coronarias aisladas, aunque sí mostraban una relajación deficiente (Mangoni y cols., 2006; Chiang y cols., 2009). Mientras que Ca_v3.1/Ca_v3.3 parecía mediar la vasoconstricción inducida por presión en la respuesta miogénica, Ca_v3.2 contribuía a la regulación negativa o relajación de esta contractilidad modulando la activación de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) (Harraz y cols., 2015).

A pesar de ello, estos canales tienen una presencia más reducida en CMLVs de fenotipo contráctil, expresándose en mayor medida en células proliferantes (House y cols., 2008), asociándose con procesos patológicos y crecimiento celular, por lo que nos centraremos en la contribución de los canales Ca_v1.2 a la regulación del tono vascular.

B. Canales de Ca²⁺ regulados por receptor o ROCCs.

Son canales catiónicos no selectivos permeables a Ca²⁺, responsables de otra vía de entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular, independiente de nivel de Ca²⁺ contenido en los reservorios o el potencial de membrana. Pueden abrirse o cerrarse en respuesta a la unión de un ligando como el ATP, la acetilcolina, la noradrenalina o incluso derivados lipídicos (DAG o AA) permitiendo el paso de iones Ca²⁺ a través de ellos. Un ejemplo de estos canales en músculo liso vascular son los canales P2X, englobados dentro de la familia de los receptores purinérgicos, que se abren en respuesta a la unión de ATP extracelular (Large, 2002). Mientras los niveles de Ca²⁺ citoplasmáticos se mantengan elevados, los ROCCs se mantienen en estado inactivo, evitando así, el efecto nocivo por sobrecarga de Ca²⁺ en la célula (Large, 2002).

C. Canales de Ca²⁺ regulados por los reservorios o SOCCs.

Los SOCCs son canales de Ca²⁺ localizados en la membrana plasmática que se activan tras el vaciado de reservorios, como el RS, mediante mecanismos independientes de voltaje. La activación de estos canales provoca una entrada de Ca²⁺ en la célula desde el exterior, denominada entrada de Ca²⁺ regulada por los reservorios y por su siglas en inglés "SOCE" o entrada capacitativa de Ca²⁺ (ECC), como inicialmente describió Putney (Putney, 1986). Esta vía de entrada de Ca²⁺ adquirió una especial relevancia en células no excitables, ya que se demostró que era la principal ruta de entrada de Ca²⁺ en estas células. Sin embargo, actualmente podemos encontrar varias publicaciones que describen la presencia de estos canales también en células excitables (Correll y cols., 2015; Moccia y cols., 2015), incluyendo CMLVs recién aisladas o en cultivo primario tanto de arterias de resistencia como otras sistémicas (Smani y cols., 2004; Smani y cols., 2007; Smani y cols., 2008).

Esta ruta de entrada de Ca^{2+} está implicada en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} debido a su relación funcional con los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (RS y mitocondria), por lo que, en CMLVs, SOCE puede regular muchas funciones celulares, como la contracción o la proliferación.

A pesar de seguir en estudio desde hace muchos años, todavía existe controversia acerca de los mecanismos de activación de esta ruta, su papel fisiológico o todos los componentes moleculares que participan en la misma. En el **apartado 1.5** detallaremos esta ruta y sus componentes en mayor profundidad.

D. Otros canales catiónicos (canales TRP).

La búsqueda de los componentes moleculares de SOCE, iniciada hace más de 20 años, condujo al descubrimiento de una nueva superfamilia de canales catiónicos, los canales TRP. Los mamíferos codifican 28 subunidades de proteínas TRP distintas, que se pueden agrupar en 6 subfamilias: TRPC (TRP *Canonical*), TRPV (TRP *Vanilloid*), TRPM (TRP *Melastatin*), TRPA (TRP *Ankyrin*), TRPML (TRP *Mucolipin*) y TRPP (TRP *Polycystin*) (Montell, 2005).

Los canales TRP son, con frecuencia, descritos como canales catiónicos no selectivos o específicos, aunque esta definición no es del todo precisa. Algunos canales TRP son altamente selectivos al Ca^{2+} , como TRPV5 o TRPV6 (Yue y cols., 2001), mientras que otros son más selectivos a iones monovalentes (Na^+ y K^+) y relativamente impermeables a Ca^{2+} u otros iones divalentes como TRPM4 (Nilius y cols., 2003) y TRPM5 (Prawitt y cols., 2003). Sin embargo, algunos canales son permeables tanto a cationes monovalentes como divalentes, como los canales TRPC1 (Strubing y cols., 2001). Aparte, algunas subfamilias poseen un dominio TRP, cuya función se desconoce, y múltiples sitios de interacción, elementos reguladores y dominios enzimáticos en los extremos intracelulares.

En CMLVs se expresan varios canales TRP. Muchos estudios sugieren que los canales TRPC1, TRPC4 y TRPC5 pueden actuar como SOCCs en CMLVs, sin embargo, varios autores demostraron que SOCE puede tener lugar en ausencia de estos canales. Otros estudios han determinado que los canales TRPCs son necesarios para que tenga lugar SOCE en determinadas circunstancias, mientras que otros han descrito que Orai1 puede actuar como un componente regulador de los SOCCs compuestos por subunidades de TRPC1 o viceversa (Ambudkar y cols., 2007; Cheng y cols., 2011), quedando por resolver todavía la relación funcional que existe entre STIM1, Orai1 y TRPC1 durante SOCE. De cualquier forma, gracias a sus propiedades como canales catiónicos, los canales TRPCs contribuyen a la regulación del potencial de membrana, a la contracción y al mantenimiento del tono miogénico. Además, pueden participar en la señalización de receptores acoplados a proteína G modulando la actividad vasodilatadora y vasoconstrictora y la proliferación celular, por lo que una función alterada de estos canales puede relacionarse con enfermedades como la hipertensión arterial, daño de la neointima, edema pulmonar... (Earley y Brayden, 2015).

1.5 Entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios o SOCE.

Como ya hemos comentado anteriormente, SOCE fue descrita inicialmente por el Dr. Putney en el año 86 (Putney, 1986), a la que llamó ECC o entrada capacitativa de Ca^{2+} , reflejando la idea de que el Ca^{2+} entraba en el citoplasma desde el exterior atravesando la membrana del RS, por lo que asumía que tendría que estar conectado directamente con el exterior. No fue hasta el año 95 cuando la ECC fue renombrada como SOCE, para referirse más explícitamente al modo de activación, el vaciado de los reservorios, y distinguirla de la entrada de Ca^{2+} regulada por voltaje, ligandos o receptores.

Los primeros estudios electrofisiológicos acerca de SOCE se realizaron en mastocitos de rata en el año 92, en los que se descubrió que el vaciado de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares, inducía la aparición de una corriente no conocida, pequeña y muy selectiva a Ca^{2+} , que denominaron I_{CRAC} o corrientes de Ca^{2+} activadas por liberación de Ca^{2+} (CRAC, *Ca²⁺ Release Activated Ca²⁺*) (Hoth y Penner, 1992). Sin embargo, las corrientes CRAC no serían las únicas corrientes activadas por el vaciado de los depósitos intracelulares, ya que pronto se describieron nuevas corrientes denominadas I_{SOC} o corrientes SOCs (*Store Operated Channel*), que también dependían de los reservorios intracelulares y no del potencial de membrana, pero que presentaban propiedades electrofisiológicas diferentes a I_{CRAC} , ya que eran corrientes catiónicas pero poco selectivas a Ca^{2+} .

Desde su descubrimiento, se necesitaron muchos años de investigación para descubrir los principales componentes moleculares de SOCE: las proteínas STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) y Orai1 (Roos y cols., 2005; Vig y cols., 2006). Aunque en mamíferos podemos encontrar 2 proteínas STIM (STIM1 y STIM2) y 3 proteínas Orai (Orai1, Orai2 y Orai3), los isotipos que predominan en CMLVs son STIM1 y Orai1. STIM1 es un sensor de Ca^{2+} del RS que tras el vaciado del reservorio oligomeriza e interacciona con los SOCCs en la membrana plasmática, constituidos por varias subunidades de Orai1 (Lewis, 2007), activando así la entrada de Ca^{2+} (Figura 22). Otras proteínas propuestas como posibles SOCCs fueron los canales TRP (Montell, 2005), siendo el canal TRCP1 el principal candidato (Beech, 2005). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la participación de los canales TRPCs en SOCE y han sido sugeridos como ROCCs (Gudermann y cols., 2004).

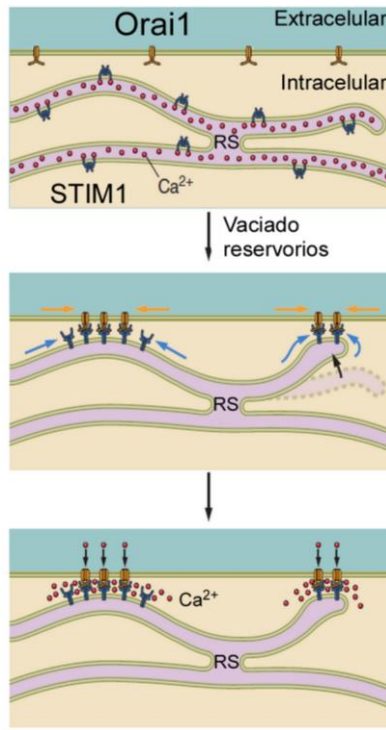


Figura 22: Entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios.

Esquema representativo de SOCE. Cuando se produce el vaciado de los reservorios (RS), se induce la oligomerización de STIM1 y su interacción con Orai1, permitiendo que estos canales se abran y entre Ca^{2+} hacia el interior celular. RS: retículo sarcoplásmico. Modificado de (Prakriya y Lewis, 2015).

Más tarde se supo que las corrientes CRAC estaban mediadas principalmente por Orai1 en células no excitables, ya que el silenciamiento de la expresión de esta proteína en estas células, reducía drásticamente estas corrientes de Ca^{2+} y SOCE. En cambio, las corrientes SOC son corrientes catiónicas poco selectivas para el Ca^{2+} , propias de células excitables, que podrían ser mediadas por TRPC1, por complejos formados por TRPC1 y Orai1, o incluso por otros canales TRPC (Bolotina, 2008).

Cada vez hay más publicaciones que sugieren la contribución de SOCE en el desarrollo y progresión de varias patologías, como veremos más adelante (Motiani y Trebak, 2012).

1.5.1 Componentes moleculares.

A. STIM1.

El gen que codifica para STIM1 se logró clonar en el año 1996 (Parker y cols., 1996), pero no se relacionó con la señalización de Ca^{2+} hasta más tarde. Gracias a los ARN de interferencia, STIM1 se identificó en 2005 como sensor de Ca^{2+} del RS y activador de SOCC en la membrana plasmática (Liou y cols., 2005; Roos y cols., 2005). Mediante un cribado en líneas celulares humanas, se describieron dos genes que codificaban para STIM, STIM1 y STIM2 (Liou y cols., 2005), a diferencia de lo que se identificó en células de *Drosophila* S2, que sólo poseían un gen para STIM (Roos y cols., 2005).

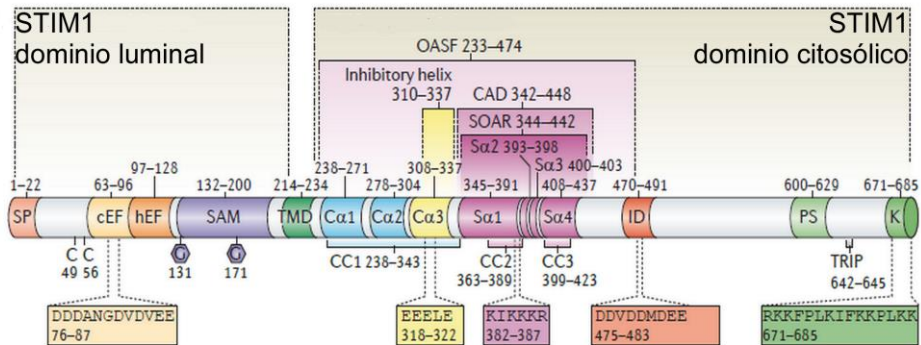
STIM1 es un polipéptido (~685 aminoácidos) con un sólo segmento transmembrana. Inicialmente se describió como una fosfoproteína glicosilada expresada principalmente en

la membrana del RS, con un 10-25% de expresión en la membrana plasmática (Manji y cols., 2000). En el RS, se encuentra distribuida homogéneamente por toda la membrana, con su extremo N-terminal hacia el lumen del RS, en el que se localiza un dominio *EF hand* de unión a Ca^{2+} y un dominio SAM (*Sterile Alpha Motif*). El dominio *EF hand* detecta la depleción de Ca^{2+} del reservorio, lo que induce la oligomerización de la proteína STIM1 y la activación de SOCE (Roos y cols., 2005), mientras que el dominio SAM está implicado en la interacción proteína-proteína, lo que le permite participar en una gran variedad de procesos celulares. El extremo C-terminal citosólico contiene 3 dominios “coiled-coil” (CC1, CC2, CC3), una región de interacción con microtúbulos, una región rica en serina-prolina susceptible de fosforilación y una región rica en lisina de interacción con fosfolípidos de membrana. El dominio CC1 se encuentra subdividido en 3 α -hélices, siendo la tercera una hélice inhibidora que bloquea la región SOAR (*STIM-Orai1 Activating Region*) (Yuan y cols., 2009), también conocida como dominio CAD (*CRAC Activation Domain*) (Park y cols., 2009) o secuencia mínima necesaria para la activación de Orai1, dentro del fragmento OASF (*Orai1-Activating Small Fragment*) (Muik y cols., 2009). CAD o SOAR es suficiente y necesario para la activación de SOCE ya que mutaciones en este dominio o su delección, bloquean la actividad de Orai1 (Figura 23) (Prakriya y Lewis, 2015).

Tras el descenso del contenido en Ca^{2+} del RS, comienza la oligomerización de STIM1 y la activación de los SOCCs mediante interacción física directa con las unidades del canal por medio de los dominios presentes en el extremo C-terminal (Oka y cols., 2005; Wu y cols., 2006; Liou y cols., 2007; Smyth y cols., 2007).

Trabajos del grupo del Dr. Rosado también demostraron la presencia de STIM1 en la membrana plasmática (Jardin y cols., 2013). En este caso el dominio N-terminal se encuentra dirigido hacia el exterior celular mientras que el dominio C-terminal se encuentra en el interior.

A. Dominios STIM1



B. Dímero STIM1

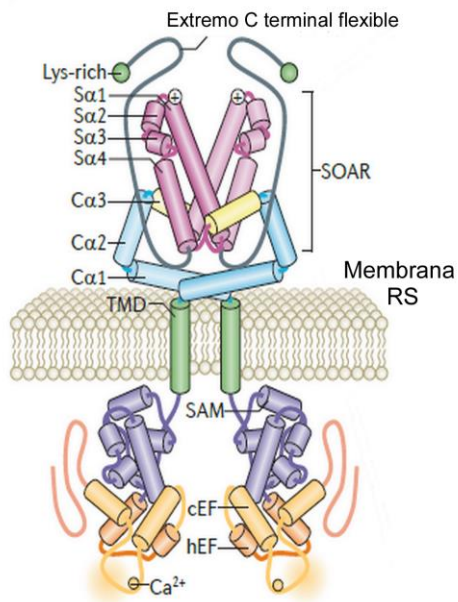


Figura 23: Estructura molecular de STIM1.

A. STIM1 presente en el RS contiene dos dominios moleculares, dominio citosólico y dominio luminal. En el dominio luminal, extremo N-terminal, podemos destacar un dominio *EF hand* de unión a Ca²⁺ y un dominio SAM responsable de la unión entre proteínas. En el dominio citosólico, extremo C-terminal, destacamos la región SOAR o CAD, mínima secuencia requerida para la activación de Orai1, que se encuentra dentro del segmento OASF. También destacar el dominio rico en lisina (K) que permite la interacción con los fosfolípidos de membrana. **B.** Posible dímero de STIM1 en estado basal, mostrando una configuración plegada, previa a su activación. *Modificado de (Soboloff y cols., 2012).*

B. Orai.

En torno a los años 90, se detectaron varios pacientes humanos con inmunodeficiencia combinada severa (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*) que presentaban una deficiencia en la función de unos canales de Ca²⁺ selectivos para este ion. No fue hasta el año 2006 cuando se relacionó esta deficiencia con una mutación en una molécula a la que denominaron Orai1 (Feske y cols., 2006), y se propuso como componente principal de los SOCCs.

Orai es un canal iónico de membrana del que se conocen 3 genes homólogos en mamíferos: Orai1, Orai2 y Orai3, con características estructurales y genéticas similares a las de otros canales iónicos de Ca²⁺. De todos ellos, Orai1 es el mejor caracterizado, siendo

el principal componente de los SOCCs y permitiendo una entrada de Ca^{2+} selectiva para este ion. Además, se ha relacionado con la patogenia de distintas enfermedades como hemos nombrado anteriormente, por lo que nos centraremos en el estudio del mismo.

Recientemente se ha confirmado mediante cristalografía y análisis de secuencias que los SOCCs formados por Orai1 presentan una estructura hexamérica, constituida por 6 subunidades de Orai1 (Hou y cols., 2012; Cai y cols., 2016), aunque no se descarta la existencia de la conocida estructura tetramérica, formada por 4 subunidades, pudiendo presentar estas dos configuraciones distintas propiedades selectivas (Thompson y Shuttleworth, 2013). La Figura 24 muestra cómo cada subunidad contiene 4 hélices transmembrana altamente conservadas (M1-M4). La cadena lateral de aminoácidos de M1 de cada subunidad forma el poro, en cuya cara extracelular presenta un anillo distintivo de residuos de glutamato que forma el filtro de selectividad (Hou y cols., 2012), haciéndolo altamente específico para Ca^{2+} sobre Na^+ o K^+ . Los extremos N- y C- terminal están orientados hacia la cara citosólica, donde se encuentran regiones de interacción con STIM1, PKC y Ca^{2+} /CaM (Mullins y cols., 2009; Hooper y cols., 2015). La interacción con STIM1 tiene lugar con el dominio CAD de éste, gracias a unos residuos hidrofóbicos y ácidos presentes en el extremo C-terminal de Orai1 (Cai, 2007).

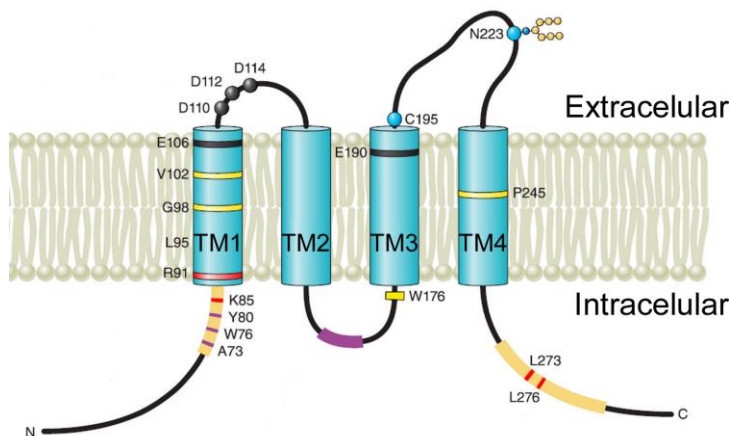


Figura 24: Estructura molecular de Orai1.

Cada subunidad de Orai1 contiene 4 segmentos transmembrana (TM1-4). En el segmento M1, se encuentran el poro y filtro de selectividad, formado por residuos de glutamato e la cara extracelular. En lado citosólico se encuentran los extremos N- y C-terminal, donde se sitúan las regiones de unión a STIM1 y otras proteínas. *Modificado de (Prakriya y Lewis, 2015).*

Orai1 participa en tres canales distintos de Ca^{2+} , incluyendo los dos canales CRACs (que implican la activación de Orai1 por STIM1) y SOCCs no selectivos (canales de Ca^{2+} operados por reservorios que implica la interacción entre Orai1, STIM1 y proteínas TRPC); y el canal de Ca^{2+} regulado por el AA (ARC) que implica interacciones entre Orai1, Orai3 y STIM1 de membrana plasmática (Feske y cols., 2006; Jardin y cols., 2008; Mignen y cols., 2009). Además, estudios recientes han revelado la expresión de variantes generadas por splicing alternativo de Orai1 (Rosado y cols., 2015), lo que demuestra la gran diversidad funcional

de estos canales para modular la dinámica de las señales de Ca^{2+} . En CMLVs, se ha demostrado que Orai1 interacciona con TRPC1 para formar SOCCs y que esta asociación aumenta como respuesta al vaciado del RS (Rodríguez-Moyano y cols., 2013).

C. TRPC1.

TRPC1, fue el primer canal TRP clonado y, al igual que todas las subunidades TRP, se expresa como polipéptido (64 – 230KDa) conteniendo 6 dominios transmembrana (S1-S6) y extremos N- y C- terminal intracelulares. En el extremo C- terminal de los canales TRPC se pueden identificar dominios de unión a CaM/ IP₃R (CIRB) y dominios de unión a Ca^{2+} *EF hand*. Los canales TRP funcionales se forman por la unión de 4 subunidades normalmente, con los dominios transmembrana S5 y S6 como formadores del poro iónico, siendo el canal TRPC1 el único que posiblemente no es capaz de formar canales catiónicos homoméricos, por lo que presenta propiedades de conducción y mecanismos reguladores características de los canales heteromultiméricos (Earley y Brayden, 2015).

La relevancia funcional de TRPC1 en CMLVs es controvertida, ya que hay estudios que apoyan (Bergdahl y cols., 2003; Bergdahl y cols., 2005; Inoue y cols., 2006) el papel del canal TRPC1 en SOCE en CMLVs y otros que lo rechazan (Varga-Szabo y cols., 2008; DeHaven y cols., 2009). Sin embargo, existe evidencias descritas de que los canales TRPC1 pueden asociarse con Orai1 para formar complejos o, al menos interaccionar funcionalmente, formando SOCCs no selectivos y facilitar SOCE (Ambudkar y cols., 2016; Gueguinou y cols., 2016). Nuestro grupo ha demostrado que TRPC1 se asocia con Orai1 en CMLVs de aorta y juega un papel esencial en la proliferación del mismo (Rodríguez-Moyano y cols., 2013). Además, se ha descrito que el canal TRPC1 puede formar heterómeros funcionales con TRPC4, 5, 6 y/o 7, regulados por rutas de señalización acopladas a proteína G o incluso asociarse con el canal BK_{Ca} (Kwan y cols., 2009) promoviendo la relajación del músculo liso vascular. Asimismo, puede formar complejos macromoleculares con otros canales de Ca^{2+} como el canal Ca_v1.2, participando en la regulación de la conducción cardiaca, actividad ventricular y contractilidad (Sabourin y cols., 2011; Avila-Medina y cols., 2016).

Aunque todavía quede por resolver la relación funcional que existe entre STIM1, Orai1 y TRPC1 durante SOCE en CMLVs, se conoce que TRPC1 es un canal permeable tanto a cationes monovalentes como divalentes, siendo poco selectivos para Ca^{2+} , lo que hace contribuyan a la regulación del potencial de membrana, la contracción y mantenimiento del tono miogénico en estas células.

1.5.2 Mecanismos de activación.

La relación entre las corrientes de Ca^{2+} descritas I_{CRAC} , I_{SOC} y SOCE consiguió aclararse gracias al descubrimiento de los inhibidores de SERCA y a método experimental de readición de Ca^{2+} , la forma más popular de estudiar SOCE (Bird y cols., 2008). Este método consiste en inducir el vaciado de los reservorios con un inhibidor de SERCA, normalmente TG (Thastrup y cols., 1989), en una solución sin Ca^{2+} extracelular disponible. La inhibición de SERCA provoca un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, debido al vaciado de las reservas de Ca^{2+} del

RS (Figura 25). Después, los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos vuelven a su estado basal gracias a los sistemas de extrusión de Ca^{2+} , y las células son sumergidas en una solución con Ca^{2+} extracelular disponible a altas concentraciones, produciéndose un influjo de Ca^{2+} a través de los SOCCs y manteniendo los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos altos. La introducción de marcadores fluorescentes sensibles a Ca^{2+} como FURA-2 (Grynkiewicz y cols., 1985) permitió detectar esta señal de Ca^{2+} , que no se produce en células con los reservorios intactos, demostrando que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular depende del llenado del RS. Por lo tanto, existe una importante dinámica celular y una intercomunicación intermembrana (Lu y Fivaz, 2016).

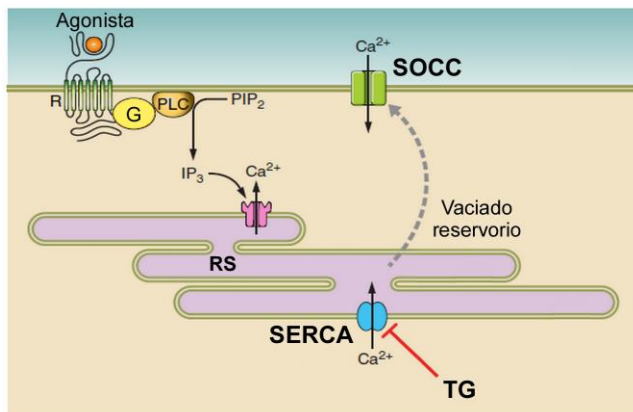


Figura 25: Mecanismo de acción de la tapsigargina.

SOCE puede ser activada fisiológicamente mediante agonista y liberación de Ca^{2+} del RS por la producción de IP_3 , o bien experimentalmente mediante la tapsigargina (TG), que provoca un vaciado pasivo de los reservorios al inhibir la bomba SERCA induciendo la activación de los SOCCs. SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del RE/RS; SOCC: canal de Ca^{2+} regulado por reservorios; RS: retículo sarcoplásmico; PLC: fosfolipasa C; TG: tapsigargina; G: proteína G; PIP_2 : fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato. *Modificado de (Prakriya y Lewis, 2015).*

Mientras tanto, desde 1992 hasta 2005 se propusieron muchos genes candidatos en esta SOCE y se formularon muchas hipótesis para explicar cómo se relacionaba con el contenido de Ca^{2+} del RS. De entre todas ellas, tres mecanismos de activación fueron los más extendidos: la existencia de un factor activador difusible liberado por el RS llamado CIF (*Ca²⁺ Influx Factor*), la inserción de canales CRAC en la membrana plasmática mediante vesículas y el acoplamiento conformacional entre canales CRAC de la membrana plasmática y una proteína sensor de Ca^{2+} en el RS (Prakriya y Lewis, 2015).

El mecanismo de **acoplamiento conformacional** llegó a ser el más cercano al mecanismo que ahora conocemos, aunque los componentes moleculares que originalmente se propusieron eran diferentes (Berridge, 1995). Hasta el año 2005-2006 no se descubrieron los principales componentes moleculares de SOCE e I_{CRAC} : STIM1 y Orai1, cuya caracterización hizo que ese mecanismo de acoplamiento conformacional pareciera el más acertado. Este mecanismo intenta explicar que la activación de SOCE está regulada por la

interacción entre proteínas del RS y los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. STIM1 induce la activación de Orai1, componente principal de los SOCCs, en la membrana plasmática en respuesta a la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (Figura 26). En condiciones normales, STIM1 se localiza en la membrana del RS formando dímeros, sensando los niveles de Ca^{2+} el lumen de mismo. Una vez se produce una disminución de la concentración de Ca^{2+} del reservorio, STIM1 oligomeriza y se transloca a regiones de unión entre RS – membrana plasmática, donde interacciona físicamente con Orai1, activando la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales hacia el interior celular (Collins y cols., 2013).

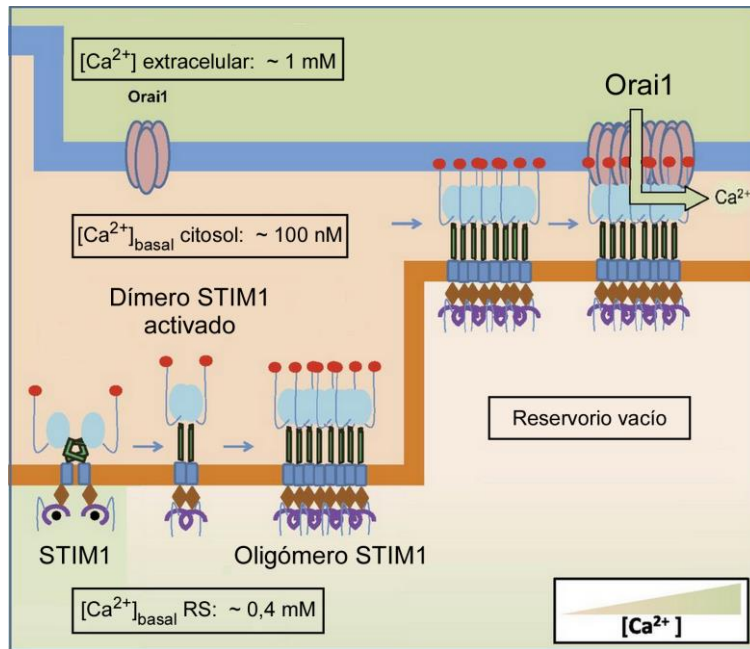


Figura 26: Mecanismo de activación de SOCE.

El mecanismo de activación de SOCE se basa en el acoplamiento conformacional entre STIM1-Orai1. En condiciones basales, STIM1 se dispone formando dímeros con una conformación plegada. Una vez se produce el vaciado de los reservorios, STIM1 se activa y forma oligómeros traslocándose a regiones cercanas a la membrana plasmática para interactuar con Orai1, activando la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. RS: retículo sarcoplásmico. *Modificado de (Collins y cols., 2013).*

Regulación de la activación STIM1-Orai1.

La inactivación de SOCE y el complejo STIM1-Orai1 implica dos procesos fundamentales, una rápida inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI, *Calcium Dependent Inactivation*) del canal Orai1 y una disociación lenta del complejo STIM1-Orai1. La CDI se lleva a cabo por la interacción entre el dominio inhibitorio citosólico de STIM1 (ID, *Inhibitory Domain*) y el extremo N-terminal de Orai1 siendo la CaM uno de los mediadores de este proceso (Derler y cols., 2009; Mullins y cols., 2009). Por otro lado, la disociación lenta del complejo STIM1-

Orai1 tiene lugar principalmente por el incremento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos, que induce el desacoplamiento de STIM1 (Deng y cols., 2009).

Como ya hemos visto, STIM1 es capaz de activar e inactivar Orai1 sin la necesidad de proteínas adicionales *in vitro*. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que el proceso sea modulado *in vivo* por otras proteínas accesorias o condiciones ambientales. Actualmente, se han aislado muchas proteínas de unión a STIM y Orai como CRACR2A, Homer, Filamina A, Golli, CaM, SARAF... (Lopez y cols., 2016). Estas proteínas, reguladoras o moduladoras, pueden controlar la actividad de los SOCCs, aunque todavía no se conocen con exactitud los mecanismos.

Entre las mejor caracterizadas, destacamos la proteína reguladora CRACR2A. Es una proteína citosólica que contiene dominios *EF hand*, capaz de unirse directamente a STIM1 y a Orai1 formando un complejo ternario para estabilizar la interacción entre ambos (Srikanth y cols., 2010) y aumentar SOCE. Una vez que se reduce el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$, el Ca^{2+} se une a los dominios *EF hand* de CRACR2A promoviendo su disociación de STIM1-Orai1, desestabilizándolo.

Otras proteínas reguladoras de SOCE son Homer y SARAF (*SOCE-Associated Regulatory Factor*). Hay estudios que describen evidencias de una asociación directa o indirecta de la proteína citoplasmática Homer1 con STIM1, TRPC1 y Orai1, regulando la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales y la agregación plaquetaria (Jardin y cols., 2012). Por otro lado, el factor regulador de SOCE, SARAF, una proteína localizada en la membrana del RS, es capaz de interactuar con STIM1 regulando negativamente la activación de SOCE para prevenir de una sobrecarga de Ca^{2+} (Palty y cols., 2012). En definitiva, la activación e inactivación de SOCE es un proceso estrictamente regulado y en el que están implicadas multitud de proteínas.

1.5.3 Papel fisiopatológico de SOCE en el sistema vascular.

La estrecha relación de SOCE con los niveles de Ca^{2+} del RS hacía pensar que la única función que tenía SOCE era rellenar los reservorios intracelulares tras el vaciado de los mismos por la unión de un agonista a su receptor. Sin embargo, el incremento mantenido de los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos que tiene lugar tras la entrada de Ca^{2+} por los SOCCs, hacía pensar que no sólo sirva para rellenar los reservorios, sino que también participaba en la regulación multitud de funciones celulares como regulación génica, proliferación, contracción, migración y diferenciación celular. Esto se ha comprobado en varios estudios con pacientes humanos o con ratones transgénicos con pérdida o ganancia de función de los genes de STIM1 u Orai1, en los que se han descritos graves defectos funcionales en el sistema inmune, muscular, vascular, etc. (Vandenberghe y cols., 2013).

Fisiológicamente, en el músculo liso vascular, un GPCR estimulado por un agonista puede desencadenar la producción de IP_3 mediante la PLC. Este IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} del RS a través de su receptor IP_3R , siendo esta depleción de los reservorios de Ca^{2+} la señal que dispara la activación de los SOCCs. Además, como ya hemos nombrado anteriormente y podemos revisar en la Figura 25, SOCE puede ser activada farmacológicamente mediante

inhibidores específicos de SERCA, como la TG o el CPA, que vacían los depósitos intracelulares de Ca^{2+} de forma pasiva sin la producción de segundos mensajeros.

STIM1 y Orai1, componentes principales de SOCE, además de TRPC1, se expresan en células de la vasculatura y median esta entrada de Ca^{2+} tanto en células endoteliales como en CMLVs (Spinelli y Trebak, 2016). En nuestro grupo hemos descrito la participación de estos componentes en la vasoconstricción producida por agonistas, como la urotensina-II en arteria coronaria y aorta de rata (Dominguez-Rodriguez y cols., 2012; Rodriguez-Moyano y cols., 2013). También se ha descrito la participación de los SOCCs en la contracción producida por agonistas vasoconstrictores endógenos, como la ET-1 (Kawanabe y cols., 2006) o la 5-HT (Alapati y cols., 2007; Avila-Medina y cols., 2016) entre otros, en distintos tipos de arterias, ya que estos agonistas regulan la función vascular actuando sobre su GPCR que induce la producción de IP_3 a través de la PLC y el vaciado de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} .

Interesantemente, como hemos ido comentando anteriormente, hay evidencias que demuestran que TRPC1, Orai1 y $\text{Ca}_v1.2$ pueden interactuar con otras proteínas para formar complejos de señalización en CMLVs. TRPC1 puede interactuar con Orai1 participando en la proliferación en aorta de rata (Rodriguez-Moyano y cols., 2013), con el canal BK_{Ca} (Kwan y cols., 2009) o incluso con el canal $\text{Ca}_v1.2$ participando en la regulación de la conducción cardiaca, actividad ventricular y contractilidad (Sabourin y cols., 2011). Por otra parte, Orai1 puede formar complejos heteromultiméricos con Orai3 para mediar una entrada de Ca^{2+} independiente de los reservorios y activada por AA dando lugar a corrientes I_{ARC} (Spinelli y Trebak, 2016), o con el canal de K^+ activado por Ca^{2+} -SK3 para regular la contracción inducida por agonista en músculo liso (Song y cols., 2015).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que la principal ruta de entrada de Ca^{2+} en CMLVs tiene lugar a través de los LTCCs, sería necesario estudiar cómo Orai1 y TRPC1 pueden influenciar a estos VDCCs en la señalización de Ca^{2+} para entender el papel fisiológico de los SOCCs en la contracción vascular.

2 MATERIALES

Y MÉTODOS

2.1 Equipamiento.

2.1.1 Miógrafo multicanal.

El miógrafo nos permite la caracterización de las propiedades y funciones fisiológicas de distintos vasos sanguíneos *in vitro*. Este sistema es esencial para estudiar los efectos de distintas drogas o fármacos, así como de otros compuestos vasoactivos como péptidos o neurotransmisores, en arterias o venas, con unas condiciones muy similares a las fisiológicas, ya que éstas mantienen muchas de las características que poseen *in vivo*.

A. Miógrafo de Mulvany.

En este caso, se utilizó un miógrafo multicanal “Mulvany-Halpern 610 M” (JP Trading, Dinamarca), para realizar estudios *in vitro* de la función vascular en arterias de pequeño diámetro. Consta de 4 canales en los que cada unidad, hecha de aluminio, posee una cámara central de acero inoxidable con una capacidad de 8 ml. Los brazos, que servirán como soporte para el tejido, están unidos, por un lado, a un micrómetro y, por otro lado, a un transductor de fuerza (Figura 27). En cada unidad se puede controlar individualmente la entrada de gas y la succión, de manera que nos permitía mantener el tejido en condiciones fisiológicas (37 °C, burbujeado con mezcla de 5% CO₂ y 95% O₂). Añadiendo los compuestos de interés directamente a la cámara, pudimos estudiar *in vitro* la contractilidad y reactividad de los vasos en condiciones isométricas.

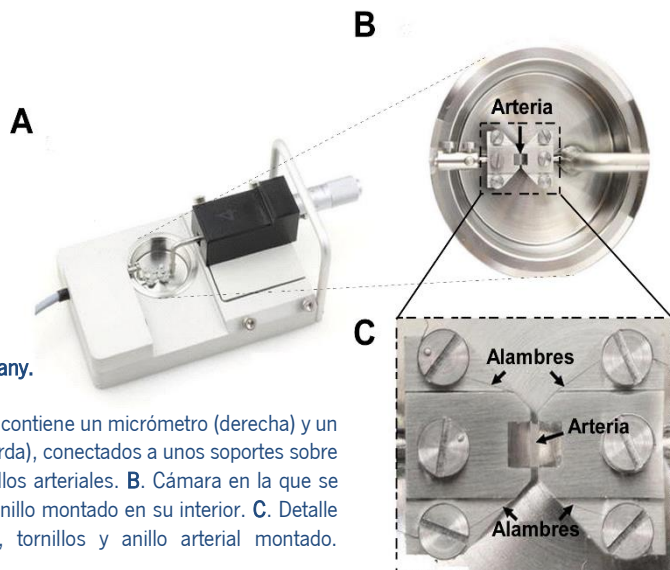


Figura 27: Miógrafo de Mulvany.

A. Cada unidad del miógrafo contiene un micrómetro (derecha) y un transductor de fuerza (izquierda), conectados a unos soportes sobre los que se montarán los anillos arteriales. **B.** Cámara en la que se visualizan los soportes y el anillo montado en su interior. **C.** Detalle de los soportes, alambres, tornillos y anillo arterial montado. Modificado de (www.dmt.dk).

B. Software.

Para registrar la medida de la fuerza isométrica se utilizó el software informático “Myodaq-2.01” (Danish Myotechnologies, Dinamarca) y para el análisis de datos el software

“Myodata-2.02” (Danish Myotechnologies, Dinamarca), de acuerdo con los protocolos previamente descritos (Mulvany y Halpern, 1977).

2.1.2 Sistema de microfluorimetría de Ca^{2+} .

Para registrar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de CMLVs se emplearon técnicas microfluorométricas, con el FURA-2 como sonda fluorescente. Este marcador fluorescente (Tsien y cols., 1985) actúa como quelante de Ca^{2+} , ya que se une con varios grupos carboxilos (-COOH) con gran afinidad a este ion divalente y no a otros, ni tampoco a otros iones monovalentes (Grynkiewicz y cols., 1985) (Figura 28). Es altamente selectivo para el Ca^{2+} y casi insensible a pequeñas fluctuaciones en el rango fisiológico del pH. Su estructura deriva del potente quelante de Ca^{2+} , EGTA (*Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*).

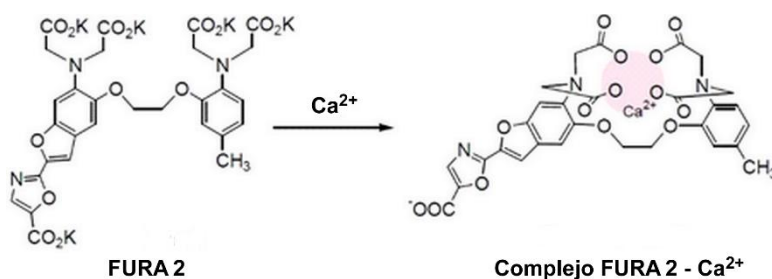


Figura 28: FURA-2.

