



Facultad de Medicina.

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica.

**Implicación de los canales de Ca^{2+} tipo L y RhoA/Rho
quinasa en el incremento del tono vascular inducido
por la despolarización mantenida: posible papel en la
hipertensión arterial.**

Cristina Porras González

Trabajo presentado para optar al título de Doctor por la
Universidad de Sevilla, 2017.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI-XI
ABREVIATURAS	XII-XIII
INTRODUCCIÓN	1-17
1. Regulación de la contracción en el músculo liso	2
1.1. Contracción mediada por cambios en la $[Ca^{2+}]$ citosólico.....	5
1.1.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L.....	7
1.1.2. Liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares.....	9
1.1.3. Interacción LTCCs y RS.....	9
1.2 Contracción mediada por los mecanismos de sensibilización a $[Ca^{2+}]$	10
1.2.1 Contracción inducida por la ruta RhoA/ROCK.....	11
1.2.2 Contracción inducida por PKC	13
2. Papel funcional del CCICR: activación de RhoA por la despolarización	14
3. Contracción arterial y actividad de RhoA/ROCK durante despolarizaciones de larga duración	16
4. Papel de los LTCCs y las rutas de sensibilización en la hipertensión	17
OBJETIVOS	18-19
RESULTADOS	20-70

1. Caracterización de la contracción inducida por la despolarización.	22
1.1. Curva dosis-respuesta a distintas $[K^+]_e$	23
1.2. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por despolarización	24
2. Sensibilidad de la contracción mantenida a los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} e inhibidores de ROCK.	25
2.1. Efecto de los CCBs sobre la fase mantenida de la contracción	26
2.2. Papel de ROCK en el mantenimiento de la contracción	27
2.3. Efecto combinado de los CCBs y los inhibidores de ROCK sobre la contracción mantenida	28
2.4. Efecto del uso combinado de los CCBs y el inhibidor de ROCK en las componentes fásica y tónica de la contracción inducida por despolarización	31
2.5. Efecto de los CCBs y el fasudil sobre las corrientes de Ca^{2+} de miocitos arteriales aislados	35
2.6. Efecto de los CCBs y el fasudil sobre la actividad eléctrica de miocitos cardíacos aislados	38
2.7. Efecto de los CCBs y el fasudil sobre la contractilidad en corazones aislados	39
2.8. Efecto del uso combinado de los CCBs y el fasudil en arterias humanas aisladas	41
3. $[Ca^{2+}]_e$ extracelular, actividad de RhoA/ROCK y mantenimiento de la contracción	43
3.1. Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la contracción inducida por despolarización en arteria femoral de rata	43
3.2. Cambios de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por despolarización, dependencia del Ca^{2+} extracelular	46

3.3. Papel del endotelio en la contracción inducida por despolarización en presencia de 7 μM Ca^{2+} extracelular	47
3.4. Participación de RhoA/ROCK en el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización en presencia de 7 μM Ca^{2+} extracelular.....	49
3.5. Activación de RhoA/ROCK por Ca^{2+}	52
3.6. Participación de los LTCCs en el mantenimiento de la contracción inducida por la despolarización en presencia de 2,5 mM Ca^{2+} extracelular.....	53
3.7. Participación de los LTCCs en el mantenimiento de la contracción inducida por la despolarización en presencia de 7 μM Ca^{2+} extracelular.....	56
3.8. Papel del retículo sarcoplásmico la contracción inducida por la despolarización en presencia de 7 μM Ca^{2+} extracelular.....	57
3.9. Efecto del nivel de despolarización en la contracción arterial inducida por la despolarización en presencia de 7 μM Ca^{2+}	58
4. Estudio de la implicación de los LTCCs, RS y RhoA/ROCK en la patología hipertensiva.....	61
4.1. Medida de la presión arterial.....	61
4.2. Contracción producida por la activación de los LTCCs en ratas hipertensas.....	62
4.3. Papel funcional del RS en ratas hipertensas.....	65
4.4. RhoA en ratas hipertensas.....	66
4.5. Contracción producida por activación de los LTCCs en ausencia de Ca^{2+} externo en ratas hipertensas.....	67
4.6. Papel funcional del acoplamiento LTCCs-RS en ratas hipertensas.....	70
DISCUSIÓN.....	72-80

1. Combinación de bajas concentraciones de inhibidores de ROCK y CCBs para la inhibición selectiva de la contracción arterial mantenida inducida por despolarización.....	73
2. Regulación de RhoA / ROCK y contracción arterial mantenida por bajos niveles de Ca²⁺ citosólico durante despolarizadas prolongadas.....	74
3. Contribución del acoplamiento LTCCs-RS y RhoA/ ROCK en la contractilidad arterial en ratas espontáneamente hipertensas.....	79
CONCLUSIONES	81-83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	84-103
1. Obtención de Muestras.....	86
1.1. Muestras animales.....	86
1.2. Muestras humanas.....	87
2. Cultivos celulares.....	87
2.1. Cultivos de células musculares lisas.....	87
2.2. Cultivos de miocitos cardíacos.....	88
3. Técnicas electrofisiológicas y microfluorimétricas en células dispersas.....	89
3.1. Registros electrofisiológicos mediante la técnica patch-clamp en células aisladas	89
3.2. Registro de la concentración de Ca ²⁺ en células aisladas.....	90
4. Registros funcionales en baños de órganos	93
4.1. Medida de fuerza isométrica.....	93
4.1.1. Permeabilización de los anillos arteriales con β -escina.....	94
4.2. Registro simultáneo de los cambios en la concentración de Ca ²⁺ citosólico y el diámetro arterial.....	95

4.3. Registro de la contractilidad cardíaca en corazón aislado mediante el sistema Langendorff.....	96
5. Medida de la presión arterial en ratas.....	97
6. Técnicas bioquímicas.....	99
6.1. Medida de la actividad de RhoA mediante G-LISA.....	99
6.2. Medida de la RhoA mediante <i>Western blot</i>	100
7. Análisis estadístico de los datos.....	101
8. Soluciones, tampones y reactivos.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	104-114

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Representación de la estructura histológica de una arteria.....	3
Figura 2: Esquema ilustrando la regulación de la contracción inducida por aumento de Ca^{2+} citosólico en músculo liso.	4
Figura 3: Esquema de las principales rutas de rutas de sensibilización a Ca^{2+}	4
Figura 4: Esquema de los distintos medios de transporte que participan en la homeostasis del Ca^{2+} en músculo liso.....	6
Figura 5: Canales de Ca^{2+} tipo L.....	7
Figura 6: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y potencial de membrana en la inactivación de los LTCCs.....	7
Figura 7: Representación del modelo de liberación de Ca^{2+} inducida por los canales de Ca^{2+} (CCICR).....	8
Figura 8: Curso temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, fosforilación de la MLC y fuerza durante estímulos de distinta duración.....	11
Figura 9: Esquema de la regulación de la vía de señalización RhoA/ROCK.....	12
Figura 10: Esquema del doble papel funcional de los LTCCs.....	15

RESULTADOS

Figura 11: Fuerza isométrica inducida por la despolarización con alto K^+	22
Figura 12: Efecto de la $[\text{K}^+]_e$ sobre la contracción arterial.....	23
Figura 13: Efecto de la $[\text{K}^+]_e$ en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células aisladas.....	24
Figura 14: Cambios en el diámetro arterial en respuesta a una solución despolarizante.....	25
Figura 15: Efecto de los CCBs sobre la fase mantenida de la contracción arterial inducida por despolarización.....	27

Figura 16: Efecto del inhibidor de ROCK sobre la fase mantenida de la contracción arterial inducida por la despolarización.....	28
Figura 17: Efecto del fasudil sobre la curva de relajación de la nifedipina en la contracción inducida por despolarización en arteria basilar de rata.....	29
Figura 18: Efecto de una baja concentración de fasudil sobre la curva de relajación de la nifedipina en la contracción inducida por despolarización en arteria basilar de rata.....	30
Figura 19: Efecto del fasudil sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata.....	31
Figura 20: Efecto de fasudil sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción en una arteria completa.....	32
Figura 21: Efecto de los CCBs sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata.....	33
Figura 22: Efecto de la aplicación individual o conjunta de dosis bajas de CCBs y fasudil sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata.....	34
Figura 23: Corrientes de Ca^{2+} generadas en miocitos de arterial basilar.....	36
Figura 24: Efecto de la aplicación combinada de bajas dosis de CCBs y fasudil sobre las I_{Ca} inducidas por pulsos despolarizantes cortos en miocitos vasculares.....	37
Figura 25: Efecto de la aplicación combinada de bajas dosis de CCBs y fasudil sobre las corrientes de Ca^{2+} inducidas por pulsos depolarizantes largos en miocitos vasculares.....	38
Figura 26: Efecto de la aplicación combinada de bajas dosis de CCBs y fasudil sobre los potenciales de acción en cardiomiocitos neonatales de rata aislados.....	39
Figura 27: Efecto de la aplicación combinada de CCBs y fasudil sobre la contractilidad cardíaca.....	40

Figura 28: Efecto de la presencia de fasudil sobre la curva de relajación de la nifedipina en arterias humanas.....	42
Figura 29: Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ en la contracción mantenida inducida por despolarización en arteria femoral de rata.....	44
Figura 30: Curso temporal y dependencia del Ca^{2+} extracelular en la contracción inducida por despolarizaciones de larga duración.....	45
Figura 31: Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ en el aumento del Ca^{2+} intracelular inducido por una solución despolarizante en miocitos arteriales.....	46
Figura 32: Papel del endotelio en la contracción inducida por 70K en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$	48
Figura 33: Implicación de ROCK en la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$	49
Figura 34: Implicación de RhoA en la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$	50
Figura 35: Curso temporal de la activación de RhoA en la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$	51
Figura 36: Curva de contracción inducida por Ca^{2+} en anillos permeabilizados con β -escina.....	52
Figura 37: Efecto del fasudil en la contracción inducida por Ca^{2+} en anillos permeabilizados con β -escina.....	53
Figura 38: Efecto de la nifedipina sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria femoral de rata	54
Figura 39: Efecto de la nifedipina en la contracción mantenida inducida por despolarización de larga duración en arteria femoral de rata.....	55
Figura 40: Papel de los LTCCs durante la contracción mantenida inducida por despolarización en presencia de $7 \mu M [Ca^{2+}]_e$	56
Figura 41: Papel de RS durante la contracción inducida por 70K en presencia de $7 \mu M [Ca^{2+}]_e$ en arteria femoral de rata	57

Figura 42: Efecto de los niveles de despolarización en la contracción inducida en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$ en arteria femoral de rata.	59
Figura 43: Presión arterial en ratas SHR y WKY	62
Figura 44: Efecto de la $[K^+]_e$ sobre la contracción arterial en ratas SHR.....	63
Figura 45: Contracción producida por (\pm) Bay K 8644 en anillos de arteria femoral de ratas hipertensas.	64
Figura 46: Contracción producida por cafeína en arterias de ratas hipertensas.....	65
Figura 47: Contracción producida por ACP en arterias de ratas hipertensas.....	66
Figura 48: Niveles y actividad de RhoA en arterias de ratas hipertensas.....	67
Figura 49: Contracción producida por 70K en ausencia de Ca^{2+} externo en anillos de arteria femoral de ratas hipertensas	68
Figura 50: Efecto de nifedipina en la contracción producida por 70K en ausencia de Ca^{2+} externo en anillos de arteria femoral de ratas hipertensas.....	69
Figura 51: Contracción producida por FPL en ausencia de Ca^{2+} externo en arterias de ratas hipertensas.....	71
Figura 52: Papel de RS el aumento de contracción inducida por despolarización en arteria femoral de rata SHR	71

DISCUSIÓN

Figura 53: Esquema de los mecanismos implicados en la contracción mantenida inducida por despolarización de larga duración.....	60
--	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 54: Fotografía de las células obtenidas tras una dispersión de arteria basilar.....	87
Figura 55: Cultivo de cardiomiocitos neonatos de rata.....	88
Figura 56: Esquema del set up utilizado para el registro de corrientes de Ca^{2+}	90

Figura 57: Espectro de excitación del Fura-2.....	91
Figura 58: Esquema representativo del set up para el registro de Ca^{2+} en células dispersas.....	92
Figura 59: Sistema de registro de fuerza isométrica en anillos arteriales.....	94
Figura 60: Esquema del Set up para registro simultaneo de $[Ca^{2+}]$ y diámetro arterial.	96
Figura 61: Esquema del sistema Langendorff.....	97
Figura 62: Sistema de medida de presión arterial en rata.....	98

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]	Concentración de Calcio
ATP	Adenosina-5'-trifosfato (“Adenosine-5-triphosphate“)
CCBs	Bloqueantes de los Canales de Calcio (“Calcium Channel Blockers“)
CCICR	Liberación de Calcio Inducida por los Canales de Calcio (“Calcium Channel Induced Calcium Release“)
CICR	Liberación de Calcio Inducida por Calcio (“Calcium Induced Calcium Release“)
CPI-17	Protein Kinase C-Potentiated Phosphatase Inhibitor of 17 KDa
DAG	Diacilglicerol
GAP	Proteínas Activadoras de GTPasas (“GTPase activating proteins“)
GDI	Inhibidores de la Disociación de nucleótidos de Guanina (“Guanine dissociation inhibitor“)
GDP	Guanosina-5'-difosfato (“Guanosine-5-diphosphate“)
GEF	Factores Intercambiadores de nucleótidos de Guanina (“Guanine Exchange Factors“)
GTP	Guanosina-5'-trifosfato (“Guanosine-5-triphosphate“)
ICa	Corriente de Calcio
Insp₃Rs	Receptores de Inositol-1, 4, 5-trifosfato (“Inositol-1, 4, 5-triphosphate Receptors“)
LTCCs	Canales de Calcio Tipo L (“L Type Calcium Channels“)
MLC	Cadena Ligera de Miosina (“Myosin Light Chain“)
MLCK	Quinasa de la Cadena Ligera de Miosina (“Myosin Light Chain Kinase“)
MLCP	Fosfatasa de la Cadena Ligera de Miosina (“Myosin Light Chain Phosphatase“)
NCX	Intercambiador Sodio/Calcio
PKC	Proteína quinasa C (“Protein Kinase C“)
PLC	Fosfolipasa C (“Phospholipase C“)
RBD	Dominio de unión a Rho (“Rho Binding Domain“)

- ROCCs** Canales de Calcio Operados por Receptores (“Receptor Operated Calcium Channels“)
- ROCK** Proteína quinasa asociada a Rho (“Rho-associated protein kinase“)
- RS** Retículo sarcoplásmico
- RyRs** Receptores de Rianodina (“Ryanodine Receptors“)
- SERCA** ATPasa de Calcio del Retículo Sarcoplásmico (“Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase“)
- SHR** Rata Espontáneamente Hipertensa (“Spontaneously Hypertensive Rat“)
- SOCCs** Canales de Calcio Operados por Reservorio (“Store-operated Calcium Channels“)
- VSM** Músculo Liso Vascular (“Vascular Smooth Muscle“)
- VSMCs** Células de Músculo Liso Vascular (“Vascular Smooth Muscle Cells“)
- V_m** Potencial de Membrana
- WKY** Ratas de la cepa Wistar Kyoto

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo está interesado en analizar los mecanismos implicados en el mantenimiento del tono vascular en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Concretamente, nuestro trabajo se centra en el estudio de la implicación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentes en la membrana de los miocitos arteriales, y la ruta de sensibilización a Ca^{2+} RhoA/ROCK, responsable del mantenimiento de la contracción arterial.

1. Regulación de la contracción en músculo liso.

Las arterias son vasos sanguíneos que se encargan de transportar la sangre desde el corazón al resto de los tejidos. Su organización histológica se caracteriza por la existencia de tres capas: una capa interna donde se encuentra el tejido endotelial (túnica íntima), una capa externa o adventicia formada principalmente por fibroblastos, y una capa intermedia (túnica media) donde se localizan las células musculares lisas, que son células altamente especializadas y cuya función principal es la regulación del diámetro del lumen arterial, controlando el flujo sanguíneo mediante su contracción o relajación (figura 1).

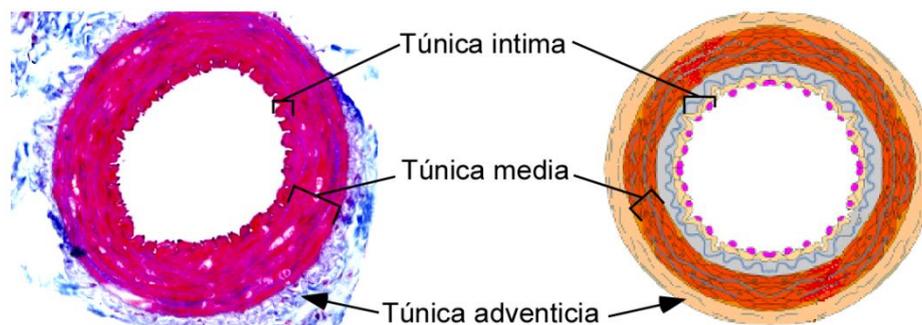


Figura 1: Representación de la estructura histológica de una arteria. Izquierda. Corte transversal de una arteria poplítea de rata teñida mediante la tinción tricrómica de Masson. **Derecha.** Esquema representativo de las distintas capas arteriales.