Estructura química del FURA-2 que forma complejo con el Ca^{2+} .

Hemos usado la forma esterificada del FURA-2, FURA-2 AM, que es permeable a través de la membrana plasmática de las células. Al penetrar en las células, las propias esterasas hidrolizan este fluoróforo quedando libre en el citosol pudiendo quelar el Ca^{2+} disponible. Cuando esta molécula es excitada, emite fluorescencia a una determinada longitud de onda (λ) con un máximo relativamente independiente de la concentración de calcio. El mayor rango dinámico para las señales de fluorescencia dependientes de Ca^{2+} se obtiene cuando el fluoróforo se excita a 340 nm, en la que la fluorescencia cambia de forma directamente proporcional al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y 380nm, en la que la fluorescencia cambia de forma inversamente proporcional al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La ratio de las intensidades de fluorescencia emitidas a 510 nm nos da una estimación de los cambios la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 29). Usando la ratio de las intensidades de fluorescencia emitidas por la excitación a esas dos λ conseguimos minimizar el efecto de una distribución irregular del marcador fluorescente y el *photobleaching*, ya que deberían afectar a ambas medidas con la misma magnitud.

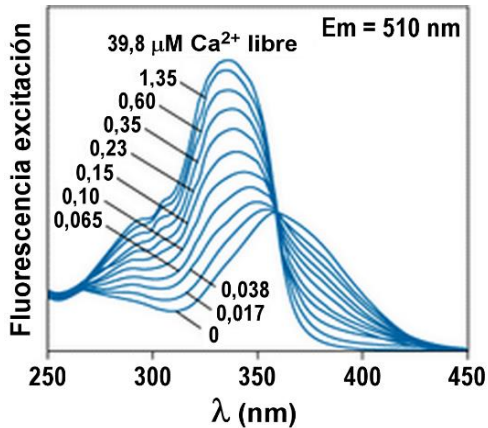


Figura 29: Espectro de fluorescencia FURA-2.

Espectro de fluorescencia de excitación del FURA-2 a distintas concentraciones de Ca^{2+} libre. El mayor rango dinámico para las fluorescencias dependientes de Ca^{2+} se obtienen cuando excitamos a 340 nm y 380 nm. La emisión se recoge a 510 nm. *Modificado de (www.thermofisher.com).*

A. Microscopio.

La fluorescencia fue monitorizada usando un microscopio invertido “Nikon Eclipse TS-100” equipado con un objetivo 20X flúor (0,75 NA). Este microscopio está equipado con un espejo dicróico de 510 nm y filtros de emisión para la misma longitud de onda, lo que nos permitió hacer incidir la luz, que proviene de una fuente de luz (monocromador), sobre las células y recolectar la fluorescencia emitida por las mismas.

B. Cámara CCD.

La imagen fue captada con una cámara CCD de 12 bits sensible a la luz acoplada al microscopio invertido (“Cooke PixelFly”, ASI, USA.).

C. Monocromador.

Para seleccionar las longitudes de onda necesarias para la excitación del FURA-2, 340 nm y 380 nm, utilizamos un monocromador, que no es más que dispositivo óptico que permite seleccionar y transmitir una estrecha banda de longitudes de onda, a partir de una fuente emisora (lámpara de xenón) que produce una amplia gama de longitudes de onda.

D. Software.

Para el análisis y control de las fluorescencias de emisión y excitación se usó el programa “InCyt Im2” (Intracellular Imaging Inc., UK) que permite registrar al mismo tiempo la fluorescencia emitida con las dos longitudes de onda de excitación y realizar el cociente o “ratio” entre ambas. Las células se excitaron a 340 y 380 nm y la longitud de onda emitida se recolectó a 510 nm. La estimación de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ se obtuvo a partir de la ratio (R) entre las señales de F340/F380 nm (Smani y cols., 2003).

2.1.3 Microscopía.

A. Microscopía convencional.

Microscopio óptico.

Para la adquisición de imágenes de epifluorescencia se utilizó un microscopio invertido "IX71" (Olympus, Tokio, Japón). Consiste en un sistema equipado para la adquisición de imágenes en campo claro, con y sin utilización de contraste interferencial de *Nomarski*, y de fluorescencia.

El sistema está equipado con una lámpara halógena y una fuente de iluminación tipo LED "Precis Excite", una cámara digital en color profesional para microscopía DP72, con resoluciones de hasta 4140 x 3096 y unos filtros para excitación en UV (entre 360 – 370 nm), en azul (entre 470 – 490 nm) y en verde (entre 530 – 550 nm). Para la adquisición empleamos dos objetivos principalmente, 20x (LUCPLFL20x/0.45) y 40x (LUCPLFL40x/0.60).

Software.

Para la adquisición de imágenes se utilizó un software de análisis de imagen intuitivo para aplicaciones biomédicas en microscopía "CellSens, CELL-A", integrando control de cámaras y microscopio monitorizado y adquisición de imágenes con autofocus, mediciones interactivas, edición... Para el procesado de las mismas, se empleó el software Image J, de libre distribución (National Institutes of Health, USA).

B. Microscopía confocal.

Microscopio confocal.

Para la adquisición confocal directa de la fluorescencia en células o tejido, utilizamos un sistema espectral confocal y multifotónico "TCS SP2" (Leica).

Este sistema permite crear un solo plano focal, así como toda una serie de planos (horizontales o verticales). Un corte único vertical o un barrido XZ, ofrece una vista lateral de la muestra. La recogida de una secuencia de cortes ópticos de la muestra como lote de imágenes y su posterior procesamiento digital presenta la ventaja de que este bloque de datos de varias dimensiones permite generar una imagen bidimensional calculada (proyección) o una representación reducida en 3 dimensiones de la muestra.

El sistema TCS SP2 de Leica está equipado con un microscopio "DM IRE2" motorizado, una lámpara halógena y de mercurio y varios láseres: Diodo-azul 405 nm, Argón-Kriptón 458–514 nm, DPSS561 561nm, Helio-Neón 543 nm y Helio-Neón 633 nm. Para la adquisición se utilizó principalmente un objetivo de inmersión con un aumento de 63x (HCX PI Apo CS 63x/1,3).

Software.

La adquisición de las imágenes se realizó utilizando la plataforma de software integrada, "LAS AF" (*Leica Application Suite*; Leica Microsystems, Alemania). Para el procesado de las mismas, se empleó el software Image J, de libre distribución (National Institutes of Health, USA).

2.1.4 Criostato.

El criostato utilizado es un criostato clínico para cortes de gran calidad "CM1950" (Leica), que puede congelar hasta -35°C de T^{a} . En el laboratorio, las muestras se procesaban a una T^{a} entre -20°C y -25°C .

Para realizar los cortes en criostato hemos utilizado OCT (*Optimum Cutting Temperature*; Sakura Finetek, USA), un medio sintético que favorece la realización de cortes en criostato a T^{a} muy bajas (-20°C). El OCT es una mezcla comercial de alcohol polivinílico, polietilenglicol y excipientes de composición reservada que nos permite la inclusión de la biopsia sin fijación previa, ya que a esa T^{a} se detienen los procesos biológicos de la muestra y la hace apta para estudios inmunohistoquímicos. Una vez obtenidos los cortes y adheridos sobre portaobjetos, el cambio de T^{a} (de -20° a T^{a} ambiente) provoca la desecación de los tejidos, manteniendo a las enzimas proteolíticas inactivas. Sin embargo, antes de comenzar con las tinciones inmunohistoquímicas es conveniente fijar los cortes histológicos con algún agente químico adecuado (acetona fría, vapores de formol, metanol...), a fin de evitar que se reinicie la actividad proteolítica.

2.2 Soluciones.

2.2.1 Solución para registro de la contractilidad arterial.

Para el registro de la fuerza isométrica, se utilizó solución Krebs cuya composición se muestra en la Tabla 1.

Composición	Concentración (mM)
NaCl	118,5
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	24,8
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
Glucosa	5

Tabla 1: composición de la solución de Krebs.

2.2.2 Solución para aislamiento de CMLVs.

Para realizar la dispersión de CMLVs de aorta de ratón, utilizamos solución de dispersión o SD (pH = 7,4), cuya composición se describe en la Tabla 2.

Composición	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	5,4
CaCl ₂	0,2
NaHCO ₃	4,17
MgCl ₂	2
NaH ₂ PO ₄	0,42
KH ₂ PO ₄	0,44
HEPES	10
Glucosa	11,11
EGTA	0,05

Tabla 2: composición de SD.

2.2.3 Solución para registro de la [Ca²⁺]_i.

Las CMLVs se incubaron con el marcador fluorescente FURA-2 en la misma SD en la que se hizo la dispersión celular y, posteriormente, para realizar los registros de la [Ca²⁺]_i, utilizamos una solución salina fisiológica estándar (PSS, *Physiological Salt Solution*; pH = 7,4) (Tabla 3):

Composición	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	2,7
CaCl ₂	2,5
MgCl ₂	1
HEPES	10
Glucosa	10

Tabla 3: composición de PSS.

Únicamente para registrar los cambios en la [Ca²⁺]_i producidos por la entrada de Ca²⁺ a través de LTCCs se utilizó otra solución distinta a la estándar, con alta concentración de KCl (70 mM), para inducir la despolarización de la membrana celular y activación de estos canales; (PSS 70K; pH = 7,4) (Tabla 4):

Composición	Concentración (mM)
NaCl	70
KCl	70
CaCl ₂	2,5
MgCl ₂	1
HEPES	10
Glucosa	10

Tabla 4: composición de PSS 70K.

2.2.4 Soluciones Western Blot.

Para la realización de los Western Blots se emplearon todas las soluciones detalladas en la Tabla 5:

Laemmli sample buffer, 2x (Sigma):		Tris-Glicina 10x, pH 8,5:	
Composición	Cantidad	Composición	Cantidad
Tris HCl pH 6,8	125 mM	Tris-Base	0,25 M
Glicerol	20%	Glicina	1,92 M
SDS	4%	Transfer Buffer:	
Azul Bromofenol	0,004%	Composición	Cantidad
Running Buffer:		Tris-Glicina 10x	10%
Composición	Cantidad	Metanol	20%
Tris-Glicina 10x	10%	TBS-T (TBS- <i>Tween</i>) 1x:	
SDS 10x	0,1%	Composición	Cantidad
TBS (<i>Tris-Buffered Saline</i>) 10x, pH 7,5:		TBS 10x	10%
Composición	Cantidad	Tween20	0,1%
Tris Base	0,1 M	Solución de Bloqueo (en TBS-T 1x):	
NaCl	1,5 M	Composición	Cantidad
Solución de Bloqueo (en TBS-T 1x):		Leche	5%
Composición	Cantidad		
Leche	5%		

Tabla 5: composición de las soluciones para Western Blots.

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida a distinto % (*resolving gel*) en función de la proteína en estudio. Para estudiar Orai1, se utilizó un gel de acrilamida al 10%, mientras que para estudiar el canal Ca_v1.2, se utilizó un gel al 8%. La composición de los geles se detalla en la Tabla 6.

	Stacking	Resolving	
	4%	8%	10%
H ₂ O	6 ml	4,6 ml	4 ml
30% Acrilamida mix	1,3 ml	2,7 ml	3,3 ml
Tris-Cl (1,5 M; pH 8,8)		2,5 ml	2,5 ml
Tris-Cl (0,5 M; pH 6,8)	2,5 ml		
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS (10%) (Ammonium Persulfate)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	10 µl	6 µl	4 µl
TOTAL	10 ml	10 ml	10 ml

Tabla 6: composición geles de acrilamida.

2.2.5 Soluciones inmunofluorescencia.

A. Inmuncitofluorescencia.

Para bloquear las uniones inespecíficas, utilizamos la siguiente solución de bloqueo, en PBS a pH 7,4 (Tabla 7):

Composición	Cantidad
Goat Serum	3%
BSA (Bovine Serum Albumin)	1%

Tabla 7: composición de la solución de bloqueo en Inmuncitofluorescencia.

Durante la técnica *in situ Proximity Ligation Assay* (PLA), los tratamientos de las CMLVs con fármacos o drogas se realizaron en PSS, descrita anteriormente. Por otro lado, para los lavados, utilizamos dos tampones distintos (Sigma), en agua bidestilada (H₂O_{bd}) (Tabla 8):

	Composición	Cantidad
Tampón A	TRIS	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05%
Tampón B	TRIS	200 mM
	NaCl	100 mM

Tabla 8: composición de los tampones de lavado PLA.

B. Inmunohistofluorescencia.

Para bloquear las uniones inespecíficas, utilizamos la siguiente solución de bloqueo, en PBS a pH 7,4 (Tabla 9).

Composición	Cantidad
Goat Serum	10%
BSA (Bovine Serum Albumin)	1%

Tabla 9: composición de la solución de bloqueo en inmunohistofluorescencia.

2.3 Farmacología.

2-aminoetil-difenil borinato (**2APB**) (Sigma Aldrich): inhibidor de los SOCCs.

Acetilcolina (**Ach**) (Sigma Aldrich): sustancia vasoactiva liberada por el endotelio que produce una relajación en CMLVs dependiente de endotelio.

BayK-8644 (**BayK**) (Sigma Aldrich): agonista de los LTCCs que aumenta la probabilidad de apertura de los mismos, incrementando la vasoconstricción en CMLVs.

Cafeína (**Caf**) (Sigma Aldrich): activador de los RyRs del RS. Induce la liberación masiva de Ca^{2+} del RS a través de estos receptores.

Cloruro Potásico (**KCl**) (Sigma Aldrich): compuesto químico que produce, a altas concentraciones, despolarización de la membrana plasmática y activación de VDCCs.

Cromakalim (**Crom**) (Sigma Aldrich): activador de canales de K^{+} dependientes de ATP ($\text{K}_{\text{ATP}}^{+}$) que provoca hiperpolarización e inactivación de los LTCCs.

Endotelina-1 (**ET-1**) (Sigma Aldrich): potente agonista vasoconstrictor en CMLVs. Media su acción tras unirse a GPCRs, induciendo la producción de IP_3 y activando SOCE.

Fenilefrina (**Phe**) (Sigma Aldrich): agonista de receptores α_1 -adrenérgicos que media la vasoconstricción en CMLVs induciendo la producción de IP_3 y la activación de SOCE.

Gadolinio (**Gd³⁺**) (Sigma Aldrich): inhibidor de SOCE.

Glibenclamida (**Gli**) (Sigma Aldrich): antagonista selectivo de los canales $\text{K}_{\text{ATP}}^{+}$ que bloquea el efecto del cromakalim.

GSK-7975A (**GSK**) (Aobious): inhibidor potente de los SOCCs, específico de Orai1.

ML-9 (Sigma Aldrich): inhibidor de SOCE.

Nifedipina (**Nif**) (Sigma Aldrich): bloqueante de los LTCCs del tipo dihidropiridina.

Serotonina (**5-HT**, 5-hidroxitriptamina) (Sigma Aldrich): neurohormona que se une a receptores 5-HT, un receptor GPCR que induce la producción de IP_3 , activación de SOCE y vasoconstricción en CMLVs.

Tapsigargina (**TG**) (Sigma Aldrich): inhibidor no competitivo de la bomba SERCA. Impide la recaptación de Ca^{2+} del RS, induciendo el vaciado pasivo del reservorio y la activación directa de SOCE.

Valinomicina (**Val**) (Sigma Aldrich): ionóforo de K^+ que provoca hiperpolarización de la membrana plasmática e inactivación de los LTCCs.

2.4 Metodología.

2.4.1 Modelo animal.

Casi la totalidad de los experimentos se han realizado en un modelo animal de ratón. Sin embargo, alternativamente se ha utilizado un modelo animal de rata para corroborar los datos obtenidos en otra especie y territorio vascular diferente.

Los animales estuvieron en condiciones óptimas de estabulación, manteniendo las variables ambientales naturales de T° , humedad e iluminación adecuadas. Todos los experimentos se realizaron según la legislación española de protección animal (Real Decreto 53/2013), de acuerdo con la directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo, y aprobado por el Comité de Ética de Cuidado Animal del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) de Sevilla.

A. Ratón C57BL/6.

El tejido vascular se obtuvo de ratones de la cepa C57BL/6 de unos 3 - 6 meses de edad, que fueron sacrificados mediante la administración intraperitoneal de una dosis letal de tiopental sódico (200 mg/Kg). Se realizó una toracotomía y laparotomía con objeto de extraer la aorta torácica rápidamente para la realización de los experimentos.

B. Rata Wistar.

Como hemos comentado anteriormente, alternativamente se obtuvo tejido vascular de ratas de la cepa Wistar, de un peso aproximado de 250 g y 2 - 4 meses de edad. Estos animales, igualmente, fueron sacrificados mediante la administración intraperitoneal de una dosis letal de tiopental sódico (200 mg/Kg) y se les realizó una toracotomía con el objeto de extraer el corazón. Una vez obtenido el corazón, se disecó la arteria coronaria descendente anterior para la realización de los experimentos.

C. Ratón knock-out de $\text{Ca}_v1.2$.

Como herramienta alternativa a la farmacología para estudiar los LTCCs en ratones C57BL/6, utilizamos ratones knock-out del canal $\text{Ca}_v1.2$ ($\text{Ca}_v1.2^{\text{KO}}$), concretamente la subunidad α_1 , formadora del poro del canal. De la misma forma que con los ratones C57BL/6, se obtuvo el tejido vascular de ratones $\text{Ca}_v1.2^{\text{KO}}$ de unos 3 - 6 meses de edad, sacrificados mediante la administración intraperitoneal de una dosis letal de tiopental sódico (200 mg/Kg).

Generación y mantenimiento de ratones knock-out $Ca_v1.2$.

Los ratones $Ca_v1.2^{KO}$ fueron generados en el instituto de farmacología y toxicología de Múnich, en Alemania (Moosmang y cols., 2003; Fernandez-Tenorio y cols., 2010) y cedidos por los Drs. José López Barneo y Antonio Castellano (Instituto de Biomedicina de Sevilla, España).

Estos ratones, con un *background* genético C57BL/6, pueden tener 3 posibles alelos para el gen que codifica para la subunidad $Ca_v1.2$, el gen *CACNA1C*. En el alelo L1, los exones 14 y 15 están delecionados, generándose un codón de stop prematuro y por tanto pérdida de función del gen. El alelo L2 posee los exones 14 y 15 *floxeados* y codifica una subunidad $Ca_v1.2$ funcional, es decir, parte de la secuencia del gen está flanqueada por dos sitios loxP. El alelo + se corresponde con un alelo no modificado. Aparte, estos ratones contienen, en el locus del promotor *SM22 α* específico de músculo liso, un gen añadido [Knock-in, (ki)] que codifica para una proteína de fusión de Cre recombinasa unida al receptor de estrógeno (ER) y controlada por tamoxifeno (T2) [SM-Cre ER^{tr}(ki)]. De esta manera, tenemos un ratón doble transgénico knock-out condicional específico de tejido.

En los experimentos, como animales knock-out, utilizamos ratones con alelos L1 y L2 para el gen $Ca_v1.2$ y que expresaran la recombinasa Cre inducible [$Ca_v1.2$ L1/L2, SM-Cre ER^{tr}(ki) +/Cre]. Sólo en estos experimentos, como animales controles utilizamos ratones wild type (WT) que expresaran la recombinasa Cre inducible, pero con alelos + para el gen $Ca_v1.2$ [$Ca_v1.2$ +/+, SM-Cre ER^{tr}(ki) +/Cre]. Para inducir la recombinación Cre específica de músculo liso (conversión de alelo L2 a L1 in vivo), los animales fueron tratados durante 5 días con tamoxifeno (inyección intraperitoneal, 500 mg/Kg/día), disuelto en aceite de maíz (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml. Los experimentos se realizaban a los 16 - 18 días después de la primera inyección, antes de que presentaran síntomas letales por la ausencia total de LTCCs.

Genotipado de ratones $Ca_v1.2^{KO}$.

Para poder realizar el genotipado de los ratones mediante PCR convencional, primero tuvimos que extraer el ADN genómico.

Para ello, tratamos las biopsias, obtenidas mediante la amputación de las falanges durante el marcaje de los ratones, con un Kit de lisado "DirectPCR Lysis Reagent (Tail)" (Viagen Biotech). Por cada biopsia, se añadieron 200 μ l del reactivo junto con 0,3 mg/ml de proteinasa K (Sigma), para degradar proteínas y lípidos, y se incubaron a 55 °C en un termoagitador a 800 rpm durante 2:30 h. Posteriormente, se incubaron los lisados a 75 °C sin agitación durante 45 min, con objeto de inactivar la proteinasa K. Por último, el producto resultante se centrifugó durante 5min a máxima rpm para recoger el sobrenadante y con ello el ADN genómico. Este ADN se conservó a -20 °C hasta realizar la PCR.

La PCR convencional se llevó a cabo mediante la polimerasa "MyTaq DNA Polymerase" (Bioline), según las instrucciones del fabricante, en un termociclador (Biorad). Esta enzima proporciona amplificaciones más robustas que otras polimerasas y se suministra con un

tampón rojo, conteniendo dNTPs, $MgCl_2$ y amplificadores a concentraciones adecuadas que evitan la necesidad de realizar una optimización previa. Además, nos permite cargar directamente el producto de PCR en el gel de agarosa para llevar a cabo la electroforesis sin necesidad de añadir tampón de carga. Por lo tanto, tan sólo teníamos que añadir la muestra (1 μg ADN genómico), los oligonucleótidos específicos para los genes de Cav1.2 y recombinasa Cre (20 μM , ver Tabla 10), H_2O y el tampón de reacción “MyTaq Red Reaction Buffer” (5x).

Gen	Etiqueta Oligo	Secuencia	Casa Comercial
Cav1.2 (CACNA1C)	VI4	5' TGGCCCCTAAGCAATGA 3'	Sigma
	VI8	5' AGGGGTGTTTCAGAGCAA 3'	
	VI10	5'-CCCCAGCCAATAGAATGCCAAT-3'	
Cre	RF67	5' CTCAGAGTGAAGGCCTGCTT 3'	
	RF90	5' CACACCATTCTTCAGCCACA 3'	
	SC135	5' GGCGATCCCTGAACATGTCC 3'	

Tabla 10: Oligonucleótidos utilizados en el genotipado de ratones Cav1.2^{no}.

La tabla muestra los genes cuya expresión fue estudiada mediante PCR convencional utilizando los oligonucleótidos correspondientes, con su etiqueta y secuencia completa, adquiridos en Sigma.

A los productos de la PCR convencional (condiciones en Figura 30) se les hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 120 V durante 40min y se observaron en un sistema de documentación de geles de agarosa “Bio Doc-it Imaging System” (UVP).

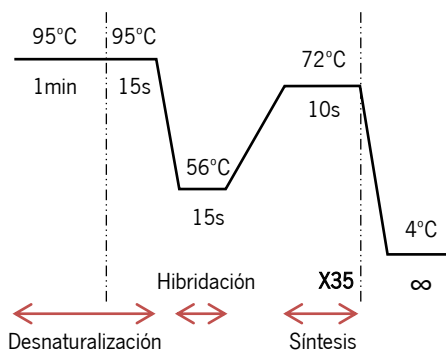


Figura 30: condiciones PCR convencional para el genotipado de ratones Cav1.2^{no}.

2.4.2 Registro de la contractilidad arterial.

A. Extracción y preparación del tejido vascular.

Las arterias, una vez extraídas, se colocaron en solución Krebs burbujeada con 5% CO_2 y 95% O_2 para mantener el pH a 7,4 y se limpiaron de tejido conectivo o adiposo. Posteriormente, se cortaron en anillos de unos 3 mm aproximadamente para proceder con los experimentos en el miógrafo, tras la previa eliminación mecánica del endotelio para centralizar el estudio en la capa de músculo liso.

B. Registro contractilidad arterial en miógrafo.

Los anillos arteriales se montaron en el miógrafo usando unos alambres de acero inoxidable de unos de 40 μm de diámetro. Estos alambres se introdujeron a través de los anillos y se fijaron a los dos brazos existentes, uno de ellos unido, como hemos dicho anteriormente, a un dinamómetro y otro, a un transductor de fuerza; quedando sumergido el anillo en solución Krebs dentro de cada cámara del sistema. Los anillos aórticos de ratón, estando en condiciones fisiológicas (37 °C y burbujeados con 5% CO_2 y 95% O_2), fueron llevados a una tensión basal de 2,5 mN y estabilizados durante, al menos, 1 h. En el caso de las arterias coronarias de rata, la tensión basal se determinó tras la normalización mediante software (ver (Dominguez-Rodriguez y cols., 2012)).

El registro de la fuerza isométrica fue continuo y con una frecuencia de adquisición de 4 puntos por segundo. Los cambios de soluciones en cada cámara se realizaron de forma discontinua mediante la succión de la solución contenida con la ayuda de un equipo de vacío y la posterior administración de la nueva solución mediante una jeringa. Los fármacos usados en estos experimentos fueron administrados directamente a la cámara.

Para evaluar la correcta eliminación funcional del endotelio y su integridad se utilizaron concentraciones crecientes de acetilcolina (hasta 10 μM) para observar la ausencia de dilatación tras la contracción producida por fenilefrina (1 μM).

La respuesta contráctil o la reactividad de la arteria a un determinado estímulo se expresa como incrementos de fuerza o tensión, medida en milinewtons (mN). La contracción se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula, siendo la *tensión final*, la vasoconstricción que se alcanza tras el estímulo y la *tensión basal*, la tensión en situación de reposo obtenida tras el proceso de estabilización:

$$\text{Contracción (mN)} = \text{tensión final} - \text{tensión basal}$$

Como se indica en la mayoría de los experimentos, las respuestas de contracción frente a un estímulo fueron normalizadas a una primera contracción inducida por un estímulo despolarizante como una alta concentración de KCl (70K, 70 mM). Además, se expresaron como porcentaje de los casos control.

2.4.3 Aislamiento de CMLVs.

A. Extracción y preparación del tejido vascular.

Tras la extracción de la arteria, ésta se colocó en SD fría para limpiar todo el tejido conectivo o adyacente. Posteriormente, se cortó la arteria longitudinalmente para eliminar la capa íntima endotelial con la ayuda de una torunda de algodón y se troceó para proceder con la digestión enzimática del tejido.

B. Digestión enzimática del tejido vascular y aislamiento de CMLVs.

La arteria aorta se incubó con 1-2 mg/ml de elastasa (4 U/mg) y 4 mg/ml de colagenasa tipo I (125 U aprox./mg) (Sigma) en SD durante 1 h a 4 °C y después, durante unos 14-

15 min a 37 °C. Cuando el tejido mostraba signos de digestión, los restos se trasladaron a SD sin enzimas y se dispersaron mecánicamente con ayuda de unas pipetas de vidrio de distintos calibres con la punta pulida. Las CMLVs, ya listas para ser empleadas en los experimentos, podían distinguirse fácilmente por su tamaño y su forma fusiforme o elipsoidal típica de músculo liso (Figura 31).

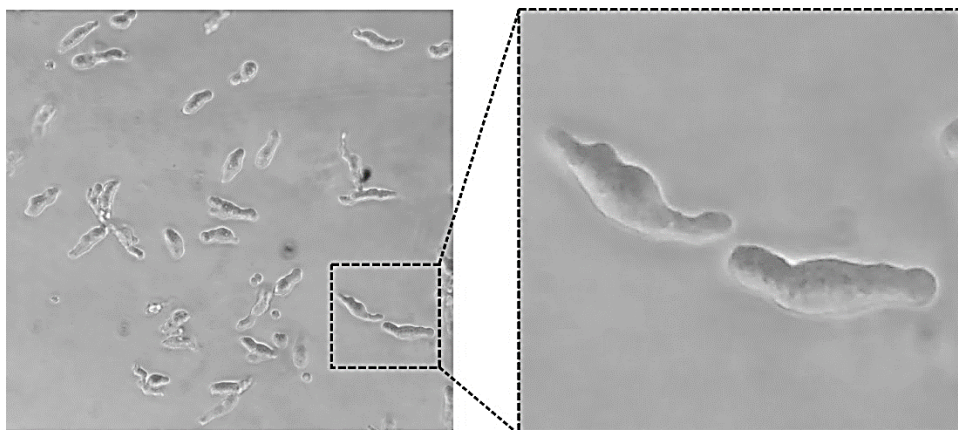


Figura 31: CMLVs aisladas de aorta de ratón.

Para el aislamiento de CMLVs de arteria coronaria de rata, éstas se incubaron con 1 mg/ml de elastasa (4 U/mg) y 2 mg/ml de colagenasa tipo I (125 U aprox./mg) (Sigma) en SD durante 45 min a 4 °C y después, durante unos 12 min a 37 °C.

2.4.4 Registro de la $[Ca^{2+}]_i$.

A. Incubación de CMLVs con FURA-2 AM.

Las CMLVs aisladas se sembraron sobre cubres de pequeño tamaño en la misma SD y se dejaron adherir a la superficie de los mismos durante al menos 15 o 20 min. Posteriormente, se añadieron 2 ml de SD conteniendo FURA-2 AM (Invitrogen), a una concentración de 2,5 μ M, y $CaCl_2$ a 0,5 μ M durante 30 min a T^a ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con SD sin fluoróforo con 1 μ M de $CaCl_2$ y se mantuvieron a 4 °C hasta el inicio de los experimentos.

B. Medida de la $[Ca^{2+}]_i$.

Como explicamos en el apartado 2.1.2, cuando excitamos las células a 340 nm, la fluorescencia emitida cambia proporcionalmente con el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que, a 380 nm, cambia de forma inversamente proporcional al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, (Figura 32A).

De esta forma, podemos determinar la ratio F_{340}/F_{380} (ratio = F_{340}/F_{380}) y las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ tras aplicar un estímulo concreto, ya que los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$, producidos se podrán estimar calculando la diferencia entre el pico máximo de la ratio después de

añadir dicho estímulo y valor basal de la ratio antes de añadir el mismo (Δ ratio) (Figura 32B), expresado en unidades arbitrarias.

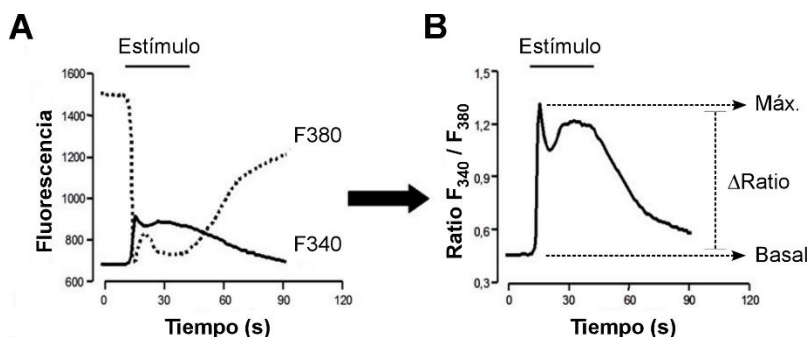


Figura 32: Fluorescencia medida a 340 y 380 nm.

A. Intensidad de fluorescencia registrada a ambas longitudes de onda de excitación tras la aplicación de un estímulo. **B.** Ratio de las fluorescencias obtenidas (F_{340} / F_{380}). La diferencia entre la ratio máxima obtenida y la ratio basal (Δ ratio), nos permite estimar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. *Modificado de (González-Ramos y cols., 2013).*

Los experimentos se hicieron con perfusión continua en PSS a T^a ambiente. Se utilizó PSS 70K con objeto de inducir una despolarización de la membrana plasmática de las células y comprobar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ que tenían lugar debido a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los VDCCs. Los valores de Δ ratio fueron normalizados a la respuesta producida por 70K, cuando fue posible, y expresados como porcentaje de los casos control.

Mediante software, a cada experimento le restamos la señal *background*, establecida fuera de foco, para evitar posibles artefactos que afecten a las fluorescencias y a la señal obtenida.

2.4.5 Transferencia de anticuerpos en anillos arteriales.

A. Chariot como agente de transferencia.

Para estudiar la implicación de algunas proteínas en la contracción intentamos inhibirlas funcionalmente mediante la transferencia de anticuerpos en anillos arteriales de aorta. Para ello, empleamos el método “Chariot” (Active Motif), una nueva técnica de transferencia que elimina muchos problemas que encontramos con otros procedimientos. Chariot es un péptido que forma enlaces no covalentes con otras macromoléculas, de manera que las estabiliza y evita su degradación durante el proceso de transferencia. Cuando se introduce en la célula, Chariot se degrada y deja la proteína completamente libre y activa, ya que es independiente de la vía endosomal, que puede afectar a la integridad de las moléculas durante la internalización.

B. Extracción y preparación del tejido vascular.

El tejido vascular utilizado para la transferencia con Chariot fue aorta de ratones C57BL/6. Una vez extraída la aorta torácica rápidamente, se colocó en SD fría con pH a 7,4 y se limpió de tejido conectivo o adiposo. Ésta se cortó en anillos de unos 3 mm aproximadamente para proceder con los experimentos de transferencia con Chariot.

C. Transferencia de anillos arteriales de aorta.

Para inhibir la función de la proteína Orai1 y estudiar su implicación en la contracción arterial, transferimos el anticuerpo monoclonal *mouse* anti-Orai1 (Novus Biologicals) con éste método (Giachini y cols., 2009; Dominguez-Rodriguez y cols., 2012). Para cada transferencia, se preparó una mezcla con 12 μ l de Chariot diluidos en 100 μ l de DMSO al 40% y 12 μ l de anticuerpo diluidos en 100 μ l de PBS, que se dejó incubar a T^a ambiente durante 30 min para que se formaran los complejos Chariot/Anticuerpo. Una vez formados los complejos, los anillos arteriales se traspasaron a una placa de cultivo con la mezcla (200 μ l) y se añadió 400 μ l de DMEM sin FBS (*Fetal Bovine Serum*), dejándose durante 1 h a 37 °C y 5% CO₂ en un incubador. Posteriormente, se añadieron 750 μ l de DMEM, sin FBS, y se dejó incubar durante 2 h a 37 °C y 5% CO₂ (ver protocolo en Figura 33).

Como control negativo, transferimos los anillos arteriales de aorta mediante el mismo protocolo utilizando únicamente el agente de transferencia Chariot, sin macromolécula.

Los anillos transferidos fueron sometidos a registros de contractilidad en el miógrafo, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y procesados en el criostato para inmunohistofluorescencia, siguiendo el protocolo descrito más adelante.

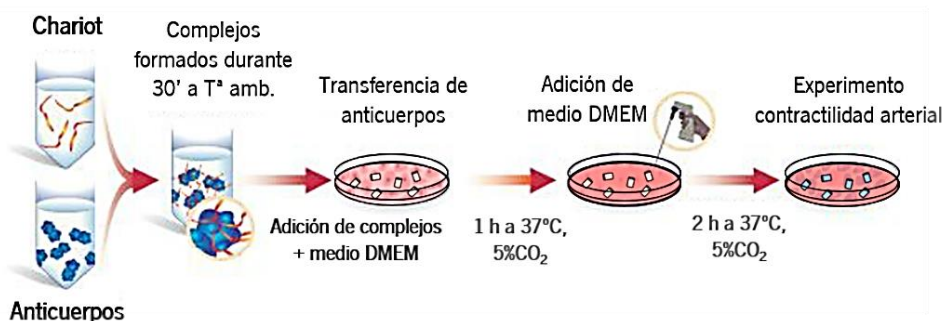


Figura 33: Protocolo resumido de la transferencia de anillos arteriales mediante Chariot.

El anticuerpo anti-Orai1 fue empleado previamente en nuestro laboratorio, comprobando su especificidad (Dominguez-Rodriguez et al. 2012; Rodriguez-Moyano et al. 2013). Adicionalmente, transferimos anillos arteriales con anticuerpos contra TRPC1 (*mouse* anti-TRPC1, Santa Cruz) y Orai3 (*rabbit* anti-Orai3, Alomone), para estudiar el efecto sobre la contractilidad arterial.

2.4.6 Inmunofluorescencia.

A. Inmunofluorescencia en CMLVs.

Siembra de CMLVs en placas “ μ -Slide VI 0,4”.

Una vez aisladas las CMLVs, éstas se sembraron en una placa con 6 canales “ μ -Slide VI 0,4” (IBIDI) de (Figura 34), que se utilizan para llevar a cabo de forma óptima experimentos de inmunofluorescencia con un número reducido de células y pequeños volúmenes de reactivos. Previamente, cada canal de la placa fue tratado con poli-L-lisina (Sigma) durante 5 min para favorecer la adhesión celular al fondo de la misma.

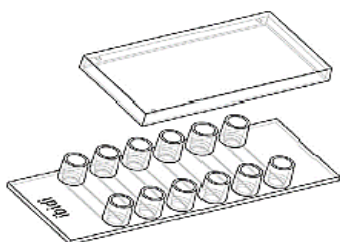


Figura 34: Placa de IBIDI “ μ -Slide VI 0.4” con 6 canales.

Cada placa consta de 6 canales centrales de una capacidad de 30 μ l con dos reservorios a cada lado de unos 60 μ l. Esto nos permite simplificar los protocolos de inmunofluorescencia, conseguir una distribución celular homogénea y reducir los costes del experimento. Las soluciones se introducirán por uno de los reservorios y se succionarán por el otro, como se muestra en la Figura 35. Para la incubación de anticuerpos, se utilizaron 25 - 30 μ l de solución, mientras que para el resto de pasos se usaron 150 μ l de solución.

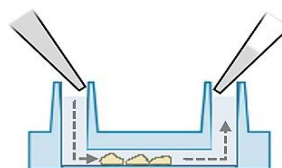


Figura 35: Metodología en placas de IBIDI “ μ -Slide VI 0.4”.

Figura representativa de la metodología seguida en los protocolos de inmunofluorescencia con las placas de IBIDI.

Las células se sembraron en SD y se dejaron decantar durante 15 o 20 min. Una vez adheridas, se retiró la SD que fue sustituida por PSS y posteriormente, se aplicaron distintos fármacos o condiciones en función de los experimentos.

Inmunocitofluorescencia.

➤ Inmunocitofluorescencia múltiple.

Para analizar la localización subcelular de distintos canales, así como una posible colocalización entre los mismos, realizamos una inmunodetección múltiple. Para ello, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol al 100% a -20 °C durante 5 min, como se muestra en la Figura 36. Posteriormente, tras realizar 5 lavados de PBS durante 10 min,

se bloquearon las uniones inespecíficas con solución de bloqueo durante 30 min a T^a ambiente, y se procedió con la incubación de los anticuerpos primarios en estudio.

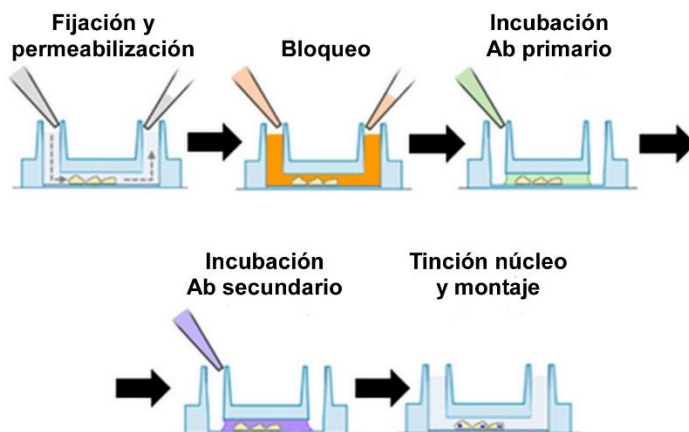


Figura 36: Esquema del protocolo de inmunocitofluorescencia con las Placa de IBIDI “ μ -Slide VI 0.4”.

Se retiró la solución de bloqueo de cada canal y se incubaron con anticuerpos primarios a una concentración indicada en la misma solución, durante 2 h a T^a ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó 5 veces con PBS y se incubó con anticuerpos secundarios en solución de bloqueo durante 45 min a T^a ambiente en oscuridad. Por último, tras lavar 5 veces con PBS durante 10 min, se realizó una tinción con DAPI (Vector Labs; 1:1000 en PBS) durante 5 min a T^a ambiente para marcar los núcleos celulares. Una vez lavadas las muestras del colorante excedente, se añadió medio de montaje fluorescente (Dako, DAKO) y se visualizó en un microscopio invertido IX-71 (Olympus) (ver protocolo resumido en Figura 36).

La inmudetección múltiple se realizó utilizando los anticuerpos primarios y secundarios indicados en la Tabla 11:

Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial	Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
<i>rabbit anti-Ca_v1.2</i>	1:50	Alomone	Alexa Fluor 488 goat anti- <i>rabbit</i>	1:400	Molecular Probes
<i>mouse anti-Orai1</i>	1:100	Novus Biologicals	Alexa Fluor 594 goat anti- <i>mouse</i>	1:400	

Tabla 11: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmudetección múltiple.

Alternativamente, se realizaron experimentos controles con otros marcadores o anticuerpos. Como control negativo, se incubaron los anticuerpos secundarios junto con faloidina-Atto 633 (Sigma, 1:50), una endotoxina que marca únicamente la F-actina de las células; o bien con anticuerpo primario *mouse anti- α -SMA* (Sigma, 1:400), indicándonos la presencia de células de músculo liso.

➤ Fluorescencia *In situ*-PLA.

Para estudiar la colocalización de los canales Cav1.2, TRPC1 y Orai1, utilizamos la tecnología *in situ* PLA (*Proximity Ligation Assay*) “Duolink *in situ* PLA red kit” (Sigma), un ensayo de ligación por proximidad *in situ* que nos permite detectar, visualizar y cuantificar la localización celular de interacciones de proteínas en un mismo experimento mediante fluorescencia y, por tanto, analizar la colocalización de canales de membrana, en este caso, que se expresan endógenamente.

En este ensayo, las muestras se incuban con dos anticuerpos primarios que se unen a las proteínas a detectar (Figura 37A). Posteriormente, se incuban anticuerpos secundarios marcados con oligonucleótidos (sondas PLA) que se unirán al anticuerpo primario correspondiente (Figura 37B). La solución de ligación, que consta de dos oligonucleótidos y enzima ligasa, permitirá que éstos hibriden con las sondas PLA y se unan en un círculo cerrado si las proteínas están muy próximas (Figura 37C). Por último, se incuban las muestras con solución de amplificación, que consta de nucleótidos y oligonucleótidos marcados fluorescentemente junto con una enzima polimerasa. El extremo de una de las sondas PLA actuará como cebador para un producto de amplificación circular usando el círculo ligado como molde, generando así un producto concatémico. Los oligonucleótidos marcados fluorescentemente se hibridarán con el amplicón, pudiéndose distinguir fácilmente como puntos fluorescentes (Figura 37D), de forma que pueden ser cuantificados y asignados a una localización subcelular específica mediante un microscopio de epifluorescencia o microscopio confocal.

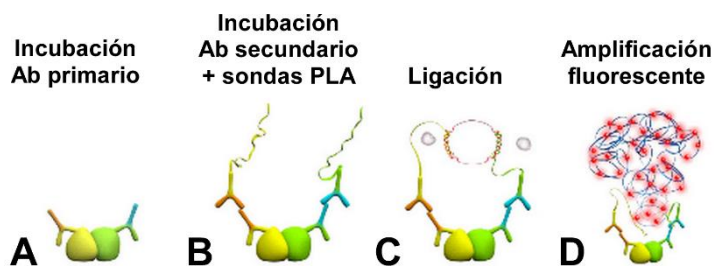


Figura 37: Protocolo resumido del ensayo *in situ* PLA.

A. Los dos anticuerpos primarios se unen a las dos proteínas en estudio. **B.** Los anticuerpos secundarios marcados con sondas de oligonucleótidos específicas se unirán a su anticuerpo primario correspondiente. **C.** Se produce la hibridación de las sondas en un círculo cerrado si las proteínas se encuentran próximas entre sí. **D.** Se genera un producto de amplificación circular, usando el círculo ligado como molde, al que se unen oligonucleótidos marcados fluorescentemente. *Modificado de (www.Sigmaaldrich.com).*

Por tanto, para llevar a cabo un experimento de PLA, necesitamos dos anticuerpos primarios que reconozcan dos epítopos distintos, además de los reactivos adicionales del “Duolink *in situ* PLA red kit” (Sigma), sondas PLA PLUS y MINUS, tampones de lavado y medio de montaje con DAPI.

Las células sembradas en las placas de IBIDI fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol 100% a -20 °C durante 5 min después del tratamiento correspondiente. Después de lavar

las células 5 veces con PBS durante 10 min, las uniones inespecíficas de las mismas se bloquearon durante 30 min a T^a ambiente con solución de bloqueo. Posteriormente, los miocitos se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 h a T^a ambiente en solución de bloqueo. Para los experimentos control, utilizamos únicamente uno de los anticuerpos primarios, control negativo, y dos anticuerpos primarios que reconocen proteínas del citoesqueleto, control positivo.

En los experimentos en los que estudiamos la interacción entre Ca_v1.2 y Orai1, utilizamos los anticuerpos indicados en la Tabla 12.

	Anticuerpos	Dilución	Casa comercial
Control	<i>rabbit</i> anti-Ca _v 1.2 +	1:50	Alomone
	<i>mouse</i> anti-Orai1	1:100	Novus Biologicals
Control Negativo	<i>mouse</i> anti-Orai1	1:100	Novus Biologicals
Control Positivo	<i>rabbit</i> anti-Vimentin +	1:100	Cell Signaling
	<i>mouse</i> anti- α SMA	1:400	Sigma

Tabla 12: Anticuerpos primarios y condiciones utilizados en el ensayo *in situ* PLA Ca_v1.2 - Orai1.

Mientras que en los experimentos para ver la interacción entre Ca_v1.2 y TRPC1, los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

	Anticuerpos	Dilución	Casa comercial
Control	<i>rabbit</i> anti-Ca _v 1.2 +	1:50	Alomone
	<i>mouse</i> anti-TRPC1	1:50	Santa Cruz Biotech.
Control Negativo	<i>mouse</i> anti-TRPC1	1:50	Santa Cruz Biotech.
Control Positivo	<i>rabbit</i> anti-Vimentin +	1:100	Cell Signaling
	<i>mouse</i> anti- α SMA	1:400	Sigma

Tabla 13: Anticuerpos primarios y condiciones utilizados en el ensayo PLA Ca_v1.2 - TRPC1.

Después de eliminar los anticuerpos mediante tampón de lavado A, las células fueron marcadas con sondas (“Duolink PLA anti-*rabbit* PLUS” y “Duolink PLA anti-*mouse* MINUS”) durante 1 h a 37 °C. Tras lavar con tampón de lavado A, incubamos con una solución de ligación durante 30 min a 37 °C que contiene dos oligonucleótidos que hibridarán con las sondas sólo si las proteínas están a **menos de 40 nm** de separación. Posteriormente, lavamos con tampón de lavado A e incubamos con una solución de amplificación durante 100 min a 37 °C, teniendo como resultado un amplicón concatémico circular y marcado fluorescentemente en rojo. Por último, lavamos con el tampón de lavado B, dejamos secar las muestras y montamos las placas de IBIDI con “Duolink Mounting Medium” que incluye DAPI para teñir los núcleos. La señal fluorescente se visualizó en un microscopio confocal.

Adquisición de imágenes en microscopio confocal.

➤ Inmunocitofluorescencia múltiple.

Para establecer la localización subcelular y la presencia de colocalización entre los canales Orai1 y Cav1.2, se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo. Se adquirieron imágenes en un microscopio confocal a intervalos de 0,4 - 0,5 μm con un objetivo de inmersión con un aumento de 63X (HCX PI Apo CS 63 \times /1,3) y se obtuvo la proyección máxima de las mismas. A partir de esta imagen se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (PCC, *Pearson's Correlation Coefficient*) o coeficiente de colocalización usando el *plugin* JACoP de análisis de imágenes dentro del programa Image J, que nos proporciona un valor numérico entre 0 y 1, siendo 0 no colocalización y 1 máxima colocalización. Valores superiores a 0,5 consideran que hay colocalización significativa (McDonald y Dunn, 2013).

La adquisición de los marcadores fluorescentes fue la siguiente: DAPI (excitación a 405 nm, recogida entre 400-450nm), Alexa Fluor 488 nm (excitación a 488 nm, recogida 505-546 nm) y Alexa Fluor 594 (excitación a 594 nm, recogida a 593-667 nm). Alternativamente, se utilizó la configuración Atto-633 (excitación a 633nm, recogida a 570-645 nm).

➤ Fluorescencia *In situ*- Duolink.

Los puntos rojos fluorescentes se visualizaron en un microscopio confocal. La adquisición se realizó tomando secciones en "Z" cada 0,5 μm con un objetivo de inmersión con un aumento de 63X (HCX PI Apo CS 63 \times /1,3) para conseguir una proyección máxima de todas las imágenes (Image J) y poder analizarla con el software "Duolink ImageTool" (Sigma). Este software está especialmente diseñado para cuantificar o contar las señales PLA que obtenemos a partir de las imágenes adquiridas. Para distinguir las células del músculo liso, adquirimos las imágenes con contraste de fase y con DAPI, de forma que los núcleos puedan ser identificados fácilmente y el citoplasma estimado, permitiendo hacer estudios y análisis estadísticos en células aisladas.

La adquisición de los marcadores fluorescentes fue la siguiente: DAPI (excitación a 405 nm, recogida entre 400-450nm) y reactivo rojo (excitado a 594nm, recogida entre 593-667nm).

Todas las figuras fueron procesadas y montadas con el software "ConfocalUniovi 1.5" (Image J). La deconvolución de las mismas se llevaron a cabo con un plugin de filtrado espectral de imágenes "Parallel Spectral Deconvolution" basado en un método generalizado "Tikhonov-reflexive" (Hansen y cols., 2006).

B. Inmunofluorescencia de anillos arteriales.

Cortes histológicos en criostato.

Los anillos arteriales se introdujeron en OCT y, con ayuda de unas pastillas de CO₂, se congelaron rápidamente para preservar el tejido previamente a la realización del estudio inmunohistoquímico. Se realizaron cortes en el criostato de 6 μm de grosor, manteniendo

la T^a de la cámara a -20 °C y la T^a de la muestra a -22 °C. Una vez realizados los cortes y colocados sobre portaobjetos, se dejaron secar a T^a ambiente durante 6 - 12 h y posteriormente se procedió con el estudio inmunohistoquímico.

Inmunohistofluorescencia.

Las secciones arteriales se fijaron con 100% metanol a -20 °C durante 10 min, se lavaron con PBS 5 veces durante 10 min y se bloquearon con solución de bloqueo durante 30 - 60 min. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, se incubaron las muestras con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo, a una concentración indicada en la siguiente tabla, a 4 °C *overnight*. Al siguiente día, después de 5 lavados con PBS de 10 min, los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios en solución de bloqueo (ver tabla) durante 2 h a T^a ambiente. Tras lavar 5 veces con PBS durante 10 min, se realizó una tinción con DAPI (1:1000 en PBS) durante 5 min a T^a ambiente para marcar los núcleos celulares. Por último, las muestras se lavaron con PBS del colorante excedente, se montaron cubreobjetos con ayuda de medio de montaje fluorescente (Dako, DAKO) y se visualizó la señal fluorescente en un microscopio confocal.

En la inmunohistofluorescencia de las muestras de ratones Ca_v1.2^{ko} y WT y en las muestras transferidas con anti-Orai1 mediante Chariot se utilizaron los anticuerpos indicados en la Tabla 14. En las muestras transferidas con anti-Orai1 no se realizó incubación con anticuerpos primarios.

Condiciones	Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial	Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
Ca _v 1.2 ^{ko} vs WT	<i>mouse anti-α-SMA</i>	1:400	Sigma	Alexa Fluor 488 goat anti- <i>mouse</i>	1:400	Molecular Probes
	<i>rabbit anti-vimentin</i>	1:100	Cell Signaling	Alexa Fluor 594 goat anti- <i>rabbit</i>	1:400	
Anti-Orai1	-	-	-	Alexa Fluor 488 goat anti- <i>mouse</i>	1:400	Molecular Probes

Tabla 14: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistofluorescencia.

Para la incubación de los anticuerpos se emplearon unas cámaras de incubación de 200 µl (Electron Microscopy Sciences, USA). Además, en algunos casos, junto con los anticuerpos secundarios, se incubó faloidina-Atto 633 o faloidina-Atto 594 (Sigma, 1:50) como control, una endotoxina que marca la F-actina de las células.

Adquisición de imágenes en microscopía confocal.

La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal a intervalos de 0,5 µM con un objetivo de inmersión con un aumento de 63X (HCX PI Apo CS 63x/1,3).

La adquisición de los marcadores fluorescentes fue la siguiente:

- Para las muestras de ratones Ca_v1.2^{ko} vs WT. DAPI (excitación a 405 nm, recogida entre 400 - 450 nm), Alexa Fluor 488 nm (excitación a 488 nm, recogida 505-546 nm) y Alexa Fluor 594 (excitación a 594 nm, recogida a 593 - 667 nm).

Alternativamente, se utilizó la configuración Atto-633 (excitación a 633 nm, recogida a 570 - 645 nm).

- Para las arterias transferidas con anti-Orai1: DAPI (excitación a 405 nm, recogida entre 400 - 450 nm) y Alexa Fluor 488 (excitación a 488 nm, recogida 505 - 546 nm). Además, también se utilizó la configuración Atto-633 (excitación a 633 nm, recogida a 570 - 645 nm).

En las figuras sólo se muestra una única sección.

2.4.7 Extracción de proteína y Western Blot.

Preparación arterias.

Una vez extraídas las aortas de ratones WT y ratones $Ca_v1.2^{KO}$ y eliminado el tejido conectivo, así como el endotelio de las mismas, se introdujeron rápidamente en una mezcla de acetona fría y sobre hielo con 10% de tricloroacético (TCA) y 10 mM de ditioneitol (DTT) durante 15 min. Posteriormente, las arterias se lavaron en acetona fría sobre hielo con 10 mM DTT y fueron liofilizadas en un liofilizador de laboratorio "LyoQuest" (Telstar) durante toda la noche a baja T^a y presión (ver protocolo (Johnson y cols., 2009)).

Extracción de proteínas.

Antes de realizar la extracción de proteínas, las arterias liofilizadas fueron pesadas en una balanza de ultra precisión para normalizar las cargas de los westerns.

Para la extracción, usamos 1 μ l de tampón de carga "Laemmli sample buffer" (Sigma) por cada 2 μ g de arteria. El tampón de carga está a una concentración 2x, por lo que previamente tuvimos que diluirlo. Antes de realizar la electroforesis, las muestras las calentamos a 95 °C durante 10 min y luego las dejamos rotando durante toda la noche a 4 °C (Johnson y cols., 2009).

Western Blot.

Al día siguiente, realizamos la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE cargando cantidades similares de cada muestra.

Para estudiar los canales de Ca^{2+} $Ca_v1.2$, separamos las proteínas en geles al 8% de poliacrilamida a 120 V durante 2 h aprox. y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) a 0,34 A durante 2 h en un sistema semiseco (Biorad). Para Orai1 o la α -tubulina, que se utilizó como control de carga, separamos las proteínas en geles al 10% de poliacrilamida a 120 V durante 1:30 h y se transfirieron a membranas de PVDF (GE Healthcare) a 0,34 A durante 1:30 h en un sistema semiseco. Para comprobar la correcta transferencia de proteínas a las membranas, éstas se tiñeron con Rojo "Ponceau" (Sigma) durante 5 min en agitación. Una vez comprobado, las membranas se lavaron con TBS-T en agitación y se bloquearon las uniones inespecíficas con solución de bloqueo durante 2 h a T^a ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C en agitación con los anticuerpos específicos diluidos en solución de bloqueo (Tabla 16). Al

día siguiente, después de lavar con TBS-T, incubamos con anticuerpos secundarios durante 1 h a Tª ambiente diluidos en TBS-T (Tabla 15).

Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial	Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
<i>rabbit anti-Cav1.2</i>	1:200	Alomone	HRP-Goat anti- <i>rabbit</i> IgG	1:5000	Jackson Immuno Research
<i>mouse anti-Orai1</i>	1:100	Novus Biologicals	HRP-Goat anti- <i>mouse</i> IgG	1:2000	Jackson Immuno Research
<i>mouse anti-α-tubulin</i>	1:5000	Sigma			

Tabla 15: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western Blot.

La detección de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo mediante el reactivo “ECL prime” de alta sensibilidad (Amersham Bioscience) y el sistema “i.Q LAS 4000 Mini Gold” (GE Healthcare). La cuantificación se realizó mediante un análisis densitométrico de las bandas para cada anticuerpo, normalizadas a su correspondiente señal de α -tubulina, mediante el software “Image J”.

2.4.8 PCR cuantitativa (RT-qPCR, *quantitative Reverse Transcription PCR*).

Para estudiar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de los canales Cav1.2 y Orai1, llevamos a cabo experimentos de PCR a tiempo real con transcripción reversa o RT (*Reverse Transcription*). Para ello utilizamos muestras de aorta tanto de ratones WT como de ratones Cav1.2^{ko}.

Extracción y preparación de tejido vascular.

Tras la extracción de la arteria, ésta se colocó rápidamente en solución Krebs burbujeada para mantener el pH a 7,4. Una vez limpia de tejido conectivo o adiposo, la arteria se sumergió en una solución para la estabilización y conservación de ARN “RNA later” (Ambiom) y se conservó hasta la extracción de ARN.

Homogenización del tejido y aislamiento de ARN

La homogeneización del tejido se realizó en una solución de lisis denominada “QIAzol lysis reagent” (Qiagen), producto similar al “TRIzol”, con ayuda de un homogeneizador de muestras o politrón a velocidad media.

El ARNm se extrajo mediante un kit de extracción “RNeasy mini kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit nos permite una rápida purificación de ARN de alta calidad mediante un método basado en columnas con capacidad de unir hasta 100 μ g de ARN. Mediante una serie de lavados con cloroformo, etanol y tampones de elución, conseguimos aislar finalmente el ARN total en H₂O con un alto grado de pureza, de forma que podemos determinar la cantidad total.

El ARN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un “NanoDrop” (Thermo Scientific). La pureza de la muestra se estimó con la relación A_{260}/A_{280} , considerando que una solución pura de ARN tiene una relación A_{260}/A_{280} de $2 \pm 0,05$.

PCR en tiempo real (qRT-PCR).

- Eliminación de ADN genómico y síntesis de ADN complementario o retrotranscripción.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante un kit de retrotranscripción reversa “QuantiTect Reverse Transcription Kit” (Qiagen). Este kit nos proporciona una rápida y eficiente retrotranscripción de nuestro ARNm y una efectiva eliminación del posible ADN genómico presente en la muestra, en dos únicos pasos. Primero, el ARN se incubó con un tampón especial “gDNA Wipeout Buffer” durante 2 min a 42 °C para eliminar ADN genómico contaminante, obteniendo una muestra lista para la transcripción reversa. Segundo, realizamos la retrotranscripción. Para ello preparamos una master mix conteniendo nuestra muestra, la enzima transcriptasa “Quantiscript Reverse Transcriptase”, el tampón necesario “Quantiscript RT Buffer” y los *primers* para la RT. La reacción tiene lugar a 42 °C y luego es inactivada a 95 °C (Figura 38) y se llevó a cabo en un termociclador (Biorad). En contraste a otros métodos, no hacen falta pasos adicionales de desnaturalización de ARN, hibridación de los *primers* o la digestión de ARNasa H. La muestra resultante, ADN complementario o ADNc, se conservó a -20 °C hasta la realización de la qRT-PCR.

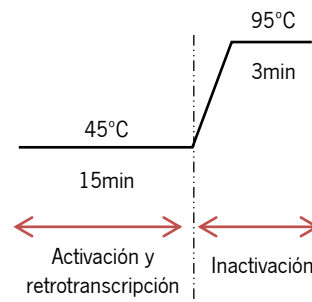


Figura 38: Protocolo de retrotranscripción de ARN.

- Amplificación relativa mediante RT-qPCR.

La expresión génica de los canales en estudio se detectó utilizando sondas TaqMan específicas validadas por Applied Biosystems.

La tecnología TaqMan consiste en un par de *primers* y unas sondas que se unen a la secuencia diana localizada entre los mismos, de manera que lleva a cabo la amplificación de nuestro gen de interés evitando amplificaciones no específicas. Las sondas TaqMan llevan un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido y un desactivador fluorescente o *quencher* al extremo 3'. Cuando los dos componentes están cerca entre sí, no habrá señal fluorescente porque el *quencher* cumple su función inhibidora. A medida que la polimerasa va sintetizando la cadena complementaria en sentido 3'-5', va degradando en sentido 5'-3' la sonda TaqMan unida al ADN, de manera que el fluoróforo quedará libre y emitirá fluorescencia al separarse del *quencher* (Figura 39). La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN de interés presente en el producto de PCR.

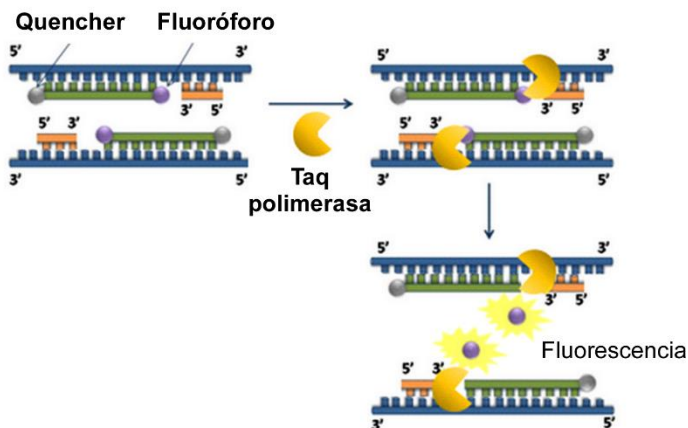


Figura 39: Esquema resumiendo el mecanismo de la tecnología TaqMan.

Los *primers* y sondas se unen a la secuencia diana de interés. La sonda lleva un fluoróforo en el extremo 5' y un desactivador o *quencher* en el extremo 3'. Cuando la polimerasa va sintetizando la cadena complementaria, libera al *quencher* inhibitor, permitiendo que el fluoróforo emita fluorescencia. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN de interés.

Las sondas TaqMan específicas utilizadas para detectar la expresión génica del canal Ca_v1.2 y Orai1, así como la expresión de un gen control, β-actina, pueden identificarse con las referencias mostradas en la Tabla 16.

Gen	Referencia	Casa Comercial
Orai1	Mm00774349_m1	Applied Biosystems
Ca _v 1.2	Mm01188822_m1	
β-actina	4352933E	

Tabla 16: referencia de las sondas TaqMan utilizadas para detectar la expresión de Orai1, Ca_v1.2 y β-actina.

La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl: 10 µl de *master mix* “2x SensiFast Probe Hi-ROX Mix” (Qiagen), 1 µl de la mezcla de *primers* más sondas, 1 µl de ADNc y 8 µl de H₂O. Las condiciones de amplificación son el estándar para la tecnología TaqMan, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C seguidos de 60 segundos a 60 °C (Figura 40). Todas las RT-qPCRs se llevaron a cabo en un sistema de PCR “7900HT Fast Real-Time” mediante el software SDS 2.4 (Applied Biosystems).

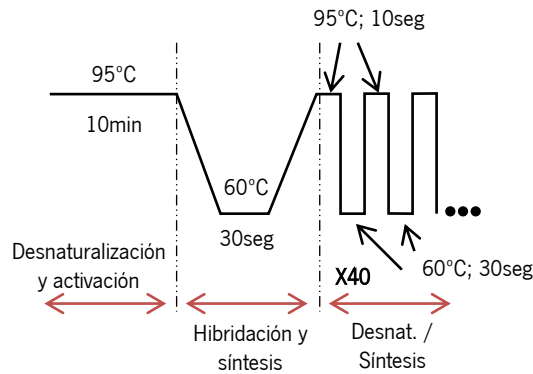


Figura 40: Protocolo RT-qPCR.

Amplificación mediante RT-qPCR con las condiciones estándar para la tecnología TaqMan.

➤ **Cuantificación relativa y análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados mediante el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$ (Schmittgen y Livak, 2008) y el software "DataAssist 2.0". Este método nos permitió comparar el ciclo umbral (Ct) de los genes $Ca_v1.2$ y $Orai1$ normalizado a la expresión de un gen endógeno como la β -actina, calculando el ΔCt :

$$\Delta Ct_{gen} = Ct_{gen} - Ct_{\beta actina}$$

Para ver cómo varía un mismo gen en nuestras diferentes muestras ($Ca_v1.2^{KO}$ vs. WT), calculamos el valor de $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct_{muestra} = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{calibrador}$$

De manera que así podemos calcular la tasa de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de un gen normalizado, $Ca_v1.2$ u $Orai1$, en nuestras muestras WT y $Ca_v1.2^{KO}$ y compararlas. Para hacer las comparaciones estadísticas, se tomó como calibrador la media de los ΔCt WT, de manera que pudiésemos obtener el error estándar de cada grupo.

Para cada grupo, se comprobó que los datos seguían una distribución normal, por lo que pudimos realizar la prueba *t de Student* para muestras independientes y determinar si había diferencias significativas entre $Ca_v1.2^{KO}$ y WT.

2.4.9 Análisis estadístico.

El análisis de los datos se realizó mediante el software "SigmaPlot, v11". Al inicio de cada estudio, se llevó a cabo un cálculo del tamaño muestral necesario. En referencia a los experimentos realizados en ratones $Ca_v1.2^{KO}$, esperábamos un descenso de la vasorreactividad de al menos un 50%, por lo que decidimos incluir entre 3 - 5 animales en cada experimento, teniendo en cuenta un α del 5% y una potencia estadística del 80%, además de los experimentos fallidos.

Para la comparación de medias entre dos grupos se utilizó la prueba *t de Student*, mientras que la comparación entre varios grupos se realizó mediante el análisis de varianzas ANOVA, seguido de un test de comparaciones múltiples de *Tukey*. Los datos se presentan como % de las medias \pm error estándar y fueron normalizados cuando fue posible. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de $p < 0,05$.

3 OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis ha sido caracterizar la comunicación entre canales de Ca^{2+} regulados por reservorios (SOCCs) y canales de Ca^{2+} tipo L (LTCCs), especialmente el subtipo $\text{Ca}_v1.2$, y su papel en la vasoconstricción inducida por agonistas.

Englobado en este objetivo central, podemos destacar otros subobjetivos:

1. Estudiar la implicación fisiológica de los SOCCs en la regulación del tono vascular.
2. Caracterizar el papel de los SOCCs en ratones $\text{Ca}_v1.2^{\text{KO}}$.
3. Caracterizar la relación o comunicación existente entre canales $\text{Ca}_v1.2$ y SOCCs.
4. Determinar el papel de Orai1 y TRPC1 en la vasoconstricción y entrada de Ca^{2+} mediada por agonista.
5. Comprobar la distribución de los canales $\text{Ca}_v1.2$, Orai1 y TRPC1 en células de músculo liso vascular (CMLVs).

4 RESULTADOS

Este trabajo se centra en el estudio del papel de SOCE y los SOCCs en la contracción inducida por agonista y su interacción con los VDCCs, especialmente los LTCCs.

Para estudiar la función contráctil en arteria aorta de ratón utilizamos como agonista la serotonina o 5-HT, una neurohormona que interacciona con receptores 5-HT acoplados a proteína G en CMLVs provocando la liberación de Ca^{2+} del RS mediante la señalización de IP_3 . Este vaciado de los RS induce la activación de los SOCCs y, por tanto, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la vasoconstricción (Figura 41).

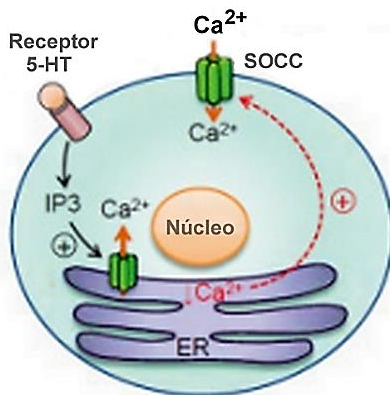


Figura 41: Esquema de la entrada de Ca^{2+} regulada por los reservorios.

Fisiológicamente, la activación de un receptor acoplado a proteína G mediante un agonista (5-HT) puede provocar el vaciado de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} y la activación de SOCE. Modificado de (Chen y cols., 2013).

IP₃: Inositol trifosfato. ER: Reticulo endoplásmico. SOCC: Canal de Ca^{2+} regulado por los reservorios.

4.1 Caracterización de la respuesta contráctil inducida por agonista en aorta.

4.1.1 Contracción inducida por agonista: papel de los LTCCs y los SOCCs.

Antes de estudiar el papel de los SOCCs y los VDCCs, más concretamente los LTCCs, en la contracción inducida por 5-HT en aorta de ratón, quisimos comprobar que la denudación del endotelio se hacía correctamente sin comprometer la integridad funcional de la arteria, y asegurarnos de que la respuesta que inducía la 5-HT era debida únicamente a la capa de músculo liso. En la Figura 42 se observa cómo la contracción inducida por 5-HT (10 μM) en anillos arteriales de aorta de ratón en los que se ha eliminado el endotelio mecánicamente, se produce una menor relajación dependiente de endotelio a concentraciones crecientes de acetilcolina (Ach, *Acetylcholine*), sin llegar a una relajación máxima.

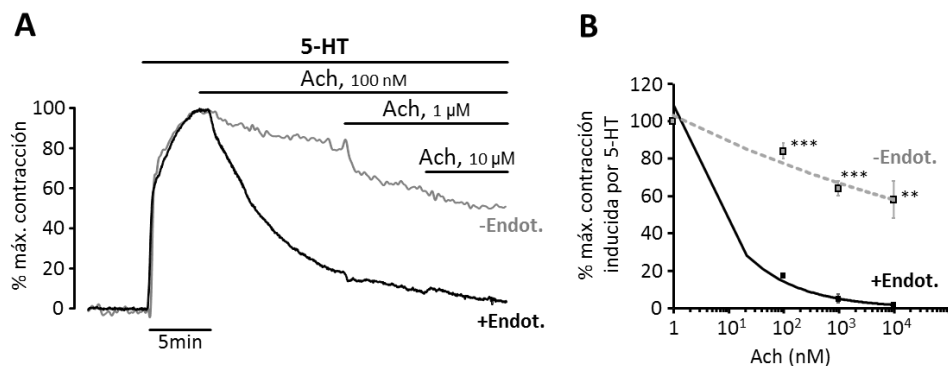


Figura 42: Vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos con y sin endotelio.

A. Registros representativos del efecto de ACh, a concentraciones crecientes (0,1, 1 y 10 μM), sobre la vasoconstricción inducida por 5-HT (10 μM) en anillos aórticos a los se les ha realizado una denudación mecánica del endotelio (- Endot.; n = 3) y en anillos con endotelio intacto (+ Endot.; n = 3). **B.** Línea de tendencia de la relajación dependiente de endotelio que produce la ACh en anillos con y sin endotelio. El gráfico muestra valores medios de contracción en % \pm error estándar, frente a las concentraciones de ACh utilizadas en escala logarítmica. "n" indica el número de anillos aórticos. **p<0,01 y ***p<0,001 vs +Endot.

Una vez comprobado que la denudación se realizaba correctamente, estudiamos la participación de los SOCCs y los LTCCs en la vasoconstricción inducida por 5-HT. Primero comprobamos la integridad de la arteria y la funcionalidad de los LTCCs aplicando un estímulo despolarizante como el KCl a alta concentración (70K, 70 mM) como se muestra en la Figura 43A.

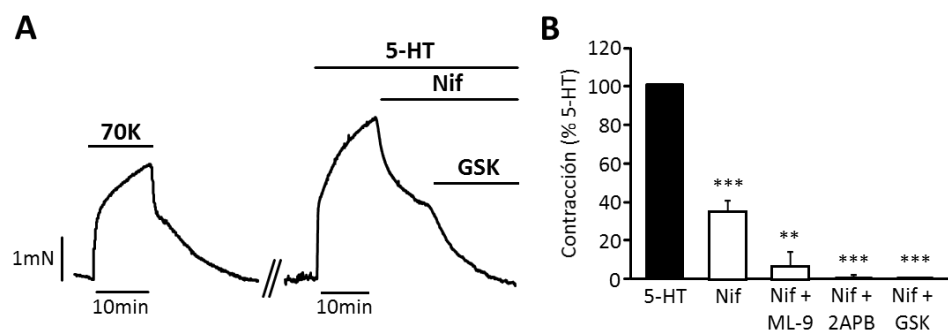


Figura 43. Efecto de inhibidores de LTCCs y SOCCs sobre la contracción inducida por 5-HT en anillos aórticos.

A. Registro representativo de la contracción inducida por un estímulo despolarizante como 70K y 5-HT (10 μM). La adición de nifedipina (Nif, 1 μM) produjo una inhibición parcial de la contracción inducida por 5-HT, que llegó a ser total tras la adición complementaria de GSK (10 μM). Otros inhibidores de SOCE como 2APB (50 μM) o ML-9 (25 μM), en sustitución de GSK, produjeron el mismo efecto relajante. **B.** Resumen de los datos de inhibición de la contracción inducida por 5-HT. La gráfica muestra valores medios de contracción en % \pm error estándar. Nif, 34,08% \pm 4,25; Nif + ML-9, 7,28% \pm 7,28; Nif + 2APB, 0,87% \pm 0,65; Nif + GSK 0,57% \pm 0,57. n = 3-16 anillos aórticos. **p<0,01 y ***p<0,001 vs 5-HT.

Posteriormente, en la misma arteria observamos que la 5-HT (10 μM) producía una vasoconstricción que dependía de los LTCCs, ya que la respuesta era sensible parcialmente

a la nifedipina, a concentraciones incluso superiores a las descritas en otras publicaciones (1 μM) (Egea-Guerrero y cols., 2015). La adición de inhibidores específicos de Orail (GSK-7975A; GSK, 10 μM) (Derler y cols., 2013) o inespecíficos de SOCE (2APB, 50 μM o ML-9, 25 μM ; ver revisión (Tian y cols., 2016)), después de la aplicación de nifedipina, conseguían relajar por completo la contracción inducida por 5-HT (Figura 43B).

Interesantemente, la previa administración de nifedipina no evitó que se produjera la contracción provocada por 5-HT (10 μM), mientras que la aplicación de 2APB (50 μM) o GSK (10 μM) consiguió relajar completamente la arteria (Figura 44). En los anillos arteriales en los que no se había aplicado previamente la nifedipina (control), el 2APB conseguía inhibir el efecto de la 5-HT, a diferencia de lo que ocurría con el inhibidor de los LTCCs aplicado post-estimulo (Figura 44), que sólo producía una relajación parcial.

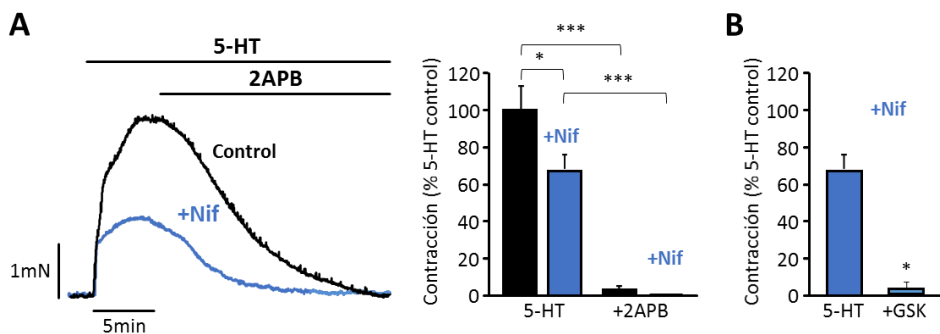


Figura 44. Vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos pretratados con nifedipina.

A. Registros representativos y resumen de los datos de la contracción inducida por 5-HT (10 μM) en anillos aórticos control y anillos tratados previamente con nifedipina durante 10 minutos (Nif, 1 μM). La aplicación de nifedipina previa al estímulo produjo una inhibición parcial de la contracción, que llegó a ser total tras la adición complementaria de 2APB (50 μM). **B.** Resumen de los datos de la Inhibición con GSK (10 μM) de la contracción evocada por 5-HT en anillos pretratados con nifedipina. Los gráficos de barras muestran valores medios de contracción en % normalizados a la respuesta de 70K \pm error estándar. Control: 5-HT, 100% \pm 13,01; 2APB, 3,13% \pm 2,40. Nif: 5-HT, 69,30% \pm 8,45; 2APB, 0,18% \pm 0,13; GSK, 3,20 \pm 3,20. n = 3 - 16 anillos aórticos. *p<0,05 y ***p<0,001 entre grupos indicados.

De igual forma, empleando otro agonista vasoconstrictor, la fenilefrina (Phe, 500 nM), se produjo una contracción en aorta en la que participaban los dos tipos de canales, ya que la adición de nifedipina (1 μM) para inhibir los LTCCs, y 2APB (75 μM) para bloquear los SOCCs, relajó por completo la contracción inducida por este agonista (Figura 45).

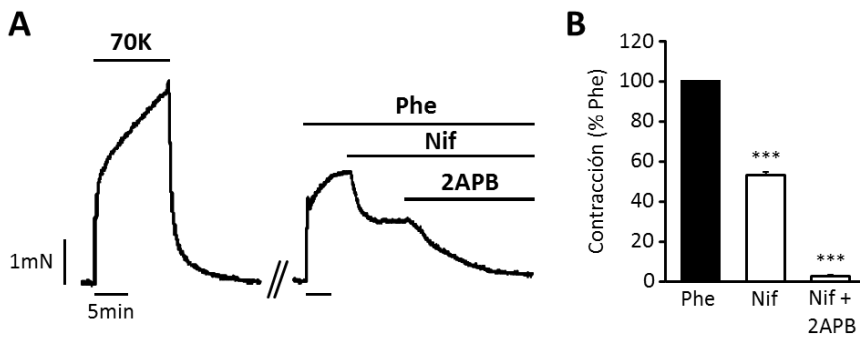


Figura 45. Efecto de inhibidores de LTCCs y SOCCs sobre la contracción inducida por Phe en anillos aórticos.

A. Registro representativo de la contracción inducida por 70K y por Phe (500 nM). La adición acumulativa de nifedipina (Nif, 1 μ M) y 2APB (75 μ M) relajó por completo la arteria. **B.** Resumen de los datos de inhibición de la contracción inducida por Phe. El gráfico muestra valores medios de contracción en % \pm error estándar. Nif, 53,27% \pm 1,83; Nif + 2APB, 2,63% \pm 0,92. n = 4 anillos aórticos. ***p<0,001 vs Phe.

Posteriormente, quisimos comprobar si tenía lugar el mismo mecanismo en otras especies y en otros terrenos vasculares más importantes como la arteria coronaria de rata. En la Figura 46 podemos observar que la endotelina (ET-1, 10 nM), estimuló una fuerte contracción en la arteria coronaria de rata que fue inhibida parcialmente por la nifedipina (Nif, 100 nM). La arteria, de nuevo, se relajó completamente tras la adición complementaria de bloqueantes de SOCE, como gadolinium (Gd^{3+} , 10 μ M) o 2APB (50 μ M), reproduciendo lo que ocurría en aorta de ratón.

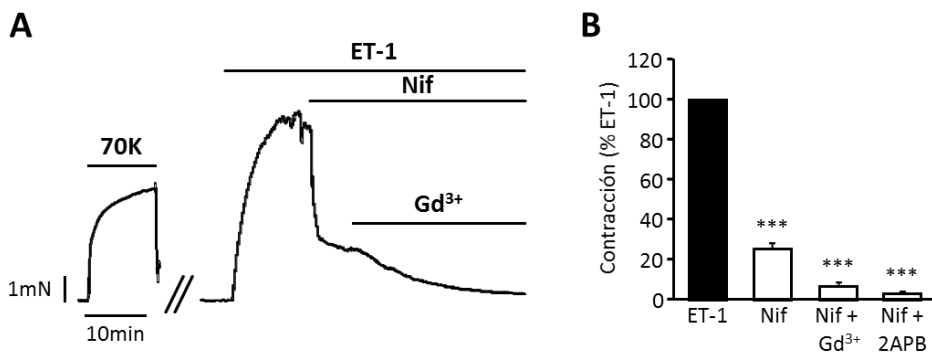


Figura 46: Efecto de inhibidores LTCCs y SOCCs sobre la contracción inducida por ET-1 en arteria coronaria de rata.

A. Registro representativo de la contracción inducida por 70K y ET-1 (10 nM). La adición acumulativa de nifedipina (Nif, 100 nM) y gadolinium (Gd^{3+} , 10 μ M) consiguen relajar la arteria completamente. Otros inhibidores de los SOCCs producen el mismo efecto (2APB, 50 μ M). **B.** Resumen de los datos de inhibición de la contracción provocada por ET-1. El gráfico muestra valores medios de contracción en % \pm error estándar. Nif, 25,46% \pm 2,68; Nif + Gd^{3+} , 6,82% \pm 2,02; Nif + 2APB, 3,16% \pm 1,06. n = 4 - 16 anillos arteriales. ***p<0,001 vs ET-1.