El nivel de contracción generada está finamente regulado por una variedad de factores extrínsecos e intrínsecos pero en definitiva, todos ellos convergen en dos rutas principales de señalización: aumento del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y activación de las denominadas rutas de sensibilización al Ca^{2+} .

La contracción inducida por un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se inicia con la unión del ion a la calmodulina. El complejo Ca^{2+} -calmodulina activa a una proteína quinasa (“Myosin Light Chain Kinase” o MLCK) que actúa fosforilando la subunidad catalítica de la cadena ligera de la miosina (“Myosin Light Chain” o MLC), permitiendo que los filamentos de actina se desplacen sobre los de miosina, lo que conlleva un acortamiento longitudinal del miocito y genera la contracción (Somlyo y Somlyo, 1994). La activación de la fosfatasa de la MLC (“Myosin Light Chain Phosphatase” o MLCP) que inactiva la ATPasa del complejo actina-miosina, permite que el aparato contráctil vuelva a la situación inicial de reposo (Somlyo y Somlyo, 1994) (figura 2).

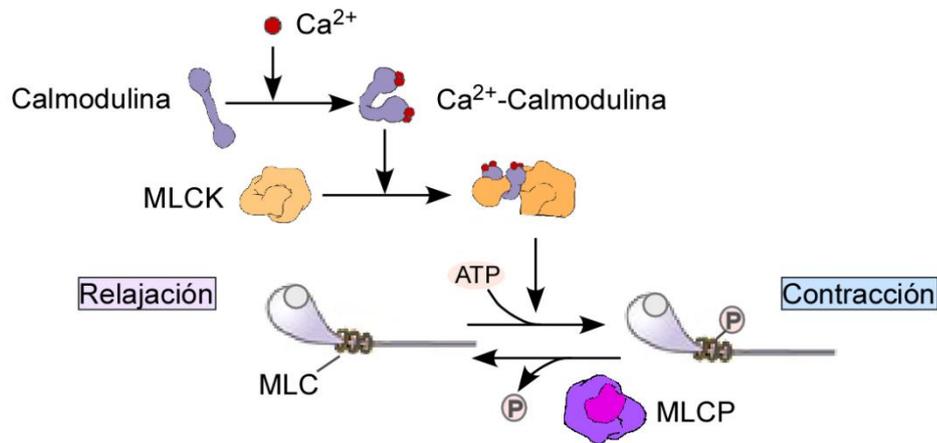


Figura 2: Esquema ilustrando la regulación de la contracción inducida por aumento de Ca^{2+} citosólico en músculo liso. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico activa a la MLCK que produce la fosforilación de la MLC y la consiguiente contracción del miocito. La actividad de la MLCP induce la relajación del miocito.

Un segundo mecanismo que participa en la contracción del músculo liso, son los mecanismos de sensibilización al ion Ca^{2+} . Se denominan así porque actúan variando el nivel de sensibilidad al $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las distintas proteínas de la maquinaria contráctil. El más importante se basa en la inhibición de la actividad de la MLCP, impidiendo la relajación, lo cual produce el mantenimiento de la contracción (figura 3).

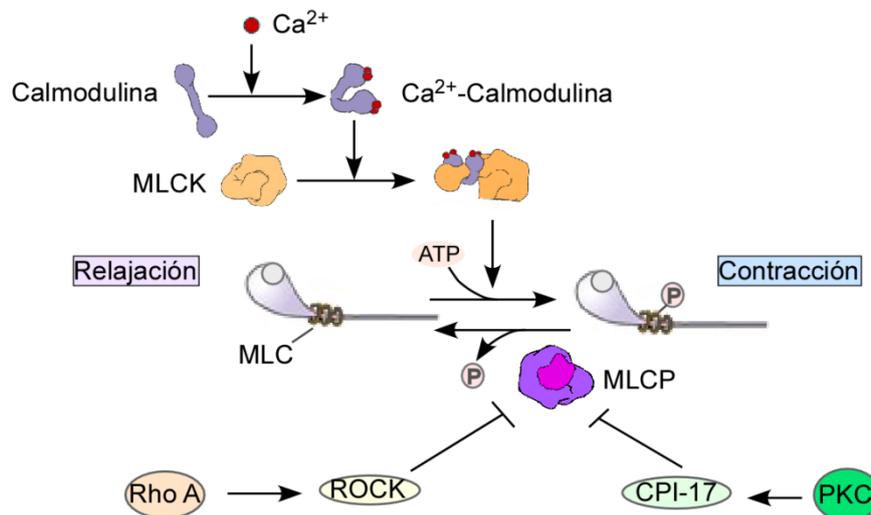


Figura 3: Esquema de las principales rutas de sensibilización a Ca^{2+} . RhoA/ROCK y PKC actúan inhibiendo a la MLCP y, por tanto, manteniendo la contracción arterial.

La sensibilización a Ca^{2+} puede estar mediada fundamentalmente por dos rutas: la vía RhoA/ROCK ("Rho-associated protein kinase") y la vía PKC/CPI-17 ("Protein Kinase C"/"Protein Kinase C-Potenciada Phosphatase Inhibitor of 17 KDa"). Estos mecanismos se explican en el apartado 1.2.

1.1. Contracción mediada por cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico

Las células de músculo liso tienen una gran capacidad amortiguadora de Ca^{2+} , un 99% del Ca^{2+} intracelular está unido a proteínas o dentro de los reservorios intracelulares manteniendo una baja concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma (~100 nM). Dado que la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es ~ 1,6 mM, existe un gradiente electroquímico que hace que la apertura de los canales de Ca^{2+} provoque un incremento del Ca^{2+} intracelular hasta alcanzar niveles del orden de micromolar, suficiente para activar los mecanismos de contracción.

El Ca^{2+} puede utilizar diversas vías para atravesar la membrana, canales iónicos regulados por receptores ("Receptor Operated Calcium Channels", ROCCs), regulados por reservorio ("Store-operated Calcium Channels", SOCCs), canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (figura 4).

Una de las vías de entrada de Ca^{2+} más importante en la regulación de la contracción arterial son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L ("L Type Calcium Channels", LTCCs) (Vogalis *et al.*, 1991). Por este motivo, estos canales constituyen una diana terapéutica importante en el tratamiento de procesos patológicos mediados por hipercontracción arterial.

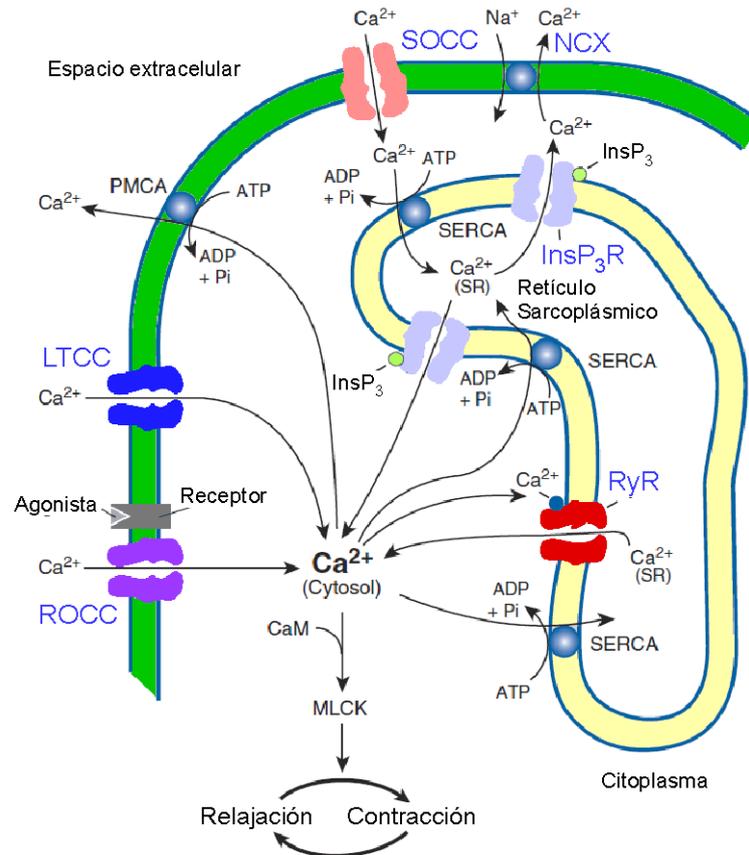


Figura 4: Esquema de los distintos medios de transporte que participan en la homeostasis del Ca^{2+} en músculo liso. El Ca^{2+} puede entrar al interior celular a través de LTCCs, ROCCs, SOCCs y el NCX y es expulsado al espacio extracelular mediante la bomba (ATPasa) de Ca^{2+} de la membrana plasmática y el NCX, o puede ser acumulado en el RS mediante la ATPasa de Ca^{2+} del RS "SERCA". El Ca^{2+} se libera del SR a través de receptores para Inositol trifosfato (InsP_3Rs), y a través de receptores de Rianodina (RyRs) que se abren cuando las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentan a su alrededor, amplificando la señal. (Modificado de Blaustein, Kao y Matteson: Fisiología Celular y Neurofisiología, 2ª edición).

1.1.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L

Los LTCCs están formados por un complejo de 4 subunidades, α_1 , $\alpha_2\text{-}\delta$, β , y γ (figura 5). Las subunidades $\alpha_2\text{-}\delta$, β , y γ son auxiliares y regulan las propiedades cinéticas de cada tipo de canal. La subunidad que reviste mayor importancia es la subunidad α_1 ya que se trata de la unidad formadora del poro, permitiendo el paso de iones a su través, es la que contiene el sensor de voltaje y el sitio de unión de los agentes bloqueantes del canal como las dihidropiridinas, fenilalkilaminas y benzodiazepinas, de tanta importancia clínica. Existen distintas isoformas de subunidad α_1 , la isoforma Cav1.2 (α_{1C}) es la que está presente en músculo liso (figura 5).

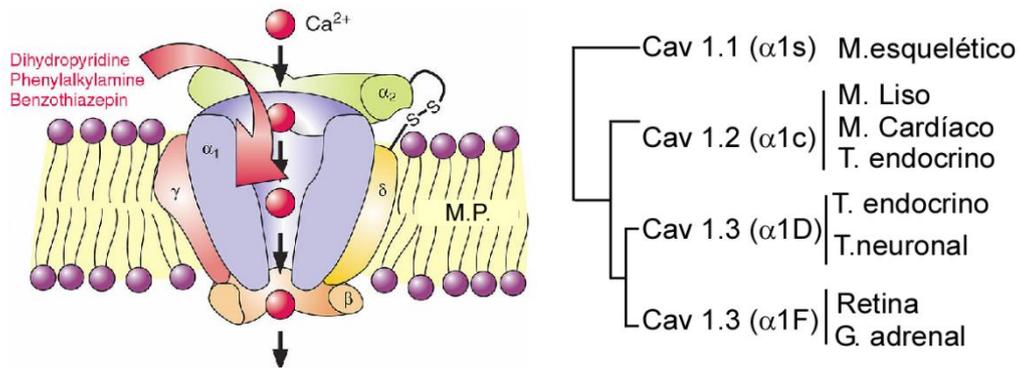


Figura 5: Canales de Ca²⁺ tipo L. Izda, Modelo representativo de las distintas subunidades que componen el canal de Ca²⁺ tipo L indicando la zona de acción de los Bloqueantes de los Canales de Calcio (CCBs “Calcium Channels Bloquers”). Dcha. Esquema de las distintas subunidades α₁ indicando los principales tejidos donde se expresan.

Los LTCCs se abren cuando el potencial de membrana supera ~ -40mV, y una vez que se encuentran abiertos, si la despolarización es suficientemente larga, pueden pasar a un estado no conductor o inactivado. La inactivación está regulada por la propia concentración intracelular de Ca²⁺ como un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que el canal posee un dominio de unión al complejo Ca²⁺-Calmodulina y su interacción con la zona terminal de la subunidad α_{1C} produce la inactivación del canal (Ganitkevich *et al.*, 1987; Gagov *et al.*, 1993; de Leon *et al.*, 1995). La inactivación también está regulada por el potencial de membrana, incrementando la proporción de canales inactivados a medida que aumenta el nivel de despolarización (figura 6).

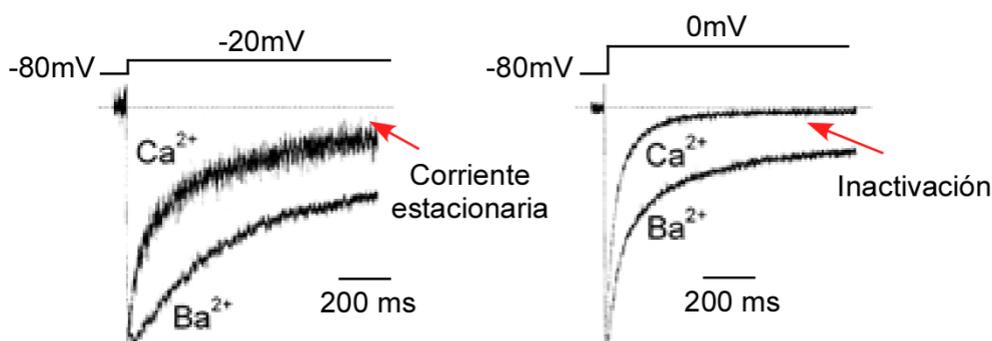


Figura 6: [Ca²⁺]_i y potencial de membrana en la inactivación de los LTCCs. Registros de la corriente de Ca²⁺ en miocitos ventriculares de cobaya normalizados al máximo de corriente para comparar el efecto de la [Ca²⁺]_i en dos pulsos despolarizantes (-20 mV y 0 mV) de 1000 ms de duración. Tomado de (Findlay, 2002).

Se ha descrito en miocitos coronarios de conejo (Matsuda *et al.*, 1990); arterias mesentéricas humanas (Smirnov y Aaronson, 1992); miocitos basilares de rata (Langton y Standen, 1993) y miocitos traqueales equinos (Fleischmann *et al.*, 1994) la presencia de un rango de potenciales de membrana (entre -40 mV y -10 mV) donde la inactivación de los LTCCs no es completa generando una pequeña corriente estacionaria de Ca^{2+} al interior celular (“window current” o “non-inactivating I_{Ca} ”). Dado que las células musculares lisas presentan un potencial de reposo de ~ -55 mV (Gluais *et al.*, 2005; Tolsa *et al.*, 2006), pequeñas despolarizaciones podrían originar la corriente estacionaria, la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs y el aumento del tono vascular.

Diversos agentes vasoactivos como la endotelina-I, α -trombina o arginina vasopresina, que de manera fisiológica son producidos por el organismo, pueden activar los LTCCs de manera indirecta provocando la despolarización de la membrana plasmática (Neylon *et al.*, 1994). Esta activación, como el caso del ATP, también puede ser directa (Del Valle-Rodriguez *et al.*, 2006; Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). En condiciones patológicas como la hemorragia subaracnoidea, la hipertensión sistémica, o la hipertensión pulmonar se ha descrito una despolarización del potencial de membrana de los miocitos arteriales que perdura a lo largo del tiempo (Post *et al.*, 1992; Pesic *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 2011). Esta despolarización provocaría la apertura de los LTCCs, y esta es la razón por la que los Bloqueantes de los Canales de Calcio (CCBs, “Calcium Channel Blockers”) han sido utilizados para el tratamiento de patologías vasculares como, por ejemplo, la hipertensión arterial esencial o secundaria (Tocci *et al.*, 2015) y los vasoespasmos cerebral (Hockel *et al.*, 2016) y coronario (Nishigaki *et al.*, 2010) entre otras.

Los CCBs más estudiados pertenecen a tres familias dihidropiridinas (nifedipina, isradipina), fenilalkilaminas (verapamil) y benzodiazepinas (diltiacem) y difieren en su selectividad entre el tejido vascular y el cardíaco (Abernethy y Schwartz, 1999). Las dihidropiridinas son más potentes como dilatadores arteriales, y poseen una mayor afinidad cuando el canal se encuentra en estado inactivado (Bean, 1984). El estudio del papel de los LTCCs y el efecto de los CCBs en la vasoreactividad durante la despolarización de larga duración constituye uno de los objetivos de este trabajo.

1.1.2. Liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares

Otra fuente que incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son los almacenes intracelulares. En el músculo liso existen dos orgánulos implicados en la regulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el retículo sarcoplásmico (RS) y la mitocondria. En nuestro grupo nos hemos centrado principalmente en el estudio del RS.

El RS es un reservorio de almacenamiento delimitado por bicapa lipídica dispuesto en diversas zonas del citosol. Formando parte de la membrana de RS se encuentran diversos canales iónicos permeables a Ca^{2+} y bombas ATPasa que introducen Ca^{2+} activamente. Se han descrito dos tipos de receptores de membrana del RS a través de los cuales se libera Ca^{2+} al espacio citoplásmico, los receptores de rianodina (RyR) (Ganitkevich y Isenberg, 1995) y los receptores de InsP_3 (InsP_3R) (Ehrlich y Watras, 1988) (ver figura 4).

El RyR es un canal catiónico del que existen tres isoformas en músculo liso vascular (Gollasch *et al.*, 1998). Este receptor se activa por un incremento en la concentración de Ca^{2+} circundante, mediante un proceso muy común en células musculares denominado “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (“Calcium Induced Calcium Release” o CICR) (Kamishima y McCarron, 1997).