Para demostrar la especificidad de alguno de los inhibidores de SOCE y corroborar que no afectaban a la contracción inducida por 70K, realizamos experimentos control en aorta aplicando 2APB (50 μM) sobre la máxima contracción inducida por KCl (Figura 47), ya que se asume que al ser un estímulo despolarizante, principalmente se activarían LTCCs. Observamos un ligero descenso de la contracción inducida por 70K en presencia de 2APB, pero no tan potente como el de la nifedipina (Nif, 1 μM). Por lo tanto, comprobamos que el inhibidor de los SOCCs actuaba primariamente sobre la contracción inducida por SOCE y no sobre la contracción producida por 70K, ya que sólo inhibe un pequeño porcentaje de la contracción y siempre después de un estímulo prolongado en el tiempo.

Todos estos datos sugieren que la vasoconstricción inducida por agonista, participan dos tipos de canales de Ca^{2+} , los LTCCs y los SOCCs, pudiendo existir una coactivación de ambos en este tipo de respuesta.

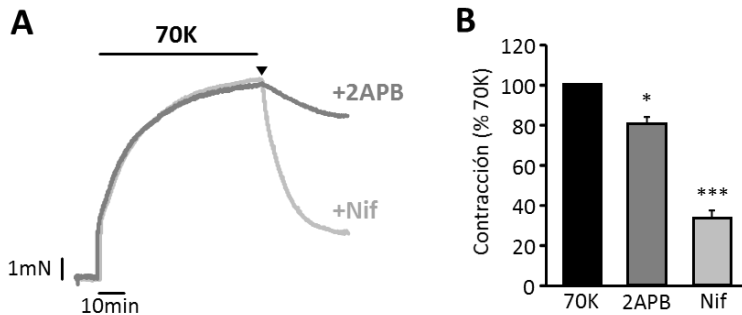


Figura 47: Efecto de inhibidores de LTCCs y SOCCs sobre la vasoconstricción inducida por KCl en anillos aórticos.

A. Registros representativos de la contracción inducida por 70K durante más de 30 minutos y el efecto de inhibidores de canales de Ca^{2+} . La flecha indica el momento en el que se añadieron los inhibidores: nifedipina (Nif, 1 μM) y 2APB (50 μM). **B.** Resumen de los datos de inhibición de la contracción inducida por 70K con nifedipina o 2APB. El gráfico muestra valores medios de contracción en % \pm error estándar. 2APB, 80,68% \pm 3,44; Nif, 33,49% \pm 3,85. n = 4 anillos aórticos. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ vs 70K.

4.1.2 Participación de los LTCCs y SOCCs en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Para comprobar que efectivamente existía la participación de ambos tipos de canales de Ca^{2+} en la vasoconstricción inducida por agonista, desarrollamos experimentos en CMLVs aisladas de aorta de ratón. Aplicamos 5-HT (10 μM) en presencia continua de Ca^{2+} extracelular y observamos los cambios producidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este agonista evocaba un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en dos fases, una rápida y transitoria y otra más prolongada y mantenida (Figura 48). Al final de cada experimento se aplicó cafeína (Caf, 10 mM), que induce la liberación de Ca^{2+} de los reservorios sensibles a rianodina, para comprobar la correcta homeostasis de Ca^{2+} en la célula.

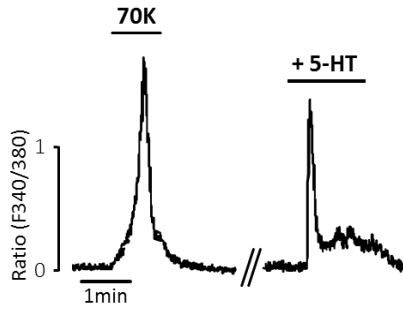


Figura 48: Componentes de la respuesta de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ originada por 5-HT en CMLVs aisladas de aorta de ratón.

Registro representativo de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por 70K y por 5-HT (10 μ M) en condiciones control, reflejando las dos fases rápida y mantenida de la respuesta a 5-HT

La respuesta inducida por 5-HT era sensible a inhibidores de LTCCs, nifedipina (100 nM), y a inhibidores de SOCCs, Gd^{3+} (5 μ M), 2APB (25 μ M), ML-9 (10 μ M) o GSK (5 μ M), aplicados 3 minutos antes del estímulo con el agonista. Además, la administración de nifedipina (100 nM) junto con 2APB (25 μ M) provocaba una mayor supresión del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en comparación con la nifedipina solamente (Figura 49).

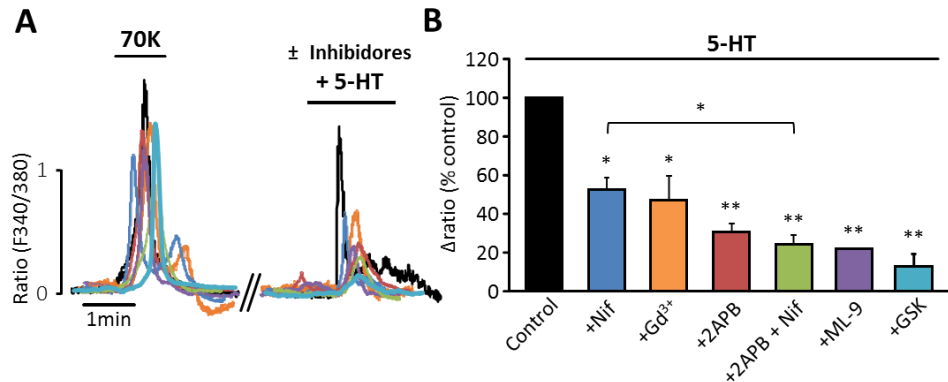


Figura 49: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por 5-HT en CMLVs aisladas de aorta de ratón.

A. Registros representativos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por 70K y por 5-HT (10 μ M) en presencia o ausencia de inhibidores. Los inhibidores fueron añadidos 3 minutos antes del agonista: nifedipina (Nif, 100 nM; azul), gadolinio (Gd^{3+} , 5 μ M; naranja), 2APB (25 μ M, rojo), 2APB + Nif (25 μ M + 100 nM, verde), ML-9 (10 μ M, morado), GSK (5 μ M; azul claro). **B.** Resumen de los datos de la inhibición del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5-HT en CMLVs aisladas. El gráfico de barras muestra valores medios de Δ ratio en % \pm error estándar. Nif, 52,30% \pm 6,20; Gd^{3+} , 47,15% \pm 12,40; 2APB, 30,69% \pm 4,40; 2APB + Nif, 23,89% \pm 5,00; ML-9, 21,76% \pm 0,50; GSK, 12,67% \pm 6,53. n = 48 - 160 CMLVs aisladas de 3 - 11 aortas independientes. * $p < 0,05$ vs control o entre grupos indicados y ** $p < 0,01$ vs control.

En experimentos similares realizados en CMLVs aisladas de coronaria de rata, utilizando otro agonista, la ET-1, obtuvimos resultados equivalentes al aplicar nifedipina (100 nM) o Gd^{3+} (5 μ M) (Figura 50) cuando medimos el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, apoyando la participación de LTCCs y SOCCs en la respuesta mediada por agonista.

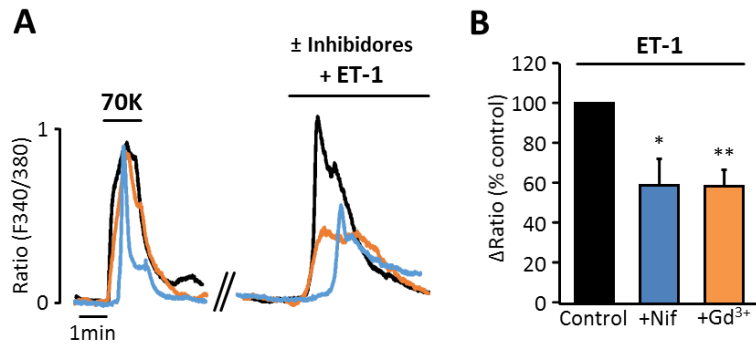


Figura 50: Cambios en la [Ca²⁺] promovidos por ET-1 en CMLVs aisladas de coronaria de rata.

A. Registros representativos de los incrementos de [Ca²⁺] originados por 70K y por ET-1 (10 nM) en presencia o ausencia de inhibidores. Los inhibidores se añadieron 3 minutos antes del estímulo: nifedipina (Nif, 100 nM; azul), gadolinio (Gd³⁺, 5 μM; naranja). **B.** Resumen de los datos de inhibición del incremento de [Ca²⁺] inducido por ET-1. El gráfico de barras muestra valores medios de Δratio en % ± error estándar. Nif, 59,76% ± 13,04; Gd³⁺, 58,88% ± 8,50. n = 59 - 204 CMLVs aisladas de 3 - 7 coronarias independientes. *p<0,05 vs control o entre grupos indicados y **p<0,01 vs control.

En la Figura 51 se muestra cómo los cambios en la [Ca²⁺] originados por 70K no se veían afectados por la aplicación de 2APB (50 μM) o Gd³⁺ (5 μM), por lo que, en correlación con lo que observamos en los registros de contracción (Figura 47), corroboramos que estos inhibidores están actuando principalmente sobre los SOCCs y no sobre los incrementos de la [Ca²⁺] originados por despolarización.

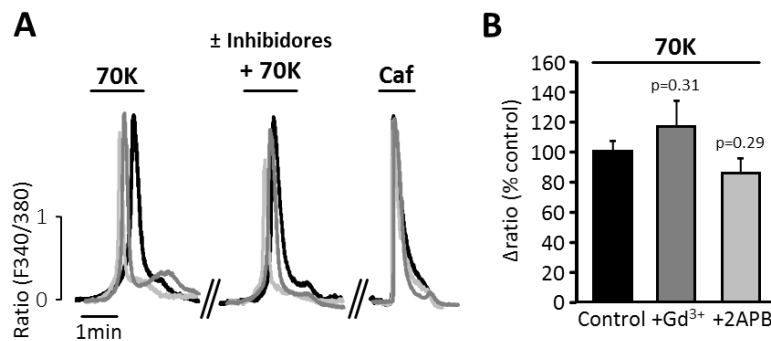


Figura 51: Cambios en la [Ca²⁺] originados por KCl en CMLVs aisladas de aorta de ratón.

A. Registros representativos de los incrementos de [Ca²⁺] originados por 70K y por cafeína (Caf, 10 mM). El segundo estímulo de 70K se aplicó en ausencia o presencia de inhibidores, añadidos 3 minutos antes: gadolinio (Gd³⁺, 5 μM; gris oscuro) o 2APB (50 μM; gris claro). La cafeína se aplicó al final de cada experimento para corroborar una correcta homeostasis de Ca²⁺. **B.** Resumen de los datos de inhibición de las respuestas de 70K en CMLVs aisladas. El gráfico de barras muestra valores medios de Δratio en % normalizado al primer estímulo de 70K ± error estándar. Gd³⁺, 89,86% ± 13,08; 2APB, 65,56% ± 7,82. n = 27 - 88 CMLVs aisladas de 3 - 4 aortas diferentes.

4.2 Vasoconstricción inducida mediante la activación específica de los SOCCs en aorta.

4.2.1 Contracción inducida por TG.

Para activar específicamente los SOCCs y promover SOCE, utilizamos en nuestros experimentos la TG, un agonista farmacológico que, como ya vimos en la introducción, actúa inhibiendo la bomba de recaptación SERCA del RS, produciendo un vaciado pasivo del Ca^{2+} almacenado en el mismo y, con ello, la activación de los SOCCs. En estos experimentos, la TG (10 μM) produjo una vasoconstricción en aorta de ratón sensible a nifedipina (1 μM), aunque en menor proporción comparada con la respuesta inducida por 5-HT. La adición complementaria del inhibidor específico de los SOCCs, GSK (10 μM), e incluso de otros inhibidores como ML-9 (50 μM) o 2APB (50 μM), relajó contundentemente la arteria (Figura 52), indicando la contribución, no sólo específica de los SOCCs, sino también de los LTCCs, en la contracción producida por el vaciado de los reservorios inducido por TG.

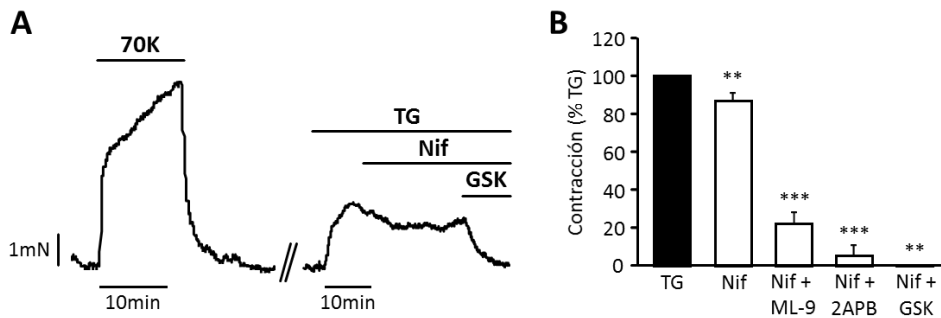


Figura 52: Vasoconstricción inducida por TG en anillos aórticos.

A. Registro representativo de la contracción inducida por 70K y TG (10 μM). La adición de nifedipina (Nif, 1 μM) produjo una leve inhibición parcial de la contracción inducida por TG, que llegó a ser total tras la adición complementaria de GSK (10 μM). Otros inhibidores de SOCE como 2APB (50 μM) o ML-9 (50 μM), en sustitución de GSK, produjeron efectos similares. **B.** Resumen de los datos de inhibición de la contracción inducida por TG. La gráfica muestra valores medios de contracción en % \pm error estándar. Nif, 86,05% \pm 3,84; Nif + ML-9, 21,97% \pm 6,20; Nif + 2APB, 5,37% \pm 5,37; Nif + GSK, 0% \pm 0,00. $n = 3 - 22$ anillos aórticos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. TG.

4.2.2 Papel de los LTCCs y SOCCs en la respuesta de Ca^{2+} a la TG.

En experimentos con CMLVs asiladas de aorta de ratón, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por TG (2 μM), en presencia continua de Ca^{2+} extracelular, disminuía cuando las células eran pretratadas con nifedipina (100 nM), además de 2APB (25 μM), ML-9 (10 μM) y GSK (5 μM) (Figura 53). La aplicación de nifedipina (100 nM) junto con 2APB (25 μM) ocasionó una inhibición adicional, aunque no significativa.

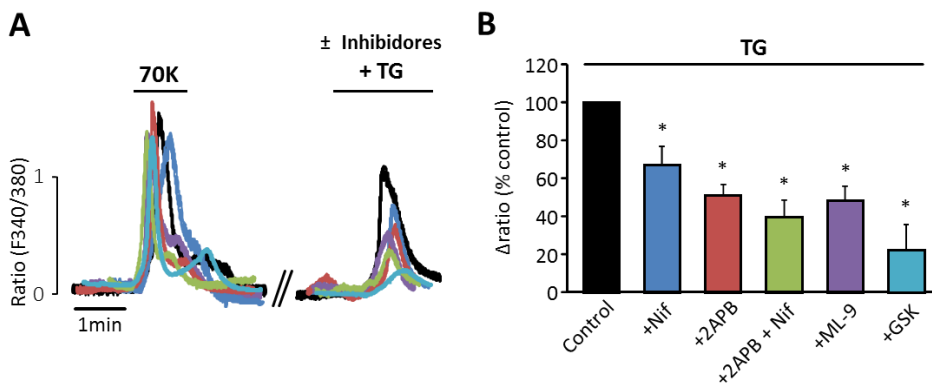


Figura 53: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados por TG en CMLVs aisladas.

A. Registros representativos de $[Ca^{2+}]_i$ originados por 70K y por TG ($2 \mu M$) en presencia o ausencia de inhibidores en CMLVs aisladas de aorta de ratón. Los inhibidores fueron añadidos 3 minutos antes del estímulo: nifedipina (Nif, 100 nM ; azul), 2APB ($25 \mu M$, rojo), 2APB + Nif ($25 \mu M + 100 \text{ nM}$, verde), ML-9 ($10 \mu M$, morado), GSK ($5 \mu M$; azul claro). **B.** Resumen de los datos de la inhibición del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por TG en CMLVs aisladas. El gráfico de barras muestra valores medios de Δ ratio en % \pm error estándar. Nif, $67,51 \pm 9,66$; 2APB, $51,49 \pm 5,45$; 2APB + Nif, $39,86 \pm 8,89$; ML-9, $48,70 \pm 7,36$; GSK, $22,10 \pm 13,71$. $n = 110 - 152$ CMLVs aisladas de 3 - 11 aortas independientes. * $p < 0,05$ vs control.

Estos datos, indican que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por TG engloba la activación de SOCCs, pero también de LTCCs, apoyando los resultados obtenidos en los experimentos anteriores.

4.3 Caracterización de SOCE en ratones knock-out del canal $Ca_v1.2$.

Con estos resultados, quisimos comprobar si SOCE puede compensar la falta de función de los LTCCs, para estudiar más en profundidad su implicación en la regulación del tono vascular. Para ello, utilizamos un modelo de ratón knock-out condicional del canal $Ca_v1.2$ ($Ca_v1.2^{KO}$), el principal tipo de VDCC en músculo liso vascular, y comprobamos los efectos de la 5-HT y la TG. Como animales control, utilizamos ratones wild type (WT), ratones transgénicos a los que se les inducía la expresión de la recombinasa Cre de la misma forma que a los ratones $Ca_v1.2^{KO}$, sin que se produjese recombinación genética alguna.

4.3.1 Determinación de la expresión y funcionalidad de los LTCCs en ratones $Ca_v1.2^{KO}$.

A. Expresión de los canales de Ca^{2+} $Ca_v1.2$.

Los niveles de expresión del canal $Ca_v1.2$ se midieron mediante la técnica RT-qPCR, utilizando como muestras las aortas completas de ratones $Ca_v1.2^{KO}$ y ratones WT. En la Figura 54 observamos cómo los niveles de expresión de ARNm del canal $Ca_v1.2$ eran significativamente menores en los ratones $Ca_v1.2^{KO}$.

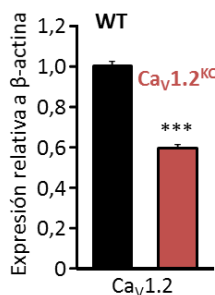


Figura 54: Expresión de ARNm del canal Ca_v1.2 en ratones WT y Ca_v1.2^{KO}.

Diagrama de barras que muestra los valores (media ± error estándar) de expresión del ARNm del canal Ca_v1.2 en aorta de ratones WT y Ca_v1.2^{KO}. El análisis se basó en el método $\Delta\Delta Ct$, normalizando a la expresión de β -actina. WT: $1,00 \pm 0,02$; Ca_v1.2^{KO}: $0,62 \pm 0,02$. n = 7 aortas en cada grupo. ***p<0,001 vs WT.

De igual forma, mediante Western Blot, se corroboró la expresión de la proteína, que fue eficientemente truncada en los ratones Ca_v1.2^{KO} en comparación con los ratones WT (Figura 55).

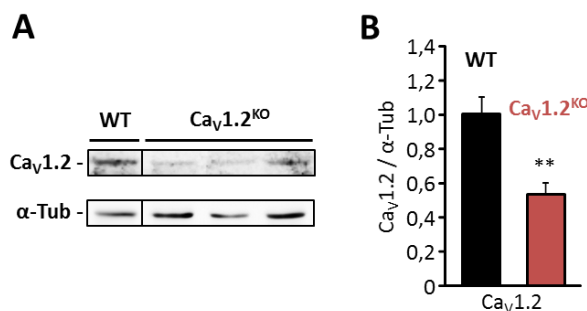


Figura 55: Expresión del canal Ca_v1.2 en ratones WT y Ca_v1.2^{KO}.

A. Western Blot representativo de las proteínas Ca_v1.2 y α -tubulina (α -tub) en aorta de ratones WT y Ca_v1.2^{KO}.
B. Niveles de expresión del canal Ca_v1.2 en ratones WT y Ca_v1.2^{KO}. El gráfico de barras muestra valores medios normalizados a la expresión de la proteína α -tubulina ± error estándar. WT: $1,00 \pm 0,10$; Ca_v1.2^{KO}: $0,59 \pm 0,06$. n = 4 aortas. **p<0,01 vs WT.

B. Respuesta funcional en ratones Ca_v1.2^{KO}.

Las Figura 56 y Figura 57 muestran que la contracción de la aorta y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas inducidos por 70K, eran significativamente menores en los ratones Ca_v1.2^{KO} en comparación con los ratones WT, consistentemente con los resultados obtenidos al medir la expresión del ARNm y proteína del canal Ca_v1.2.

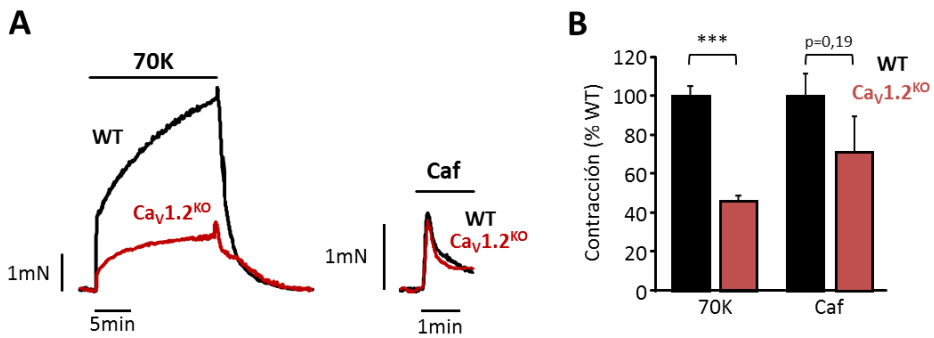


Figura 56: Vasoconstricción inducida por KCl y cafeína en anillos aórticos de ratones WT y Ca_v1.2^{ko}.

A. Registros representativos de la contracción inducida en ratones WT y Ca_v1.2^{ko} por 70K y cafeína (Caf, 10 mM). **B.** Resumen de los datos de la respuesta contráctil inducida por 70K y cafeína en ratones WT y Ca_v1.2^{ko}. El gráfico de barras muestra valores medios de contracción en % ± error estándar. WT: 70K, 100% ± 5,58; Caf, 100% ± 12,10. Ca_v1.2^{ko}: 70K, 51,24% ± 3,17; Caf, 71% ± 18,68. n = 9 - 42 anillos aórticos. ***p<0,001 vs WT.

En estos animales también comprobamos la integridad del RS mediante cafeína (Fernandez-Tenorio y cols., 2010), debido a que los estímulos que posteriormente íbamos a estudiar dependen de una liberación inicial de Ca²⁺ del RS mediante la señalización de IP₃. Observamos que no existían diferencias ni en la contracción en anillos aórticos (Figura 56) ni en los cambios en la [Ca²⁺] en CMLVs aisladas (Figura 57) inducidos por cafeína (10 mM) entre ratones WT y ratones Ca_v1.2^{ko}, indicando que los niveles de Ca²⁺ del RS no se veían afectados en estos ratones.

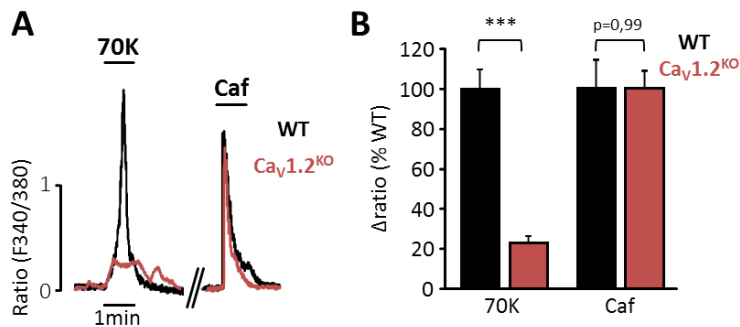


Figura 57: Incrementos de la [Ca²⁺] en CMLVs aisladas de ratones WT y Ca_v1.2^{ko}.

A. Registros representativos del incremento de la [Ca²⁺] inducido por 70K y cafeína (Caf, 10 mM) en ratones WT y Ca_v1.2^{ko}. **B.** Resumen de los datos de los cambios en la [Ca²⁺] inducidos por 70K y cafeína. El gráfico de barras muestra los valores medios de Δratio en % ± error estándar. WT: 70K, 100% ± 8,77; Caf, 100% ± 14,23. Ca_v1.2^{ko}: 70K, 22,92% ± 2,82; Caf, 99,88% ± 8,60. n = 190 - 1157 CMLVs aisladas de al menos 10 aortas diferentes en cada grupo. ***p<0,001 vs WT.

C. Morfología arterial en ratones $Ca_v1.2^{KO}$.

Posteriormente analizamos si la falta de los canales $Ca_v1.2$ se asociaba con cambios estructurales y/o remodelado de las arterias en los ratones $Ca_v1.2^{KO}$. La Figura 58 muestra que la disminución de expresión y funcionalidad de los canales $Ca_v1.2$ no implicaba la alteración de la estructura arterial. De hecho, la inmunofluorescencia realizada en cortes histológicos de aortas de ratones WT y ratones $Ca_v1.2^{KO}$ con anticuerpos *mouse* anti- α -SMA, para marcar la actina de músculo liso, y *rabbit* anti-vimentina, para marcar fibroblastos, reflejaba una morfología similar (Figura 58).

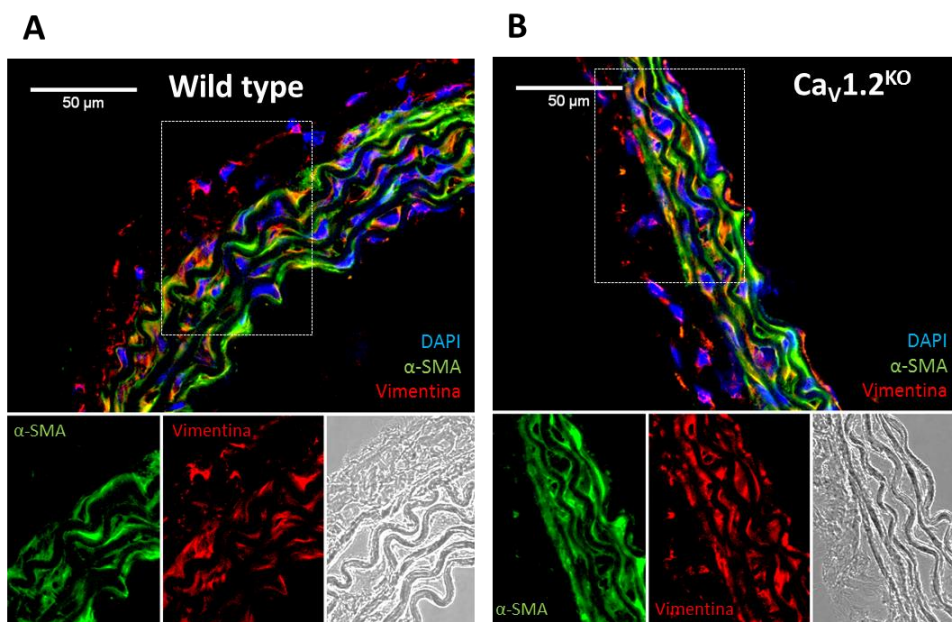


Figura 58: Inmunohistofluorescencia de aorta de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$.

Inmunohistofluorescencia de secciones de aorta de ratones WT (A) y ratones $Ca_v1.2^{KO}$ (B) reflejando una morfología histológica similar. Todas las secciones fueron incubadas con anticuerpos *mouse* anti- α -SMA y *rabbit* anti-vimentina, además de DAPI para teñir los núcleos. Adicionalmente, se muestran imágenes adquiridas en campo claro. Resultados similares se observaron en 4 aortas independientes.

4.3.2 SOCE no compensa la pérdida de función de los canales $Ca_v1.2$.

A. Determinación de la expresión de los SOCCs.

Para determinar si SOCE puede compensar esa disminución de la expresión y funcionalidad de los canales $Ca_v1.2$ en ratones $Ca_v1.2^{KO}$, primero medimos los niveles de expresión de ARNm de *Orai1* en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$. Esta proteína, como ya hemos explicado en la introducción, es el principal componente de los canales selectivos a Ca^{2+} o SOCCs y, por tanto, es un componente imprescindible de SOCE (Putney y cols., 2016). Mediante RT-qPCR, observamos que los niveles de ARNm de *Orai1* en ratones $Ca_v1.2^{KO}$ no eran significativamente diferentes a los de los ratones WT, aunque sí apreciablemente superiores (Figura 59).

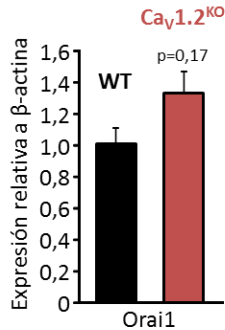


Figura 59: Expresión de ARNm de Orai1 en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$.

Niveles de expresión del ARNm de Orai1 en aorta de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$ medidos mediante RT-qPCR. El análisis se basó en el método $\Delta\Delta Ct$, normalizando a la expresión de β -actina. El gráfico muestra valores medios \pm error estándar. WT: 1,00 \pm 0,10; $Ca_v1.2^{KO}$: 1,33 \pm 0,14. n = 3 - 5 aortas independientes.

Tampoco se encontraron diferencias significativas a nivel de proteína, cuantificada mediante Western Blot, entre arterias de ratones WT y ratones $Ca_v1.2^{KO}$ (Figura 60), por lo que estos datos nos sugerían que SOCE no compensaba la falta de función de los LTCCs, ya que los niveles de expresión de los SOCCs (Orai1) eran similares en ambos ratones.

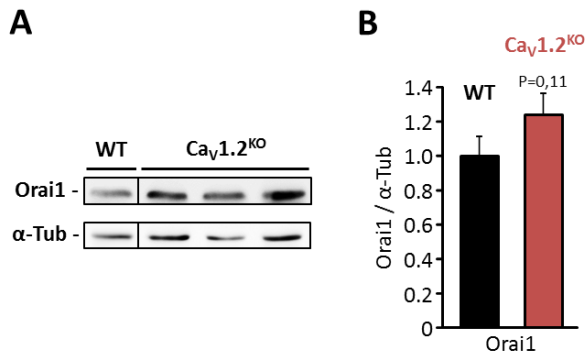


Figura 60: Expresión de Orai1 en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$.

A. Western Blot representativo de las proteínas Orai1 y α -tubulina (α -tub) en aorta de ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$. **B.** Niveles de expresión del Orai1 en ratones WT y $Ca_v1.2^{KO}$. El gráfico de barras muestra valores medios normalizados a la expresión de α -tubulina \pm error estándar. WT: 1,00 \pm 0,11; $Ca_v1.2^{KO}$: 1,24 \pm 0,12. n = 3 - 4 aortas independientes.

B. Vasoconstricción atenuada pero mantenida en ratones $Ca_v1.2^{KO}$.

Como explicamos anteriormente, aunque no encontramos una compensación por la falta de LTCCs, queríamos estudiar cuál era la implicación de los SOCCs en la regulación del tono vascular en estos ratones $Ca_v1.2^{KO}$, de manera que investigamos los efectos de la 5-HT la TG tanto en anillos aórticos como en CMLVs aórticas aisladas.

Primero, realizamos los experimentos para medir la respuesta contráctil en anillos aórticos y, al igual que ocurría con la respuesta contráctil inducida por 70K, la vasoconstricción provocada por 5-HT (10 μ M) y TG (10 μ M) era significativamente más pequeña en anillos aórticos de ratones $Ca_v1.2^{KO}$ en comparación con ratones WT (Figura 61).

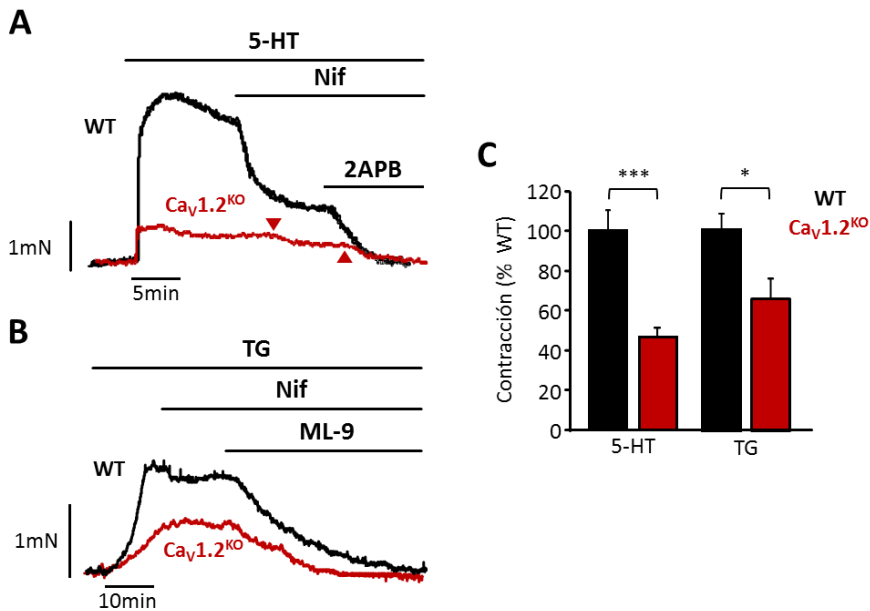


Figura 61: Vasoconstricción inducida por 5-HT y TG en anillos aórticos de ratones WT y Cav1.2^{KO}.

Registros representativos de la constricción inducida por 5-HT (10 μ M) (A) y TG (10 μ M) (B) en ratones Cav1.2^{KO} en comparación ratones WT. La adición de nifedipina (Nif, 1 μ M) produjo una inhibición parcial de la constricción en ambos casos, mientras que la adición complementaria de 2APB (50 μ M) o ML-9 (50 μ M) produjo una relajación completa de las arterias. Las flechas indican el momento de aplicación de los inhibidores. C. Resumen de los datos de constricción inducidos por 5-HT y TG en ratones WT y Cav1.2^{KO}. Gráfico de barras que muestra valores medios de constricción en % \pm error estándar. WT: 5-HT, 100% \pm 11,23; TG, 100% \pm 1,95. Cav1.2^{KO}: 5-HT, 46,02% \pm 6,42; TG, 66,23% \pm 10,22. n = 11-22 anillos aórticos. * p <0,05 y *** p <0,001 vs. WT.

Estas constricciones en arterias de ratones Cav1.2^{KO} eran, todavía, levemente sensibles a nifedipina (1 μ M), debido seguramente a la presencia de canales Cav1.2 funcionales remanentes (Figura 61A y B). Además, se inhibían completamente mediante inhibidores de los SOCCs, ML-9 (25 μ M) o 2APB (50 μ M), como se puede ver en la Figura 61A y B, y se resume en la Figura 62.

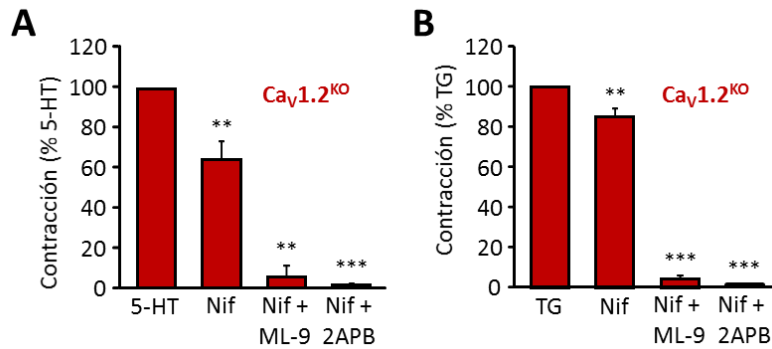


Figura 62: Inhibición de la vasoconstricción inducida por 5-HT y TG en anillos aórticos de ratones $Ca_v1.2^{ko}$.

Inhibición de la contracción inducida por 5-HT (10 μ M) (A) y TG (10 μ M) (B) mediante inhibidores de LTCCs (Nifedipina; Nif, 1 μ M) y SOCCs (ML-9, 25-50 μ M y 2APB, 50 μ M) en ratones $Ca_v1.2^{ko}$. Los gráficos de barras muestran valores medios de contracción en % \pm error estándar. 5-HT: Nif, 64,16% \pm 8,70; Nif + ML-9, 5,61% \pm 5,61; Nif + 2APB, 1,34% \pm 0,63. TG: Nif, 85,14% \pm 4,15; Nif + ML-9, 4,42% \pm 1,93; Nif + 2APB, 0,83% \pm 0,83. n = 3 - 12 anillos aórticos. **p<0,01 y ***p<0,001 vs. contracción máxima.

C. Disminución del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en ratones $Ca_v1.2^{ko}$.

Posteriormente, para relacionar esta reducida respuesta contráctil observada en anillos aórticos de ratones $Ca_v1.2^{ko}$ con los movimientos intracelulares de Ca^{2+} , realizamos experimentos para medir los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de aorta. Observamos que la adición de 5-HT (10 μ M) y TG (2 μ M) evocaba, en estas células, un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ significativamente menor en comparación con CMLVs aisladas de aortas de ratones WT (Figura 63). Como vimos en las Figura 56 y Figura 57, la disminución de las respuestas inducidas por 5-HT y TG no podía deberse a diferencias en los niveles de Ca^{2+} almacenados en el RS, ya que los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ provocados por la cafeína no se veían afectados en ratones $Ca_v1.2^{ko}$.

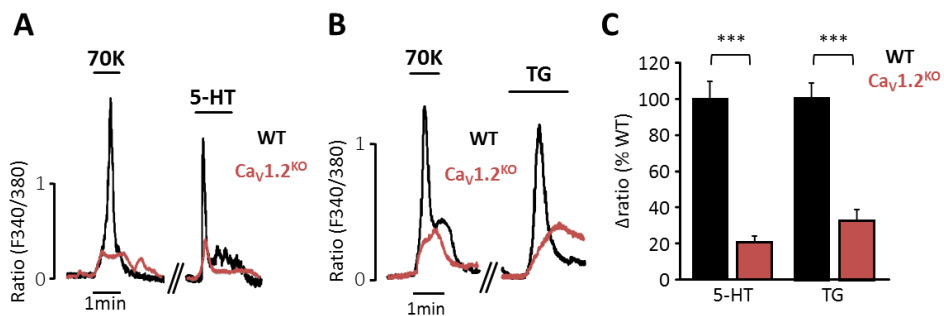


Figura 63: Incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 5-HT y TG en CMLVs aisladas de ratones WT y $Ca_v1.2^{ko}$.

A, B. Registros representativos de los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ originados por 70K, 5-HT (10 μ M) y TG (2 μ M) en ratones $Ca_v1.2^{ko}$ y ratones WT. **C.** Resumen de los datos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 5-HT y TG. El gráfico de barras muestra valores medios de Δ ratio en % \pm error estándar. WT: 5-HT, 100% \pm 13,18; TG, 100% \pm 8,17%. $Ca_v1.2^{ko}$: 5-HT, 20,76% \pm 3,94; TG, 26,83% \pm 6,18. n = 190 - 640 CMLVs aisladas de al menos 10 aortas diferentes en cada grupo. ***p<0,001 vs WT.

4.4 Efecto de la modificación del potencial de membrana sobre la respuesta contráctil y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5-HT y TG.

Juntos, todos estos datos demuestran que las respuestas que originan la 5-HT y la TG en músculo liso vascular implican una coactivación de los SOCCs y los LTCCs. Por este motivo, nos propusimos investigar si la modificación del potencial de membrana era relevante para las respuestas mediadas por agonistas y la activación de SOCE.

4.4.1 La hiperpolarización inducida por valinomicina atenúa la vasoconstricción y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por agonista y TG.

Primero, examinamos el efecto de la valinomicina, un ionóforo de K^+ que permite a este ion atravesar libremente la membrana celular por gradiente electroquímico (Tanner y Wellhausen, 1998). En la mayoría de las células, incluidas las CMLVs, debido a que el potencial de equilibrio del K^+ es más negativo que el potencial de membrana en reposo, la valinomicina daría como resultado un eflujo de este ion hacia el exterior y, por tanto, hiperpolarización de la membrana. Esta hiperpolarización haría que los LTCCs estuvieran más inactivos.

Como podemos observar en la Figura 64, el pretratamiento de anillos aórticos de ratón con valinomicina (500 nM) durante 15 minutos, redujo parcialmente la respuesta contráctil mediada por 70K, aunque no lo suficiente como para evitar una contundente vasoconstricción aórtica.

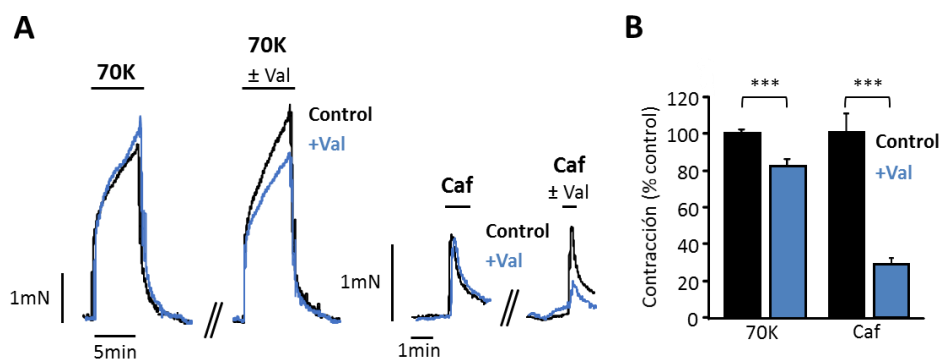


Figura 64: La valinomicina atenúa la contracción inducida por KCl y cafeína en anillos aórticos de ratón.

A. Registros representativos de la contracción inducida por 70K y cafeína (Caf, 10 mM) en anillos tratados 15 minutos con valinomicina (Val, 500 nM) y con vehículo (control). **B.** Resumen de los datos de contracción inducidos por 70K y cafeína. Gráfico de barras que muestra los valores medios de contracción en % normalizados a un primer estímulo ± error estándar. Control: 70K, 100% ± 2,52; Caf, 100% ± 3,92. Val: 70K, 82,56% ± 3,50; Caf, 28,16% ± 3,92. n = 7 - 14 anillos aórticos. ***p<0,001 vs control.

Además, la contracción inducida por cafeína (10 mM) también se veía afectada. La disminución de la contracción tras un estímulo 70K, era previsible debido a la hiperpolarización y la inactivación de los LTCCs que provoca la valinomicina, sin embargo, el efecto de la cafeína necesita ser estudiado a nivel de CMLV aislada.

Por ello, comprobamos los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ que se producen en presencia de este fármaco. Aplicamos la valinomicina (100 nM) durante 3 minutos antes del estímulo en CMLVs aisladas de aorta de ratón y observamos que, al igual que la vasoconstricción, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se veía disminuido tras un estímulo de 70K. Sin embargo, cuando tratábamos las células con cafeína (10 mM), los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ originados eran similares entre las CMLVs incubadas con valinomicina y con el vehículo (Figura 65).

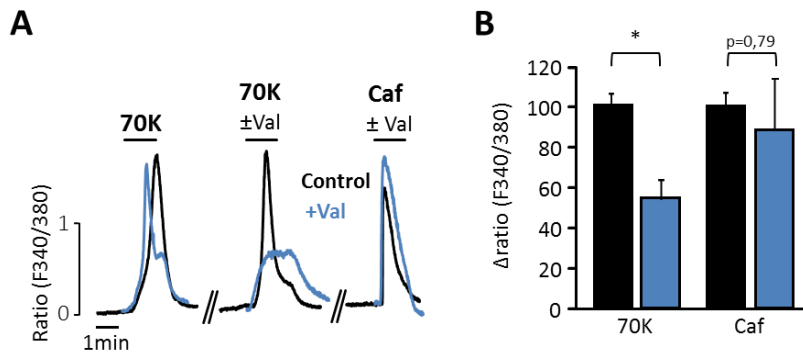


Figura 65: La valinomicina atenúa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por KCl, pero no por cafeína, en CMLVs aisladas de aorta de ratón.

A. Registros representativos de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 70K y cafeína (Caf, 10 mM) en CMLVs incubadas con valinomicina (Val, 100 nM) o vehículo (control) durante 3 minutos. **B.** Resumen de los datos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 70K y cafeína. El gráfico de barras muestra valores medios de Δ ratio en % normalizado a estímulo control previo \pm error estándar. Control: 70K, 100% \pm 6,68; Caf, 100% \pm 6,86. Val: 70K, 55,21% \pm 9,40; Caf, 92,34% \pm 25,45. n = 72 - 76 CMLVs aisladas de 3 aortas diferentes. *p<0,05.

Una vez comprobado que el contenido de Ca^{2+} del RS no se veía afectado, decidimos estudiar qué ocurría con la activación de SOCE en la respuesta mediada por agonista y por TG cuando modificábamos el potencial de membrana. Tanto la vasoconstricción como el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 5-HT (10 μ M) fueron significativamente menores en anillos arteriales y CMLVs aisladas de aorta de ratón, respectivamente, incubadas previamente con valinomicina (Figura 66), en comparación con anillos aórticos y CMLVs aisladas tratados con el vehículo del fármaco.

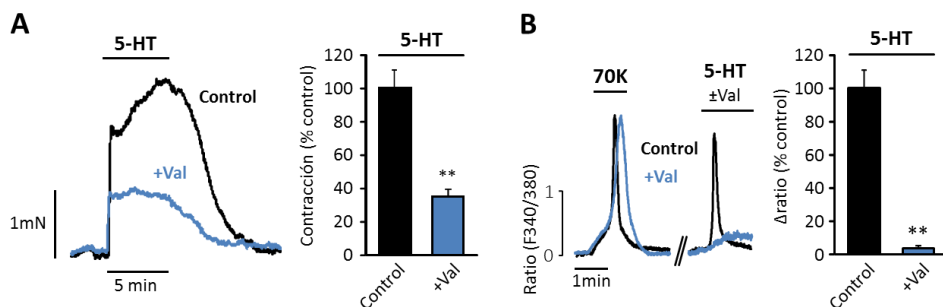


Figura 66: La valinomicina disminuye la vasoconstricción en anillos aórticos y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de aorta de ratón inducidos por 5-HT.

A. Registros representativos y resumen de los datos de la contracción inducida por 5-HT (10 μ M) en anillos tratados con valinomicina (Val, 500 nM) o con vehículo (control) durante 15 minutos. **B.** Registros representativos y resumen de los datos de los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 5-HT (10 μ M) en CMLVs tratadas con valinomicina (Val, 100 nM) o vehículo (control) durante 3 minutos. Los gráficos de barras muestran valores medios en % normalizados a la respuesta inducida por 70K \pm error estándar. Contracción: Control, 100% \pm 10,62; Val, 35,10% \pm 4,67. Δ ratio: Control, 100% \pm 11,24; Val, 3,68% \pm 0,63. n = 4 - 9 anillos aórticos y 89-93 CMLVs aisladas de aorta. **p<0,01 vs control.

De igual forma, las respuestas originadas por la administración de TG (10 μ M) mostraban una disminución significativa en presencia de valinomicina (500 nM) en anillos aórticos en comparación con anillos control (Figura 67A). Además, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por TG (2 μ M) en CMLVs aisladas preincubadas con el fármaco (Val, 100 nM) durante 3 minutos antes del estímulo, era mínimo si lo comparamos con CMLVs control (Figura 67B).

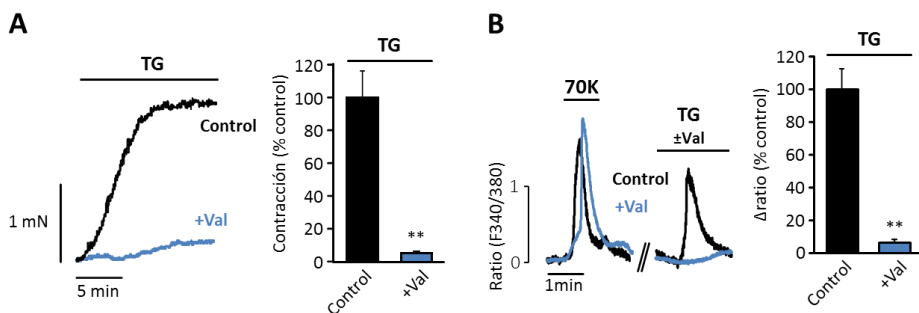


Figura 67: La valinomicina disminuye la vasoconstricción en anillos aórticos y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLVs aisladas de aorta de ratón inducidos por TG.

A. Registros representativos y resumen de los datos de la contracción inducida por TG (10 μ M) en anillos aórticos cuando se incuban con valinomicina (Val, 500 nM) o con vehículo (control) durante 15 minutos. **B.** Registros representativos y resumen de los datos de los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por TG (2 μ M) en CMLVs tratadas con valinomicina (Val, 100 nM) o vehículo (control) durante 3 minutos. Los gráficos de barras muestran valores medios en % normalizados a la respuesta inducida por 70K \pm error estándar. Contracción: Control, 100% \pm 16,07; Val, 5,57% \pm 0,53. Δ ratio: Control, 100% \pm 12,64; Val, 6,38% \pm 1,95. n = 3 - 5 anillos aórticos y 90 - 114 CMLVs aisladas de aorta. **p<0,01 vs control.

4.4.2 La hiperpolarización inducida por cromakalim también atenúa la vasoconstricción y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5-HT.

Para corroborar los experimentos obtenidos con la aplicación de valinomicina, nos planteamos utilizar otro fármaco con una acción más específica sobre la manipulación del potencial de membrana de las células. El cromakalim es un fármaco antihipertensivo que abre canales de K^+ dependientes de ATP (K^+_{ATP}) (Smani y cols., 2002), provocando un flujo de iones K^+ hacia el exterior y con ello hiperpolarización. Esta hiperpolarización reduce la probabilidad de apertura del LTCC, disminuyendo la $[Ca^{2+}]_i$ y, por tanto, tiene acción vasodilatadora sobre la arteria. De esta manera, podíamos modificar el potencial de membrana actuando específicamente sobre un tipo de canal únicamente, y no sobre la célula entera como ocurría con la valinomicina.

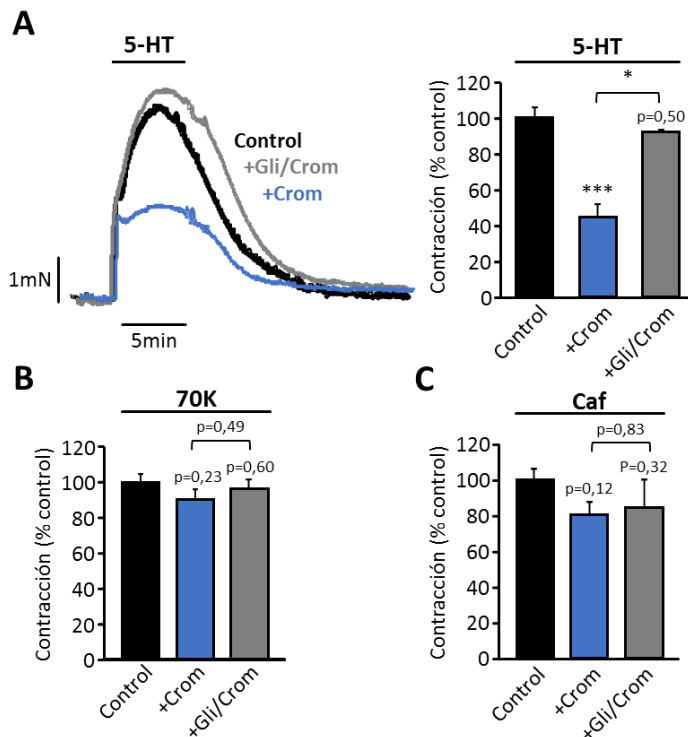


Figura 68: El cromakalim atenúa la vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos de ratón, pero no afecta a la producida por KCl o cafeína.

A. Registros representativos y resumen de los datos de la vasoconstricción inducida por 5-HT (10 μ M) en anillos incubados durante 15 minutos con vehículo (control), cromakalim (Crom, 20 μ M) o glibenclámda junto con cromakalim (Gli/Crom, 3 μ M Gli/ 20 μ M Crom). **B y C.** Resumen de datos del efecto del cromakalim y glibenclámda sobre la contracción inducida por 70K (**B**) y por cafeína (Caf, 10 mM) (**C**). Los gráficos de barras muestran valores medios de contracción en % normalizados a 70K (A) o a un estímulo control previo (B y C) \pm error estándar. Control: 5-HT, 100% \pm 5,73; 70K, 100% \pm 4,33; Caf, 100% \pm 6,80. Crom: 5-HT, 44,59% \pm 7,16; 70K, 90,09% \pm 6,39; Caf, 80,44% \pm 7,68. Gli/crom: 5-HT, 92,47% \pm 0,72; 70K, 96,13% \pm 5,00; Caf, 84,42% \pm 16,32. n = 3 - 6 anillos aórticos. * $p < 0,05$ entre grupos indicados y *** $p < 0,001$ vs control.

Primero, estudiamos el efecto del cromakalim sobre la respuesta mediada por agonista. Observamos que tras la administración de cromakalim (20 μM) durante al menos 15 minutos, se producía una reducción muy significativa de la vasoconstricción inducida por 5-HT (10 μM) en anillos aórticos de ratón (Figura 68A). Para contrarrestar el efecto de esta inhibición de la respuesta, utilizamos glibenclamida, un antagonista selectivo de los canales K^+_{ATP} que bloquea el efecto del cromakalim (Daut y cols., 1990; Smani y cols., 2002). La aplicación de glibenclamida (3 μM) junto con cromakalim (20 μM) a los anillos arteriales 15 minutos antes del estímulo, restauraba la respuesta contráctil de los mismos a 5-HT, ya que la glibenclamida estaba bloqueando el efecto hiperpolarizante del cromakalim y no se modificaba la probabilidad de apertura de los LTCCs (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.A**).

Por otro lado, el cromakalim no afectaba a la contracción evocada por 70K (Figura 68B) o cafeína (10 mM) (Figura 68C), por lo que únicamente afectaba a la respuesta mediada por agonista, a diferencia de lo que ocurría con la valinomicina.

A nivel de CMLV aislada, el cromakalim también afecta a la respuesta mediada por agonista. La aplicación de cromakalim (5 μM) atenuaba significativamente los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovidos por 5-HT (10 μM) cuando se incubaban las células durante 3 minutos (Figura 69A). En cambio, cuando se aplicaba 70K o cafeína (10 mM), que directamente libera Ca^{2+} del RS independientemente del potencial de membrana, los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no se veían afectados en presencia de cromakalim (Figura 69B).

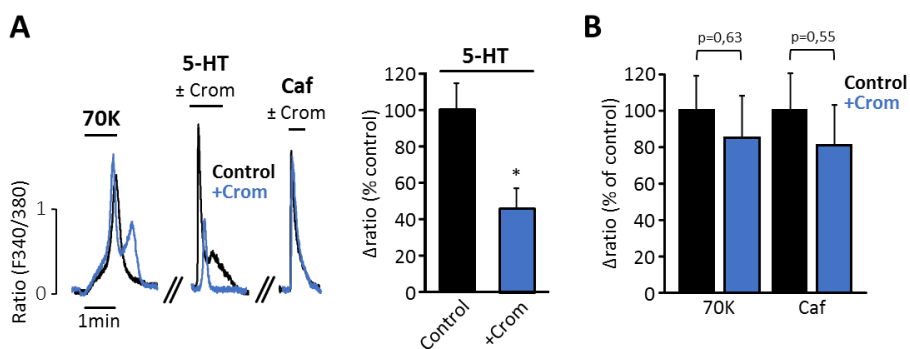


Figura 69: El cromakalim afecta al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por 5-HT en CMLVs aisladas de aorta de ratón, pero no por KCl o cafeína.

Registros representativos y resumen de los datos de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por 5-HT (10 μM) en CMLVs incubadas durante 3 minutos con vehículo (control) o cromakalim (Crom, 5 μM). B. Resumen de datos del efecto del cromakalim sobre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por 70K y por cafeína (Caf, 10 mM). Los gráficos de barras muestran valores medios de Δratio en % normalizados a 70K (A) o a un estímulo control previo (B) \pm error estándar. Control: 5-HT, 100% \pm 14,44; 70K, 100% \pm 18,67; Caf, 100% \pm 20,13. Crom: 5-HT, 46,39% \pm 10,94; 70K, 84,97% \pm 22,55; Caf, 80,91% \pm 2,81. n = 74 - 95 CMLVs aisladas de al menos 3 aortas diferentes. * $p < 0,05$ entre grupos indicados.

Una vez observado que las respuestas promovidas por un agonista fisiológico se veían afectadas por la modificación del potencial de membrana, decidimos comprobar si activando farmacológicamente SOCE se experimentaban los mismos efectos. Para ello,

comprobamos las respuestas que producía la TG en presencia de cromakalim. Interesantemente, cuando incubábamos con cromakalim los anillos aórticos a 20 μM durante 15 minutos o las CMLVs aisladas de aorta a 5 μM durante 3 minutos, observábamos que tanto las respuestas contráctiles como las de Ca^{2+} se veían significativamente atenuadas (Figura 70).

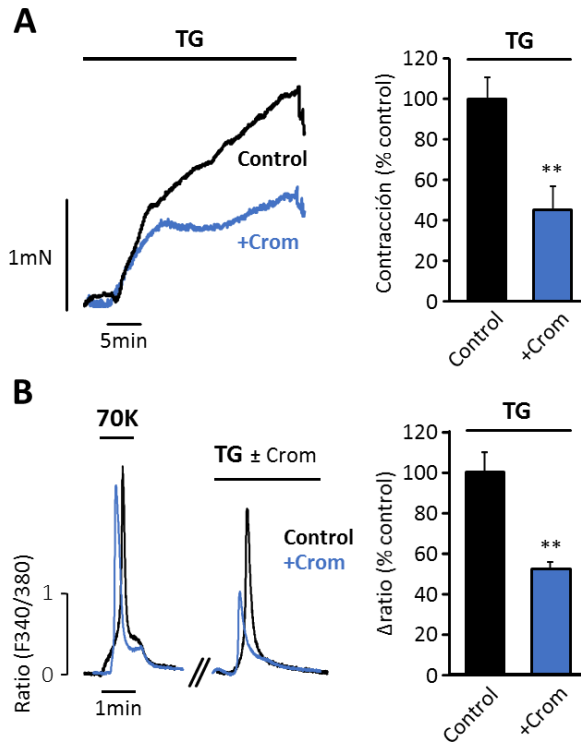


Figura 70: El cromakalim atenúa la vasoconstricción en anillos aórticos de ratón y el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en CMLVs aisladas de aorta de ratón inducidos por TG.

A. Registros representativos y resumen de datos de la respuesta contráctil inducida por TG (10 μM) en anillos tratados con vehículo (control) o cromakalim (Crom, 20 μM) durante 15 minutos antes del estímulo. **B.** Registros representativos y resumen de datos de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$, mediados por 70K y TG (2 μM) en CMLVs tratadas con vehículo (control) y cromakalim (Crom, 5 μM) 3 minutos antes de TG. Los gráficos de barras muestran valores medios en % normalizados a la respuesta de 70K \pm error estándar. Contracción: Control, 100% \pm 8,21; Crom, 44,35% \pm 11,42. Δ ratio: Control, 100% \pm 9,30; Crom, 52,36% \pm 2,95. n = 4 anillos aórticos o 94 - 151 CMLVs aisladas de 3 arterias independientes. **p<0,01 vs control.

4.4.3 Potenciación de la función de los LTCCs sobre la contracción inducida por 5-HT y TG.

Para confirmar la relevancia fisiológica de la coactivación de los LTCCs y los SOCCs durante una estimulación mediante agonista, quisimos averiguar si el activador de los LTCCs, Bay-k-8644 (BayK), podría aumentar las respuestas de la aorta inducidas por 5-HT y TG. Este

fármaco es un agonista capaz de modular la actividad de los LTCCs modificando su umbral de activación desplazándolo hacia valores más negativos y enlenteciendo la inactivación de los mismos (Fass y Levitan, 1996). Todo esto se traduce una mayor probabilidad de apertura de estos canales de Ca^{2+} . Como se muestra en la Figura 71A, los anillos aórticos tratados con BayK (100 nM) presentaban una mayor contracción en respuesta a la 5-HT (10 μM) en comparación con anillos no tratados o control, aunque no llegó a ser significativa, quizás por un tamaño muestral insuficiente. Una respuesta similar y significativa se observó en la contracción inducida por 70K, en la que los anillos aórticos tratados con BayK tenían una mayor respuesta (Figura 71B).

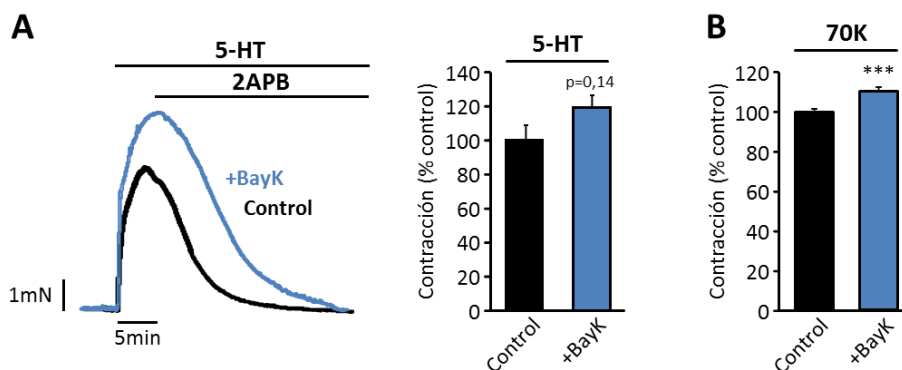


Figura 71: Efecto del BayK sobre la vasoconstricción en anillos aórticos de ratón inducida por 5-HT y KCl.

A. Registros representativos y resumen de datos de la contracción inducida por 5-HT (10 μM) en anillos control y tratados con BayK (100 nM) durante 15 minutos. La aplicación de 2APB (50 μM) antagonizaba completamente la respuesta. **B.** Resumen de los datos de contracción producida por 70K en anillos control e incubados con BayK. Los gráficos de barras muestran valores medios de contracción en % normalizados a la contracción inducida 70K \pm error estándar. Control: 5-HT, 100% \pm 9,50; 70K, 100% \pm 1,56. BayK: 5-HT, 119,54% \pm 6,75; 70K, 110,43% \pm 1,84. n = 3 - 12 anillos aórticos. ***p<0,001 vs control.

De igual forma, la respuesta contráctil mediada por TG (10 μM) en anillos aórticos tratados con BayK (100 nM) también se veía aumentada, en esta ocasión de forma significativa (Figura 72). La adición del inhibidor de SOCE, 2APB (50 μM), relajó eficientemente las contracciones producidas tanto por 5-HT (Figura 71A) como por TG (Figura 72).

Todos estos datos sugerían que la vasoconstricción iniciada por la estimulación con un agonista fisiológico, 5-HT, o por la activación de SOCE mediante TG, estaban atenuadas en arterias hiperpolarizadas, mientras que presentaban una potenciación cuando favorecíamos la activación de los LTCCs, indicando que en estas respuestas podría existir una coactivación de estos canales de Ca^{2+} y los SOCCs.

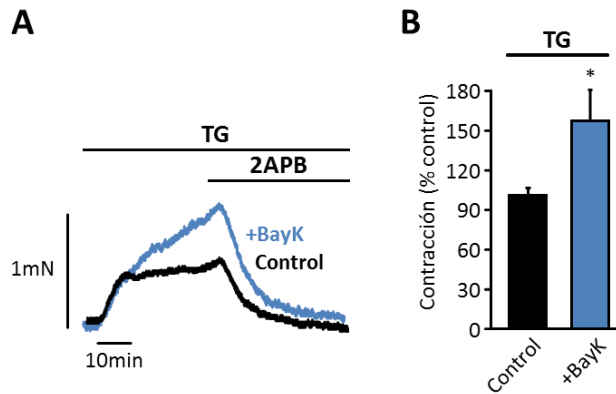


Figura 72: Efecto del BayK sobre la vasoconstricción inducida por TG en anillos aórticos de ratón.

A. Registros representativos de la vasoconstricción evocada por TG (10 μ M) en anillos control y tratados con 100 nM BayK, aplicado 15 minutos antes del estímulo. La aplicación de 2APB (50 μ M) antagonizaba completamente la respuesta. **B.** Resumen de los datos de la contracción inducida por TG. El gráfico de barras muestra valores medios de contracción en % normalizados a la contracción inducida por 70K \pm error estándar. Control, 100% \pm 5,67; BayK, 157,23% \pm 24,16. n = 6 anillos aórticos. *p<0,05 vs control.

4.5 Caracterización del papel de Orai1 y TRPC1 en la contracción inducida por 5-HT.

4.5.1 Participación de Orai1 en la contracción inducida por 5-HT.

Varias publicaciones ponen de manifiesto que Orai1 es una proteína de membrana que forma canales selectivos a Ca^{2+} o SOCCs en diferentes tipos celulares, incluyendo CMLVs (Spinelli y Trebak, 2016). Como método alternativo a la inhibición farmacológica de Orai1, quisimos estudiar la reactividad vascular de anillos aórticos de ratón después de la transferencia de un anticuerpo contra Orai1 (*mouse anti-Orai1*) mediante la técnica de Chariot.

En la figura Figura 73 podemos observar cómo con esta técnica conseguíamos introducir el anticuerpo en las células de músculo liso de anillos aórticos de forma exitosa, ya que la inmunohistoquímica de secciones de los segmentos arteriales a los que se le ha realizado la transferencia, revelaba la presencia del mismo, marcado en verde (anti-Orai1, Figura 73B). En cambio, las secciones de anillos aórticos incubados con los reactivos de Chariot, pero sin incluir anticuerpo, como control negativo, no mostraban marcaje fluorescente en verde (control, Figura 73A). La faloidina nos permitía identificar las células de músculo liso, aparte de fibroblastos, al marcar en rojo la F-actina.

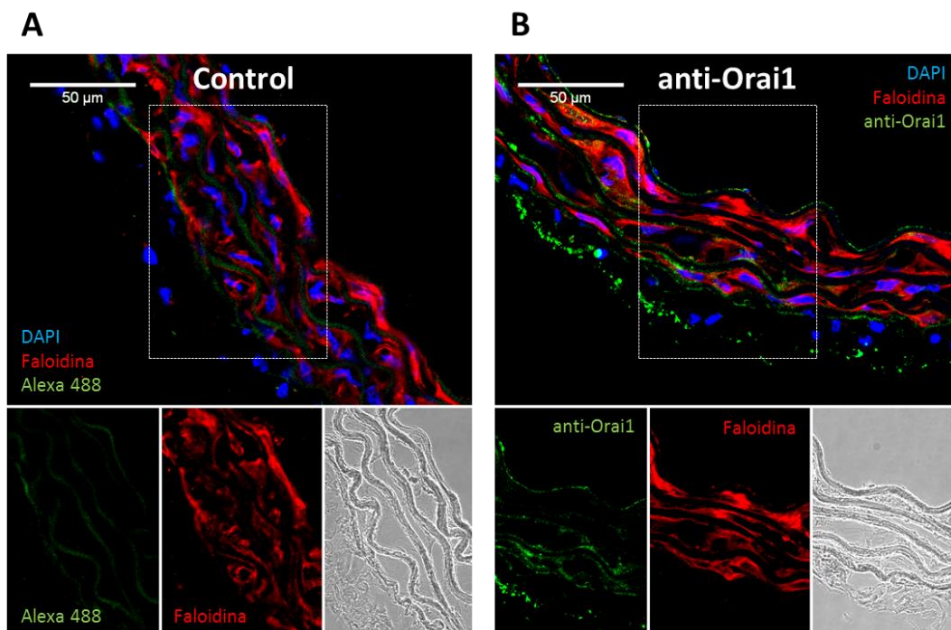


Figura 73: Transferencia de anticuerpo anti-Orai1 en anillos aórticos mediante Chariot.

A. Inmunohistofluorescencia representativa de secciones de aorta incubadas únicamente con los reactivos de Chariot sin anticuerpo (control). **B.** Inmunohistofluorescencia representativa de secciones incubadas con anticuerpo *mouse* anti-Orai1 y Chariot (anti-Orai1). En ambos casos, las secciones de aorta fueron incubadas con faloidina (faloidina-Atto 594), que se une a la F-actina, DAPI para teñir los núcleos y Alexa Fluor 488 anti-*mouse*. Adicionalmente, se muestran imágenes adquiridas en campo claro. Resultados similares se observaron en 3 aortas independientes.

Interesantemente, la transferencia de anti-Orai con Chariot atenuó significativamente más de un 20% la contracción inducida por 5-HT (10 μ M) en anillos aórticos (anti-Orai1) respecto a los anillos control (Figura 74). Para confirmar que anti-Orai1 inhibe de una manera eficiente la actividad del canal, añadimos 2APB a los anillos después de la aplicación del estímulo. Como muestra la Figura 74, la adición de 2APB (25 μ M y 50 μ M) conseguía una mayor inhibición de la contracción llegando a una relajación completa en la arteria control, mientras que en los anillos transferidos con anti-Orai1 no se antagonizaba por completo la respuesta. Esto nos confirmaba que la transferencia del anticuerpo disminuía eficientemente la función de Orai1.

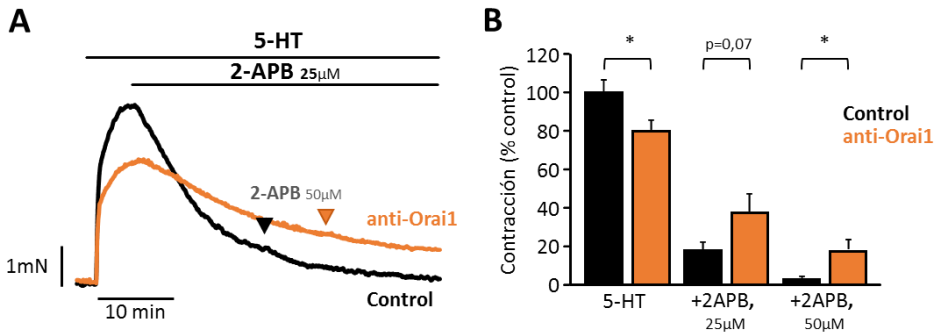


Figura 74: La transferencia del anticuerpo anti-Orai1 mediante Chariot atenúa la vasoconstricción inducida por 5-HT en anillos aórticos de ratón.

Registros representativos (A) y resumen de datos (B) de las contracciones inducidas por 5-HT (10 μM) en anillos transferidos con anti-Orai1 y anillos control. La adición de 2APB (25 y 50 μM) se realizó en el momento indicado en la figura. El gráfico de barras muestra valores medios de contracción en % normalizados a la contracción inducida por 70K ± error estándar. Control: 5-HT, 100% ± 5,81; 2APB 25 μM, 17,78% ± 3,54; 2APB 50 μM, 2,42% ± 0,72. anti-Orai1: 5-HT: 79,73% ± 5,28; 2APB 25 μM, 37,43% ± 9,19; 2APB 50 μM, 17,47% ± 4,96. n = 13-16 anillos aórticos. *p<0,05 entre grupos indicados.

La transferencia del anticuerpo contra Orai1, por otro lado, no afectaba significativamente a la vasoconstricción producida por 70K o cafeína (Caf, 10 mM) (Figura 75). Por lo que estos datos nos sugerían que Orai1 estaba participando en la vasoconstricción inducida por agonista, pero no en la contracción producida por despolarización o por cafeína.

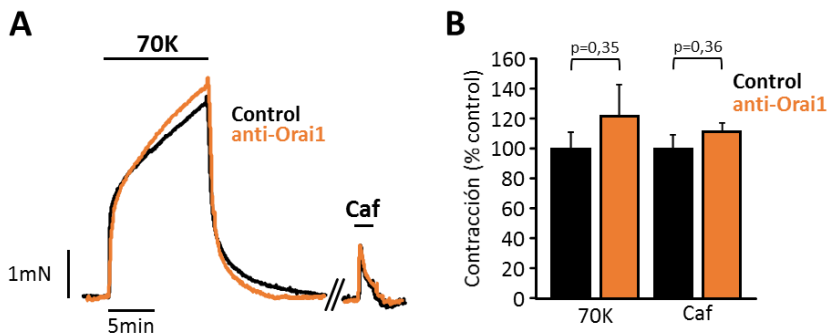


Figura 75: La transferencia del anticuerpo anti-Orai1 mediante Chariot no afecta a la vasoconstricción producida por KCl o cafeína en anillos aórticos de ratón.

Registros representativos (A) y resumen de datos (B) de las contracciones inducidas por 70K y cafeína (Caf, 10 mM) en anillos transferidos con anti-Orai1 y anillos control. El gráfico de barras muestra valores medios de contracción en % normalizados a la contracción inducida por 70K ± error estándar. Control: 70K, 100% ± 1,95; Caf, 100% ± 9,41. anti-Orai1: 70K, 121,63% ± 21,04; Caf, 111,11% ± 6,31. n = 10-12 anillos aórticos.

4.5.2 Participación de TRPC1 en la contracción inducida por 5-HT.

Algunos autores han sugerido la participación de otras proteínas en los SOCCs, como TRPC1, en células excitables (Ambudkar y cols., 2007), mientras que otros han descrito que SOCE depende únicamente de Orai1 y STIM1 en CMLVs de fenotipo proliferativo o sintético (Potier y cols., 2009). Por este motivo, decidimos explorar el efecto de la transferencia de anticuerpos contra Orai3 y TRPC1 sobre la vasoconstricción inducida por agonista en anillos aórticos de ratón. Coherentemente con estos últimos estudios, no encontramos diferencias significativas en la contracción producida por 5-HT (10 μ M) entre anillos aórticos control y anillos aórticos transferidos con anti-Orai3 o anti-TRPC1 mediante Chariot (Figura 76), lo que nos indicaba que Orai3 y TRPC1 podrían no estar participando en la vasoconstricción inducida por 5-HT en aorta.

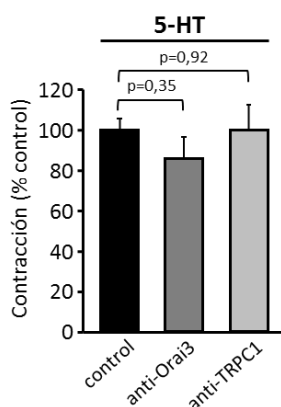


Figura 76: La transferencia de anticuerpo anti-Orai3 y anti-TRPC1 mediante Chariot no afecta a la vasoconstricción producida por 5-HT en anillos aórticos de ratón.

Resumen de datos de la contracción inducida por 5-HT (10 μ M) en anillos transferidos con anti-Orai3, anti-TRPC1 y anillos control. El gráfico de barras muestra valores medios de contracción en % normalizados a 70K \pm error estándar. Control: 100% \pm 5,81; anti-Orai3, 86,48% \pm 10,08; anti-TRPC1, 98,56% \pm 12,01. n = 3 - 16 anillos aórticos.

A pesar de ello, en nuestro laboratorio tenemos evidencias de que TRPC1 pueden funcionar colaborativamente con canales Orai1 para formar canales SOCCs no selectivos y facilitar SOCE (Rodríguez-Moyano y cols., 2013), por lo que se necesitan más estudios para corroborar los resultados anteriores.

4.6 Distribución endógena de Orai1, TRPC1 y Ca_v1.2.

4.6.1 Distribución endógena de Orai1 y Ca_v1.2.

Dados todos los resultados anteriores que nos sugerían una coactivación y una probable comunicación funcional entre los SOCCs, principalmente Orai1, y los canales Ca_v1.2 tras la estimulación con agonista, realizamos una primera aproximación para determinar la localización celular de dichas proteínas en CMLVs aisladas de aorta de ratón. En ensayos de inmunofluorescencia observamos que Orai1 y Ca_v1.2 mostraban una localización celular similar y una distribución uniforme en la membrana plasmática, estando muy próximas entre sí (Figura 77A). Mediante el análisis del coeficiente de correlación de Pearson (PCC, *Pearson's Correlation Coefficient*), que estima la correlación entre dos proteínas marcadas fluorescentemente, se confirmó que existía una colocalización entre

Ca_v1.2 y Orai1 en aorta (Figura 77B) ya que el valor de PCC era mayor a 0,5 (McDonald y Dunn, 2013). Las mismas conclusiones se obtuvieron en CMLVs aisladas de coronaria de rata (Figura 77B).

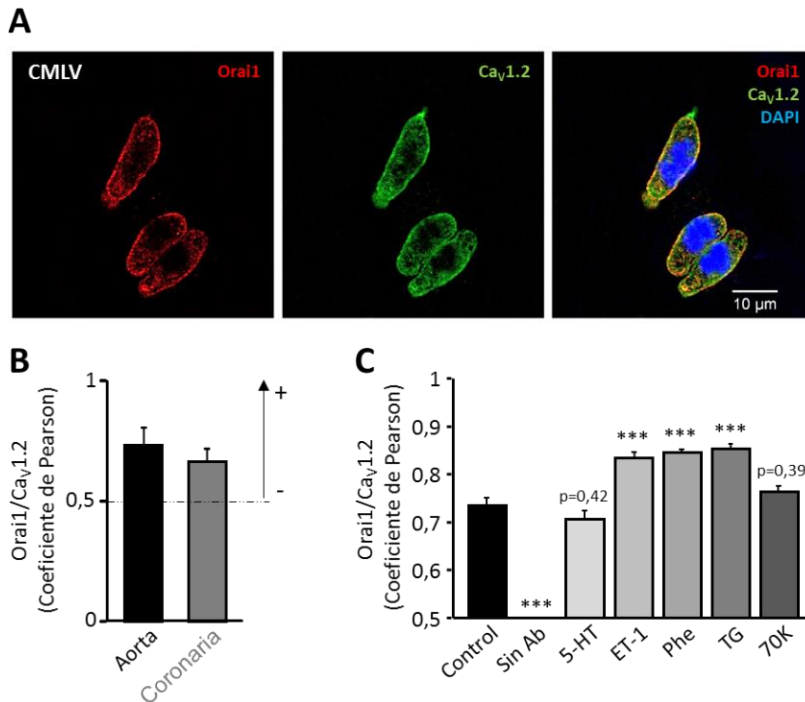


Figura 77: Distribución endógena y colocalización de Orai1 y Ca_v1.2 en CMLVs aisladas de aorta de ratón y coronaria de rata.

A. Inmunoconfuorescencia representativa de CMLVs aórticas incubadas con *mouse* anti-Orai1 y *rabbit* anti-Ca_v1.2. El núcleo de las células fue marcado con DAPI. **B.** Resumen de los datos de colocalización entre Orai1/Ca_v1.2, calculados a partir de las imágenes de inmunofluorescencia, en CMLVs aórticas y de coronaria en condiciones basales control. **C.** Resumen de los datos de colocalización entre Orai1/Ca_v1.2 en CMLVs aórticas en control y tratadas con 5-HT (10 μM), ET-1 (10 nM), Phe (500 nM), TG (2 μM) o 70K durante 2-3 minutos. Los gráficos de barras muestran valores medios de PCC ± error estándar. Orai1/Ca_v1.2 aorta: control, 0,73 ± 0,01; 5-HT, 0,71 ± 0,02; Phe, 0,84 ± 0,01; ET-1, 0,83 ± 0,01; 70K, 0,76 ± 0,01. Orai1/Ca_v1.2 coronaria: 0,67 ± 0,05. Valores > 0,5 indican correlación positiva y colocalización. n = 14 - 27 CMLVs aisladas en 3 experimentos diferentes. Sin Ab: CMLVs incubadas sólo con anticuerpos secundarios. ***p<0,001 vs control.

Esta colocalización no sólo existía en condiciones basales (control), sino que aumentaba cuando las CMLVs eran estimuladas durante 2-3 minutos con agonistas. Como se puede observar en la Figura 77C, el PCC calculado en imágenes de inmunofluorescencia de CMLVs aisladas de aorta de ratón aumentaba significativamente cuando éstas eran tratadas con agonistas fisiológicos utilizados anteriormente, como ET-1 (10 nM) o Phe (500 nM), y agonistas farmacológicos de SOCE como la TG (2 μM). En cambio, no se encontraban diferencias en el PCC con respecto a las células control cuando se aplicaba

70K. (Figura 77C). Como control negativo, incubamos las células únicamente con anticuerpos secundarios (sin Ab).

4.6.2 Colocalización de Orai1, Ca_v1.2 y TRPC1 en condiciones basales.

Como hemos nombrado previamente, aunque los resultados mostrados con anterioridad no implicaban a TRPC1 en la respuesta mediada por agonista, estudios en nuestro laboratorio y de otros colaboradores han sugerido la interacción entre Orai1 y TRPC1 para formar SOCCs no selectivos (Rodríguez-Moyano y cols., 2013). Aparte, hay muchas evidencias acerca de los complejos de señalización en los que puede participar el canal Ca_v1.2 con otros canales para regular la [Ca²⁺]_i en CMLVs (Kwan y cols., 2009; Song y cols., 2015; Spinelli y Trebak, 2016).