El otro receptor presente en el RS es el InsP_3R . El InsP_3 es un segundo mensajero de la transmisión de señales muy frecuente en el citosol que se produce por la activación de proteínas G acopladas a la membrana (Ehrlich y Watras, 1988). La proteína G (Gq o G_{11}) está asociada a una fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (un lípido de membrana) produciendo Diacilglicerol (DAG) e InsP_3 . El DAG se va a quedar en la membrana actuando también como segundo mensajero, mientras que el InsP_3 difunde al citosol pudiendo alcanzar los InsP_3R del RS y provocando la liberación de Ca^{2+} al citosol.

1.1.3. Interacción LTCCs y RS.

Los dos mecanismos que provocan el aumento de Ca^{2+} citosólico, entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y la liberación de Ca^{2+} desde el RS, pueden actuar conjuntamente. Al igual que en músculo cardíaco, la despolarización de la membrana plasmática provoca la apertura de los LTCCs y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico puede

activar la liberación de Ca^{2+} por los RyRs del RS, mecanismo denominado CICR (“Calcium Induced Calcium Release”). La activación de los LTCCs en músculo liso también puede provocar la liberación de Ca^{2+} desde el RS sin necesidad de que exista una entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Este mecanismo denominado CCICR (“Calcium Channel Induced Calcium Release”) (del Valle-Rodriguez *et al.*, 2003) implica una ruta metabotrópica en la cual la activación del canal provocaría la activación de la ruta proteína G/PLC con la consecuente liberación de InsP_3 que, al unirse a su receptor del RS, provocaría la liberación de Ca^{2+} desde el RS. Este aumento de Ca^{2+} activaría los RyRs que amplificarían la señal de Ca^{2+} (figura 7).

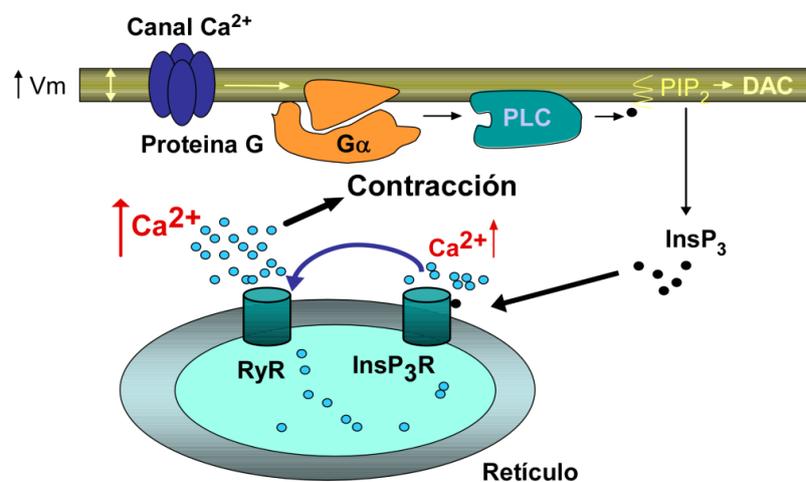


Figura 7: Representación del modelo de liberación de Ca^{2+} inducida por los canales de Ca^{2+} (CCICR). La activación del canal pone en marcha una ruta metabotrópica en la que se produce InsP_3 . La unión de InsP_3 a su receptor en el retículo, favorece la liberación de Ca^{2+} . El Ca^{2+} liberado a través de este receptor activa a los RyR amplificando la señal de Ca^{2+} . (Urena *et al.*, 2007).

1.2. Contracción mediada por los mecanismos de sensibilización a $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Un aumento de Ca^{2+} citoplásmico es necesario para llevar a cabo la contracción del músculo liso, sin embargo, la sensibilidad de la contracción a dicha $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede ser variable. En la figura 8 se comparan los cambios en la dinámica de contracción durante un estímulo de corta duración y un estímulo prolongado en el tiempo. Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, fosforilación de la MLC, y fuerza durante el estímulo de corta duración, siguen la misma dinámica, aumento rápido y transitorio, que va decayendo con el tiempo hasta los valores iniciales (figura 8A). Sin embargo, durante un estímulo sostenido, donde la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la fosforilación de la MLC aumentan rápida y transitoriamente, la fuerza

generada se mantiene mientras el estímulo esté presente, aún cuando el nivel de fosforilación de la MLC es tan solo de un 20-30% (figura 8B).

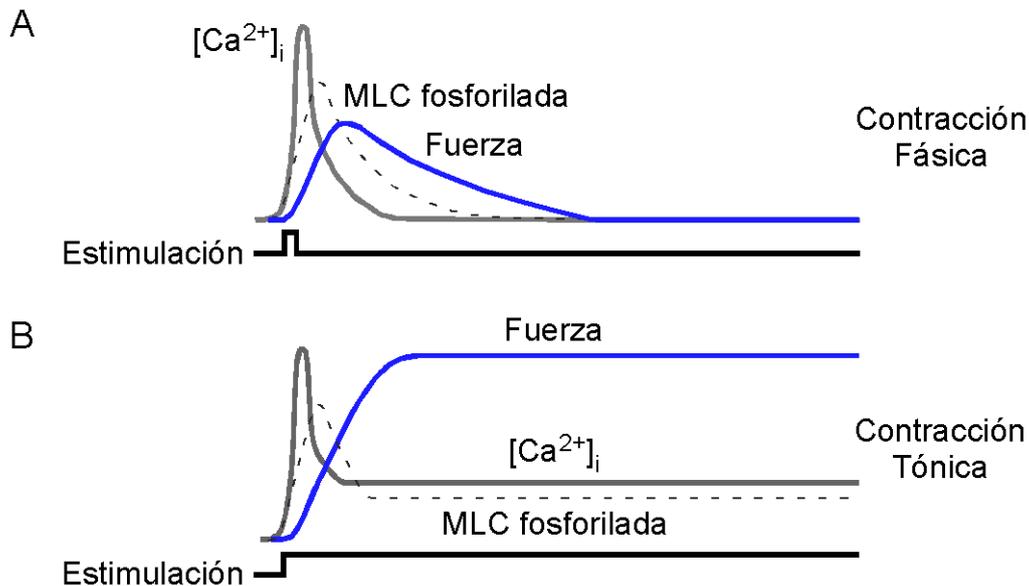


Figura 8: Curso temporal de la $[Ca^{2+}]_i$, fosforilación de la MLC y fuerza durante un estímulo de distinta duración. (A) Estímulo de corta duración. (B) Estímulo de larga duración. (Modificado de Koeppen y Stanton: Berne y Levy, Fisiología, 6ª edición).

Esta contracción mantenida se debe a los mecanismos de sensibilización a Ca^{2+} que hemos comentado anteriormente, RhoA/ROCK y PKC/CPI-17, fundamentalmente. Estos mecanismos permiten que se mantenga la contracción con una $[Ca^{2+}]_i$ constante mediante la inhibición de la MLCP (ver figura 3).

1.2.1 Contracción inducida por la ruta RhoA/ROCK.

RhoA pertenece a la familia de proteínas G monoméricas pequeñas. Esta familia contiene alrededor de 20 miembros cuya expresión es ubicua. RhoA es uno de los miembros mejor conocidos y además de intervenir en la regulación del citoesqueleto de actina, regula una gran variedad de funciones celulares fundamentales como son contracción, movimiento, proliferación y apoptosis (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Esta proteína actúa como un interruptor molecular cuyo cambio conformacional, entre el estado inactivo (unida a GDP) y el estado activo (unida a GTP), provoca la activación de una cascada de señalización intracelular interaccionando con sus dianas para llevar a cabo las respuestas celulares. RhoA en estado inactivo se encuentra unida a GDP y a un

factor denominado GDI (“Guanine dissociation inhibitor”) que bloquea el intercambio de GDP y mantiene a la proteína en el citosol. Un grupo de factores denominados GEF (“Guanine nucleotide Exchange Factors”) desplazan al GDI liberando el residuo que permite a RhoA anclarse a la membrana plasmática y promueven el intercambio de GDP por GTP. RhoA unida a GTP estaría en el estado activo que le permitiría unirse a sus efectores. Otro grupo de factores denominados GAP (“GTPase activating proteins”) estimulan la hidrólisis intrínseca del GTP y producen la rápida conversión de RhoA a su estado inactivo unido a GDP y GDI (figura 9).

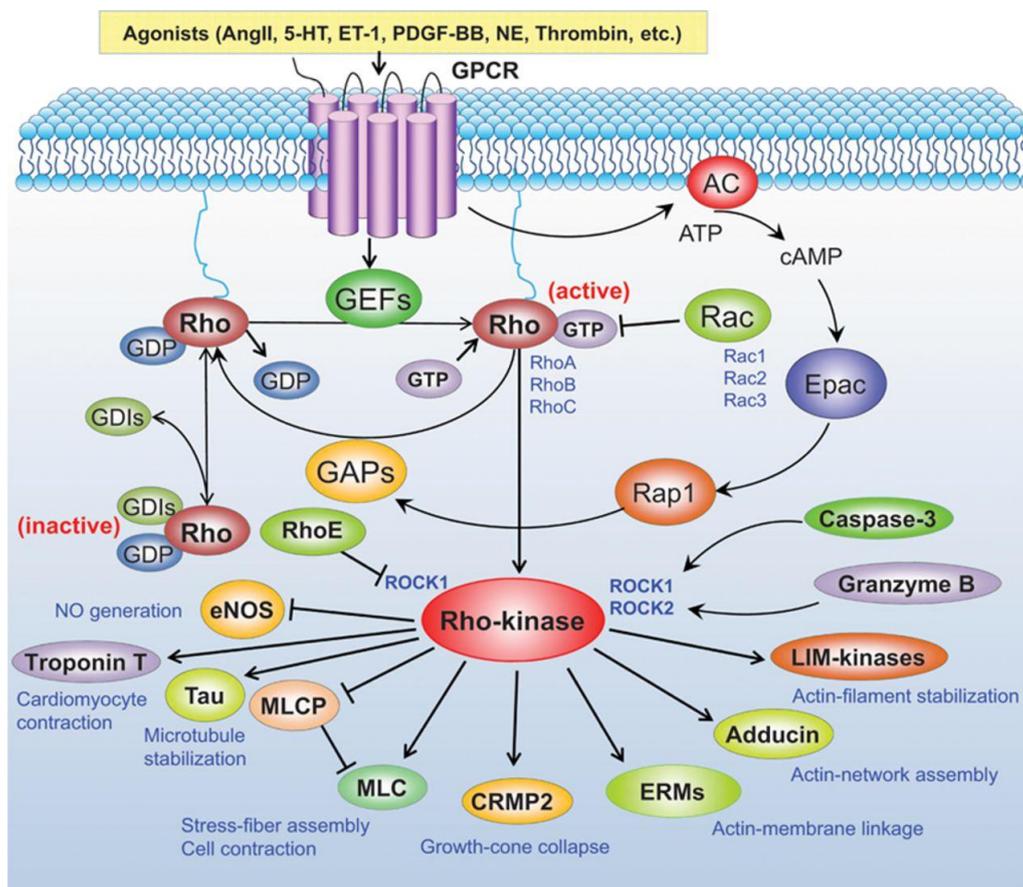


Figura 9: Esquema de la regulación de la vía de señalización RhoA/ROCK. Las Rho GTPasas, incluyendo RhoA, son activadas por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que catalizan el intercambio de GDP por GTP e inactivados por las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs). Cuando un receptor acoplado a proteína G se une a su ligando, desencadena la activación de RhoA, y como consecuencia la de su principal efector ROCK. Se han identificado muchos sustratos de ROCK, incluyendo la MLC, la MLCP y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). (Shimokawa *et al.*, 2016)

La activación de RhoA está controlada por muchas señales como la activación de receptores acoplados a proteína G (Siehler, 2009), receptores de Tirosina quinasa (Schiller, 2006), receptores de citoquinas, o por adhesión celular y agrupación de

integrinas (Tybulewicz y Henderson, 2009). Está descrito que RhoA también se puede activar por la despolarización (Mita *et al.*, 2002; Sakurada *et al.*, 2003; Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011), aunque los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo este proceso no se conocen con detalle.

La ROCK es una serína/treonina quinasa principal efector de RhoA. Existen dos isoformas, ROCKI y ROCKII, y ambas poseen un dominio de unión a RhoA (RBD "Rho Binding Domain"). Cuando RhoA activa se une al dominio RBD provoca un cambio conformacional que permite la activación de ROCK (Matsui *et al.*, 1996). El sustrato mejor caracterizado de ROCK es la MLCP, que al ser fosforilada disminuye su actividad provocando el mantenimiento de la contracción (Amano *et al.*, 1996).

La ruta RhoA/ROCK está implicada en la patogénesis de muchos de desórdenes cardiovasculares (Shimokawa *et al.*, 2016) como la hipertensión (Uehata *et al.*, 1997) y el asma bronquial (Iizuka *et al.*, 2000). En este sentido, inhibidores específicos de ROCK, como el faudil (HA-1077), están indicados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares asociadas a hipercontracción del músculo liso vascular (VSM, "Vascular Smooth Muscle"; por ejemplo, vasoespasmo coronario e hipertensión), aterosclerosis (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular), e hiperreactividad del músculo liso (por ejemplo, asma bronquial) (Masumoto *et al.*, 2002; Hu y Lee, 2005; Shibuya *et al.*, 2005). Ensayos clínicos ya han demostrado la eficacia y seguridad del fasudil en humanos (Vicari *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2011).

1.2.2 Contracción inducida por PKC.

Como se ha comentado anteriormente, existe un segundo mecanismo inhibitorio de la MLCP a través de la vía PKC/CPI-17. CPI-17 es una proteína inhibidora de la MLCP que se expresa predominantemente en el músculo liso, con niveles especialmente altos en las arterias (Woodsome *et al.*, 2001). CPI-17 desempeña un papel crítico en la regulación de la contracción del músculo liso ya que la fosforilación reversible de CPI-17 en Thr38 regula su actividad, uniéndose directamente a la MLCPe inhibiendo su actividad y, en consecuencia, provocando la contracción del músculo liso (Eto, 2009).

Las PKCs constituyen una familia de Serina/treonina quinasas formada por 12 miembros, que regulan numerosas respuestas celulares incluyendo la expresión génica, la secreción de proteínas, la proliferación celular y la respuesta inflamatoria. En condiciones fisiológicas, la activación de PKC se produce por la activación de receptores acoplados a proteína G. No obstante, aunque la sensibilización a Ca^{2+} inducida por despolarización a través de la activación de PKC permanece incierta, algunos estudios describen un aumento significativo en los niveles de fosforilación de CPI-17 en Thr38 durante un estímulo despolarizante, sugiriendo que PKC puede desempeñar un papel importante en la contracción inducida por este estímulo (Kitazawa *et al.*, 2003). El estudio de la activación de PKC por la despolarización y la posible interacción con la ruta RhoA/ROCK está siendo actualmente objeto de investigación en nuestro laboratorio. Como resultado de esta investigación se ha obtenido la patente “Composiciones y preparaciones combinadas para el tratamiento del vasoespasma arterial” ES 2534708 B1.

2. Papel funcional del CCICR: activación de RhoA por la despolarización

Muchos estudios han revelado una importante contribución de los LTCCs y la ruta RhoA/ROCK en la contracción arterial (Yanagisawa y Okada, 1994; Mita *et al.*, 2002; Sakurada *et al.*, 2003; Ratz *et al.*, 2005) pero la relación entre ambos mecanismos no es bien conocida. Estudiando el papel funcional del CCICR, nuestro laboratorio describió que la componente sostenida de la contracción inducida por despolarización estaba mediada por la activación de RhoA/ROCK a través del CCICR. La inhibición de los elementos que intervienen en la ruta del CCICR (LTCCs, Proteínas G, PLC, RS) reducen selectivamente la contracción mantenida inducida por alto K^+ así como la actividad de RhoA (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). Estos datos sugirieron que durante la fase mantenida de la contracción inducida por la despolarización, la activación de RhoA sería, en parte, consecuencia de la activación del CCICR (figura 10).

Estos resultados pueden tener gran relevancia clínica ya que clásicamente se han utilizado los CCBs para el tratamiento de la hipertensión arterial esencial o secundaria y en los vasoespasmos cerebral y coronario entre otros, pero el uso de estos inhibidores presenta problemas secundarios debido a que pueden bloquear también los canales que se encuentran en otros órganos como el corazón. En este caso, el bloqueo de los LTCCs

del músculo cardíaco afectaría a su actividad contráctil. Este hecho podría ser responsable del efecto inotrópico negativo que puede acompañar al tratamiento con estos inhibidores.