Por todo ello, decidimos finalmente confirmar esa posible distribución tan próxima de Orai1, TRPC1 y Ca_v1.2 y su potencial interacción a la hora de regular el tono vascular, utilizando una técnica más específica, el *Proximity Ligation Assay* (PLA). El PLA nos permite detectar cuándo dos proteínas se encuentran a menos de 40 nm de separación. En esta técnica, si las células son incubadas con anticuerpos contra las proteínas de interés y éstas se localizan en regiones cercanas, se detectarán puntos rojos o señales PLA mediante inmunofluorescencia. De esta forma, cuando las CMLVs aisladas de aorta de ratón fueron incubadas con anticuerpos contra Orai1 y Ca_v1.2 en condiciones control, detectamos un gran número de señales PLA, no siendo así cuando la incubación se hizo únicamente con anti-Orai1 (control negativo, control -) (Figura 78). Como control positivo (control +), incubábamos las células con anticuerpos contra proteínas del citoesqueleto (anti- α -SMA y anti-vimentina), que forman parte de la maquinaria contráctil de la célula interaccionando a escala nanométrica (Ye y cols., 2014), pudiendo observarse casi un 90% más de señales PLA (Figura 78).

Adicionalmente, se detectaron señales PLA cuando las CMLVs se incubaban con anticuerpos contra Ca_v1.2 y TRPC1 en condiciones control. Además, la incubación sólo con anti-TRPC1 (control -) o con anticuerpos contra proteínas del citoesqueleto (control +), manifestó el mismo resultado que en el experimento anterior (Figura 79).

4.6.3 Colocalización de Orai1, Ca_v1.2 y TRPC1 en presencia de agonistas.

Interesantemente, cuando estimulamos durante 2 - 3 minutos las CMLVs aisladas con 5-HT (10 μ M) o TG (2 μ M) y se incubaban con anticuerpos contra Ca_v1.2 y Orai1, aumentaba significativamente el número de señales PLA detectadas mediante inmunofluorescencia. No ocurría lo mismo cuando las CMLVs se estimulaban con 70K, indicando que existía una mayor interacción entre estos dos canales sólo tras la estimulación con agonista (Figura 80).

Este mismo efecto se repetía en CMLVs aisladas e incubadas con anticuerpos contra Ca_v1.2 y TRPC1, ya que tras la estimulación con 5-HT (10 μ M) y TG (2 μ M) también aumentaba la interacción entre estas dos proteínas, pero no con 70K (Figura 81).

Todos estos datos sugieren que existe una interacción entre Orai1 o TRPC1 y $Ca_v1.2$ en condiciones basales, la cual aumenta tras la estimulación con agonista favoreciendo la comunicación funcional entre estos canales para promover una señalización de Ca^{2+} intracelular en CMLVs, responsable de la regulación del tono vascular.

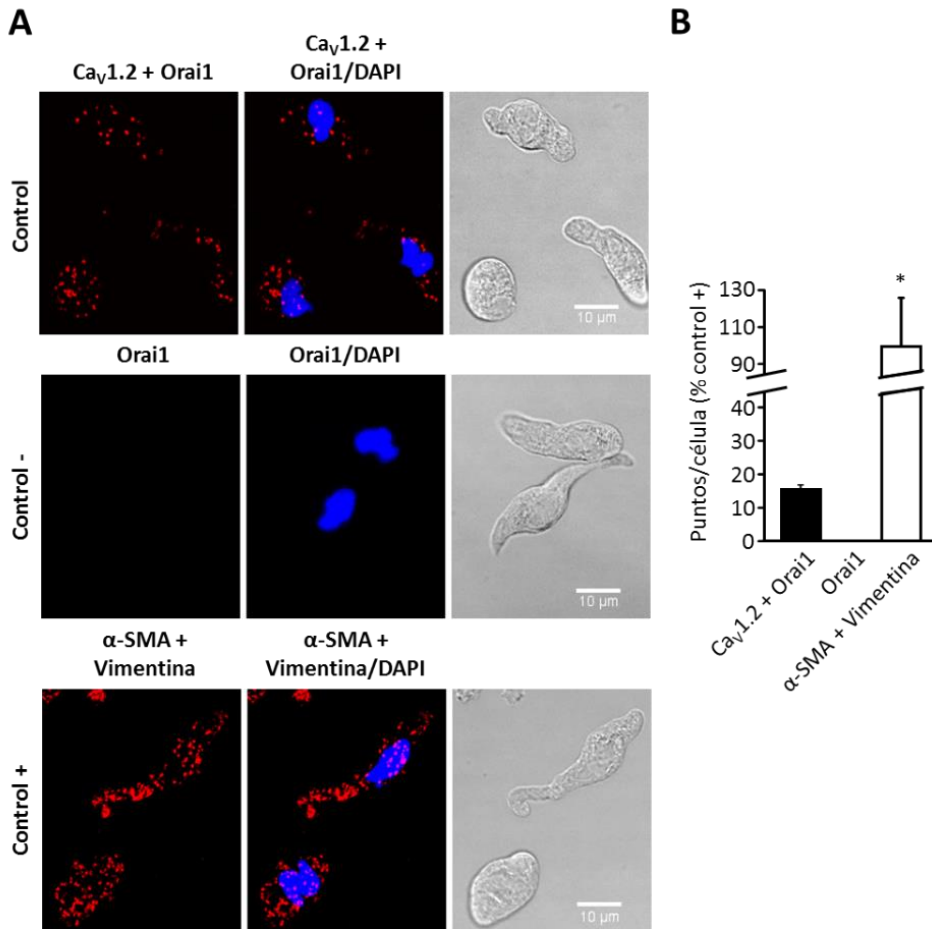


Figura 78: Orai1 y $Ca_v1.2$ colocalizan en CMLVs aisladas de aorta de ratón.

A. Proximity Ligation Assay (PLA) realizado en CMLVs. Las células fueron incubadas con *mouse* anti-Orai1 y *rabbit* anti- $Ca_v1.2$ (control), con sólo anti-Orai1 como control negativo (control -) o con *mouse* anti- α -SMA y *rabbit* anti-vimentina como control positivo (control +). Los puntos o señales rojas fluorescentes indican si las proteínas están próximas entre sí (< 40nm distancia). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En el panel derecho se distinguen las CMLVs en campo claro. **B.** Resumen de datos de las señales PLA detectadas en CMLVs mediante inmunofluorescencia. El gráfico de barras muestra valores medios de señales PLA en % \pm error estándar. Control, 14,42% \pm 1,50; control +, 100% \pm 25,88. n = 5 - 8 CMLVs aisladas en 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

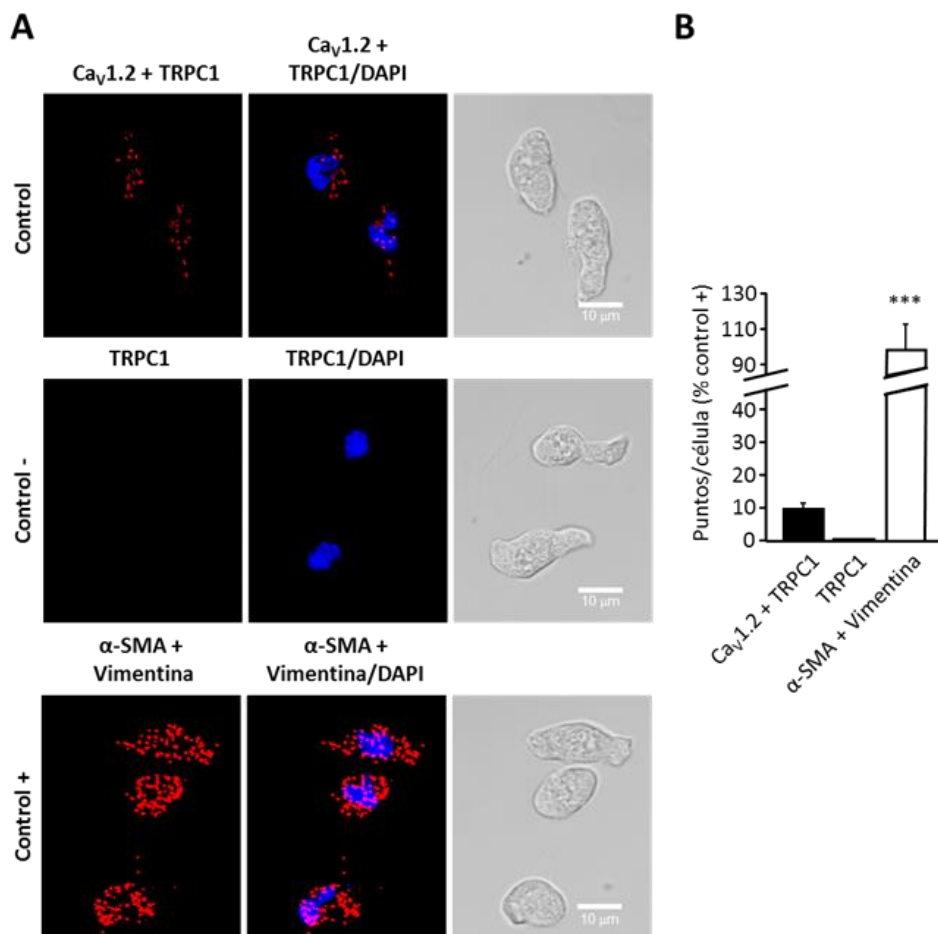


Figura 79: TRPC1 y Cav1.2 colocalizan en CMLVs aisladas de aorta de ratón.

A. *Proximity Ligation Assay* (PLA) realizado en CMLVs. Las células fueron incubadas con *mouse* anti-TRPC1 y *rabbit* anti-Cav1.2 (control), con anti-TRPC1 como control negativo (control -) o con *mouse* anti-α-SMA y *rabbit* anti-vimentina como control positivo (control +). Los puntos o señales rojas fluorescentes indican si las proteínas están próximas entre sí (< 40nm distancia). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En el panel derecho se distinguen las CMLVs en campo claro. **B.** Resumen de datos de las señales PLA detectadas en CMLVs mediante inmunofluorescencia. El gráfico de barras muestra valores medios de señales PLA en % ± error estándar. Control, 9,85% ± 1,53; control +, 100% ± 14,63. n = 7 - 10 CMLVs aisladas en 3 experimentos. ***p<0,001 vs control.

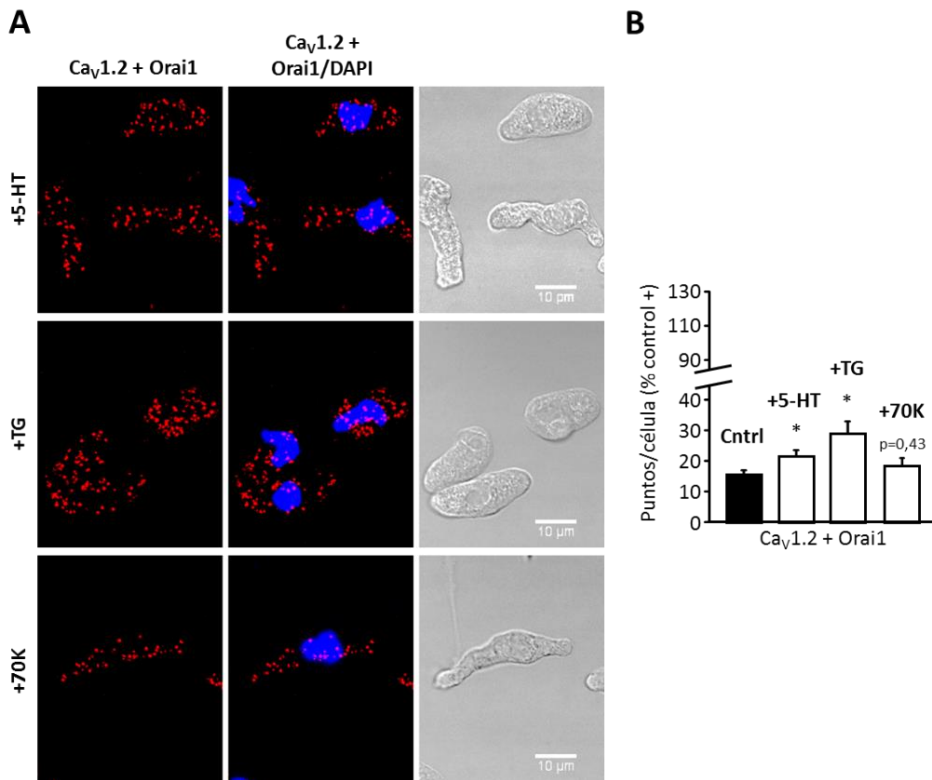


Figura 80: Orai1 y Ca_v1.2 aumentan su colocalización en CMLVs aisladas de aorta de ratón tras estimulación con agonista.

A. *Proximity Ligation Assay* (PLA) realizado en CMLVs. Las células fueron tratadas, o no (control), con 5-HT (10 μM), TG (2 μM) o 70K durante 2 – 3 minutos e incubadas con *mouse* anti-Orai1 y *rabbit* anti-Ca_v1.2. Los puntos o señales rojas fluorescentes indican si las proteínas están próximas entre sí (< 40nm distancia). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En el panel derecho se distinguen las CMLVs en campo claro. **B.** Resumen de datos de las señales PLA detectadas en CMLVs mediante inmunofluorescencia. El gráfico de barras muestra valores medios de señales PLA en % ± error estándar. Control, 14,42% ± 1,50; 5-HT, 21,60% ± 1,65; TG, 28,90% ± 3,81; 70K, 18,33% ± 2,45. n = 6 - 10 CMLVs aisladas en 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

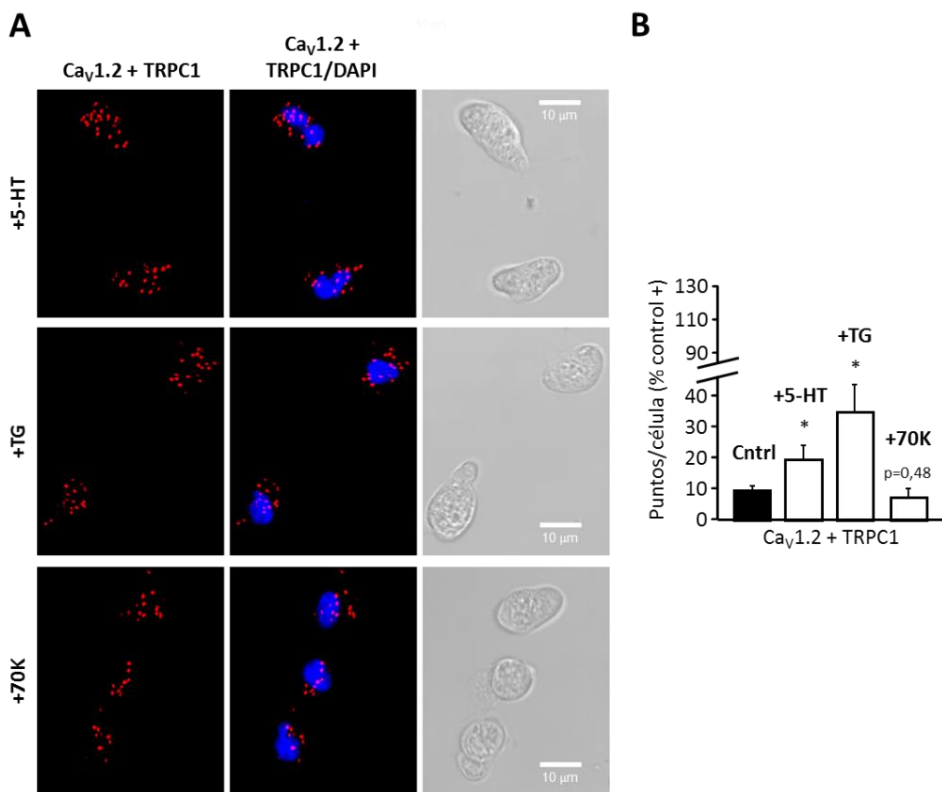


Figura 81: TRPC1 y Ca_v1.2 aumentan su colocalización en CMLVs aisladas de aorta de ratón tras estimulación con agonista.

A. *Proximity Ligation Assay* (PLA) realizado en CMLVs. Las células fueron tratadas, o no (control), con 5-HT (10 μ M), TG (2 μ M) o 70K durante 2 – 3 minutos e incubadas con *mouse* anti-TRPC1 y *rabbit* anti-Ca_v1.2. Los puntos o señales rojas fluorescentes indican si las proteínas están próximas entre sí (< 40nm distancia). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En el panel derecho se distinguen las CMLVs en campo claro. **B.** Resumen de datos de las señales PLA detectadas en CMLVs mediante inmunofluorescencia. El gráfico de barras muestra valores medios de señales PLA en % \pm error estándar. Control, 9,85% \pm 1,53; 5-HT, 19,98% \pm 4,72; TG, 35,53% \pm 8,78; 70K, 7,72% \pm 2,76. n = 8 - 9 CMLVs aisladas en 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

5 DISCUSIÓN

Actualmente, la contribución de los LTCCs y los SOCCs a la fisiopatología de las CMLVs está bastante aceptada, como hemos descrito en la introducción de esta memoria. Sin embargo, la relación funcional que existe entre ellos, todavía sigue siendo un campo por explorar. Existían indicios de una cierta coactivación de ambos canales de Ca^{2+} en respuesta a agentes vasoactivos; no obstante, no se había investigado previamente la distribución de las proteínas que forman los canales ni se había determinado la posible interacción que pudiera existir entre ellas.

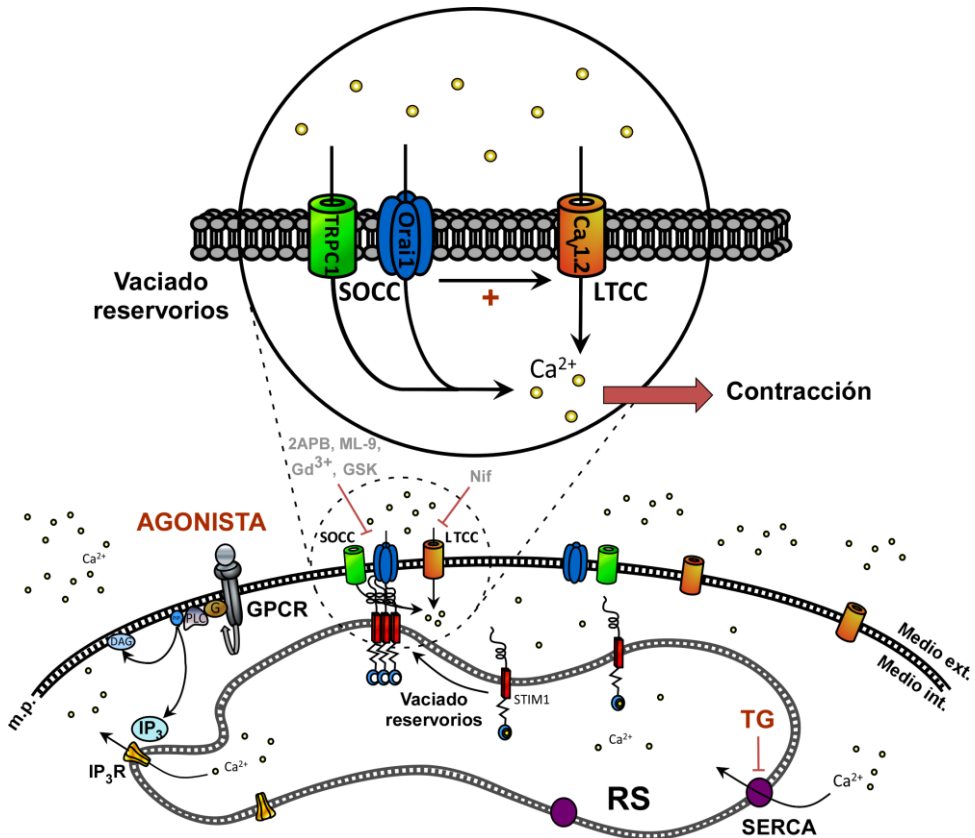


Figura 82: Modelo esquemático que resume la coactivación de SOCCs y $\text{Ca}_v1.2$ tras la estimulación con agonista.

Figura que propone el modelo de interacción entre SOCCs dependientes de TRPC1 y Orai1 y canales $\text{Ca}_v1.2$ tras la estimulación con un agonista. SOCC: canal de Ca^{2+} activado por reservorios; LTCC: canal de Ca^{2+} tipo L; GPCR: receptor acoplado a proteína G; m.p.: membrana plasmática; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; RS: retículo sarcoplásmico; TG: tapsigargina; SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del RE/RS; Nif: nifedipina; 2APB, ML-9, Gd^{3+} y GSK: inhibidores de SOCCs.

Los resultados presentados en esta tesis confirman el papel de los SOCCs en la regulación del tono vascular, revelando por primera vez una interacción funcional entre los canales $\text{Ca}_v1.2$ y Orai1, además de TRPC1, pudiendo servir para controlar estrechamente la

señalización de Ca^{2+} en el músculo liso vascular. Además, mostramos varias evidencias que demuestran que los componentes de SOCCs, Orai1 y TRPC1, forman un complejo macromolecular con Ca_v1.2, lo que permitiría aumentar la señalización de Ca^{2+} y regular la contractilidad arterial gracias a la activación secundaria de los LTCCs tras la inducción de SOCE mediante un agonista.

Es decir, como se resume en el esquema de la Figura 82, cuando un agonista como la 5-HT de une a su receptor en CMLVs, se produce una liberación de Ca^{2+} del RS promovida por IP_3 , la liberación de Ca^{2+} de los reservorios y, con ello, la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de SOCCs dependientes de Orai1 y TRPC1. Esta entrada de Ca^{2+} originaría una activación secundaria de los LTCCs, permitiendo un mayor incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la contracción arterial.

5.1 Métodos de estudio de SOCE en músculo liso vascular.

Para estudiar la activación de los SOCCs y con ello, la entrada de Ca^{2+} conocida como SOCE, se utilizan de forma rutinaria agonistas fisiológicos o farmacológicos en ausencia de Ca^{2+} , para luego reestablecer el Ca^{2+} extracelular, en el clásicamente establecido protocolo de readición o readmisión de Ca^{2+} (*Ca²⁺ readdition* o *Ca²⁺ add-back*) (Bird y cols., 2008). Este método inicialmente se desarrolló en células no excitables, y consiste en un intercambio a una solución sin Ca^{2+} , en presencia de un inhibidor de la bomba de recaptación SERCA, normalmente TG. La inhibición de la bomba induce una liberación pasiva del Ca^{2+} almacenado en el RS, dando como resultado un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que puede observarse mediante fluorescencia en células previamente cargadas con FURA-2. Durante este periodo debido al descenso/vaciado del RS se activaría la maquinaria que abre los canales SOCCs. Posteriormente, cuando el Ca^{2+} citoplasmático recupera su nivel basal, las células se vuelven a cambiar a una solución con alta $[\text{Ca}^{2+}]_o$ extracelular, de esta forma fluye Ca^{2+} a través de los SOCCs induciendo un incremento mantenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este aumento no es observable en células con los reservorios intactos o rellenos, un control experimental que corrobora que la entrada de Ca^{2+} depende del estado de los reservorios, especialmente del RS (Smani y cols., 2007).

A pesar de las claras limitaciones que pueda presentar la técnica de readmisión de Ca^{2+} , ésta ha demostrado ser una herramienta óptima en células no excitables, ya que las respuestas de SOCE en estas células son robustas y dependientes de STIM1 y Orai1, los principales componentes moleculares de SOCE y responsables de las corrientes selectivas a Ca^{2+} (I_{CRAC}). Este método funciona relativamente bien en células no excitables cuyos reservorios se llenan en el momento en el que el Ca^{2+} se reintroduce, a menos que esté presente un fármaco que induzca el vaciado. Sin embargo, no es el caso de las células excitables, ya que, por ejemplo, se ha descrito en neuronas que el cambio de las células a una solución sin Ca^{2+} extracelular inducía un rápido descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en el RS, incluso en ausencia de fármacos que provoquen el vaciado de los reservorios, de hecho, es tan rápido que se enmascaraba parcialmente la liberación de Ca^{2+} del RS inducida por TG (Samtleben y cols., 2015). Esto implica que SOCE, si tiene lugar, debería activarse al

menos parcialmente sólo por el hecho de cambiar a una solución sin Ca^{2+} disponible, haciendo que la diferencia de la magnitud de SOCE se reduzca entre células tratadas con TG y células sin tratar (Lu y Fivaz, 2016). Algunos grupos toman la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular como la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, ignorando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citoplasmática antes de cambiar la solución, de manera que tras la readición de Ca^{2+} , estiman SOCE teniendo en cuenta el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ relativo a ese basal. Con ese método, es difícil valorar la magnitud de SOCE, ya que la entrada de Ca^{2+} simplemente puede estar reestableciendo los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos después de eliminar el Ca^{2+} externo.

Además de estos inconvenientes, las células excitables expresan en su superficie una gran variedad de canales de Ca^{2+} , como los LTCCs, con conductancias para Ca^{2+} varios ordenes de magnitud mayores que los SOCCs. Por otro lado, todavía sigue en discusión el mecanismo de activación de SOCE en presencia de Ca^{2+} extracelular como en situaciones fisiológicas (Beech, 2012). Por eso, en esta tesis nos centramos en estudiar cómo los agonistas fisiológicos pueden activar este tipo de entrada de Ca^{2+} en CMLVs incluso en presencia de Ca^{2+} extracelular y sin vaciado completo de los reservorios, simulando situaciones fisiológicas. Además, estaríamos determinando la activación de la SOCE por el descenso parcial, en vez de liberación completa, del contenido del RS como respuesta a un agente vasoactivo.

5.2 Inhibidores de SOCCs y su controversia.

La complejidad del proceso de activación de los canales SOCCs, que engloba la interacción entre proteínas y entre membrana plasmática y RS, ofrece potencialmente varias dianas para la regulación farmacológica de la actividad del canal. Gracias a inhibidores ampliamente usados como el 2APB, el SFK96365 o el La^{3+} , se ha podido identificar y estudiar la función de los SOCCs en distintos tejidos. Sin embargo, la selectividad de estos inhibidores es generalmente pobre, y los mecanismos por los que afectan a la función de estos canales todavía no están completamente claros (Parekh y Putney, 2005). A continuación, detallaremos brevemente lo que conocemos acerca de los inhibidores que hemos utilizado en nuestro trabajo.

Los iones trivalentes como el La^{3+} o Gd^{3+} bloquean las corrientes I_{CRAC} con alta afinidad, sin embargo, su selectividad es indeterminada ya que también son capaces de bloquear canales Ca_v , canales TRPs y PMCA (Lansman, 1990; Carafoli, 1991; Clapham y cols., 2001). A pesar de ello, gracias a la cristalización de Orai1, se ha conseguido descubrir que los lantánidos bloquean los canales Orai1 interfiriendo con el acceso de los iones al filtro de selectividad y poro al unirse a los residuos de glutamato en esa región (Hou y cols., 2012). Por lo cual se sigue considerando adecuado el uso de Gd^{3+} a concentraciones por debajo de $5 \mu\text{M}$ como selectivo para inhibir los SOCCs. De hecho diferentes grupos pretiran las células de una manera rutinaria con Gd^{3+} para bloquear SOCE endógeno y así estudiar otros canales catiónicos como TRPs (DeHaven y cols., 2009).

El 2APB se usa de manera rutinaria como inhibidor de SOCE (Parekh y Putney, 2005). Este inhibidor fue propuesto inicialmente como antagonista de los IP₃Rs (Maruyama y cols., 1997), por lo que rápidamente se concluyó que la apertura de los SOCCs ocurría a través de un acoplamiento conformacional con los IP₃Rs (Ma y cols., 2000). Sin embargo, otros estudios demostraron que el efecto del 2APB no estaba relacionado con estos receptores (Prakriya y Lewis, 2001), aunque el mecanismo concreto por el que el 2APB inhibe la actividad de SOCE todavía no se conoce, pudiendo afectar a STIM1, Orai1 o al acoplamiento entre las dos proteínas. Este compuesto es relativamente poco selectivo, ya que puede activar o inhibir muchas clases de canales iónicos y receptores, sin embargo, sí se ha descrito que tiene un efecto bimodal dosis dependiente, incrementando las corrientes I_{CRAC} y SOCE a bajas concentraciones ($< 5 \mu\text{M}$) e inhibiéndolas a concentraciones mayores ($> 20 \mu\text{M}$) (Prakriya y Lewis, 2001).

Otro inhibidor de SOCE es el ML-9. Este fármaco es un potente inhibidor de la MLCK. El Dr. Putney y colaboradores propusieron que el ML-9 conseguía inhibir esta entrada de Ca^{2+} evitando la agrupación y translocación de STIM1, en células que expresaban sólo esta proteína de forma exógena. Este efecto era independiente de la inhibición de MLCK y persistía en células *knockdown* para MLCK. No obstante, aunque la sobreexpresión de STIM1 reducía la sensibilidad de este compuesto para inhibir SOCE, cuando se coexpresaba Orai1 junto con STIM1, el ML-9 no tenía el mismo efecto. Las razones no están claras aún, pero parece ser que pueda tener relación con la estabilidad de STIM1 que tiene lugar tras la interacción STIM1-Orai1 en las regiones de unión entre RS y membrana plasmática (Smyth y cols., 2008). Aun así, aunque su diana y el mecanismo de acción sean todavía desconocidos, se sabe que el ML-9 es el único inhibidor de SOCE que actúa a nivel de localización de STIM1. En nuestro grupo, hemos demostrado previamente que ML-9 al igual que Gd^{3+} , inhiben SOCE en cultivo primario de aorta (Rodríguez-Moyano y cols., 2013).

Hoy en día, se están identificando nuevos fármacos mucho más selectivos, incluyendo algunos que afectan directamente a ciertos componentes de los SOCCs, como Orai1. Uno de ellos es el GSK-7975A, otro inhibidor de SOCE que hemos utilizado en nuestros experimentos. Este inhibidor no interfiere en el acoplamiento de STIM1-Orai1, por lo que no afecta a los primeros pasos de activación de la ruta. La acción de este compuesto está aparentemente determinada por la geometría del filtro de selectividad del poro de Orai1, ya que la mutación de un residuo del mismo (E106D) requiere 10 veces más concentración del fármaco para que tenga lugar una inhibición similar. Esta pérdida de afinidad aparente puede ser debida a la alteración de la geometría del poro, lo que se refleja en una menor selectividad a Ca^{2+} (Derler y cols., 2013). Sin embargo, sí que es cierto que este bloqueante también puede afectar a canales Orai3 y TRPV6 debido a las similitudes estructurales en el sitio diana con los canales Orai1. Por este motivo, se necesitan más estudios antes de proponerlo como la única herramienta para estudiar la función y los mecanismos de SOCE. En este trabajo hemos demostrado que la adición de GSK-7975A afecta de una manera eficiente al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido de una manera específica por la inhibición de SERCA con TG, lo cual confirma su uso como un buen candidato para estudiar los SOCCs en CMLVs.

Por último, hemos empleado otro fármaco considerado selectivo denominado Synta66, aunque no mostramos datos del mismo. En nuestros experimentos, este inhibidor consigue relajar la arteria aorta de ratón pre-contraída con 5-HT casi en su totalidad, además de disminuir el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por este agonista. Otros grupos han descrito que este fármaco conseguía inhibir I_{CRAC} en células no excitables RBL y parecía ser selectivo, al menos en la medida en que no inhibía canales de K^+ o bombas de Ca^{2+} (Ng y cols., 2008). La velocidad de inhibición es lenta y pobremente reversible. Además, no afectaba a los primeros pasos de activación de STIM1 y translocación a regiones cercanas entre la membrana del RS y membrana plasmática (Li y cols., 2011b). Poco más se conoce acerca del mecanismo de inhibición de los canales CRAC, sin embargo, cada vez más estudios están empleando este inhibidor para estudiar la contribución fisiológica de estos canales.

Nosotros consideramos que es conveniente usar al menos 2 inhibidores diferentes de los SOCCs para minimizar las contaminaciones de sus efectos secundarios. Además, para comprobar que los inhibidores de los SOCCs empleados en nuestros experimentos no estaban afectando al resto de canales en estudio, en especial a los LTCCs, estudiamos el efecto que tenían sobre la contracción inducida por despolarización o 70K. Esta vasoconstricción, a priori, no se produce por la activación de SOCE, por lo que inhibidores de esta ruta no deberían alterar la respuesta. De hecho, la aplicación de 2APB, el inhibidor de SOCE más estudiado y controvertido, sobre la contracción inducida por 70K en aorta de ratón, sólo relaja una pequeña parte de la contracción en comparación con la nifedipina, inhibidor específico de los LTCCs. Esa relajación tiene lugar después de un estímulo prolongado y puede estar relacionado con el papel metabotrópico del canal LTCC descrito por el grupo del Dr. Juan Ureña en CMLVs, por el que este canal produce la liberación de Ca^{2+} del RS mediante la activación de la PLC y producción de IP_3 (Ureña y cols., 2013), que puede ocasionar una posible activación de SOCE.

Además, también corroboramos que los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por 70K en CMLVs aisladas de aorta de ratón tampoco se ven afectados por la adición de Gd^{3+} o 2APB previa al estímulo, corroborando que los inhibidores de los SOCCs están actuando sobre las respuestas inducidas por SOCE en estas células y no sobre la contracción producida por despolarización.

5.3 SOCCs y LTCCs en la respuesta mediada por agonista.

Como agonista fisiológico hemos empleado la 5-HT, una neurohormona que, una vez sintetizada en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, es transportada por la sangre en el interior de las plaquetas (Cote y cols., 2004), pudiendo liberarse ante factores como la hipoxia crónica, hipertensión, disfunción endotelial... Además, desempeña múltiples acciones periféricas, teniendo importantes efectos sobre la sangre, vasos sanguíneos y corazón.

Se sabe que cuando la 5-HT se une a su receptor 5-HT_{2A}, se activa la PLC que produce DAG e IP₃, que difunde por el citosol e induce la liberación de Ca²⁺ del RS tras unirse al IP₃R, incrementando la [Ca²⁺]_i. Este incremento de Ca²⁺ citosólico podría preceder a un influjo de Ca²⁺ desde el medio extracelular a través de los SOCCs (SOCE), motivado seguramente por la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares. Este puede ser el motivo por el que, en nuestros experimentos, cuando aplicamos esta neurohormona en presencia de Ca²⁺ extracelular, se produce un rápido incremento de la [Ca²⁺]_i seguido de una fase mantenida en CMLVs aisladas frescas, es decir, obtenidas tras la digestión enzimática del tejido en el mismo día en el que se extrae. Esto ha sido descrito en algunos tipos celulares como CMLVs de arteria pulmonar de rata (Yuan y cols., 1997), aunque no se ha confirmado en otras especies como células arteriales pulmonares caninas, debido posiblemente a la distinta organización funcional de los reservorios intracelulares sensibles a rianodina e IP₃ (Wilson y cols., 2005). Por otro lado, la 5-HT también activa una vasoconstricción mantenida en anillos aórticos. Ambas respuestas, tanto el incremento de la [Ca²⁺]_i como la vasoconstricción, eran sensibles a inhibidores de LTCCs y SOCCs, apoyando la implicación de SOCE en la contracción de los vasos. De hecho, en este trabajo se demuestra que GSK (GSK-7975A), que es considerado un inhibidor específico de Orai1 (Derler y cols., 2013), además de otros bloqueantes de Ca²⁺ como Gd³⁺, 2APB y ML-9, inhiben eficientemente las respuestas de SOCE. Interesantemente, aplicando nifedipina antes del estímulo, la vasoconstricción inducida por 5-HT sólo se inhibe parcialmente. Sin embargo, inhibidores de SOCE tales como el 2APB o el GSK relajan completamente la arteria, tanto en los casos en los que se había añadido nifedipina pre-estímulo como en los que se había añadido post-estímulo. Estos datos indican que no sólo están implicados los canales LTCCs en la contracción mediada por agonista, sino que los SOCCs también están participando.

De igual forma, empleamos otro agonista vasoconstrictor para comprobar que, activando otro GPCR y la misma ruta de señalización mediada por liberación de IP₃ e incremento de Ca²⁺ intracelular, tenía lugar una vasoconstricción similar en la que participaban LTCCs y SOCCs. Efectivamente, la fenilefrina produce una respuesta en aorta que se asemeja a la observada con la 5-HT y a los resultados previamente demostrados en arteria coronaria (Smani y cols., 2007). La nifedipina aplicada post-estímulo relaja parcialmente la arteria y el inhibidor de SOCE, 2APB, consigue una relajación completa, inhibiendo la contracción remanente. Por tanto, se confirma que, utilizando otro agonista en el mismo territorio vascular, se produce una contracción en la que participan los canales LTCCs y los SOCCs.

En otros territorios vasculares y otras especies, como en la arteria coronaria de rata, y utilizando otros agonistas como la ET-1, también se reproduce este hecho. La ET-1 estimula una fuerte contracción que se antagoniza parcialmente con la aplicación de nifedipina y por completo con la adición de 2APB o Gd³⁺, otro inhibidor de SOCE. Estos datos ratifican los resultados obtenidos en aorta de ratón, corroborando la participación de ambos canales en la vasoconstricción también en arterias de resistencia.

Como hemos visto anteriormente, SOCE se activa fisiológicamente por un agonista que actúa mediante la señalización de IP₃. Sin embargo, hay evidencias de que algunos canales

no regulados por reservorios pueden ser activados por IP_3 (Zarayskiy y cols., 2007). Para estudiar SOCE generalmente se ha utilizado el inhibidor de SERCA, la TG, y el método de readición de Ca^{2+} . Igualmente, existen canales no regulados por los reservorios que pueden verse afectados, ya sea positiva o negativamente, por los inhibidores de SERCA (DeHaven y cols., 2009). Por todo esto, es necesario confirmar esta entrada de Ca^{2+} mediante más de una vía, como la inhibición de SERCA y la señalización mediada por IP_3 .

En este sentido, quisimos comprobar la activación de los SOCCs mediante la TG en presencia de Ca^{2+} extracelular, sin el método de readición de Ca^{2+} . En estos experimentos demostramos que la TG produce una vasoconstricción sensible a nifedipina en aorta, además de a distintos inhibidores de los SOCCs, ya que la aplicación sumatoria de ambos relaja completamente la arteria. De esta manera corroboramos la implicación de los SOCCs, además de los LTCCs, en la vasoconstricción activada específicamente con TG. De igual manera, observamos la implicación de estos dos tipos de canales a nivel de Ca^{2+} intracelular, ya que en CMLVs aisladas, la TG evoca un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que se ve atenuado en presencia de inhibidores de ambos canales. Por tanto, estos datos indican que SOCE contribuye a la regulación del tono vascular, de acuerdo a estudios previos [ver revisión (Leung y cols., 2008)].

5.4 SOCE en ratones knock-out del canal $Ca_v1.2$.

Una de las hipótesis originales del trabajo fue comprobar si SOCE podría compensar la pérdida de expresión de canales LTCCs. Interesantemente, demostramos que los SOCCs mantienen una pequeña entrada de Ca^{2+} y causan vasoconstricción en ratones $Ca_v1.2^{ko}$, aunque no suficiente para compensar completamente la ausencia de LTCCs funcionales, ya que la expresión de *Orai1* no es significativamente mayor en comparación con los WT, aunque sí apreciablemente superior, ni la magnitud de la respuesta vasoconstrictora así como de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, iguala a la de los ratones WT.

Nuestros resultados usando los ratones $Ca_v1.2^{ko}$ confirman la necesidad de los LTCCs para la contracción de los vasos incluso cuando la vasoconstricción es activada específicamente con TG, no sólo con agonista. Además, esas respuestas se inhiben completamente con inhibidores de los SOCCs. Cabe señalar que la vasoconstricción en ratones $Ca_v1.2^{ko}$ se ve atenuada parcialmente por nifedipina, debido a la expresión remanente de LTCCs propia de un modelo animal knock-out condicional de un gen vital para el organismo.

Todos estos datos concuerdan con estudios previos usando ratones $Ca_v1.2^{ko}$, los cuales demostraron que el canal $Ca_v1.2$ era esencial para el control de la presión sanguínea y las respuestas vasoconstrictoras (Moosmang y cols., 2003; Fernandez-Tenorio y cols., 2010).