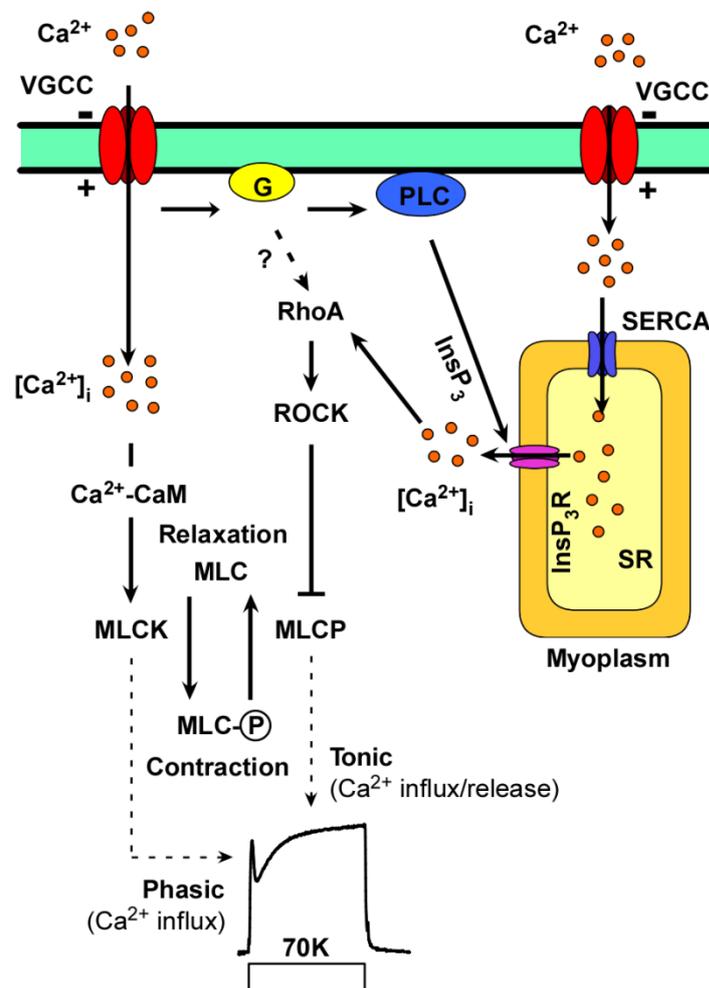


Figura 10: Esquema del doble papel funcional de los LTCCs. Ante la llegada de un estímulo despolarizante, los LTCCs (VGCCs) se abrirían permitiendo un flujo masivo de Ca^{2+} al interior celular responsable de la contracción fásica (papel tradicional, ionotrópico). Además de este tendrían un papel metabotrópico activando una cascada de señalización que implicaría la activación de una proteína G, una PLC, producción de InsP_3 , liberación de Ca^{2+} desde el RS y todo este mecanismo en definitiva estaría activando la ruta RhoA/ROCK para que siga ejerciendo su inhibición sobre la MLCP y, por tanto, manteniendo la contracción. Durante esta fase mantenida, donde una mayor proporción de canales permanecerían en un estado inactivo, un flujo reducido de Ca^{2+} a través de los canales sería suficiente para mantener este proceso activo (Fernandez-Tenorio et al., 2011).

Según el modelo presentado, los LTCCS están interviniendo directamente en la regulación de otra diana terapéutica muy importante implicada en numerosas patologías cardiovasculares y cuyos inhibidores están siendo actualmente utilizados en clínica,

RhoA/ROCK. Por ello uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar los efectos de un posible tratamiento combinado de bajas dosis de inhibidores de ambas rutas con el fin de una posible optimización de los tratamientos actuales.

3. Contracción arterial y actividad de RhoA/ROCK durante despolarizaciones de larga duración.

Como se ha indicado en el apartado anterior, tanto el flujo continuo de Ca^{2+} como la sensibilización a Ca^{2+} llevada a cabo por RhoA/ROCK son necesarios para mantener la contracción inducida por despolarización. Frecuentemente el estudio de las corrientes de Ca^{2+} y los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante técnicas electrofisiológicas y microfluorimétricas se ha llevado a cabo en periodos de tiempo en los cuales la inactivación dependiente de voltaje no se ha desarrollado sustancialmente. Los estímulos despolarizantes utilizados para inducir estas corrientes tiene una duración de unos cientos de milisegundos. Por lo tanto, las corrientes de Ca^{2+} y los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ registrados, podrían ser sobrestimaciones de las que se esperaría ver *in vivo*, dado que el potencial de membrana puede permanecer despolarizado durante muchos minutos u horas, lo que induciría una inactivación importante de estas corrientes. Esto también ocurriría en condiciones patológicas como en la hemorragia subaracnoidea y la hipertensión pulmonar o esencial, donde las células musculares lisas (VSMCs, "Vascular Smooth Muscle Cells") permanecen despolarizadas por largos periodos de tiempo (Wellman *et al.*, 2001). A pesar de que las soluciones de alto K^+ se usan con frecuencia para determinar el papel de la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs y RhoA/ROCK en la contracción arterial, rara vez se ha utilizado la despolarización durante periodos de tiempo prolongado (más de una hora) para estudiar el papel de ambas vías de señalización en la contracción sostenida. Con el fin de simular las condiciones que podrían estar ocurriendo *in vivo* el segundo objetivo de este trabajo ha consistido en evaluar el papel de la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs y la activación de RhoA/ROCK en anillos arteriales despolarizados durante más de una hora en condiciones fisiológicas (2,5 mM Ca^{2+} extracelular) y cuando el flujo de Ca^{2+} está altamente restringido mediante la utilización de soluciones extracelulares con baja concentración de Ca^{2+} (del orden de μM) o la inhibición de la entrada de Ca^{2+} con CCBs.

4. Papel de los canales de Ca^{2+} y las rutas de sensibilización en la hipertensión.

En nuestro grupo hemos descrito un acoplamiento entre los LTCCs, RS y RhoA/ROCK en músculo liso vascular, responsable del mantenimiento de la contracción arterial en respuesta a estímulos despolarizantes. En este trabajo nos ha parecido interesante estudiar si este mecanismo puede participar en procesos fisiopatológicos del sistema cardiovascular como la hipertensión.

La elección de esta patología se fundamenta en que los estudios realizados en modelos de animales hipertensos muestran que en el músculo liso vascular, a) su V_m está despolarizado (Wellman *et al.*, 2001); b) la expresión y función de la subunidad α_{1C} de los LTCCs están incrementadas (Simard *et al.*, 1998; Pesic *et al.*, 2004); c) el RS aumenta la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} (Nomura y Asano, 2002); y d) análisis bioquímicos han demostrado un aumento de actividad de RhoA y ROCK en diferentes modelos animales de hipertensión (SHR, Ang II, L-NAME o DOCA-sal) (Seasholtz *et al.*, 2001; Kataoka *et al.*, 2002; Seko *et al.*, 2003; Guilluy *et al.*, 2010). Dado que todos estos elementos están presentes en la ruta de señalización descrita en la figura 10, un tercer objetivo del proyecto es estudiar si el acoplamiento LTCCs-RS participa en el incremento de reactividad de las arterias de ratas espontáneamente hipertensas y en su caso, si este fenómeno está mediado por la ruta RhoA/ROCK.

OBJETIVOS

Objetivos

El trabajo desarrollado durante la presente Tesis Doctoral se centró en el estudio de los LTCCs y RhoA/ROCK en la contracción mantenida inducida por despolarizaciones prolongadas y su posible implicación en la hipertensión arterial. Para llevar a cabo este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1- Determinación de la concentración óptima de los inhibidores de LTCCs y ROCK que tienen efecto vasorrelajante sobre la fase mantenida de la contracción y que no generan efectos secundarios sobre la contractilidad cardíaca.

1.1 Caracterización del efecto de bajas concentraciones de los inhibidores de LTCCs y ROCK, aplicados por separado o conjuntamente, sobre las distintas fases de la contracción arterial inducida por despolarización.

1.2 Estudio del efecto de estos inhibidores sobre las propiedades eléctricas (corrientes iónicas y potencial de acción) de los miocitos arteriales y cardíacos aislados.

1.3 Análisis del efecto de estos inhibidores sobre la contractilidad cardíaca.

2- Estudio del papel de la entrada de Ca^{2+} y RhoA/ROCK sobre la contracción arterial durante despolarizaciones prolongadas.

2.1 Efecto de bajas $[Ca^{2+}]$ extracelular en la contracción arterial inducida por despolarización mantenida: Papel de los LTCCs.

2.2 Papel de RhoA/ROCK durante la despolarización arterial mantenida. Sensibilidad de RhoA a Ca^{2+} .

3- Estudio de la implicación de los LTCCs, RS y RhoA/ROCK en la vasorreactividad arterial en modelos animales de hipertensión esencial.

3.1 Estudio de la respuesta vasocontráctil mediada por la activación de los LTCCs en condiciones fisiológicas.

3.2 Estudio de la respuesta vasocontráctil mediada por el CCICR.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados que se exponen en este trabajo se han dividido en 4 apartados (1-4). En el primer apartado se caracteriza la contracción inducida por despolarización en dos arterias distintas. Un segundo apartado recoge el estudio de la sensibilidad de la contracción arterial a los inhibidores de los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCCs) y de la ruta RhoA/ROCK. En el tercer apartado se estudia la dependencia del Ca^{2+} de la activación de RhoA y el mantenimiento de la contracción durante estímulos prolongados. El último apartado recoge los estudios de la implicación de los LTCCs, RS y RhoA/ROCK en la vasorreactividad en ratas espontáneamente hipertensas.

1. Caracterización de la contracción inducida por la despolarización.

Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto un nuevo papel funcional de los LTCCs en músculo liso arterial (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2010; Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). Estos canales, además de permitir la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (papel ionotrópico), pueden regular la actividad de las proteínas RhoA/ROCK a través de una ruta metabotrópica, permitiendo así el mantenimiento de la contracción.

Para estudiar el papel de los LTCCs en la contracción arterial se ha usado una solución externa con una alta concentración de K^+ ($[\text{K}^+]_e$), con el fin de provocar la despolarización de la membrana plasmática de las VSMCs, favoreciendo la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales y la consecuente contracción del miocito. De esta forma, se fija el potencial de membrana de los miocitos a un nivel cercano al potencial de equilibrio para el K^+ , considerando que éste es el ion más permeable en este tipo celular.

Estudiamos la contracción inducida por la solución despolarizante en dos tipos de arterias musculares, la arteria basilar y la arteria femoral. En ambos tipos arteriales, la solución de alto K^+ induce una contracción muy similar, con una fase rápida y transitoria, denominada fásica (debida principalmente al papel inotrópico de los LTCCs), y otra fase más lenta, denominada tónica, que se mantiene todo el tiempo que dura el estímulo (debida a la activación de la ruta RhoA/ROCK a través de la ruta metabotrópica) (figura 11).

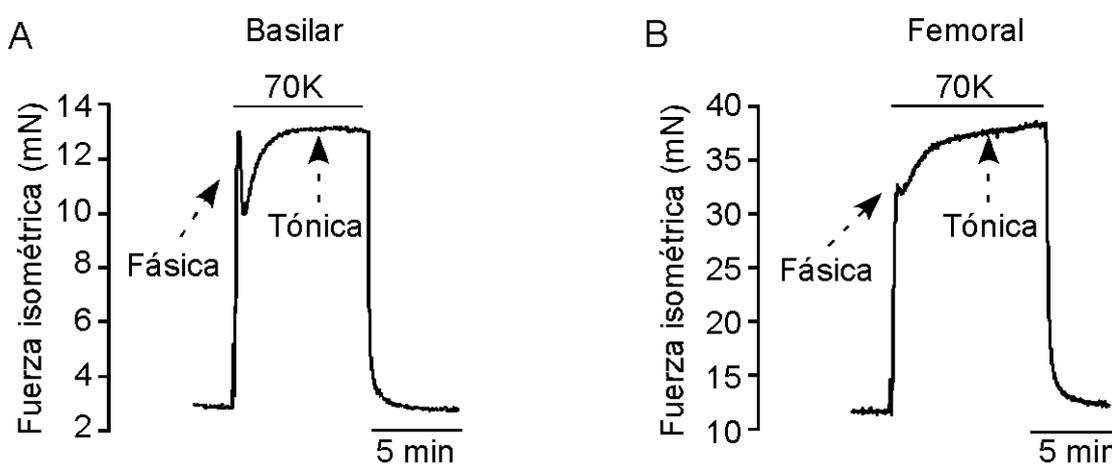


Figura 11: Fuerza isométrica inducida por la despolarización con alto K^+ . Registros representativos de la fuerza isométrica inducida por 70K en anillos de arteria basilar (A) y femoral (B) de rata. Las flechas indican las dos fases de la contracción en cada caso.

1.1. Curva dosis-respuesta a distintas $[K^+]_e$.

Para caracterizar mejor la respuesta a alto K^+ , analizamos el efecto de distintas $[K^+]_e$ en la contracción arterial. La figura 12 muestra un registro representativo de la fuerza isométrica generada por un anillo de arteria basilar (figura 12A) y de arteria femoral (figura 12B) de rata que es sometidos a distintas $[K^+]_e$. En ambos tipos arteriales, la fuerza desarrollada aumenta a medida que se incrementa la $[K^+]_e$, alcanzando el valor máximo con 70 mM K^+ (70K) (figura 12C y D). La $[K^+]_e$ necesaria para inducir la mitad de la fuerza máxima en ambos casos está muy próxima a 30 mM de K^+ (30K) (27,83 mM en el caso de la arteria basilar, y 26,9 mM, en el caso de la arteria femoral).

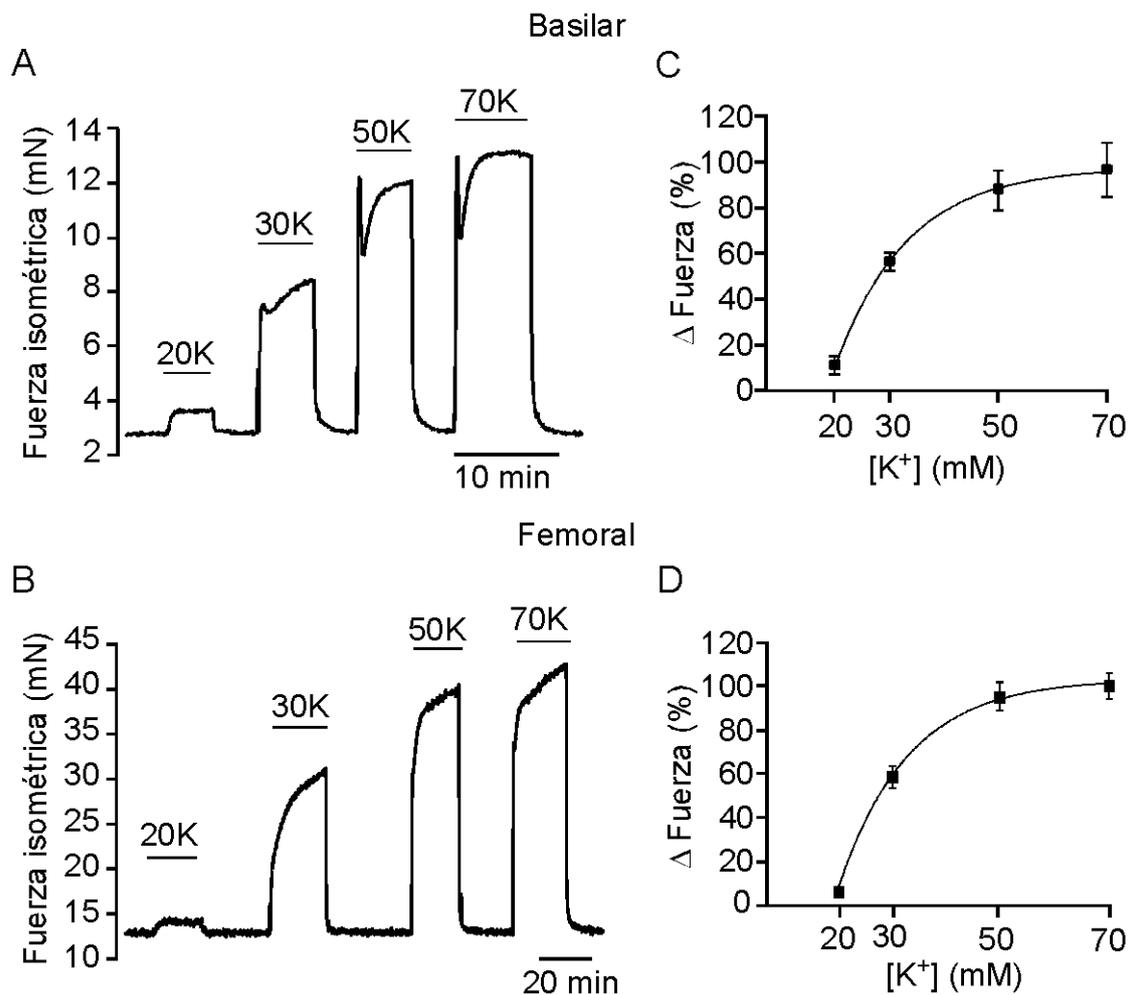


Figura 12: Efecto de la $[K^+]_e$ sobre la contracción arterial. (A y B) Registro representativo de la fuerza isométrica generada por anillos de arteria basilar y femoral, respectivamente, al ser sometidos a distintas $[K^+]_e$. (C y D) Curvas dosis-respuesta del efecto de la $[K^+]_e$ sobre la fuerza generada por anillos de arteria basilar y femoral, respectivamente. Los valores se representan como la media de la contracción tónica medida a los 5-10 min en arteria basilar y 20 min en femoral, \pm error estándar, normalizada en relación a la contracción con 70K (n= 7 anillos de arteria basilar; n=18 anillos de arteria femoral).

1.2. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la despolarización.

Con objeto de estudiar el papel del Ca^{2+} en la fuerza generada por los anillos arteriales, se midieron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos aislados cuando se sometían a distintas $[K^+]_e$ (figura 13). Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se corresponde con el cociente entre la fluorescencia emitida por el Fura-2 cuando se excita a una longitud de onda de 340 nm y 380 nm (F_{340}/F_{380}). La $[Ca^{2+}]_i$ aumenta a medida que se incrementa la $[K^+]_e$, además la exposición a 70K produce inicialmente un incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$ y posteriormente una segunda fase de meseta en la que la concentración del ion se mantiene constante.