5.5 Repercusión de la manipulación del potencial de membrana sobre la respuesta contráctil.

Los resultados anteriores nos indican que las respuestas originadas por 5-HT y TG en músculo liso vascular implican una coactivación de los SOCCs y LTCCs. Hay evidencias que sugieren que la activación de SOCE puede servir no sólo como una ruta importante para la entrada de Ca^{2+} , sino también como un estímulo despolarizante para una activación secundaria de los LTCC en CMLVs (Bolotina, 2012; Molnar y cols., 2012; Narayanan y cols., 2012).

Teniendo en cuenta esto y sabiendo que los canales de K^+ son los principales reguladores del potencial de reposo de las CMLVs y los responsables del tono vascular (Nelson y Quayle, 1995), nos planteamos modificar el potencial de membrana con fármacos que alteran el flujo de este ion para observar si las respuestas a 5-HT y TG se veían alteradas. Nuestros datos muestran que la hiperpolarización inducida por fármacos atenúa la respuesta contráctil y de Ca^{2+} mediados por la activación de los SOCCs.

Primero, usamos valinomicina, un ionóforo de K^+ que provoca un eflujo de este ion hacia el exterior celular, induciendo la hiperpolarización de la membrana y la inactivación de los LTCCs (Zha y cols., 2014). Este hecho pudimos observarlo experimentalmente ya que la valinomicina atenúa significativamente la contracción y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en aorta en respuesta a 70K. Hasta donde sabemos, algunos estudios han sugerido que la hiperpolarización debida a la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K^+_{Ca}) facilita la entrada de Ca^{2+} a través de canales catiónicos no selectivos, incluidos los SOCCs, en células como los condrocitos (Funabashi y cols., 2010). Sin embargo, en nuestros experimentos la hiperpolarización producida por valinomicina no originaba un incremento de SOCE, ya que las respuestas a 5-HT y TG se ven atenuadas en presencia de este fármaco, al no compensarse el efecto de activación secundaria de los LTCCs por estar inactivados.

La valinomicina es conocida por llevar el potencial de membrana a valores cercanos al potencial de equilibrio de Nerst para el K^+ , que está en torno a -85 mV (Tanner y Wellhausen, 1998), es decir, se disminuye el potencial de membrana en torno a 20 o 25 mV. Se han realizado varios estudios con este ionóforo en distintos tipos celulares, empleando concentraciones del orden de micromolar o incluso milimolar (Platoshyn y cols., 2000; Pereira y cols., 2013). Sin embargo, en nuestro laboratorio, empleando concentraciones similares, las respuestas a agonistas se abolían casi por completo, incluso se comprometía drásticamente la vasoconstricción inducida por 70K. Este hecho quizás puede relacionarse con la capacidad de inducir apoptosis que posee este fármaco a altas concentraciones, como se ha descrito en algunos estudios en los que la administración de valinomicina (100 μM) en cultivos primarios de células de músculo liso de arteria pulmonar de rata o humano, producía una apoptosis de aproximadamente el 80% de las células tras 25 h de cultivo (Krick y cols., 2001). Por ese motivo, las concentraciones de valinomicina empleadas en este estudio no superan los 500 nM en anillos arteriales o 100 nM en CMLVs aisladas, rango en el que no se afectan drásticamente las respuestas a 70K o cafeína, que

nos sirven para valorar la viabilidad celular y el correcto funcionamiento de la homeostasis celular.

Para corroborar estos hallazgos, utilizamos otro fármaco con una acción más específica sobre un tipo de canal principalmente y no sobre la célula completa, el cromakalim. Este compuesto abre canales de K^+ dependientes de ATP (K^+_{ATP}), provocando un eflujo de iones K^+ hacia el exterior y la hiperpolarización de la membrana celular (Fransen y cols., 2012), lo cual reduce la probabilidad de apertura de los LTCCs. Se sabe que la adición de cromakalim reduce el potencial de membrana alrededor de 10 y 15 mV en CMLV (Nelson y Quayle, 1995; Chataigneau y cols., 1999), alejando así el umbral de activación de los canales LTCCs.

A diferencia de lo que ocurría con la valinomicina, el cromakalim no afecta a la respuesta inducida por 70K en aorta, debido a que este fármaco desplaza la curva de activación de los LTCCs a valores más despolarizados, pero no afecta a la respuesta máxima ante un estímulo tan despolarizante como una alta concentración de KCl (Fransen y cols., 2012). Sin embargo, al igual que con la valinomicina, las respuestas a 5-HT y TG también se ven atenuadas en presencia de cromakalim. Interesantemente, la aplicación de glibenclamida, un antagonista selectivo de los canales K^+_{ATP} que bloquea el efecto de cromakalim (Daut y cols., 1990; Smani y cols., 2002), es capaz de revertir los efectos sobre la respuesta a 5-HT, sin tener repercusión alguna sobre las respuestas a 70K o cafeína, que tampoco se ve afectadas por cromakalim.

Estos datos confirman que existe una contribución de los LTCCs en la respuesta a agonista y TG en aorta, y sugieren que en presencia de cromakalim y valinomicina, la activación de SOCE no es suficiente estímulo despolarizante para la activación secundaria de los LTCCs. Según vimos en la introducción, el potencial de membrana en reposo de las CMLVs está en torno a -60 mV y el umbral de activación de los canales $Ca_v1.2$ se sitúa a partir de los -40 mV estas células. En comparación con los canales de Ca^{2+} análogos en corazón, la activación dependiente de voltaje de los $Ca_v1.2$ de músculo liso presenta un desplazamiento a un umbral más hiperpolarizado, lo que permite la activación de los canales con leves despolarizaciones fisiológicas del potencial de membrana, generando así una tensión suficiente en los vasos para mantener el tono vascular. Si desplazamos el potencial de membrana de las células a valores más negativos (hiperpolarización), esas leves despolarizaciones fisiológicas no llegarían a activar los LTCCs. Esto es lo que podría estar ocurriendo cuando aplicamos valinomicina y cromakalim, ya que la hiperpolarización de la membrana ocasionada por estos compuestos puede ser suficiente para que no se produzca la activación secundaria de los LTCCs tras la despolarización inducida por la activación de SOCE.

Por otro lado, observamos que el agonista de los LTCCs BayK, que desplaza el umbral de activación de estos canales a potenciales más hiperpolarizados, aumenta las respuestas a agonistas. Similarmente, un estudio reciente ha demostrado que el vaciado del RS estimulaba SOCE, produciendo la despolarización y activación de los LTCCs en miometrio de rata (Noble y cols., 2014). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las respuestas de los agonistas pueden ser atenuadas o potenciadas significativamente dependiendo de

la probabilidad de apertura de los LTCCs, por lo que existe una activación secundaria de estos canales tras la activación de los SOCCs.

5.6 Activación o inactivación secundaria de los LTCCs.

En el año 2010, se publicaron 2 trabajos independientes en células excitables que demostraron que la activación de la SOCE implica la translocación del sensor STIM1 hacia la membrana plasmática donde, por un lado, se asocia con Orai1 para iniciar SOCE y, por otro lado, inhibe los LTCCs (Park y cols., 2010; Wang y cols., 2010). Recientemente, en colaboración con otros grupos hemos verificado que tras el vaciado de los reservorios, STIM1 regula la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs, de acuerdo con los estudios anteriores (Wang y cols., 2010), pero introduciendo un nuevo participante molecular, la proteína citosólica Homer, que estabiliza la interacción STIM1- $\text{Ca}_v1.2$ tras el vaciado de los reservorios (Dionisio y cols., 2015). Por otro lado, se demostró que la expresión temporal de las subunidades de canal $\text{Ca}_v1.2$ en células HEK daba como resultado un incremento significativo en SOCE inducida por TG, atribuida a una activación secundaria de los canales $\text{Ca}_v1.2$ inducida por el influjo catiónico vía SOCCs (Dionisio y cols., 2015). En consonancia con estos últimos resultados, los experimentos presentados en este trabajo aportan varios indicios que apoyan la coactivación de Orai1 y $\text{Ca}_v1.2$ después de un estímulo con agonistas. Por tanto, en conjunto, nuestros datos sugieren que tras el vaciado de los reservorios pueden promoverse dos mecanismos independientes implicados en la interacción de diferentes componentes de SOCE con $\text{Ca}_v1.2$ para controlar su actividad. Por un lado, el flujo de Ca^{2+} a través de SOCE promueve una activación secundaria de los LTCCs y, por otro, STIM1 modula la función del canal $\text{Ca}_v1.2$. Indiscutiblemente, se necesita investigar más acerca de esta regulación recíproca de los LTCCs mediante el vaciado de los reservorios. De hecho, la regulación dual de los LTCCs mediante el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se ha estudiado extensamente en células excitables, como se ha revisado recientemente (Hofmann y cols., 2014). Se conoce que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promueve el proceso de inactivación dependiente de Ca^{2+} o CDI, un proceso bien conocido que se caracteriza por prevenir la sobrecarga de Ca^{2+} (Barrett y Tsien, 2008). En cambio, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también puede estimular la facilitación dependiente de Ca^{2+} del canal $\text{Ca}_v1.2$ para potenciar el flujo de Ca^{2+} , por ejemplo, durante el acoplamiento excitación-contracción en CMLVs (Saponara y cols., 2008).

Hasta ahora, la regulación recíproca de STIM1 con los canales Orai1 y $\text{Ca}_v1.2$ se ha estudiado principalmente en el cambio fenotípico de músculo liso quiescente a proliferativo/migratorio o en líneas celulares, quedando por esclarecerse los mecanismos moleculares que participan. El principal impulsor del cambio fenotípico de CMLVs es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que actúa sobre su receptor induciendo la liberación de Ca^{2+} del RS, siendo un importante activador de Orai1 en músculo liso. Además de su papel en la activación de Orai1, la oligomerización de STIM1 en regiones de aproximación entre membrana plasmática y RS también modula el influjo de Ca^{2+} a través de canales $\text{Ca}_v1.2$ e induce la internalización de los LTCCs en neuronas

corticales de rata y células de músculo liso A7r5 (Park y cols., 2010; Wang y cols., 2010). Este mecanismo de inhibición, en cambio, no ha podido ser confirmado en CMLVs quiescentes (Takeda y cols., 2011), lo que puede reflejar distintos papeles para la proteína STIM1 en células proliferativas y en células contráctiles, el fenotipo celular en el que se ha centrado este trabajo.

Aunque los trabajos publicados por los grupos de los Drs. Park y Wang indican una inhibición significativa de la actividad de los LTCCs tras el vaciado del RS, el grupo del Dr. Takeda muestra resultados opuestos. Las razones todavía no están claras, pero la posibilidad de que la expresión de STIM1 en células en cultivo primario y células frescas sea diferente, puede contribuir a las diferencias en la modulación de los LTCCs después de la liberación de Ca^{2+} desde el RS. De hecho, hay estudios que sugieren que STIM1 se expresa abundantemente en células en cultivo, pero se detectan niveles muy bajos en CMLVs aisladas en fresco (Berra-Romani y cols., 2008). Por otro lado, es posible que los LTCCs no se vean regulados por STIM1 después del vaciado de los reservorios en miocitos arteriales o que las diferencias en las condiciones experimentales puedan explicar las disparidades encontradas. Independientemente, los resultados del grupo del Dr. Takeda descartan un mecanismo de retroalimentación potencial por el cual la carga de Ca^{2+} del RS regula negativamente la actividad de los VDCCs en CMLVs. Por lo tanto, la relevancia fisiológica de regulación de STIM1 de los LTCCs en miocitos arteriales no está del todo clara.

5.7 Caracterización del papel de Orai1 y TRPC1 en la contracción inducida por 5-HT.

5.7.1 Orai1 participa en la vasoconstricción inducida por agonista.

Conjuntamente con otros componentes moleculares de SOCE, se ha sugerido la implicación de Orai1 en enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión, proliferación de CMLVs o remodelado vascular (Giachini y cols., 2009; Zhang y cols., 2011; Rodríguez-Moyano y cols., 2013). Sin embargo, la implicación fisiológica de Orai1 en la contractilidad vascular no está clara. En este trabajo, mostramos por primera vez nuevas evidencias acerca de la contribución de Orai1 en la vasoconstricción inducida por agonista en presencia de Ca^{2+} extracelular, sin necesidad del vaciado previo de los reservorios. Interesantemente, la aplicación de 5-HT evoca una respuesta de contracción que se ve atenuada en anillos aórticos cuando se transfieren con anti-Orai1. En cambio, las respuestas a cafeína y a KCl a alta concentración no se ven afectadas, por lo que la transferencia del anticuerpo sólo afecta a la respuesta mediada por agonista y no a la contracción mediada por la liberación de Ca^{2+} del RS con cafeína o por despolarización y activación de los LTCCs.

Considerando que la transferencia de anticuerpos en tejido es limitada, la disminución del efecto de un inhibidor de SOCE como 2APB en anillos transferidos con anti-Orai1 sobre la

contracción producida por 5-HT confirma la disminución de la actividad de Orai1. Aunque nuestros datos no descartan la posible participación de otras proteínas en la formación de los SOCCs, estos resultados siguen la línea de otros artículos en los que se ha estudiado el papel de los canales Orai1 en CMLVs contráctiles. El grupo del Dr. Giachini demostró que el anticuerpo anti-Orai1 inhibía la contracción de la aorta en ratones hipertensos usando el protocolo de readición de Ca^{2+} (Giachini y cols., 2009). Por otro lado, en nuestro grupo hemos demostrado que las contracciones evocadas tanto por Urotensina II como por fenilefrina o lisosofatidilcolina, se ven atenuadas en anillos arteriales de coronaria tras su transfección con siRNA de Orai1 (Dominguez-Rodriguez y cols., 2012). Cabe resaltar que en este caso se trataron los anillos durante 48 horas, mientras que los datos presentados en esta memoria corresponden a experimentos hechos el mismo día.

5.7.2 Papel de TRPC1 y Orai3 en la vasoconstricción inducida por agonista.

Otras proteínas propuestas como posibles SOCCs fueron los canales TRP (Montell, 2005), en especial el canal TRPC1 (Beech, 2005). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la participación de los canales TRPCs en SOCE, ya que algunos autores han apoyado su implicación en células excitables (Ambudkar y cols., 2007), mientras que otros han descrito que SOCE depende únicamente de Orai1 y STIM1 en CMLVs de fenotipo proliferativo o sintético, ya que el silenciamiento de la expresión de TRPC1 y otras isoformas como Orai2, Orai3, TRPC4 y TRPC6 no tenían efecto sobre esta ruta de entrada de Ca^{2+} (Potier y cols., 2009). Por este motivo, decidimos explorar el efecto de la transferencia de anticuerpos contra Orai3 y TRPC1 sobre la vasoconstricción inducida por agonista en anillos aórticos de ratón. En nuestros experimentos, no encontramos diferencias significativas en la contracción producida por 5-HT (10 μM) entre anillos aórticos control y anillos aórticos transferidos con anti-Orai3 o anti-TRPC1, lo que sugiere que Orai3 y TRPC1, en principio, no participan en la vasoconstricción inducida por 5-HT en aorta. Es cierto que hay que tomar en cuenta la poca eficiencia y la dificultad que implica la transferencia en tejidos de moléculas grandes como los anticuerpos, y que la unión del anticuerpo a su antígeno no implica necesariamente bloqueo de función.

A pesar de ello, los canales TRP, especialmente la subfamilia TRPC, han sido propuestos en multitud de ocasiones como mediadores de SOCE en muchos tipos celulares, incluyendo células vasculares. Además, en nuestro laboratorio tenemos evidencias de que algunas isoformas, como TRPC1, pueden funcionar colaborativamente con canales Orai1 para formar canales SOCCs no selectivos y facilitar SOCE (Rodriguez-Moyano y cols., 2013). Por lo tanto, se necesitan más estudios para ver la relación que podría existir entre ellos y el papel fisiológico que tienen.

5.8 Distribución endógena de Orai1, TRPC1 y $\text{Ca}_v1.2$.

La estricta regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es de suma importancia para el desarrollo controlado del tono miogénico ya que un cambio relativamente pequeño en los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos (de <100 a 400 nM de Ca^{2+}) es suficiente para abarcar desde una relajación

completa a una contracción completa (Hill-Eubanks y cols., 2011). Por tanto, los complejos mecanismos reguladores controlan la dinámica local de Ca^{2+} dentro de las CMLVs para regular tanto los mecanismos contráctiles como los relajantes. Una manera lógica de conseguir esta regulación es disponer los componentes proteicos en microdominios contráctiles y relajantes espacialmente separados, agrupando y aislando los mecanismos moleculares necesarios dentro de un espacio extremadamente limitado. Con esta disposición, un incremento localizado en el Ca^{2+} intracelular puede ser suficiente para activar mecanismos independientes de contracción o de relajación, sin que interfieran entre ellos ni se produzca un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ global que pueda comprometer la viabilidad celular (Hill-Eubanks y cols., 2011). Gracias a las restricciones espaciales impuestas dentro de estos microdominios se consigue una fina regulación de la señalización de Ca^{2+} y del tono miogénico (Parekh, 2008).

En este sentido, varios grupos han demostrado interacciones entre diferentes proteínas para formar complejos de señalización de SOCE como se discute en estos trabajos (Vaca, 2010; Berna-Erro y cols., 2012). Nuestros experimentos de inmunocitoquímica muestran que Orai1 y $\text{Ca}_v1.2$ presentan una localización subcelular similar y una distribución uniforme en la membrana plasmática de CMLVs, estando muy próximas entre sí. Gracias al cálculo del coeficiente de Pearson o PCC, confirmamos que existe una colocalización significativa entre ambos canales en aorta de ratón y en arteria coronaria de rata. Interesantemente, esta colocalización aumenta cuando las CMLVs aisladas de aorta de ratón se estimulan con agonistas como ET-1, Phe o TG, no siendo así cuando se aplica 70K. Estos datos sugieren que los canales Orai1 y $\text{Ca}_v1.2$ pueden distribuirse en regiones cercanas en la membrana plasmática de CMLVs lo que les permite interactuar, al menos funcionalmente, cuando se induce SOCE.

Recientemente, estudios independientes han demostrado que Orai1 se asociaba con otros canales, como Orai3, para formar canales de Ca^{2+} regulados por AA (ARC) (Mignen y cols., 2009), con TRPC1 para formar SOCCs no selectivos (Rodríguez-Moyano y cols., 2013; Desai y cols., 2015), o incluso con canales de K^+ activados por pequeñas conductancias de Ca^{2+} (SK3) (Song y cols., 2015; Gueguinou y cols., 2016). Por otro lado, también hemos comentado la interacción que tiene lugar entre distintos componentes de SOCE con el canal $\text{Ca}_v1.2$ (Wang y cols., 2010; Dionisio y cols., 2015). Además, se ha descrito que TRPC1 puede formar complejos macromoleculares con el canal $\text{Ca}_v1.2$, participando en la regulación de la conducción cardíaca, actividad ventricular y contractilidad durante la cardiogénesis (Sabourin y cols., 2011).

Teniendo en cuenta esto, y a raíz de nuestros resultados, quisimos corroborar la colocalización existente entre los canales $\text{Ca}_v1.2$ y Orai1 y determinar otras posibles interacciones con otros canales, como TRPC1, con el objeto de identificar complejos de señalización de SOCE en los que pudieran estar participando estas proteínas. Para ello, diseñamos experimentos utilizando una técnica de inmunofluorescencia más novedosa denominada *in situ* PLA, en los que demostramos por primera vez que Orai1, $\text{Ca}_v1.2$ y también TRPC1, expresados endógenamente en CMLVs, se distribuyen en regiones cercanas. Con esta tecnología, cuando dos proteínas se encuentran próximas entre sí, a

una distancia menor a 40 nm de longitud, se pueden visualizar señales fluorescentes (Soderberg y cols., 2008). De esta manera, en nuestros datos se observa que no sólo existe una colocalización basal entre Cav1.2 y Orai1, sino que también existe entre Cav1.2 y TRPC1. Estas colocalizaciones aumentan cuando las CMLVs se incuban con agonistas que implican la activación de SOCE (5-HT a través de señalización IP₃ y TG a través de la inhibición de SERCA), ya que el número de señales fluorescentes por PLA se ven incrementadas. En cambio, no se observa mayor número de señales PLA cuando se incuban las células con un estímulo despolarizante como 70K, lo que sugiere que el flujo de Ca²⁺ inducido por agonista puede ser debido principalmente a una interacción funcional o comunicación entre los SOCCs dependientes de TRPC1 y Orai1 y los canales Cav1.2 en CMLVs.

Por lo tanto, aquí mostramos varias evidencias que demuestran que los componentes de SOCCs, Orai1 y TRPC1, forman un complejo macromolecular con Cav1.2 para regular la señalización de Ca²⁺ y el tono vascular.

Si tenemos en cuenta que los SOCCs formados por Orai1 hexaméricos, recientemente cristalografiados (Hou y cols., 2012), pueden ser canales catiónicos no selectivos con propiedades biofísicas ligeramente diferentes a los canales CRAC o canales Orai1 tetraméricos clásicamente descritos (Thompson y Shuttleworth, 2013) y que existen evidencias descritas de que los canales TRPC1 pueden asociarse con Orai1 formando SOCCs no selectivos y facilitar SOCE (Ambudkar y cols., 2016; Gueguinou y cols., 2016), la existencia de complejos macromoleculares en los que Orai1, TRPC1 y Cav1.2 puedan interactuar funcionalmente apoya la idea de que el canal Cav1.2 pueda incrementar significativamente SOCE, gracias a una activación secundaria de los canales Cav1.2 inducida por el influjo catiónico y despolarización vía SOCCs (Bolotina, 2012; Molnar y cols., 2012; Dionisio y cols., 2015).

5.9 Papel fisiopatológico de SOCE.

Como hemos introducido anteriormente, la capa más importante de los vasos sanguíneos es la túnica media, ya que es la responsable del mantenimiento y regulación del tono vascular, siendo las CMLVs, el tipo celular predominante. Varias enfermedades vasculares como la aterosclerosis, hipertensión y reestenosis presentan alteraciones a nivel de CMLV, en las que normalmente se produce un cambio de fenotipo debido a procesos mecánicos o inflamatorios, pasando de un fenotipo contráctil a un fenotipo sintético, proliferativo y migratorio. Este tipo de células son las responsables del estrechamiento y el remodelado de los vasos característico en estas patologías (Liu y cols., 1989; Puato y cols., 2004; Orr y cols., 2010).

Este tipo de enfermedades se asocia con contracciones arteriales mantenidas debido al flujo de Ca²⁺ transmembrana a través de canales iónicos en CMLVs, el cual modifica el flujo sanguíneo comprometiendo la función de distintos órganos. En este trabajo, demostramos que los SOCCs dependientes de Orai1 y TRPC1, activados por agonistas que implican la

ruta de señalización de IP_3 , interaccionan con canales $Ca_v1.2$. Estos canales están localizados en regiones muy próximas o microdominios y su comunicación funcional se incrementa después de la estimulación con agonista, sugiriendo su importante papel en la modulación del diámetro arterial y, por lo tanto, en el control del flujo sanguíneo. Por lo tanto, esta interacción funcional entre los SOCCs y LTCCs puede ser una atractiva estrategia terapéutica para mejorar la regulación del tono vascular en estas enfermedades, ya que muchos de los componentes moleculares de esta ruta de entrada de Ca^{2+} se encuentran sobreexpresados en alguna patología vascular como veremos a continuación.

La participación de SOCE no se limita a las CMLVs contráctiles, sino que se ha descrito que existe un aumento de este tipo de entrada de Ca^{2+} en CMLVs con fenotipo proliferativo o sintético, debido en parte, a un aumento de la expresión de STIM1 y Orai1 (Potier y cols., 2009). Esto sugiere que estos cambios adaptativos en la expresión y función de Orai1 y STIM1 podrían llevar a la modulación fenotípica que ocurre durante distintas patologías.

La señalización de Ca^{2+} regula la función vascular, no sólo la contracción, sino también los cambios fenotípicos, la proliferación y migración de las CMLVs. Nuestro grupo ha corroborado la participación de SOCE en la vasoconstricción y proliferación inducida por Urotensina II en coronaria y aorta de rata, en la que STIM1, Orai1 y TRPC1 tienen un papel protagonista (Dominguez-Rodriguez y cols., 2012; Rodriguez-Moyano y cols., 2013), lo que refleja la interacción que puede existir entre STIM1 y Orai1 con estos canales TRP no selectivos para Ca^{2+} . Mediante el silenciamiento de la expresión de estas proteínas con siRNAs e inhibidores farmacológicos, hemos demostrado la reducción de SOCE inducida por agonista y TG, limitando la proliferación de las CMLVs (Rodriguez-Moyano y cols., 2013). Otros grupos también han demostrado la participación de STIM1, Orai1 y TRPC1 en SOCE (Takahashi y cols., 2007; Li y cols., 2008), relacionando estos componentes con la proliferación y migración celular, por lo que se demuestra que esta entrada de Ca^{2+} está implicada en procesos patológicos que impliquen una proliferación de CMLVs.

Varios grupos han utilizado un modelo de angioplastia carotídea en rata *in vivo* para estudiar la proliferación y migración de las CMLVs. En ellos se ha observado que, tras la lesión arterial, existía una sobreexpresión de Orai1 y STIM1. Además, describieron que, silenciando ambas proteínas con vectores adenovirales, conseguían prevenir la sobreexpresión de ambos componentes de SOCE, reducir la proliferación de CMLVs y la formación de la neointima, al mismo tiempo que evitaban la activación de factores de transcripción como NFAT (Mancarella y cols., 2013). Actualmente, en nuestro laboratorio estamos desarrollando experimentos usando el modelo de angioplastia carotídea para determinar los componentes moleculares de SOCE involucrados en la formación de la neointima, incluyendo proteínas reguladoras de STIM1 como SARAF, además de estudiar la posible implicación de los SOCCs como mediadores de la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), que regula la proliferación celular.

Asimismo, se ha relacionado a STIM1 y Orai1 con patologías como la hipertensión. Algunos estudios describieron que en modelos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR, *Spontaneously Hypertensive Rats*), la contracción inducida por SOCE era mayor

comparadas con ratas WT. Además, esta contracción se suprimía con inhibidores de SOCE como el 2APB y Gd^{3+} o se reducía mediante la aplicación de anticuerpos contra STIM1 y Orai1, llegando a igualar las diferencias entre SHR y ratas WT (Giachini y cols., 2009). Estos resultados se correlacionaron con una mayor expresión de estos componentes de SOCE a nivel de proteína y mRNA. Otros demostraron que la hipertensión pulmonar está relacionada con una sobreexpresión de STIM1 y Orai1 en CMLV de la arteria pulmonar (Ogawa y cols., 2012). Todo ello apoya la idea de STIM1 y Orai1 como dianas terapéuticas en enfermedades que cursan con oclusión vascular y la hipertensión.

SOCE igualmente puede participar en procesos patológicos como la trombosis, que tiene lugar cuando hay una obstrucción del flujo sanguíneo debido a la agregación plaquetaria o coagulación sanguínea inducida por un estímulo o un daño severo. La activación y agregación plaquetaria tiene lugar por un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que puede ser debido, al menos en parte, a una SOCE activada por diversos agonistas. Se han descrito altos niveles de expresión de STIM1 y Orai1, además de algunos canales TRP (Berna-Erro y cols., 2016), en estas células sugiriendo que esta entrada de Ca^{2+} tiene un papel importante en la función y regulación de las mismas.

Por otra parte, la hipoxia es uno de los factores importantes que promueven angiogénesis. En estas condiciones, se ha observado una mayor proliferación de células endoteliales y CMLVs, debido al aumento de la transcripción de genes que codifican agonistas vasoactivos como la ET-1 o factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento derivado de PDGF, que pueden promover la activación de SOCE. Existen estudios que describen una entrada de Ca^{2+} mantenida en células endoteliales promovida por VEGF y sensible a inhibidores de SOCE como Synta66 (Li y cols., 2011a), implicando a este tipo de entrada de Ca^{2+} en procesos angiogénicos.

Aquí se ha demostrado que la señalización de Ca^{2+} regulada por los reservorios mediada por SOCCs es crucial en multitud de funciones celulares y tiene un papel fisiológico muy importante, estando implicada en diversas patologías. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos inhibidores de SOCE que sean altamente específicos tanto de tejido como de sus distintos componentes, para poder entender con exactitud la implicación fisiopatológica de SOCE y para poder desarrollar nuevos tratamientos de enfermedades.

5.9.1 Perspectivas futuras.

Desde su descubrimiento, hace casi 30 años, se ha progresado mucho en el estudio de SOCE. El descubrimiento de STIM1 y Orai1 indujo un rápido crecimiento de lo que conocemos hoy en día sobre las funciones fisiológicas y las consecuencias patológicas que puede tener la disfunción de esta ruta de entrada de Ca^{2+} . Sin embargo, todavía se desconocen algunos aspectos sobre el mecanismo, como la estequiometría de la unión STIM1-Orai1, cómo se induce la apertura, qué factores regulan el proceso... Y, sobre todo, se desconocen aspectos acerca de la significancia fisiológica de los SOCCs y SOCE y especialmente de su importancia en enfermedades. Además, la heterogeneidad de los mismos ha complicado su entendimiento ya que no hay herramientas suficientes para

hacer esta determinación ni tampoco se ha podido cuantificar la importancia relativa de TRPC1/Orai1 comparado con otros tipos de canales de Ca^{2+} . Por eso, es necesario realizar más investigaciones acerca de la participación de estos canales a la fisiología celular y cómo interaccionan con otros canales de Ca^{2+} más importantes como los VDCC.

Por todo esto, el descubrimiento de nuevos fármacos o pequeñas moléculas que actúen contra estos canales es de gran importancia para la investigación preclínica. Podemos encontrar antagonistas de canales de Ca^{2+} , erróneamente llamados así ya que haría referencia a bloqueantes de todos los canales de Ca^{2+} o a la inexistencia de otros tipos de canales de Ca^{2+} , que bloquean los LTCCs específicamente, reduciendo la contracción del músculo liso vascular y la resistencia periférica. Sin embargo, no se han desarrollado fármacos o pequeñas moléculas contra otros tipos de canales de Ca^{2+} como los SOCCs, que presumiblemente bloquearían el remodelado vascular, la reestenosis o la angiogénesis tumoral. Por tanto, es de gran interés el desarrollo de nuevas estrategias contra este tipo de canales, ya sea con bloqueantes específicos contra Orai1, TRPC1, etc., con tratamientos combinados con antagonistas de LTCCs o mediante pequeñas moléculas contra los heterómeros que forman estos canales desempeñando distintas funciones en diferentes tipos celulares. Existen nuevas moléculas que se postulan como antagonistas específicos de SOCE, como el Synta66 (van Kruchten y cols., 2012) o GSK-7975A (Derler y cols., 2013), sin embargo, todavía no se conoce el mecanismo de actuación de estos inhibidores o por qué pueden ser más potentes contra SOCE en un tipo celular más que en otro. El último compuesto fue desarrollado por la empresa GlaxoSmithKline, lo cual refleja la apuesta de la industria farmacéutica para encontrar inhibidores eficientes para esta vía de señalización.

6 CONCLUSIONES

1. La vasoconstricción inducida por agonista que activa la cascada de señalización de fosfolipasa C (PLC) e inositol 1,4.5-trifosfato (IP₃), implica la coactivación de canales de Ca²⁺ regulados por reservorios (SOCCs) y canales de Ca²⁺ tipo L (LTCCs) en aorta de ratón y coronaria de rata.
2. El incremento de la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]) en células de músculo liso vascular (CMLVs) aisladas de aorta de ratón y coronaria de rata mediado por agonista implica la participación de SOCCs y LTCCs.
3. La activación de la entrada de Ca²⁺ regulada por los reservorios (SOCE) promovida por la taspigargina (TG) induce un aumento de la [Ca²⁺], y una vasoconstricción que implican la activación específica de los SOCCs, pero también de LTCCs.
4. SOCE no compensa la falta de función de los LTCCs en ratones knock-out de Ca_v1.2 (Ca_v1.2^{ko}).
5. La respuesta contráctil en aorta y el incremento de la [Ca²⁺] en CMLVs evocados por serotonina (5-HT) y TG en ratones Ca_v1.2^{ko} son significativamente menores en comparación con ratones wild type (WT), confirmando la necesidad de los LTCCs para mediar la contracción de los vasos.
6. Las respuestas provocadas por 5-HT y TG en aorta son susceptibles a los cambios en el potencial de membrana promovidos por valinomicina y cromakalim confirmando la contribución de los LTCCs en estas respuestas.
7. Las respuestas provocadas por 5-HT y TG en aorta se aumentan en presencia de BayK-8644, agonista de los LTCCs.
8. SOCE no es suficiente estímulo despolarizante para la activación secundaria de los LTCCs en las respuestas mediadas por 5-HT y TG cuando se hiperpolariza la membrana farmacológicamente, debido a la inactivación de estos canales.
9. Orai1 está implicado en la vasoconstricción inducida por 5-HT en CMLVs.
10. Los canales Orai1 (SOCCs) y canales Ca_v1.2 (LTCCs) presentan una distribución uniforme y localización subcelular similar en CMLVs, mostrando colocalización en condiciones basales que aumenta en presencia de agonistas que activan SOCE.
11. Existe una interacción basal entre Ca_v1.2 y Orai1, y entre Ca_v1.2 y TRPC1, de manera que forman un complejo macromolecular de señalización de Ca²⁺ en CMLVs.
12. La interacción entre Ca_v1.2, Orai1, y TRPC1 se incrementa en presencia de agonistas de SOCE indicando un mecanismo de regulación controlada de la señalización de Ca²⁺ y el tono vascular.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Saleh, H., Pathan, A. R., Daalis, A., Hubrack, S., Abou-Jassoum, H., Al-Naeimi, H., . . . Machaca, K. (2013). "Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor up-regulation in hypertension is associated with sensitization of Ca²⁺ release and vascular smooth muscle contractility." *J Biol Chem* 288(46): 32941-32951.
- Afroze, T., Yang, G., Khoshbin, A., Tanwir, M., Tabish, T., Momen, A. y Husain, M. (2014). "Calcium efflux activity of plasma membrane Ca²⁺ ATPase-4 (PMCA4) mediates cell cycle progression in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 289(10): 7221-7231.
- Aguilar, H. N. y Mitchell, B. F. (2010). "Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility." *Hum Reprod Update* 16(6): 725-744.
- Alapati, V. R., McKenzie, C., Blair, A., Kenny, D., MacDonald, A. y Shaw, A. M. (2007). "Mechanisms of U46619- and 5-HT-induced contraction of bovine pulmonary arteries: role of chloride ions." *Br J Pharmacol* 151(8): 1224-1234.
- Ambudkar, I. S., de Souza, L. B. y Ong, H. L. (2016). "TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces." *Cell Calcium*.
- Ambudkar, I. S., Ong, H. L., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C. y Cheng, K. T. (2007). "TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels." *Cell Calcium* 42(2): 213-223.
- Amiya, E., Watanabe, M. y Komuro, I. (2014). "The Relationship between Vascular Function and the Autonomic Nervous System." *Ann Vasc Dis* 7(2): 109-119.
- Avila-Medina, J., Calderon-Sanchez, E., Gonzalez-Rodriguez, P., Monje-Quiroga, F., Rosado, J. A., Castellano, A., . . . Smani, T. (2016). "Orai1 and TRPC1 Proteins Co-localize with CaV1.2 Channels to Form a Signal Complex in Vascular Smooth Muscle Cells." *J Biol Chem* 291(40): 21148-21159.
- Badou, A., Jha, M. K., Matza, D. y Flavell, R. A. (2013). "Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes." *Front Immunol* 4: 243.
- Bannister, J. P., Bulley, S., Narayanan, D., Thomas-Gatewood, C., Luzny, P., Pachua, J. y Jaggar, J. H. (2012). "Transcriptional upregulation of alpha2delta-1 elevates arterial smooth muscle cell voltage-dependent Ca²⁺ channel surface expression and cerebrovascular constriction in genetic hypertension." *Hypertension* 60(4): 1006-1015.
- Barrett, C. F. y Tsien, R. W. (2008). "The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of CaV1.2 L-type calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 2157-2162.
- Beech, D. J. (2005). "TRPC1: store-operated channel and more." *Pflugers Arch* 451(1): 53-60.
- Beech, D. J. (2012). "Orai1 calcium channels in the vasculature." *Pflugers Arch* 463(5): 635-647.
- Bergdahl, A., Gomez, M. F., Dreja, K., Xu, S. Z., Adner, M., Beech, D. J., . . . Sward, K. (2003). "Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca²⁺ entry dependent on TRPC1." *Circ Res* 93(9): 839-847.
- Bergdahl, A., Gomez, M. F., Wihlborg, A. K., Erlinge, D., Eyjolfson, A., Xu, S. Z., . . . Hellstrand, P. (2005). "Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca²⁺ entry." *Am J Physiol Cell Physiol* 288(4): C872-880.

- Berna-Erro, A., Jardin, I., Smani, T. y Rosado, J. A. (2016). "Regulation of Platelet Function by Orai, STIM and TRP." *Adv Exp Med Biol* 898: 157-181.
- Berna-Erro, A., Redondo, P. C. y Rosado, J. A. (2012). "Store-operated Ca(2+) entry." *Adv Exp Med Biol* 740: 349-382.
- Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M. V. y Golovina, V. A. (2008). "Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture." *Am J Physiol Cell Physiol* 295(3): C779-790.
- Berridge, M. J. (1995). "Capacitative calcium entry." *Biochem J* 312 (Pt 1): 1-11.
- Berridge, M. J. (2008). "Smooth muscle cell calcium activation mechanisms." *J Physiol* 586(21): 5047-5061.
- Bird, G. S., DeHaven, W. I., Smyth, J. T. y Putney, J. W., Jr. (2008). "Methods for studying store-operated calcium entry." *Methods* 46(3): 204-212.
- Blaustein, M. P., Kao, J. P. y Matteson, D. R. (2011). *Cellular Physiology and Neurophysiology: Mosby Physiology Monograph Series*, Elsevier Health Sciences.
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A. y Schwartz, A. (2005). "The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on." *J Clin Invest* 115(12): 3306-3317.
- Bolotina, V. M. (2008). "Orai, STIM1 and iPLA2beta: a view from a different perspective." *J Physiol* 586(13): 3035-3042.
- Bolotina, V. M. (2012). "Orai1, STIM1, and iPLA2beta determine arterial vasoconstriction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(5): 1066-1067.
- Boron, W. F. y Boulpaep, E. L. (2012). *Medical physiology, 2e updated edition: with Student consult online access*, Elsevier Health Sciences.
- Brini, M. y Carafoli, E. (2011). "The plasma membrane Ca(2+) ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(2).
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. y Sheu, S. S. (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4): C817-833.
- Brozovich, F. V., Nicholson, C. J., Degen, C. V., Gao, Y. Z., Aggarwal, M. y Morgan, K. G. (2016). "Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders." *Pharmacol Rev* 68(2): 476-532.
- Cai, X. (2007). "Molecular evolution and structural analysis of the Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel subunit, Orai." *J Mol Biol* 368(5): 1284-1291.
- Cai, X., Zhou, Y., Nwokonko, R. M., Loktionova, N. A., Wang, X., Xin, P., . . . Gill, D. L. (2016). "The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer." *J Biol Chem* 291(50): 25764-25775.
- Carafoli, E. (1991). "Calcium pump of the plasma membrane." *Physiol Rev* 71(1): 129-153.
- Catterall, W. A. (2011). "Voltage-gated calcium channels." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8): a003947.
- Cipolla, M. J., Gokina, N. I. y Osol, G. (2002). "Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior." *Faseb j* 16(1): 72-76.