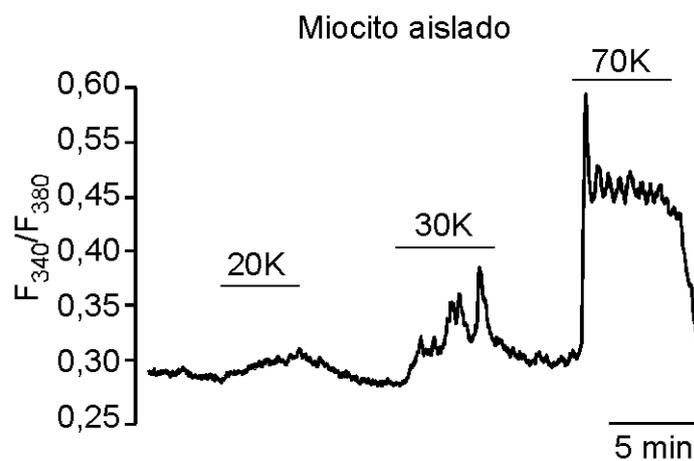


Figura 13: Efecto de la $[K^+]_e$ en la $[Ca^{2+}]_i$ en células aisladas. Registro representativo de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ generada por distintas $[K^+]_e$ en una célula aislada de arteria femoral de rata.

El papel del Ca^{2+} se estudió también midiendo simultáneamente los cambios en la concentración del ion y el diámetro arterial en arterias basilares intactas mediante un sistema presurizado donde el lumen arterial es perfundido con una solución sin Ca^{2+} a una presión de 60 mmHg, de tal forma que se mantiene el endotelio aislado de los cambios en la solución externa (figura 14). En respuesta a la despolarización se produce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que va acompañado de la reducción del diámetro arterial presentando ambos parámetros, una primera fase rápida y transitoria seguida de una fase mantenida hasta el final del estímulo.

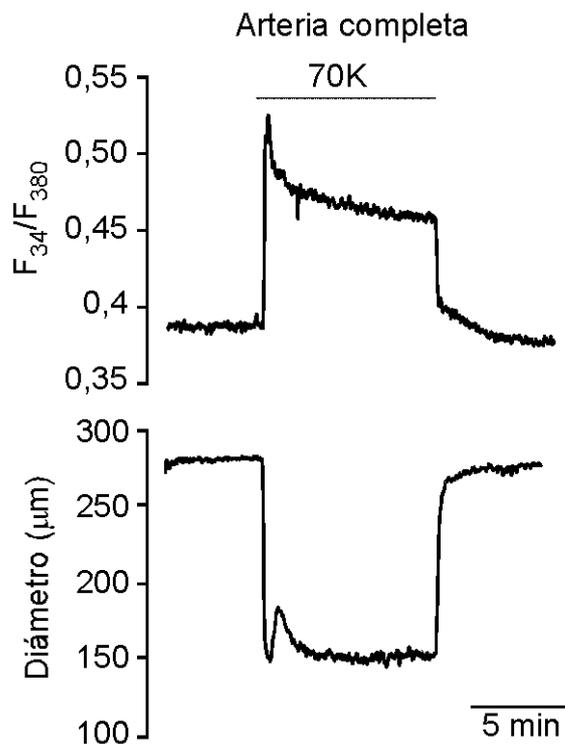


Figura 14: Cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el diámetro arterial en respuesta a una solución despolarizante. Registro representativo de la medida simultánea de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el diámetro arterial inducido por 70K en una arteria basilar de rata.

2. Sensibilidad de la contracción mantenida a los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} e inhibidores de ROCK

Clásicamente se han utilizado los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (CCBs, “ Ca^{2+} Channel Blockers”) para el tratamiento de ciertas patologías cardiovasculares, como por ejemplo la hipertensión arterial esencial o secundaria y los vasoespasmos cerebral y coronario, entre otros. El uso de estos inhibidores presenta problemas secundarios, debido a que pueden bloquear también los canales que se encuentran en otros órganos como el corazón. En este caso, el bloqueo de los LTCCs de los cardiomiocitos afectaría a su actividad contráctil, lo que podría ser responsable del efecto inotrópico negativo que puede acompañar al tratamiento con estos inhibidores.

Ya que los LTCCs están interviniendo directamente en la regulación de RhoA/ROCK, otra diana terapéutica muy importante implicada en numerosas patologías cardiovasculares y cuyos inhibidores están siendo actualmente utilizados en clínica, el estudio del efecto de bajas concentraciones de los inhibidores de LTCCs y

ROCK, aplicados conjuntamente o por separado, podría ayudar a mejorar los tratamientos, evitando o disminuyendo los efectos secundarios.

Con el fin de mimetizar lo que estaría ocurriendo en el vasoespasmo cerebral donde las arterias se encuentran despolarizadas, realizaremos este estudio en arterias basilares despolarizadas con una solución de 30K, que induce ~50% de la contracción máxima (ver figura 12A y C) y estaría fijando el potencial de membrana del miocito a ~-36 mV (estimado mediante un simulador de la ecuación de Nernst/Goldman, Universidad de Arizona) valor cercano al nivel de despolarización descrito en arterias procedentes de modelos animales de hemorragia subaracnoidea (Harder *et al.*, 1987; Koide *et al.*, 2011).

2.1. Efecto de los CCBs sobre la fase mantenida de la contracción.

Para estudiar el papel de los LTCCs en el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización, hemos analizado el efecto vasorrelajante de distintas concentraciones de dos tipos distintos de CCBs, dos dihidropiridinas (nifedipina e isradipina) y una fenilalkilamina (verapamil). Estos bloqueantes son usados comúnmente en clínica y difieren en su selectividad sobre el tejido vascular y el cardíaco (Abernethy y Schwartz, 1999).

En la figura 15 se pueden observar los registros representativos y las curvas dosis-respuesta de estos inhibidores aplicados durante la fase mantenida de la contracción. Las dihidropiridinas presentan un mayor efecto vasorrelajante, ya que se necesitan concentraciones más bajas del fármaco para obtener el mismo efecto (IC_{50} de la nifedipina = 2,56 nM; isradipina = 0,140 nM; verapamil = 43,5 nM), y entre ellas la isradipina es la que mayor efecto produce, llegando a relajar el 100% con una concentración de tan solo 0,5 nM.

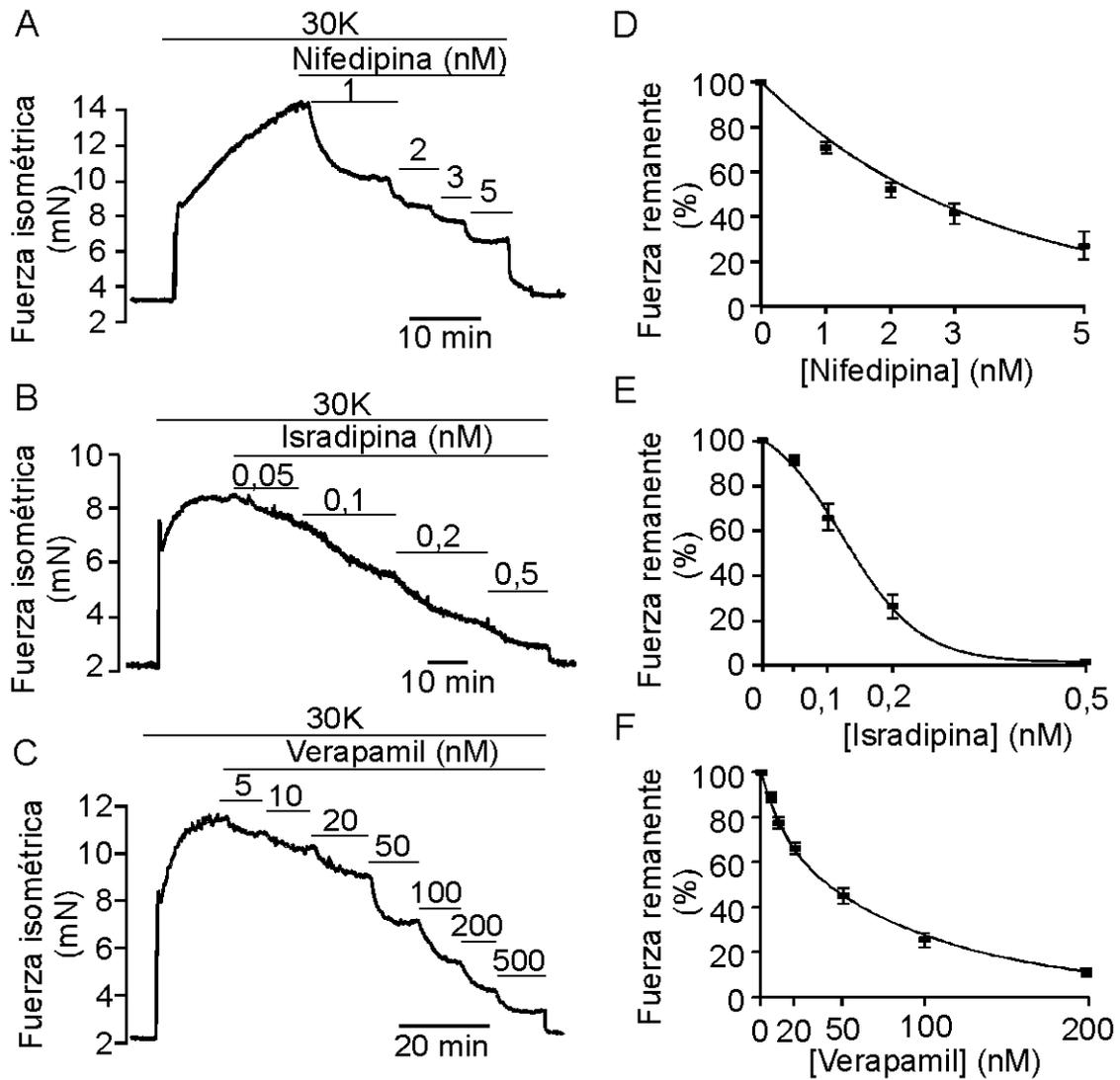


Figura 15: Efecto de los CCBs sobre la fase mantenida de la contracción arterial inducida por despolarización. (A, B y C) Registros representativos del efecto acumulativo de nifedipina, isradipina y verapamil, respectivamente, sobre la fase mantenida de la contracción inducida por 30K. (D, E y F) Curvas dosis-respuesta del efecto vasorrelajante de nifedipina ($IC_{50} = 2,56$ nM, $n = 21$), isradipina ($IC_{50} = 0,140$ nM, $n = 11$) y verapamil ($IC_{50} = 43,5$ nM, $n = 7$), respectivamente. Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar los CCBs.

2.2. Papel de ROCK en el mantenimiento de la contracción

Dado que en la fase tónica de la contracción participa la ruta RhoA/ROCK, hemos estudiado el efecto vasorrelajante del fasudil, un inhibidor de ROCK. La figura 16A muestra un registro representativo del efecto vasorrelajante de la aplicación de dosis crecientes de fasudil sobre la fase mantenida de la contracción en un anillo de arteria basilar. La figura 16B muestra la curva dosis-respuesta (IC_{50} fasudil = $0,76$ μ M).

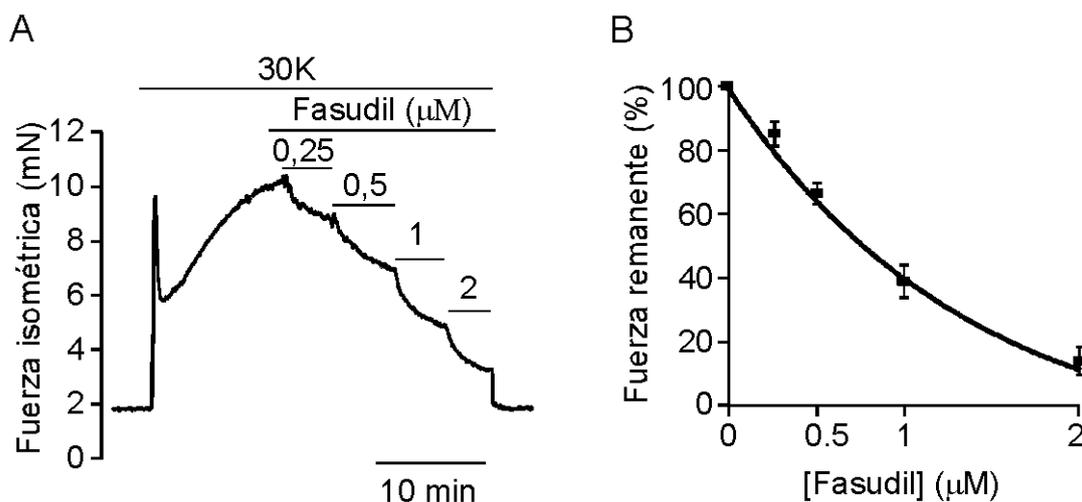


Figura 16: Efecto del inhibidor de ROCK sobre la fase mantenida de la contracción arterial inducida por la despolarización. (A) Registro representativo del efecto acumulativo de fasudil sobre la fase mantenida de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata. (B) Curva dosis-respuesta del efecto vasorrelajante del fasudil ($IC_{50} = 0,76 \mu\text{M}$, $n= 3$). Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar el inhibidor.

2.3. Efecto combinado de los CCBs y los inhibidores de ROCK sobre la contracción mantenida.

Ya que los inhibidores de los LTCCs y de ROCK poseen gran efecto vasorrelajante sobre la contracción mantenida, se estudió el efecto vasorrelajante de la aplicación conjunta de los dos inhibidores, siguiendo el protocolo indicado en la figura 17. Con el fin de determinar qué concentración de fasudil es la más adecuada, probamos inicialmente tres concentraciones distintas de fasudil combinadas con nifedipina.

En la figura 17A, B y C se muestran los registros representativos de los efectos vasorrelajantes de dosis crecientes de nifedipina aplicadas en presencia de 0,25 μM , 0,5 μM y 1 μM fasudil, respectivamente. En la figura 17D se muestran las curvas dosis-respuesta para la nifedipina, aplicada individual o conjuntamente con las distintas concentraciones de fasudil. Las tres concentraciones probadas de fasudil provocan un desplazamiento significativo de la curva de relajación de la nifedipina, disminuyendo el IC_{50} de 2,56 nM a 1,59 nM en el caso de 0,25 μM fasudil, 0,8 nM para 0,5 μM fasudil y 0,29 nM para 1 μM fasudil. Dado que el objetivo es utilizar la menor concentración posible que produzca la mayor relajación, utilizaremos 0,25 μM fasudil para aplicarlo conjuntamente con los otros CCBs.

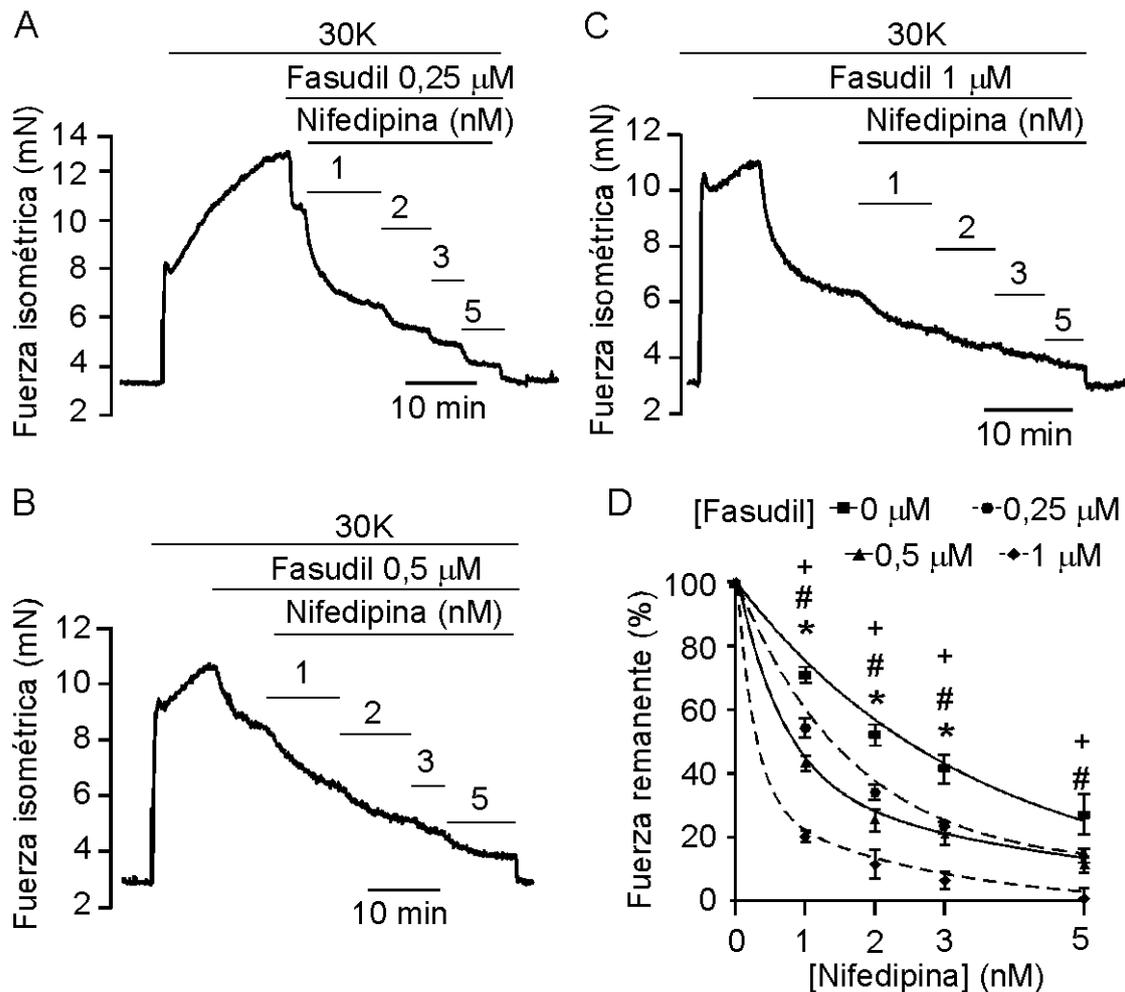


Figura 17: Efecto del fasudil sobre la curva de relajación de la nifedipina en la contracción inducida por despolarización en arteria basilar de rata. (A, B y C) Registro representativo del efecto del fasudil (0,25 μ M, 0,5 μ M y 1 μ M, respectivamente) sobre la relajación inducida por dosis acumuladas de nifedipina durante la fase mantenida de la contracción. (D) Curvas dosis-respuesta del efecto vasorrelajante de la nifedipina aplicada individualmente (indicada como 0 μ M fasudil, IC_{50} = 2,56 nM, n= 21), en presencia de 0,25 μ M fasudil (IC_{50} = 1,59 nM, n= 19), 0,5 μ M fasudil (IC_{50} = 0,8 nM, n= 11) o 1 μ M fasudil (IC_{50} = 0,29 nM, n= 4). Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar fasudil. * p <0,05; # p <0,05 y + p <0,05 para 0,25 μ M, 0,5 μ M y 1 μ M fasudil, respectivamente, *versus* 0 μ M fasudil.

En la figura 18A y B se muestra el efecto combinado de bajas dosis de fasudil 0,25 μ M, en presencia de isradipina o verapamil, respectivamente. En el caso de la isradipina, esta concentración de fasudil no fue capaz de desplazar la curva de relajación significativamente, y sólo se hallaron diferencias en el primer punto de la curva (figura 18C). En el caso del verapamil la curva de relajación se desplaza hacia la izquierda en presencia de fasudil, disminuyendo el IC_{50} de 43,5 nM a 22,2 nM (figura 18D).

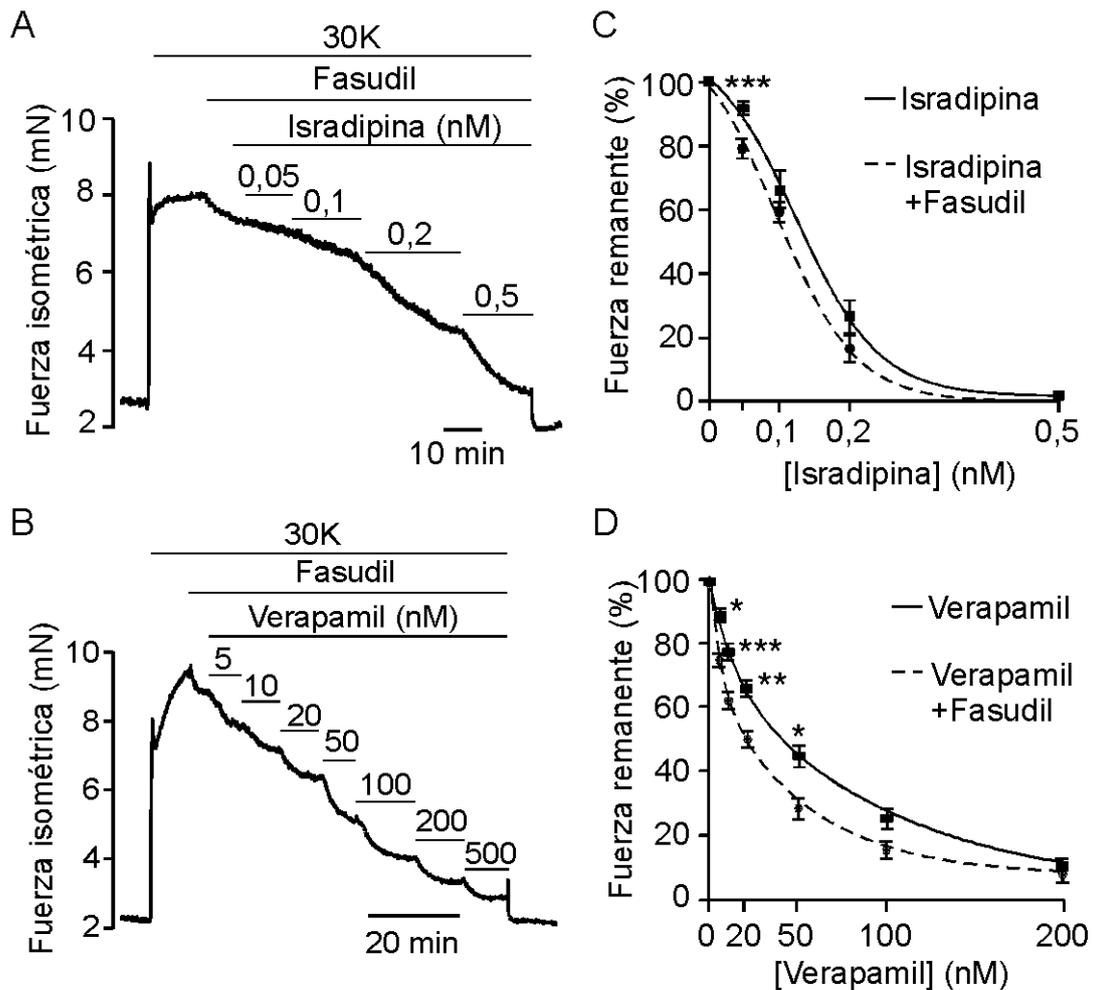


Figura 18: Efecto de una baja concentración de fasudil sobre la curva de relajación de la nifedipina en la contracción inducida por despolarización en arteria basilar de rata. (A y B) Registro representativo del efecto de la presencia de una baja concentración de fasudil (0,25 μM) sobre la relajación inducida por dosis acumuladas de isradipina y verapamil, respectivamente, durante la fase mantenida de la contracción. **(C y D)** Curvas dosis-respuesta del efecto vasorrelajante acumulado de isradipina y verapamil, respectivamente, aplicados individualmente (isradipina IC₅₀ = 0,140 nM, n= 11; verapamil IC₅₀ = 43,5 nM, n= 7), o en presencia de baja concentración de fasudil (isradipina IC₅₀ = 0,113 nM, n= 6; verapamil IC₅₀ = 22,2 nM, n= 7), sobre la fase mantenida de la contracción. Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar fasudil. *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001.

Estos resultados indican que la aplicación combinada de bajas concentraciones de CCBs (nifedipina y verapamil) junto con el inhibidor de ROCK genera mayor efecto vasorrelajante sobre la fase mantenida de la contracción que la aplicación por separado de estos inhibidores.

2.4. Efecto del uso combinado de los CCBs y el inhibidor de ROCK sobre las componentes fásica y tónica de la contracción inducida por despolarización.

Dado que la contracción arterial inducida por despolarización posee dos componentes, se hicieron experimentos para determinar el efecto del tratamiento combinado sobre las distintas fases de la contracción. Para estos experimentos los anillos fueron tratados durante ~15min con los distintos inhibidores previamente a la aplicación de la solución despolarizante.

En la figura 19 se observa que la aplicación de altas dosis de fasudil (2 μM) inhibe tanto la componente tónica como la fásica de la contracción, mientras que concentraciones más bajas (0,5 μM) afectan solamente a la fase mantenida.

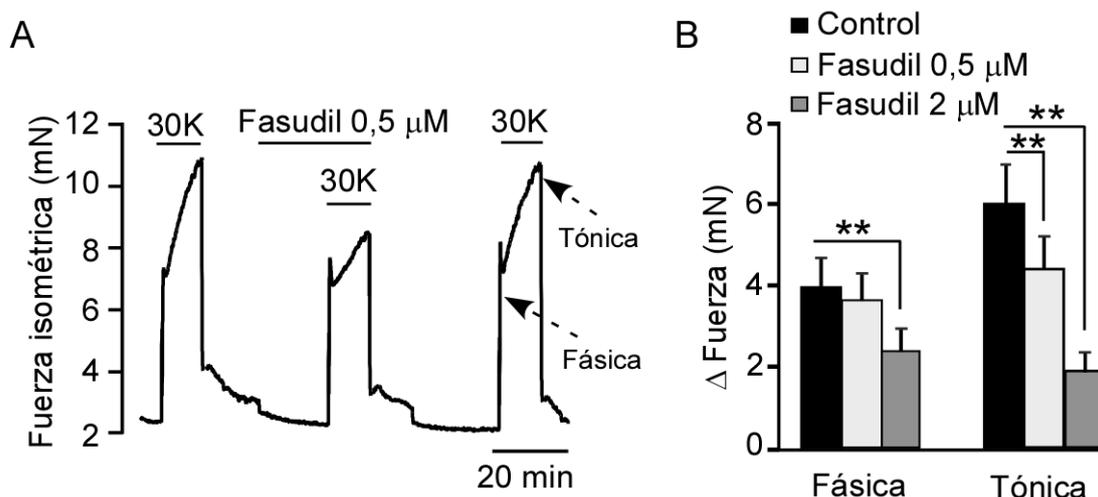


Figura 19: Efecto del fasudil sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata. (A) Registro representativo del efecto de bajas dosis de fasudil (0,25 μM) sobre la fuerza generada por la aplicación de 30K en un anillo de arteria basilar de rata. Las flechas indican los dos componentes de la contracción. (B) El diagrama de barras representa la cuantificación del incremento de fuerza isométrica inducido por 30K en ausencia (control) o en presencia de bajas (0,25 μM , n= 5) o altas (2 μM , n= 6) dosis de fasudil. Los datos se representan en valores absolutos. **p<0,01.

Para descartar que este efecto inhibitorio del fasudil esté asociado a una acción inespecífica sobre los mecanismos de regulación del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), se realizó la medida simultánea de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el diámetro arterial en un sistema presurizado.

La figura 20A muestra un registro simultáneo de la medida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (representada como F_{340}/F_{380}) y el diámetro arterial en una arteria basilar completa de rata. El análisis cuantitativo de los datos se muestra en la figura 18B. La despolarización

con 70K produce el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ que se acompaña de la reducción del diámetro arterial. En presencia de 10 μ M fasudil se inhibe selectivamente la fase mantenida de la contracción sin alterar la $[Ca^{2+}]_i$, reforzando la idea de que la fase mantenida está mediada por RhoA/ROCK. Un efecto similar ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio utilizando Y27632 para inhibir ROCK (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011).

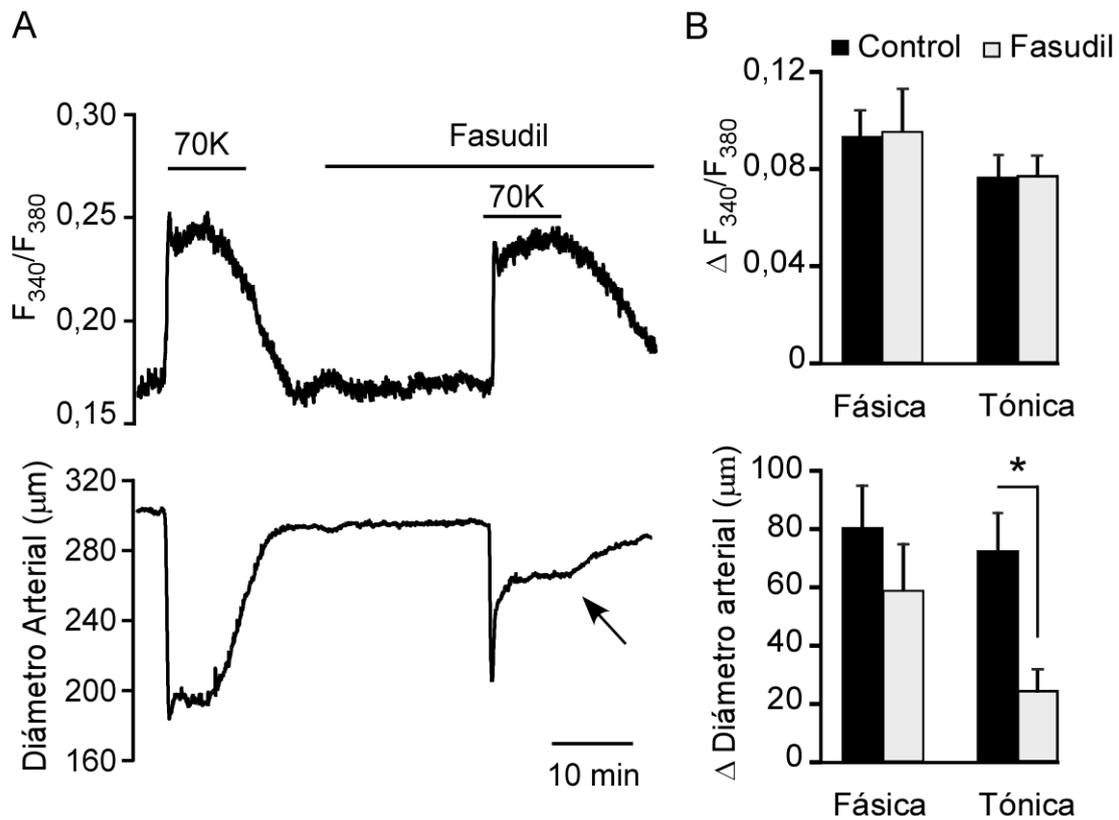


Figura 20: Efecto de fasudil sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción en una arteria completa. (A) Registro simultáneo de la $[Ca^{2+}]_i$ (F_{340}/F_{380}) y el diámetro arterial en arteria basilar de rata. La flecha resalta el efecto inhibitorio selectivo del fasudil (10 μ M) sobre la fase tónica de la contracción. (B) Los diagramas de barras representan la cuantificación de los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ y el diámetro arterial inducidos por alto K^+ en ausencia (control) o presencia de fasudil (n= 4). Los datos se representan en valores absolutos. * $p < 0,05$.

Para testar el efecto de los CCBs sobre las distintas fases de la contracción, preincubamos los anillos arteriales con distintas concentraciones de los antagonistas antes de aplicar la solución despolarizante (figura 21). La aplicación de 8 nM nifedipina y 500 nM verapamil inhiben ambas componentes de la contracción, mientras que concentraciones más bajas (2 nM nifedipina y 5 nM verapamil) sólo afectan a la fase mantenida de la misma.

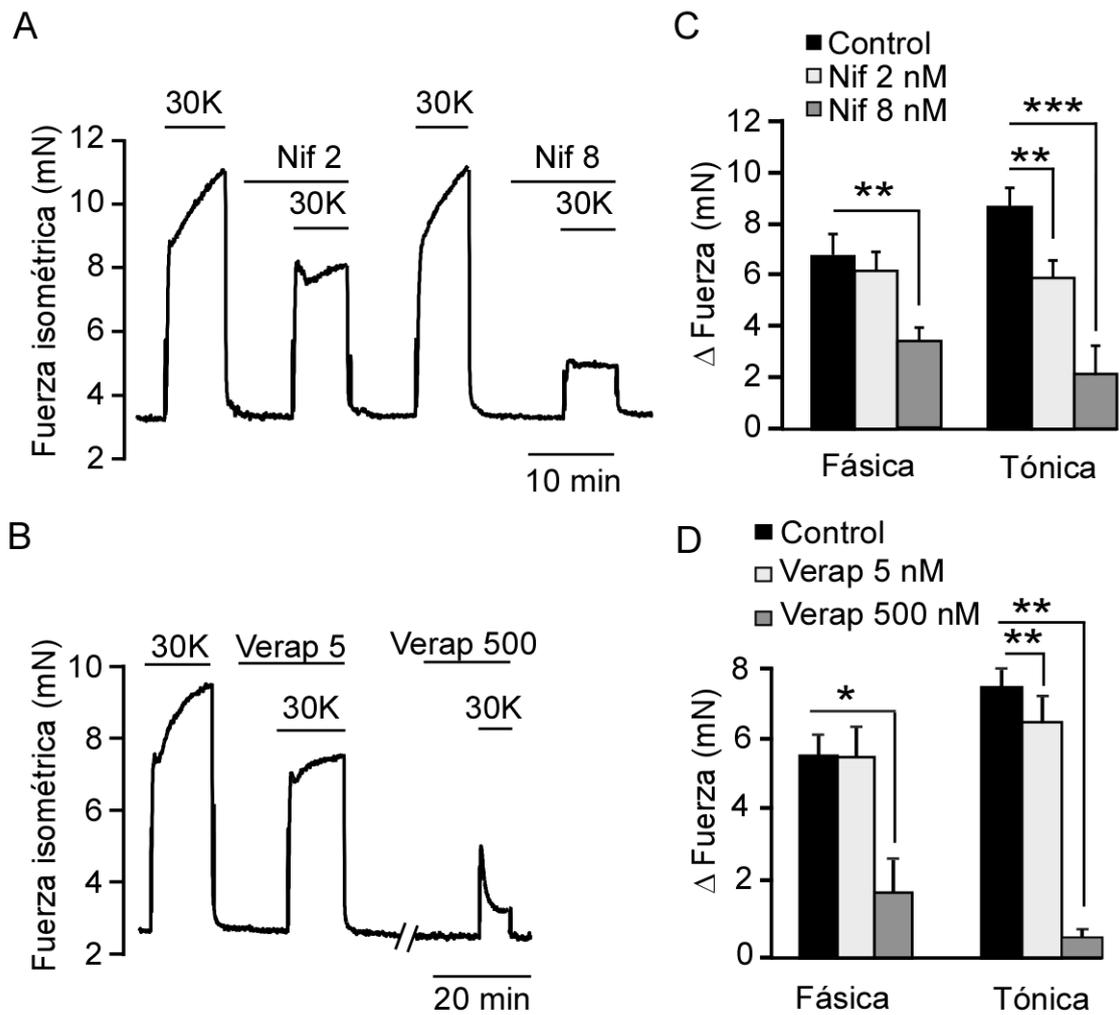


Figura 21: Efecto de los CCBs sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata. (A y B) Registros representativos de la fuerza generada por la solución 30K en un anillo de arteria basilar de rata en presencia de bajas (2 nM nifedipina; 5 nM verapamil) o altas concentraciones (8 nM nifedipina, 500 nM verapamil) de los CCBs. (C y D) Análisis cuantitativo del incremento de fuerza isométrica inducido por 30K en ausencia (control) o presencia de bajas (2 nM nifedipina, n= 3; 5 nM verapamil, n= 6) o altas dosis (8 nM nifedipina n= 4; 500 nM verapamil, n= 4) de los CCBs. Los datos se representan en valores absolutos. *p<0,05; **p<0,01.