- Clapham, D. E., Runnels, L. W. y Strubing, C. (2001). "The TRP ion channel family." *Nat Rev Neurosci* 2(6): 387-396.
- Cogolludo, A. L., Perez-Vizcaino, F., Lopez-Lopez, G., Ibarra, M., Zaragoza-Arnaez, F. y Tamargo, J. (2001). "Propafenone modulates potassium channel activities of vascular smooth muscle from rat portal veins." *J Pharmacol Exp Ther* 299(2): 801-810.
- Collins, H. E., Zhu-Mauldin, X., Marchase, R. B. y Chatham, J. C. (2013). "STIM1/Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305(4): H446-458.
- Correll, R. N., Goonasekera, S. A., van Berlo, J. H., Burr, A. R., Accornero, F., Zhang, H., . . . Molkentin, J. D. (2015). "STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca(2+)(+) handling and cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* 87: 38-47.
- Cote, F., Fligny, C., Fromes, Y., Mallet, J. y Vodjdani, G. (2004). "Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function." *Trends Mol Med* 10(5): 232-238.
- Coussin, F., Macrez, N., Morel, J. L. y Mironneau, J. (2000). "Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca(2+)-induced Ca(2+) release in vascular myocytes." *J Biol Chem* 275(13): 9596-9603.
- Crawford, J. H., Isbell, T. S., Huang, Z., Shiva, S., Chacko, B. K., Schechter, A. N., . . . Patel, R. P. (2006). "Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation." *Blood* 107(2): 566-574.
- Croisier, H., Tan, X., Chen, J., Sneyd, J., Sanderson, M. J. y Brook, B. S. (2015). "Ryanodine receptor sensitization results in abnormal calcium signaling in airway smooth muscle cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* 53(5): 703-711.
- Chalmers, M., Schell, M. J. y Thorn, P. (2006). "Agonist-evoked inositol trisphosphate receptor (IP3R) clustering is not dependent on changes in the structure of the endoplasmic reticulum." *Biochem J* 394(Pt 1): 57-66.
- Chataigneau, T., Feletou, M., Huang, P. L., Fishman, M. C., Duhault, J. y Vanhoutte, P. M. (1999). "Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice." *Br J Pharmacol* 126(1): 219-226.
- Chemaly, E. R., Bobe, R., Adnot, S., Hajjar, R. J. y Lipskaia, L. (2013). "Sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPases (SERCA) isoforms in the normal and diseased cardiac, vascular and skeletal muscle." *J Cardiovasc Dis Diagn* 1: 113.
- Chen, Y. F., Chen, Y. T., Chiu, W. T. y Shen, M. R. (2013). "Remodeling of calcium signaling in tumor progression." *J Biomed Sci* 20: 23.
- Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W. y Ambudkar, I. S. (2011). "Local Ca(2+)(+) entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca(2+)(+) signals required for specific cell functions." *PLoS Biol* 9(3): e1001025.
- Chiang, C. S., Huang, C. H., Chieng, H., Chang, Y. T., Chang, D., Chen, J. J., . . . Chen, C. C. (2009). "The Ca(v)3.2 T-type Ca(2+)(+) channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice." *Circ Res* 104(4): 522-530.
- Darby, P. J., Kwan, C. Y. y Daniel, E. E. (1996). "Selective inhibition of oxalate-stimulated Ca2+ transport by cyclopiazonic acid and thapsigargin in smooth muscle microsomes." *Can J Physiol Pharmacol* 74(2): 182-192.

- Daut, J., Maier-Rudolph, W., von Beckerath, N., Mehrke, G., Gunther, K. y Goedel-Meinen, L. (1990). "Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels." *Science* 247(4948): 1341-1344.
- Davies, M. G. (2015). "New Insights on the Role of SERCA During Vessel Remodeling in Metabolic Syndrome." *Diabetes* 64(9): 3066-3068.
- Davis, M. J. y Hill, M. A. (1999). "Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response." *Physiol Rev* 79(2): 387-423.
- de Wit, C., Boettcher, M. y Schmidt, V. J. (2008). "Signaling across myoendothelial gap junctions—fact or fiction?" *Cell Commun Adhes* 15(3): 231-245.
- DeHaven, W. I., Jones, B. F., Petranka, J. G., Smyth, J. T., Tomita, T., Bird, G. S. y Putney, J. W., Jr. (2009). "TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1." *J Physiol* 587(Pt 10): 2275-2298.
- Delmotte, P., Jia, L. y Sieck, G. C. (2014). The role of mitochondria in calcium regulation in airway smooth muscle. *Calcium Signaling In Airway Smooth Muscle Cells*, Springer: 211-234.
- Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J. y Gill, D. L. (2009). "STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals." *J Biol Chem* 284(34): 22501-22505.
- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K. y Romanin, C. (2009). "A Ca₂(+) release-activated Ca₂(+) (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca₂(+)-dependent inactivation of ORAI1 channels." *J Biol Chem* 284(37): 24933-24938.
- Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M. C., Begg, M., . . . Romanin, C. (2013). "The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry." *Cell Calcium* 53(2): 139-151.
- Desai, P. N., Zhang, X., Wu, S., Janoshazi, A., Bolimuntha, S., Putney, J. W. y Trebak, M. (2015). "Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message." *Sci Signal* 8(387): ra74.
- Devine, C. E., Somlyo, A. V. y Somlyo, A. P. (1972). "Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles." *J Cell Biol* 52(3): 690-718.
- Dionisio, N., Smani, T., Woodard, G. E., Castellano, A., Salido, G. M. y Rosado, J. A. (2015). "Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels." *Biochim Biophys Acta* 1853(5): 1145-1153.
- Doan, L. (2010). "Voltage-gated calcium channels and pain." *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 14(2): 42-47.
- Dominguez-Rodriguez, A., Diaz, I., Rodriguez-Moyano, M., Calderon-Sanchez, E., Rosado, J. A., Ordonez, A. y Smani, T. (2012). "Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(5): 1325-1332.
- Earley, S. y Brayden, J. E. (2015). "Transient receptor potential channels in the vasculature." *Physiol Rev* 95(2): 645-690.
- Eddinger, T. J. y Meer, D. P. (2007). "Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(2): C493-508.

- Egea-Guerrero, J. J., Murillo-Cabezas, F., Munoz-Sanchez, M. A., Vilches-Arenas, A., Porrás-Gonzalez, C., Castellano, A., . . . González-Montelongo Mdel, C. (2015). "Role of L-type Ca²⁺ channels, sarcoplasmic reticulum and Rho kinase in rat basilar artery contractile properties in a new model of subarachnoid hemorrhage." *Vascul Pharmacol* 72: 64-72.
- Essin, K., Welling, A., Hofmann, F., Luft, F. C., Gollasch, M. y Moosmang, S. (2007). "Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate Ca²⁺ sparks in murine arterial smooth muscle cells." *J Physiol* 584(Pt 1): 205-219.
- Esteller Pérez, A. (2005). "Biología de la pared vascular y síndrome metabólico." *Nutrición hospitalaria* 20(1): 5-17.
- Ets, H. K., Seow, C. Y. y Moreland, R. S. (2016). "Sustained Contraction in Vascular Smooth Muscle by Activation of L-type Ca²⁺ Channels Does Not Involve Ca²⁺ Sensitization or Caldesmon." *Front Pharmacol* 7: 516.
- Evans, W. H. y Martin, P. E. (2002). "Gap junctions: structure and function (Review)." *Mol Membr Biol* 19(2): 121-136.
- Fass, D. M. y Levitan, E. S. (1996). "Bay K 8644 reveals two components of L-type Ca²⁺ channel current in clonal rat pituitary cells." *J Gen Physiol* 108(1): 1-11.
- Fernandez-Tenorio, M., Gonzalez-Rodriguez, P., Porrás, C., Castellano, A., Moosmang, S., Hofmann, F., . . . Lopez-Barneo, J. (2010). "Short communication: genetic ablation of L-type Ca²⁺ channels abolishes depolarization-induced Ca²⁺ release in arterial smooth muscle." *Circ Res* 106(7): 1285-1289.
- Fernandez-Tenorio, M., Porrás-Gonzalez, C., Castellano, A., Lopez-Barneo, J. y Urena, J. (2012). "Tonic arterial contraction mediated by L-type Ca²⁺ channels requires sustained Ca²⁺ influx, G protein-associated Ca²⁺ release, and RhoA/ROCK activation." *Eur J Pharmacol* 697(1-3): 88-96.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., . . . Rao, A. (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature* 441(7090): 179-185.
- Firth, A. L., Remillard, C. V., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E. A. y Yuan, J. X. (2011). "Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels." *Pulm Circ* 1(1): 48-71.
- Fischer, E. I. C. (2008). "La adventicia: estado actual del conocimiento." *Rev Argent Cardiol* 76: 58-63.
- Fransen, P., Van Hove, C. E., van Langen, J., Schrijvers, D. M., Martinet, W., De Meyer, G. R. y Bult, H. (2012). "Contribution of transient and sustained calcium influx, and sensitization to depolarization-induced contractions of the intact mouse aorta." *BMC Physiol* 12: 9.
- Funabashi, K., Ohya, S., Yamamura, H., Hatano, N., Muraki, K., Giles, W. y Imaizumi, Y. (2010). "Accelerated Ca²⁺ entry by membrane hyperpolarization due to Ca²⁺-activated K⁺ channel activation in response to histamine in chondrocytes." *Am J Physiol Cell Physiol* 298(4): C786-797.
- Ghosh, D., Syed, A. U., Prada, M. P., Nystoriak, M. A., Santana, L. F., Nieves-Cintrón, M. y Navedo, M. F. (2017). "Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle." *Adv Pharmacol* 78: 49-87.

- Giachini, F. R., Chiao, C. W., Carneiro, F. S., Lima, V. V., Carneiro, Z. N., Dorrance, A. M., . . . Webb, R. C. (2009). "Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: a novel insight into vascular dysfunction." *Hypertension* 53(2): 409-416.
- González-Ramos, S., Carrasquero, L. M. G., Delicado, E. G., Miras-Portugal, M. T., Fernández-Velasco, M. y Boscá, L. (2013). "Determination of the Intracellular Calcium Concentration in Peritoneal Macrophages Using Microfluorimetry." *Bio-protocol* 3(23): e988.
- Grayson, T. H., Haddock, R. E., Murray, T. P., Wojcikiewicz, R. J. y Hill, C. E. (2004). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries." *Cell Calcium* 36(6): 447-458.
- Grover, A. K. y Samson, S. E. (1986). "Pig coronary artery smooth muscle: substrate and pH dependence of the two calcium pumps." *Am J Physiol* 251(4 Pt 1): C529-534.
- Grover, A. K., Samson, S. E. y Misquitta, C. M. (1997). "Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ pump isoform SERCA3 is more resistant than SERCA2b to peroxide." *Am J Physiol* 273(2 Pt 1): C420-425.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* 260(6): 3440-3450.
- Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M. y Dietrich, A. (2004). "Receptor-operated cation entry—more than esoteric terminology?" *Sci STKE* 2004(243): pe35.
- Gueguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Deliot, N., Gambade, A., . . . Potier-Cartreau, M. (2016). "SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin." *Oncotarget* 7(24): 36168-36184.
- Guerrero-Hernandez, A., Gomez-Viquez, L., Guerrero-Serna, G. y Rueda, A. (2002). "Ryanodine receptors in smooth muscle." *Front Biosci* 7: d1676-1688.
- Gunter, T. E., Gunter, K. K., Sheu, S. S. y Gavin, C. E. (1994). "Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance." *Am J Physiol* 267(2 Pt 1): C313-339.
- Gutierrez-Pajares, J. L., Iturrieta, J., Dulam, V., Wang, Y., Pavlides, S., Malacari, G., . . . Frank, P. G. (2015). "Caveolin-3 Promotes a Vascular Smooth Muscle Contractile Phenotype." *Front Cardiovasc Med* 2: 27.
- Guyton, A. (2011). *Tratado de Fisiología Médica* 12 edición Elsevier España, SL.
- Haeusler, G. (1983). "Contraction, membrane potential, and calcium fluxes in rabbit pulmonary arterial muscle." *Fed Proc* 42(2): 263-268.
- Hamilton, S. L. (2005). "Ryanodine receptors." *Cell Calcium* 38(3-4): 253-260.
- Hansen, P. C., Nagy, J. G. y O'leary, D. P. (2006). *Deblurring images: matrices, spectra, and filtering*, SIAM.
- Harraz, O. F., Brett, S. E., Zechariah, A., Romero, M., Puglisi, J. L., Wilson, S. M. y Welsh, D. G. (2015). "Genetic ablation of CaV3.2 channels enhances the arterial myogenic response by modulating the RyR-BKCa axis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(8): 1843-1851.
- Hermesmeyer, K. (2013). "Calcium Antagonist Effects on Vascular Muscle." *Calcium in Biological Systems*. 423.

- Hill-Eubanks, D. C., Werner, M. E., Heppner, T. J. y Nelson, M. T. (2011). "Calcium signaling in smooth muscle." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(9): a004549.
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S. y Wegener, J. W. (2014). "L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function." *Physiol Rev* 94(1): 303-326.
- Hooper, R., Zhang, X., Webster, M., Go, C., Kedra, J., Marchbank, K., . . . Soboloff, J. (2015). "Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma." *Mol Cell Biol* 35(16): 2790-2798.
- Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R. y Morgan, K. G. (1996). "Mechanisms of smooth muscle contraction." *Physiol Rev* 76(4): 967-1003.
- Hoth, M. y Penner, R. (1992). "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." *Nature* 355(6358): 353-356.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M. y Long, S. B. (2012). "Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai." *Science* 338(6112): 1308-1313.
- House, S. J., Potier, M., Bisailon, J., Singer, H. A. y Trebak, M. (2008). "The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease." *Pflugers Arch* 456(5): 769-785.
- Huang, J., Wolk, J. H., Gewitz, M. H., Loyd, J. E., West, J., Austin, E. D. y Mathew, R. (2015). "Enhanced caveolin-1 expression in smooth muscle cells: Possible prelude to neointima formation." *World J Cardiol* 7(10): 671-684.
- Inoue, R., Jensen, L. J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A. y Ito, Y. (2006). "Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease." *Circ Res* 99(2): 119-131.
- Ismat, F. A., Zhang, M., Kook, H., Huang, B., Zhou, R., Ferrari, V. A., . . . Patel, V. V. (2005). "Homeobox protein Hop functions in the adult cardiac conduction system." *Circ Res* 96(8): 898-903.
- Jackson, W. F. (2000). "Ion channels and vascular tone." *Hypertension* 35(1 Pt 2): 173-178.
- Jacob, M., Chappell, D. y Becker, B. F. (2016). "Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation." *Crit Care* 20(1): 319.
- Jardin, I., Albarran, L., Bermejo, N., Salido, G. M. y Rosado, J. A. (2012). "Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1." *Biochem J* 445(1): 29-38.
- Jardin, I., Dionisio, N., Frischauf, I., Berna-Erro, A., Woodard, G. E., Lopez, J. J., . . . Rosado, J. A. (2013). "The polybasic lysine-rich domain of plasma membrane-resident STIM1 is essential for the modulation of store-operated divalent cation entry by extracellular calcium." *Cell Signal* 25(5): 1328-1337.
- Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. y Rosado, J. A. (2008). "Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* 283(37): 25296-25304.
- Johnson, R. P., El-Yazbi, A. F., Takeya, K., Walsh, E. J., Walsh, M. P. y Cole, W. C. (2009). "Ca²⁺ sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response." *J Physiol* 587(Pt 11): 2537-2553.

- Kang, K. T. (2014). "Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension." *Toxicol Res* 30(3): 141-148.
- Katz, A. M. (2005). Molecular and Cellular Basis of Contraction and Relaxation. *Atlas of Heart Failure*, Springer: 1-14.
- Kawanabe, Y., Masaki, T. y Hashimoto, N. (2006). "Involvement of phospholipase C in endothelin 1-induced stimulation of Ca⁺⁺ channels and basilar artery contraction in rabbits." *J Neurosurg* 105(2): 288-293.
- Kim, H. R., Gallant, C., Leavis, P. C., Gunst, S. J. y Morgan, K. G. (2008). "Cytoskeletal remodeling in differentiated vascular smooth muscle is actin isoform dependent and stimulus dependent." *Am J Physiol Cell Physiol* 295(3): C768-778.
- King, M. W. (1996). *The medical biochemistry page*, Terre Haute Center for Medical Education.
- Kitamura, K. y Yamazaki, J. (2001). "Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature." *Jpn J Pharmacol* 85(4): 351-357.
- Ko, E. A., Han, J., Jung, I. D. y Park, W. S. (2008). "Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells." *J Smooth Muscle Res* 44(2): 65-81.
- Kotlikoff, M. I. (2003). "Calcium-induced calcium release in smooth muscle: the case for loose coupling." *Prog Biophys Mol Biol* 83(3): 171-191.
- Krick, S., Platoshyn, O., Sweeney, M., Kim, H. y Yuan, J. X. (2001). "Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4): C970-979.
- Kwan, H. Y., Shen, B., Ma, X., Kwok, Y. C., Huang, Y., Man, Y. B., . . . Yao, X. (2009). "TRPC1 associates with BK(Ca) channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 104(5): 670-678.
- Lacinova, L. (2005). "Voltage-dependent calcium channels." *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1: 1-78.
- Lansman, J. B. (1990). "Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit." *J Gen Physiol* 95(4): 679-696.
- Large, W. A. (2002). "Receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective." *J Cardiovasc Electrophysiol* 13(5): 493-501.
- Leung, F. P., Yung, L. M., Yao, X., Laher, I. y Huang, Y. (2008). "Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle." *Br J Pharmacol* 153(5): 846-857.
- Levick, J. R. (2013). *An introduction to cardiovascular physiology*, Butterworth-Heinemann.
- Levy, M. N., Koeppen, B. M. y Stanton, B. A. (2005). *Berne & Levy principles of physiology*, Elsevier Health Sciences.
- Lewis, R. S. (2007). "The molecular choreography of a store-operated calcium channel." *Nature* 446(7133): 284-287.
- Li, J., Cubbon, R. M., Wilson, L. A., Amer, M. S., McKeown, L., Hou, B., . . . Beech, D. J. (2011a). "Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation." *Circ Res* 108(10): 1190-1198.
- Li, J., McKeown, L., Ojelabi, O., Stacey, M., Foster, R., O'Regan, D., . . . Beech, D. J. (2011b). "Nanomolar potency and selectivity of a Ca(2)(+) release-activated Ca(2)(+)

- channel inhibitor against store-operated Ca^{2+} entry and migration of vascular smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* 164(2): 382-393.
- Li, J., Patel, V. V., Kostetskii, I., Xiong, Y., Chu, A. F., Jacobson, J. T., . . . Radice, G. L. (2005). "Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis." *Circ Res* 97(5): 474-481.
- Li, J., Sukumar, P., Milligan, C. J., Kumar, B., Ma, Z. Y., Munsch, C. M., . . . Beech, D. J. (2008). "Interactions, functions, and independence of plasma membrane STIM1 and TRPC1 in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 103(8): e97-104.
- Li, L., Eto, M., Lee, M. R., Morita, F., Yazawa, M. y Kitazawa, T. (1998). "Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle." *J Physiol* 508 (Pt 3): 871-881.
- Liao, P. y Soong, T. W. (2010). "Understanding alternative splicing of Cav1.2 calcium channels for a new approach towards individualized medicine." *J Biomed Res* 24(3): 181-186.
- Liao, P., Yong, T. F., Liang, M. C., Yue, D. T. y Soong, T. W. (2005). "Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca^{2+} channels in cardiac and smooth muscles." *Cardiovasc Res* 68(2): 197-203.
- Liao, P., Yu, D., Lu, S., Tang, Z., Liang, M. C., Zeng, S., . . . Soong, T. W. (2004). "Smooth muscle-selective alternatively spliced exon generates functional variation in Cav1.2 calcium channels." *J Biol Chem* 279(48): 50329-50335.
- Lin, Q., Zhao, G., Fang, X., Peng, X., Tang, H., Wang, H., . . . Ouyang, K. (2016). "IP3 receptors regulate vascular smooth muscle contractility and hypertension." *JCI Insight* 1(17): e89402.
- Lindauer, U., Vogt, J., Schuh-Hofer, S., Dreier, J. P. y Dirnagl, U. (2003). "Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca^{2+} -activated potassium channels." *J Cereb Blood Flow Metab* 23(10): 1227-1238.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T. y Meyer, T. (2007). "Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22): 9301-9306.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. y Meyer, T. (2005). "STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx." *Curr Biol* 15(13): 1235-1241.
- Liu, M. W., Roubin, G. S. y King, S. B., 3rd (1989). "Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia." *Circulation* 79(6): 1374-1387.
- Lopez, J. J., Albarran, L., Gomez, L. J., Smani, T., Salido, G. M. y Rosado, J. A. (2016). "Molecular modulators of store-operated calcium entry." *Biochim Biophys Acta* 1863(8): 2037-2043.
- Lu, B. y Fivaz, M. (2016). "Neuronal SOCE: Myth or Reality?" *Trends Cell Biol* 26(12): 890-893.
- Luscher, T. F. y Barton, M. (1997). "Biology of the endothelium." *Clin Cardiol* 20(11 Suppl 2): II-3-10.

- Ma, H. T., Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K. y Gill, D. L. (2000). "Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels." *Science* 287(5458): 1647-1651.
- Mancarella, S., Potireddy, S., Wang, Y., Gao, H., Gandhirajan, R. K., Autieri, M., . . . Gill, D. L. (2013). "Targeted STIM deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle." *FASEB J* 27(3): 893-906.
- Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A. L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., . . . Lory, P. (2006). "Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels." *Circ Res* 98(11): 1422-1430.
- Manji, S. S., Parker, N. J., Williams, R. T., van Stekelenburg, L., Pearson, R. B., Dziadek, M. y Smith, P. J. (2000). "STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface." *Biochim Biophys Acta* 1481(1): 147-155.
- Marchand, A., Abi-Gerges, A., Saliba, Y., Merlet, E. y Lompré, A.-M. (2012). Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: from physiology to pathology. *Calcium Signaling*, Springer: 795-810.
- Marin, J., Encabo, A., Briones, A., Garcia-Cohen, E. C. y Alonso, M. J. (1999). "Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps." *Life Sci* 64(5): 279-303.
- Martinez-Lemus, L. A., Hill, M. A. y Meininger, G. A. (2009). "The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure." *Physiology (Bethesda)* 24: 45-57.
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. y Mikoshiba, K. (1997). "2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release." *J Biochem* 122(3): 498-505.
- Matlib, M. A., Whitmer, K. R., MacCarthy, E. P. y Ooi, B. S. (1986). "Sodium-calcium exchange exists across the cell membrane of intact vascular smooth muscle cells." *J Hypertens Suppl* 4(5): S222-223.
- McCarron, J. G., Chalmers, S., Wilson, C. y Sandison, M. E. (2016). Calcium mobilization via intracellular ion channels, store organization and mitochondria in smooth muscle. *Vascular Ion Channels in Physiology and Disease*, Springer: 233-253.
- McDonald, J. H. y Dunn, K. W. (2013). "Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy." *J Microsc* 252(3): 295-302.
- Mignen, O., Thompson, J. L. y Shuttleworth, T. J. (2009). "The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits." *J Physiol* 587(Pt 17): 4181-4197.
- Moccia, F., Zuccolo, E., Soda, T., Tanzi, F., Guerra, G., Mapelli, L., . . . D'Angelo, E. (2015). "Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability." *Front Cell Neurosci* 9: 153.
- Molist, P., Pombal, M. A. y Megias, P. (2011). "Atlas de histología vegetal y animal." *Cap. I, Dpto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.*
- Molnar, T., Barabas, P., Birnbaumer, L., Punzo, C., Kefalov, V. y Krizaj, D. (2012). "Store-operated channels regulate intracellular calcium in mammalian rods." *J Physiol* 590(15): 3465-3481.

- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." *Sci STKE* 2005(272): re3.
- Moosmang, S., Lenhardt, P., Haider, N., Hofmann, F. y Wegener, J. W. (2005). "Mouse models to study L-type calcium channel function." *Pharmacol Ther* 106(3): 347-355.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., . . . Klugbauer, N. (2003). "Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation." *EMBO J* 22(22): 6027-6034.
- Motiani, R. K. y Trebak, M. (2012). Cardiovascular System. *Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) pathways: Emerging signaling concepts in human (patho)physiology*. Groschner, K., Graier, W. F. y Romanin, C. Vienna, Springer Vienna: 301-325.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., . . . Romanin, C. (2009). "A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels." *J Biol Chem* 284(13): 8421-8426.
- Mulvany, M. J. y Halpern, W. (1977). "Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats." *Circ Res* 41(1): 19-26.
- Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. y Lewis, R. S. (2009). "STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(36): 15495-15500.
- Nagatomo, T., Rashid, M., Abul Muntasir, H. y Komiyama, T. (2004). "Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system." *Pharmacol Ther* 104(1): 59-81.
- Narayanan, D., Adebisi, A. y Jaggar, J. H. (2012). "Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(11): H2190-2210.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. y Lederer, W. J. (1995). "Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks." *Science* 270(5236): 633-637.
- Nelson, M. T. y Quayle, J. M. (1995). "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): C799-822.
- Ng, S. W., di Capite, J., Singaravelu, K. y Parekh, A. B. (2008). "Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca²⁺ influx through Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* 283(46): 31348-31355.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., . . . Flockerzi, V. (2003). "Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4." *J Biol Chem* 278(33): 30813-30820.
- Noble, D., Borysova, L., Wray, S. y Burdyga, T. (2014). "Store-operated Ca²⁺(+) entry and depolarization explain the anomalous behaviour of myometrial SR: effects of SERCA inhibition on electrical activity, Ca²⁺(+) and force." *Cell Calcium* 56(3): 188-194.
- Ogawa, A., Firth, A. L., Smith, K. A., Maliakal, M. V. y Yuan, J. X. (2012). "PDGF enhances store-operated Ca²⁺ entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 302(2): C405-411.
- Oka, T., Hori, M. y Ozaki, H. (2005). "Microtubule disruption suppresses allergic response through the inhibition of calcium influx in the mast cell degranulation pathway." *J Immunol* 174(8): 4584-4589.

- Orr, A. W., Hastings, N. E., Blackman, B. R. y Wamhoff, B. R. (2010). "Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis." *J Vasc Res* 47(2): 168-180.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R. y Reuveny, E. (2012). "SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling." *Cell* 149(2): 425-438.
- Parekh, A. B. (2008). "Ca²⁺ microdomains near plasma membrane Ca²⁺ channels: impact on cell function." *J Physiol* 586(13): 3043-3054.
- Parekh, A. B. y Putney, J. W., Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." *Physiol Rev* 85(2): 757-810.
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., . . . Lewis, R. S. (2009). "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1." *Cell* 136(5): 876-890.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A. y Dolmetsch, R. (2010). "The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels." *Science* 330(6000): 101-105.
- Parker, N. J., Begley, C. G., Smith, P. J. y Fox, R. M. (1996). "Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5." *Genomics* 37(2): 253-256.
- Pereira, A. C., Lunardi, C. N., Paulo, M., da Silva, R. S. y Bendhack, L. M. (2013). "Nitric oxide generated by the compound RuBPY promotes the vascular smooth cell membrane hyperpolarization." *Eur J Pharm Sci* 48(4-5): 604-610.
- Perez, G. J., Bonev, A. D., Patlak, J. B. y Nelson, M. T. (1999). "Functional coupling of ryanodine receptors to K_{Ca} channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries." *J Gen Physiol* 113(2): 229-238.
- Platoshyn, O., Golovina, V. A., Bailey, C. L., Limsuwan, A., Krick, S., Juhaszova, M., . . . Yuan, J. X. (2000). "Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(5): C1540-1549.
- Poburko, D., Kuo, K. H., Dai, J., Lee, C. H. y van Breemen, C. (2004). "Organellar junctions promote targeted Ca²⁺ signaling in smooth muscle: why two membranes are better than one." *Trends Pharmacol Sci* 25(1): 8-15.
- Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Singer, H. A. y Trebak, M. (2009). "Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration." *FASEB J* 23(8): 2425-2437.
- Prakriya, M. y Lewis, R. S. (2001). "Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyl-diphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors." *J Physiol* 536(Pt 1): 3-19.
- Prakriya, M. y Lewis, R. S. (2015). "Store-Operated Calcium Channels." *Physiol Rev* 95(4): 1383-1436.
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A. y Penner, R. (2003). "TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15166-15171.

- Puato, M., Faggin, E., Favaretto, E., Bertipaglia, B., Rattazzi, M., Rizzoni, D., . . . Pauletto, P. (2004). "Prevalence of fetal-type smooth muscle cells in the media of microvessels from hypertensive patients." *Hypertension* 44(2): 191-194.
- Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." *Cell Calcium* 7(1): 1-12.
- Putney, J. W., Steinckwich-Besancon, N., Numaga-Tomita, T., Davis, F. M., Desai, P. N., D'Agostin, D. M., . . . Bird, G. S. (2016). "The functions of store-operated calcium channels." *Biochim Biophys Acta*.
- Ratz, P. H. (2016). Vascular Structure and Function. *Vascular Smooth Muscle: Structure and Function in Health and Disease*, World Scientific: 47-144.
- Rembold, C. M., Richard, H. y Chen, X. L. (1992). "Na(+)-Ca²⁺ exchange, myoplasmic Ca²⁺ concentration, and contraction of arterial smooth muscle." *Hypertension* 19(4): 308-313.
- Rodriguez-Moyano, M., Diaz, I., Dionisio, N., Zhang, X., Avila-Medina, J., Calderon-Sanchez, E., . . . Smani, T. (2013). "Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation." *Cardiovasc Res* 100(2): 297-306.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., . . . Stauderman, K. A. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." *J Cell Biol* 169(3): 435-445.
- Rosado, J. A., Diez, R., Smani, T. y Jardin, I. (2015). "STIM and Orai1 Variants in Store-Operated Calcium Entry." *Front Pharmacol* 6: 325.
- Sabourin, J., Robin, E. y Raddatz, E. (2011). "A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart." *Cardiovasc Res* 92(2): 226-236.
- Saladin, K. S. (2013). *Anatomía y fisiología: la unidad entre forma y función (6a)*, McGraw Hill Mexico.
- Saleh, S. N. y Greenwood, I. A. (2005). "Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarization involves intracellular calcium release." *Am J Physiol Cell Physiol* 288(1): C122-131.
- Samtleben, S., Wachter, B. y Blum, R. (2015). "Store-operated calcium entry compensates fast ER calcium loss in resting hippocampal neurons." *Cell Calcium* 58(2): 147-159.
- Sanders, K. M. (2001). "Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles." *J Appl Physiol (1985)* 91(3): 1438-1449.
- Sanders, K. M., Koh, S. D., Ro, S. y Ward, S. M. (2012). "Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(11): 633-645.
- Sanon, V. P., Sawaki, D., Mjaatvedt, C. H. y Jourdan-Le Saux, C. (2015). "Myocardial tissue caveolae." *Compr Physiol* 5(2): 871-886.
- Saponara, S., Sgaragli, G. y Fusi, F. (2008). "Quercetin antagonism of Bay K 8644 effects on rat tail artery L-type Ca²⁺ channels." *Eur J Pharmacol* 598(1-3): 75-80.
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.

- Sellers, J. R., Eisenberg, E. y Adelstein, R. S. (1982). "The binding of smooth muscle heavy meromyosin to actin in the presence of ATP. Effect of phosphorylation." *J Biol Chem* 257(23): 13880-13883.
- Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Folgering, J. H., Duprat, F., Patel, A., Nilius, B. y Honore, E. (2008). "TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response." *Pflügers Arch* 456(3): 529-540.
- Smani, T., Dominguez-Rodriguez, A., Hmadcha, A., Calderon-Sanchez, E., Horrillo-Ledesma, A. y Ordonez, A. (2007). "Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 and store-operated pathway in urocortin-induced vasodilatation of rat coronary artery." *Circ Res* 101(11): 1194-1203.
- Smani, T., Hernandez, A., Urena, J., Castellano, A. G., Franco-Obregon, A., Ordonez, A. y Lopez-Barneo, J. (2002). "Reduction of Ca²⁺ channel activity by hypoxia in human and porcine coronary myocytes." *Cardiovasc Res* 53(1): 97-104.
- Smani, T., Iwabuchi, S., Lopez-Barneo, J. y Urena, J. (2001). "Differential segmental activation of Ca²⁺-dependent Cl⁻ and K⁺ channels in pulmonary arterial myocytes." *Cell Calcium* 29(6): 369-377.
- Smani, T., Patel, T. y Bolotina, V. M. (2008). "Complex regulation of store-operated Ca²⁺ entry pathway by PKC-epsilon in vascular SMCs." *Am J Physiol Cell Physiol* 294(6): C1499-1508.
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S. y Bolotina, V. M. (2004). "A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway." *Nat Cell Biol* 6(2): 113-120.
- Smani, T., Zakharov, S. I., Leno, E., Csutora, P., Trepakova, E. S. y Bolotina, V. M. (2003). "Ca²⁺-independent phospholipase A2 is a novel determinant of store-operated Ca²⁺ entry." *J Biol Chem* 278(14): 11909-11915.
- Smyth, J. T., DeHaven, W. I., Bird, G. S. y Putney, J. W., Jr. (2007). "Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1." *J Cell Sci* 120(Pt 21): 3762-3771.
- Smyth, J. T., Dehaven, W. I., Bird, G. S. y Putney, J. W., Jr. (2008). "Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function." *J Cell Sci* 121(Pt 6): 762-772.
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M. y Gill, D. L. (2012). "STIM proteins: dynamic calcium signal transducers." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(9): 549-565.
- Soderberg, O., Leuchowius, K. J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L. G. y Landegren, U. (2008). "Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay." *Methods* 45(3): 227-232.
- Somlyo, A. P. y Somlyo, A. V. (1994). "Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle." *Alcohol Clin Exp Res* 18(1): 138-143.
- Somlyo, A. P. y Somlyo, A. V. (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." *Physiol Rev* 83(4): 1325-1358.
- Song, K., Zhong, X. G., Xia, X. M., Huang, J. H., Fan, Y. F., Yuan, R. X., . . . Shen, B. (2015). "Orai1 forms a signal complex with SK3 channel in gallbladder smooth muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 466(3): 456-462.

- Spinelli, A. M. y Trebak, M. (2016). "Orai channel-mediated Ca²⁺ signals in vascular and airway smooth muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* 310(6): C402-413.
- Srikanth, S., Jung, H. J., Kim, K. D., Souda, P., Whitelegge, J. y Gwack, Y. (2010). "A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells." *Nat Cell Biol* 12(5): 436-446.
- Stromer, M. H. y Bendayan, M. (1988). "Arrangement of desmin intermediate filaments in smooth muscle cells as shown by high-resolution immunocytochemistry." *Cell Motil Cytoskeleton* 11(2): 117-125.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. y Clapham, D. E. (2001). "TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain." *Neuron* 29(3): 645-655.
- Suárez, J. E. y Bravo, A. I. (2006). "Conexinas y sistema cardiovascular." *Revista argentina de cardiología* 74(3): 149-156.
- Takahashi, Y., Watanabe, H., Murakami, M., Ono, K., Munehisa, Y., Koyama, T., . . . Ito, H. (2007). "Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 361(4): 934-940.
- Takeda, Y., Nystoriak, M. A., Nieves-Cintrón, M., Santana, L. F. y Navedo, M. F. (2011). "Relationship between Ca²⁺ sparklets and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ load and release in rat cerebral arterial smooth muscle." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(6): H2285-2294.
- Tanaka, T., Ohta, H., Kanda, K., Tanaka, T., Hidaka, H. y Sobue, K. (1990). "Phosphorylation of high-Mr caldesmon by protein kinase C modulates the regulatory function of this protein on the interaction between actin and myosin." *Eur J Biochem* 188(3): 495-500.
- Tang, D. D. (2008). "Intermediate filaments in smooth muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* 294(4): C869-878.
- Tanner, M. K. y Wellhausen, S. R. (1998). "Flow cytometric detection of fluorescent redistributional dyes for measurement of cell transmembrane potential." *Methods Mol Biol* 91: 85-95.
- Taylor, C. W., da Fonseca, P. C. y Morris, E. P. (2004). "IP(3) receptors: the search for structure." *Trends Biochem Sci* 29(4): 210-219.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. y Dawson, A. P. (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7): 2466-2470.
- Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., . . . Hanley, M. R. (1989). "Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage." *Agents Actions* 27(1-2): 17-23.
- Thompson, J. L. y Shuttleworth, T. J. (2013). "How many Orai's does it take to make a CRAC channel?" *Sci Rep* 3: 1961.
- Tian, C., Du, L., Zhou, Y. y Li, M. (2016). "Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges." *Future Med Chem* 8(7): 817-832.
- Tsien, R. Y., Rink, T. J. y Poenie, M. (1985). "Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths." *Cell Calcium* 6(1-2): 145-157.

- Urena, J., Fernandez-Tenorio, M., Porras-Gonzalez, C., Gonzalez-Rodriguez, P., Castellano, A. y Lopez-Barneo, J. (2013). "A new metabotropic role for L-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle contraction." *Curr Vasc Pharmacol* 11(4): 490-496.
- Vaca, L. (2010). "SOCIC: the store-operated calcium influx complex." *Cell Calcium* 47(3): 199-209.
- van Kruchten, R., Braun, A., Feijge, M. A., Kuijpers, M. J., Rivera-Galdos, R., Kraft, P., . . . Heemskerk, J. W. (2012). "Antithrombotic potential of blockers of store-operated calcium channels in platelets." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(7): 1717-1723.
- Vandenberghe, M., Raphael, M., Lehen'kyi, V., Gordienko, D., Hastie, R., Oddos, T., . . . Prevarskaya, N. (2013). "ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50): E4839-4848.
- Varga-Szabo, D., Authi, K. S., Braun, A., Bender, M., Ambily, A., Hassock, S. R., . . . Nieswandt, B. (2008). "Store-operated Ca²⁺ entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1." *Pflugers Arch* 457(2): 377-387.
- Vetter, I. (2012). Development and optimization of FLIPR high throughput calcium assays for ion channels and GPCRs. *Calcium Signaling*, Springer: 45-82.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., . . . Kinet, J. P. (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry." *Science* 312(5777): 1220-1223.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., . . . Gill, D. L. (2010). "The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and Ca_v1.2 channels." *Science* 330(6000): 105-109.
- Wilson, S. M., Mason, H. S., Ng, L. C., Montague, S., Johnston, L., Nicholson, N., . . . Hume, J. R. (2005). "Role of basal extracellular Ca²⁺ entry during 5-HT-induced vasoconstriction of canine pulmonary arteries." *Br J Pharmacol* 144(2): 252-264.
- Wu, C. C., Chen, S. J. y Garland, C. J. (2004). "NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries." *Br J Pharmacol* 142(3): 479-484.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M. y Lewis, R. S. (2006). "Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." *J Cell Biol* 174(6): 803-813.
- Ye, G. J., Nesmith, A. P. y Parker, K. K. (2014). "The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes' [corrected] cytoskeleton and contractile function." *Anat Rec (Hoboken)* 297(9): 1758-1769.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F. y Muallem, S. (2009). "SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels." *Nat Cell Biol* 11(3): 337-343.
- Yuan, X. J., Bright, R. T., Aldinger, A. M. y Rubin, L. J. (1997). "Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells." *Am J Physiol* 272(1 Pt 1): L44-50.
- Yue, L., Peng, J. B., Hediger, M. A. y Clapham, D. E. (2001). "Ca_v1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel." *Nature* 410(6829): 705-709.

- Zarayskiy, V., Monje, F., Peter, K., Csutora, P., Khodorov, B. I. y Bolotina, V. M. (2007). "Store-operated Orai1 and IP3 receptor-operated TRPC1 channel." *Channels (Austin)* 1(4): 246-252.
- Zha, H. Y., Shen, B., Yau, K. H., Li, S. T., Yao, X. Q. y Yang, D. (2014). "A small synthetic molecule forms selective potassium channels to regulate cell membrane potential and blood vessel tone." *Org Biomol Chem* 12(41): 8174-8179.
- Zhang, B. X. y Muallem, S. (1992). "Feedback inhibition of Ca²⁺ release by Ca²⁺ is the underlying mechanism of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells." *J Biol Chem* 267(34): 24387-24393.
- Zhang, W., Halligan, K. E., Zhang, X., Bisailon, J. M., Gonzalez-Cobos, J. C., Motiani, R. K., . . . Trebak, M. (2011). "Orai1-mediated I (CRAC) is essential for neointima formation after vascular injury." *Circ Res* 109(5): 534-542.
- Zhang, W. B. y Kwan, C. Y. (2016). "Pharmacological evidence that potentiation of plasmalemmal Ca(2+)-extrusion is functionally coupled to inhibition of SR Ca(2+)-ATPases in vascular smooth muscle cells." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389(4): 447-455.
- Zhang, Y. P., Zhang, H. y Duan, D. D. (2013). "Chloride channels in stroke." *Acta Pharmacol Sin* 34(1): 17-23.
- Zucchi, R. y Ronca-Testoni, S. (1997). "The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states." *Pharmacol Rev* 49(1): 1-51.