Para determinar si el tratamiento combinado de bajas dosis de CCBs y fasudil, producía un efecto vasorrelajante selectivo sobre la fase mantenida de la contracción, se preincubaron los anillos con bajas dosis de verapamil, en este caso 10 nM, de forma individual o conjuntamente con 0,25 μ M fasudil.

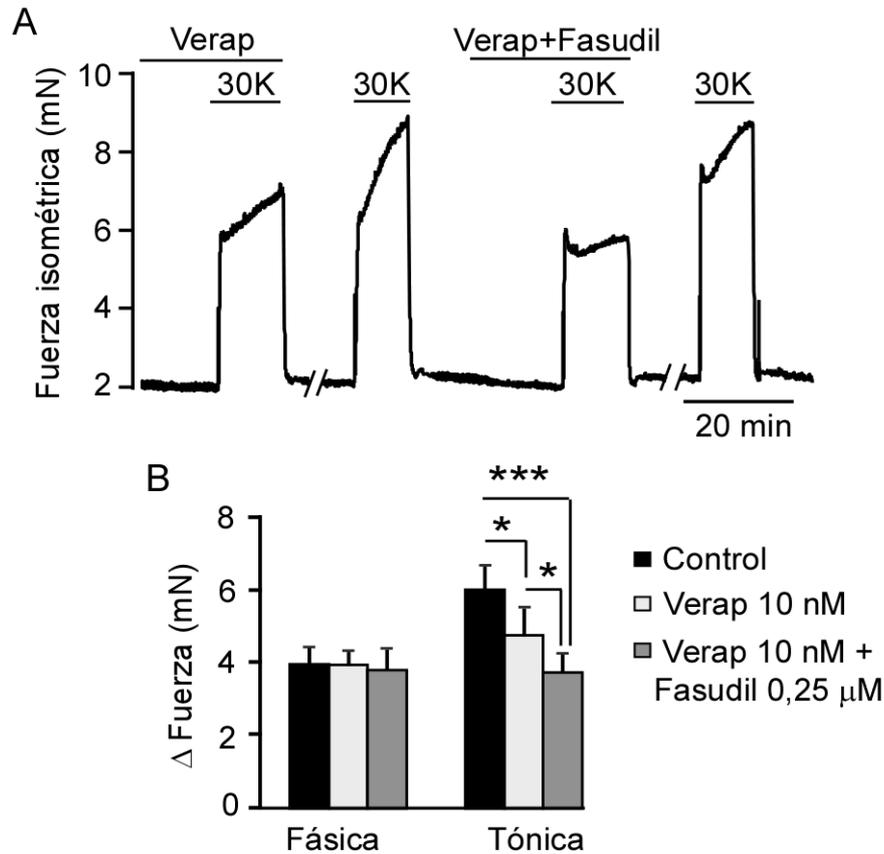


Figura 22: Efecto de la aplicación individual o conjunta de dosis bajas de CCBs y fasudil sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria basilar de rata. (A) Registro representativo de la fuerza generada por la aplicación de 30K en un anillo de arteria basilar de rata al aplicar una baja concentración de verapamil (10 nM) de forma individual o conjuntamente con una baja concentración de fasudil (0,25 μ M). (B) El diagrama de barras representa el incremento de fuerza isométrica inducido por 30K en ausencia (control) o en presencia de bajas dosis de verapamil aplicado en solitario (10 nM) o de manera conjunta con bajas dosis de fasudil (0,25 μ M) (n=8). Los datos se representan en valores absolutos. * p <0,05; *** p <0,001.

La figura 22 muestra la efectividad del tratamiento combinado, obteniéndose una mayor inhibición de la contracción cuando ambos fármacos se aplican conjuntamente que cuando se aplican de manera individual. Además, este efecto inhibitorio sigue siendo selectivo sobre la fase mantenida de la contracción. Estos resultados sugieren que la aplicación conjunta de bajas concentraciones de los LTCCs y fasudil podría constituir un buen abordaje terapéutico para el tratamiento de la contracción arterial mantenida sin afectar a las contracciones de corta duración.

2.5. Efecto de los CCBs y el fasudil sobre las corrientes de Ca^{2+} de miocitos arteriales aislados.

Como se ha indicado anteriormente, los LTCCs desempeñan un doble papel funcional cuando las VSMCs son sometidas a soluciones despolarizantes. En la fase inicial de la despolarización, la entrada masiva de Ca^{2+} (efecto ionotrópico) sería responsable de la componente fásica de la contracción. La despolarización mantenida favorece la inactivación de los LTCCs, y la pequeña entrada de Ca^{2+} a través de ellos facilitaría la activación de RhoA/ROCK a través de una ruta metabotrópica (componente tónica). Dado que ambas componentes requieren la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs, estudiamos mediante técnicas electrofisiológicas si, realmente, el flujo de Ca^{2+} no se ve afectado por las bajas concentraciones de los inhibidores de LTCCs y ROCK que han mostrado un papel vasorrelajante importante.

Mediante la técnica de “patch-clamp”, utilizando el método de fijación de voltaje, registramos las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) en VSMCs aisladas de arteria basilar de rata durante pulsos de 10 ms o 500 ms de duración. La figura 23A muestra un registro representativo de una I_{Ca} cuando se aplica un pulso despolarizante que lleva el potencial de membrana (V_m) desde -70 mV a +20 mV durante 10 ms. La corriente refleja un flujo masivo de Ca^{2+} a través de los canales que se mantiene durante el estímulo. Al final del pulso despolarizante se genera una gran corriente de cola, como consecuencia del alto gradiente electroquímico en el momento de la repolarización. La figura 23B muestra la corriente registrada durante un pulso de 500 ms en el mismo tipo celular. La corriente alcanza rápidamente un valor máximo ($I_{\text{Ca}} \text{ max}$) y a continuación decrece con el tiempo debido a la inactivación de los LTCCs ($I_{\text{Ca}} \text{ 500 ms}$).

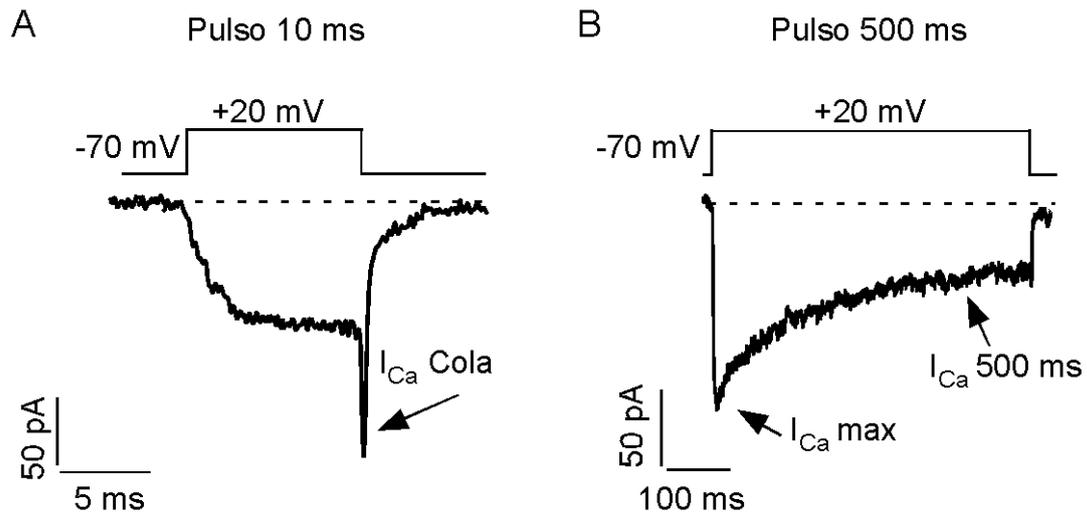


Figura 23: Corrientes de Ca^{2+} generadas en miocitos de arterial basilar. Registros representativos de las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) de miocitos aislados procedentes de arteria basilar de rata cuando se someten a un pulsos despolarizantes desde -70 mV a $+20$ mV durante 10 ms (**A**) o 500 ms (**B**) en condición control. La flecha en (A) señala la I_{Ca} de cola que se genera como consecuencia del alto gradiente electroquímico en el momento de la repolarización. Las flechas en (B) señalan la I_{Ca} debida a la apertura (I_{Ca} max) y a la inactivación (I_{Ca} 500 ms) de los LTCCs.

Para testar el efecto de los inhibidores de los LTCC y RhoA sobre la entrada de Ca^{2+} realizamos la curva corriente-voltaje (I-V) aplicando pulsos 10 ms de duración en presencia o ausencia de los inhibidores (figura 24). Una alta concentración de nifedipina (100 nM, H) reduce considerablemente la corriente de Ca^{2+} (trazo gris oscuro), sin embargo, mientras que la aplicación de una baja concentración de nifedipina (3 nM, L) y fasudil (1 μM) no afecta a la corriente (trazo gris claro). La figura 24B muestra las curvas corriente-voltaje (I-V) para los distintos tratamientos. A todos los potenciales de membrana estudiados, la aplicación de 3 nM nifedipina + 1 μM fasudil (concentraciones incluso superiores al IC_{50} , véanse las figuras 15B y 16B) no afecta a las corrientes de Ca^{2+} , las cuales si son inhibidas cuando la concentración de nifedipina es de 100 nM.

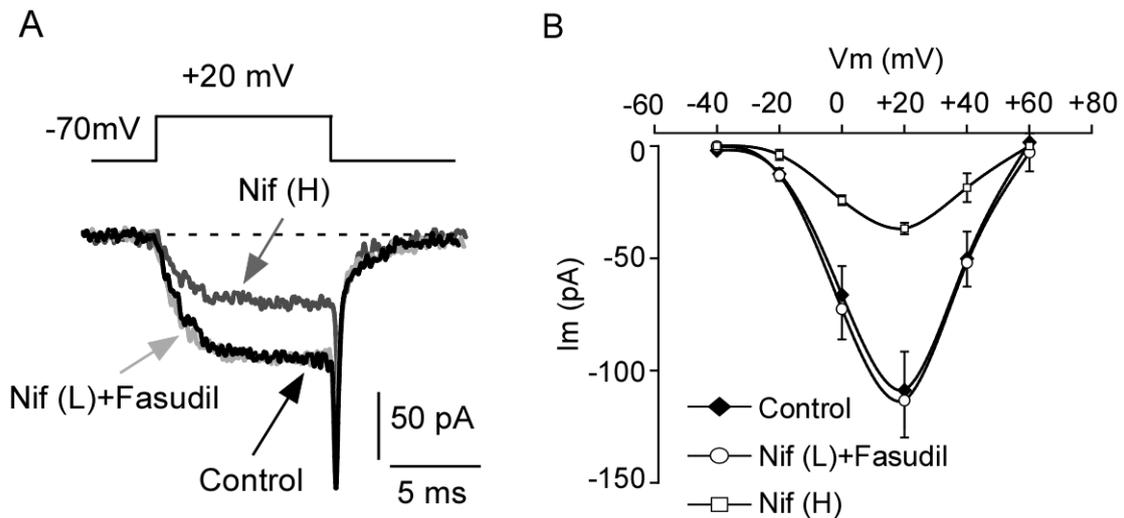


Figura 24: Efecto de la aplicación combinada de bajas dosis de CCBs y fasudil sobre las I_{Ca} inducidas por pulsos despolarizantes cortos en miocitos vasculares. (A) Registros representativos de las corrientes de Ca^{2+} de miocitos aislados procedentes de arteria basilar de rata al ser sometidos a un pulso despolarizante de -70 mV a +20 mV durante 10 ms, en condición control (control, trazo negro), en presencia de bajas dosis de nifedipina (3 nM) y fasudil (1 μ M) (Nif (L) + fasudil, trazo gris claro) y en presencia de una concentración alta de nifedipina (100 nM) (Nif (H), trazo gris oscuro). (B) Curvas I-V de las corriente de Ca^{2+} medidas al final de pulsos despolarizantes en las distintas condiciones experimentales (control, n=8; Nif (L) + fasudil, n=8; Nif (H), n=3). Los datos se representan en valores absolutos.

A continuación se estudió el efecto de este tratamiento cuando se aplica un pulso despolarizante de 500 ms de duración. La figura 25A muestra los registros representativos de I_{Ca} en situación control (trazo negro), en presencia de bajas concentraciones de nifedipina y fasudil (3 nM + 1 μ M, respectivamente) o con altas concentraciones de nifedipina (100 nM). En la figura 25B se muestra el análisis cuantitativo del efecto de los distintos tratamientos. Al igual que ocurría con los pulsos cortos, la aplicación combinada de nifedipina 3 nM + fasudil 1 μ M no tiene efecto sobre las I_{Ca} , mientras que, tanto I_{Ca} max como I_{Ca} 500 ms se inhiben cuando se aplica una dosis alta de nifedipina (100 nM).

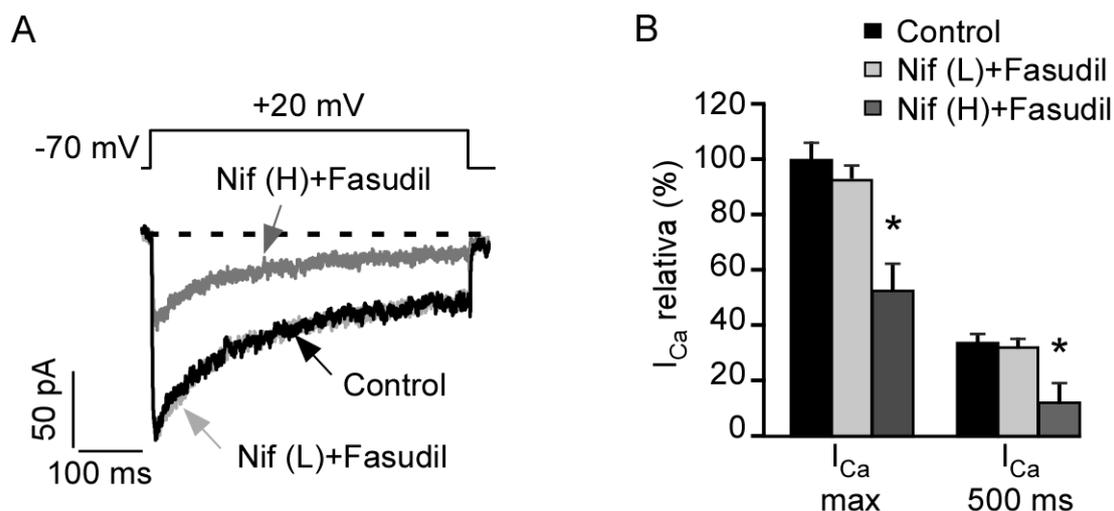


Figura 25: Efecto de la aplicación combinada de bajas dosis de CCBs y fasudil sobre las corrientes de Ca^{2+} inducidas por pulsos depolarizantes de 500 ms en miocitos vasculares. (A) Registros representativos de las corrientes de Ca^{2+} de miocitos aislados procedentes de arteria basilar de rata cuando se someten a un pulso despolarizante desde -70 mV a +20 mV durante 500 ms, en condición control (control, trazo negro), en presencia de bajas dosis de nifedipina (3 nM) y fasudil (1 μ M) (Nif (L) + fasudil, trazo gris claro) y en presencia de una concentración alta de nifedipina (100 nM) (Nif (H), trazo gris oscuro). (B) El diagrama de barras muestra el análisis cuantitativo de la amplitud de la corriente máxima (I_{Ca} max) y la corriente medida al final del pulso (I_{Ca} 500 ms) en situación control (n=11), con bajas dosis de nifedipina (n=7) y en presencia de una concentración alta de nifedipina (100 nM) (n=4). Los valores se han relativizado a la media de la corriente máxima de los controles. * $p < 0,05$ versus control.

Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con bajas concentraciones de nifedipina y fasudil en VSMCs, que ejerce un efecto vasorrelajante selectivo sobre la fase mantenida de la contracción, no afectaría a la contracción inducida por estímulos despolarizantes fisiológicos con duración < 1 s.

2.6. Efecto de los CCBs y el fasudil sobre la actividad eléctrica de miocitos cardíacos aislados.

Dado que los LTCCs también están presentes en músculo cardíaco, se diseñaron experimentos para determinar si un posible tratamiento conjunto de la contracción arterial sostenida con bajas concentraciones de inhibidores de LTCCs y ROCK induce algún efecto secundario indeseado sobre las propiedades eléctricas y contráctiles de los miocitos cardíacos. Mediante la técnica de “patch-clamp”, utilizando el método de fijación de corriente, se registró en cardiomiocitos la actividad eléctrica en presencia de

los distintos tratamientos (Figura 26). La aplicación simultánea de bajas concentraciones de los inhibidores no modifica ni la amplitud ni la duración de los potenciales de acción evocados. Sin embargo, estos parámetros disminuyen drásticamente cuando aumenta la concentración de los CCBs.

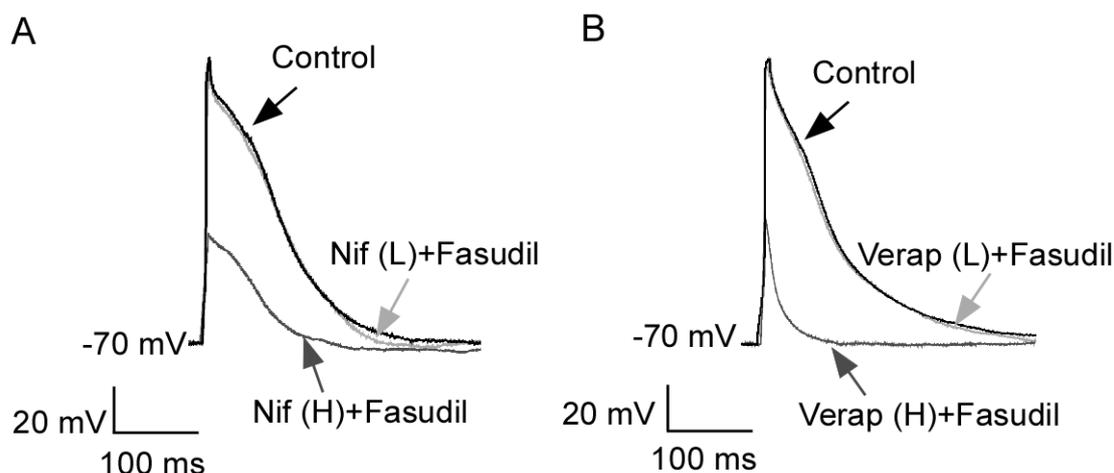


Figura 26: Efecto de la aplicación combinada de bajas dosis de CCBs y fasudil sobre los potenciales de acción en cardiomiocitos neonatales de rata aislados. (A) Registros representativos de potenciales de acción de cardiomiocitos neonatales de rata en condición control (control, trazo negro), en presencia de bajas dosis de nifedipina (3 nM) + fasudil (1 μ M) (Nif (L) + fasudil, trazo gris claro, n=5) y en presencia de una concentración alta de nifedipina (100 nM) + fasudil (1 μ M) (Nif (H) + fasudil, trazo gris oscuro, n=5). (B) Registros representativos de potenciales de acción de cardiomiocitos neonatales de rata en condición control (control, trazo negro), en presencia de bajas dosis de verapamil (5 nM) + fasudil (1 μ M) (Verap (L) + fasudil, trazo gris claro, n=4) y en presencia de una concentración alta de verapamil (500 nM) + fasudil (1 μ M) (Verap (H) + fasudil, trazo gris oscuro, n=3).

Estos experimentos de registro de potenciales de acción en cardiomiocitos neonatales de rata, fueron llevados a cabo por la Dra. Patricia González Rodríguez, miembro del grupo del Dr. José López Barneo.

2.7. Efecto de los CCBs y el fasudil sobre la contractilidad en corazones aislados.

Con el fin de determinar si este tratamiento combinado con bajas dosis de CCBs e inhibidores de ROCK podría tener efectos secundarios inespecíficos sobre la contracción del músculo cardíaco, se diseñaron experimentos en corazones de rata aislados en el sistema Langendorff. Estos experimentos fueron llevados a cabo por la Dra. Eva Calderón Sánchez en el laboratorio de Investigación Cardiovascular liderado por el Dr. Antonio Ordoñez Fernández.

La figura 27 muestra el registro funcional de la presión del ventrículo izquierdo (“Left ventricular pressure”, L.V.P.) y de la contractilidad (dP/dt) de corazones de rata aislados en situación control (izda), sometidos a concentraciones bajas de los inhibidores (centro), o cuando se les aplican dosis altas del CCBs (dcha). En este caso se utilizó verapamil, ya que es el que presenta una mayor afinidad por los LTCCs presentes en el músculo cardíaco. Se puede observar la ausencia de efecto del tratamiento combinado con bajas dosis de CCBs (L), mientras que concentraciones más altas (H) afectaron significativamente la contractilidad del corazón.

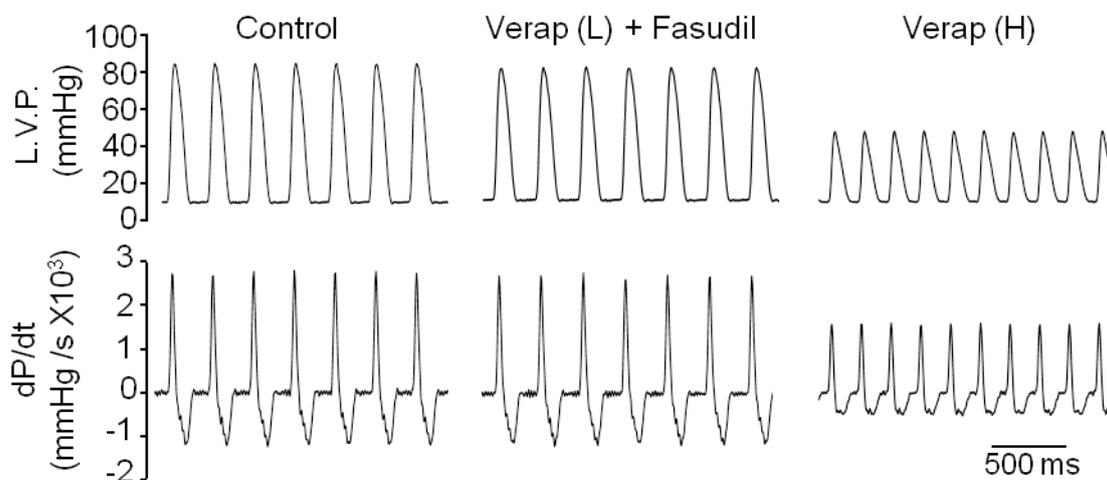


Figura 27: Efecto de la aplicación combinada de CCBs y fasudil sobre la contractilidad cardíaca. Registro representativo de la presión del ventrículo izquierdo (L.V.P) y de la contractilidad (dP/dt) de corazones de rata perfundidos en un sistema Langendoff, cuando se registran en (**izda**) situación control (dP/dt = $100 \pm 7,2\%$; n= 3), (**centro**) bajas dosis de verapamil (5 nM) + fasudil (1 μ M) (verap (L) + fasudil, dP/dt = $85 \pm 7,7\%$; n= 3; p<0,05) o (**dcha**) cuando se aplica una dosis alta de verapamil (500 nM) (verap (H), dP/dt $63,2 \pm 7,2\%$; n= 4; p<0,05).

Estos resultados indican que el tratamiento combinado con inhibidores de los LTCCs y ROCK, en el rango de concentración en el que son capaces de inhibir selectivamente la fase mantenida de la contracción en VSMCs, no tendría efectos sobre la actividad eléctrica y la contractilidad de los miocitos cardíacos.

2.8. Efecto del uso combinado de los CCBs y el fasudil sobre arterias humanas aisladas.

Nuestro laboratorio se encuentra ubicado dentro del recinto del Hospital Universitario Virgen del Rocío (H.U.V.R.). Esta localización y la colaboración con la Unidad de Coordinación de Trasplantes y la Unidad de Cirugía Cardíaca del H.U.V.R. nos permitió obtener muestras de arterias humanas y evaluar si el tratamiento combinado de los inhibidores de LTCCs y ROCK podría ser efectivo en tejido vascular humano. Para ello, diseñamos experimentos de registro de fuerza isométrica con anillos de arterias carótida y coronaria humanas.

La figura 28 muestra que, al igual que ocurre en arteria basilar de rata, la aplicación de 30K induce una contracción con dos fases, una inicial rápida seguida de otra sostenida. La aplicación de fasudil desplaza la curva de relajación en respuesta a dosis acumuladas de nifedipina durante la fase mantenida de la contracción en arteria carótida (figura 28A-C) y coronaria (figura 28D). El efecto fue significativamente mayor a concentraciones de nifedipina \leq de 10 nM en el caso de la arteria carótida (0,25 μ M fasudil), y \leq de 3 nM en el caso de la coronaria (1 μ M fasudil). Obsérvese que la IC_{50} de la nifedipina es similar en los tres tipos de arterias estudiadas, $IC_{50} = 2,56$ nM en arteria basilar de rata, $IC_{50} = 2,21$ nM, en carótida humana y $IC_{50} = 2,85$ nM, en arteria coronaria humana (ver figuras 15D, 26C y D).

Aunque son necesarios más experimentos para estudiar con detalle el impacto del tratamiento combinado de inhibidores de ROCK y CCBs, estos datos nos muestran que con el uso de menores concentraciones de ambos inhibidores de manera conjunta, se consigue una relajación más efectiva y más específica que cuando se aplican por separado, lo que podría mejorar los tratamientos en ciertas patologías vasculares a la vez que disminuyen los efectos secundarios indeseados.

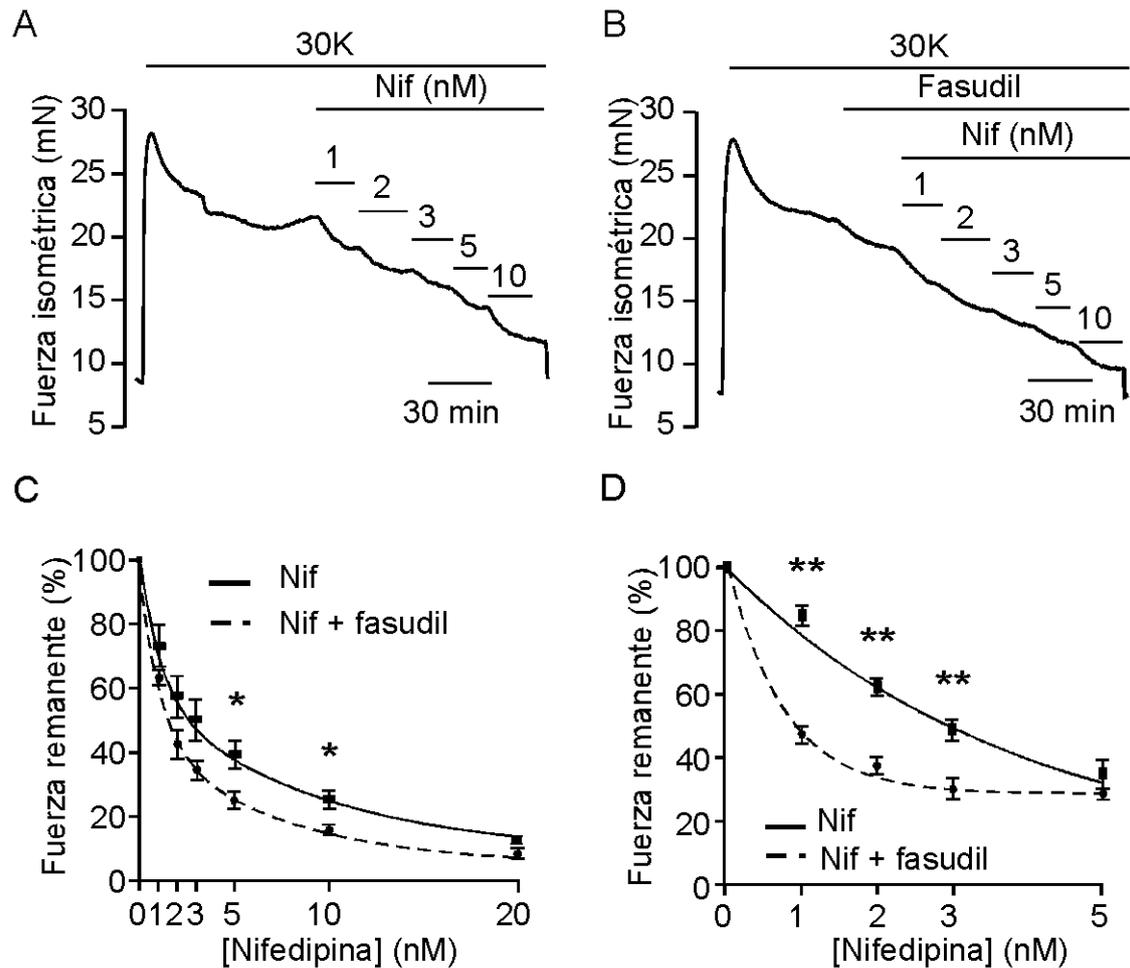


Figura 28: Efecto de la presencia de fasudil sobre la curva de relajación de la nifedipina en arterias humanas. (A, y B) Registros representativos de la relajación producida por dosis acumuladas de nifedipina sobre la contracción mantenida inducida por 30K en arteria carótida humana, en ausencia o presencia de 0,25 μ M fasudil, respectivamente. (C) Curva dosis-respuesta del efecto vasorrelajante acumulado de la nifedipina, aplicada individualmente ($IC_{50} = 2,21$ nM, $n=6$), o en presencia de una baja concentración de fasudil (0,25 μ M) ($IC_{50} = 1,5$ nM, $n=7$), sobre la fase mantenida de la contracción en arteria carótida humana. (D) Curva dosis-respuesta del efecto vasorrelajante acumulado de la nifedipina, aplicada individualmente ($IC_{50} = 2,85$ nM, $n=5$), o en presencia de una baja concentración de fasudil (1 μ M) ($IC_{50} = 0,84$ nM, $n=3$), sobre la fase mantenida de la contracción en arteria coronaria humana. Los valores se muestran relativizados respecto a la fuerza máxima de cada anillo antes de aplicar fasudil. * $p<0,05$ y ** $p<0,01$.

3. $[Ca^{2+}]_e$ extracelular, actividad de RhoA/ROCK y mantenimiento de la contracción.

Aunque durante un pulso despolarizante de larga duración, los LTCCs pasan mayoritariamente a un estado inactivado, un flujo de Ca^{2+} reducido sería suficiente para que la ruta RhoA/ROCK siguiera activa, ejerciendo su inhibición sobre la MLCP y, por tanto, manteniendo la contracción. Aunque este proceso ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la $[Ca^{2+}]_e$ es de $\sim 1,6$ mM, no se conoce la sensibilidad de RhoA/ROCK al Ca^{2+} . En este apartado queremos determinar la sensibilidad de este mecanismo a la $[Ca^{2+}]_e$, y para ello hemos realizado experimentos en los que disminuimos drásticamente la $[Ca^{2+}]_e$ (~ 7 μ M).

La arteria basilar de rata presenta una reducida cantidad de tejido insuficiente para llevar a cabo la medida de actividad de RhoA, uno de los principales objetivos de este estudio. Para solventar este problema, hemos realizado estos experimentos en arteria femoral de rata que presenta una curva dosis-respuesta de la contracción inducida por distintas $[K^+]_e$ similar a la que presenta la arteria basilar (figura 12).

3.1. Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la contracción inducida por despolarización en arteria femoral de rata.

Previamente, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la despolarización provoca una contracción arterial que se mantiene durante todo el tiempo que dura el estímulo, incluso durante horas (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2012). Para determinar el papel de la $[Ca^{2+}]_e$ en esta contracción mantenida, realizamos el experimento mostrado en la figura 29.

Durante un estímulo despolarizante de larga duración (90 min) en presencia de concentraciones fisiológicas de $[Ca^{2+}]_e$ (2,5 mM), se genera una contracción que se mantiene a lo largo del tiempo (figura 29A y D). Si durante esta fase cambiamos a una solución sin Ca^{2+} añadido y con 1 mM de EGTA ($[Ca^{2+}]_e \sim 100$ nM, (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011), la contracción cesa completamente a los 10 min del cambio de solución aunque el estímulo despolarizante (70K) continúe presente (figura 29B y D). Sin embargo, si aplicamos una solución a la que no se le ha añadido Ca^{2+} ni EGTA, es decir, con Ca^{2+} contaminante ($[Ca^{2+}]_e \sim 7$ μ M (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011), aunque se

inicialmente se produce una disminución de la fuerza de contracción, ésta se mantiene e incluso tiende a aumentar si el estímulo continúa (figura 29C y D).

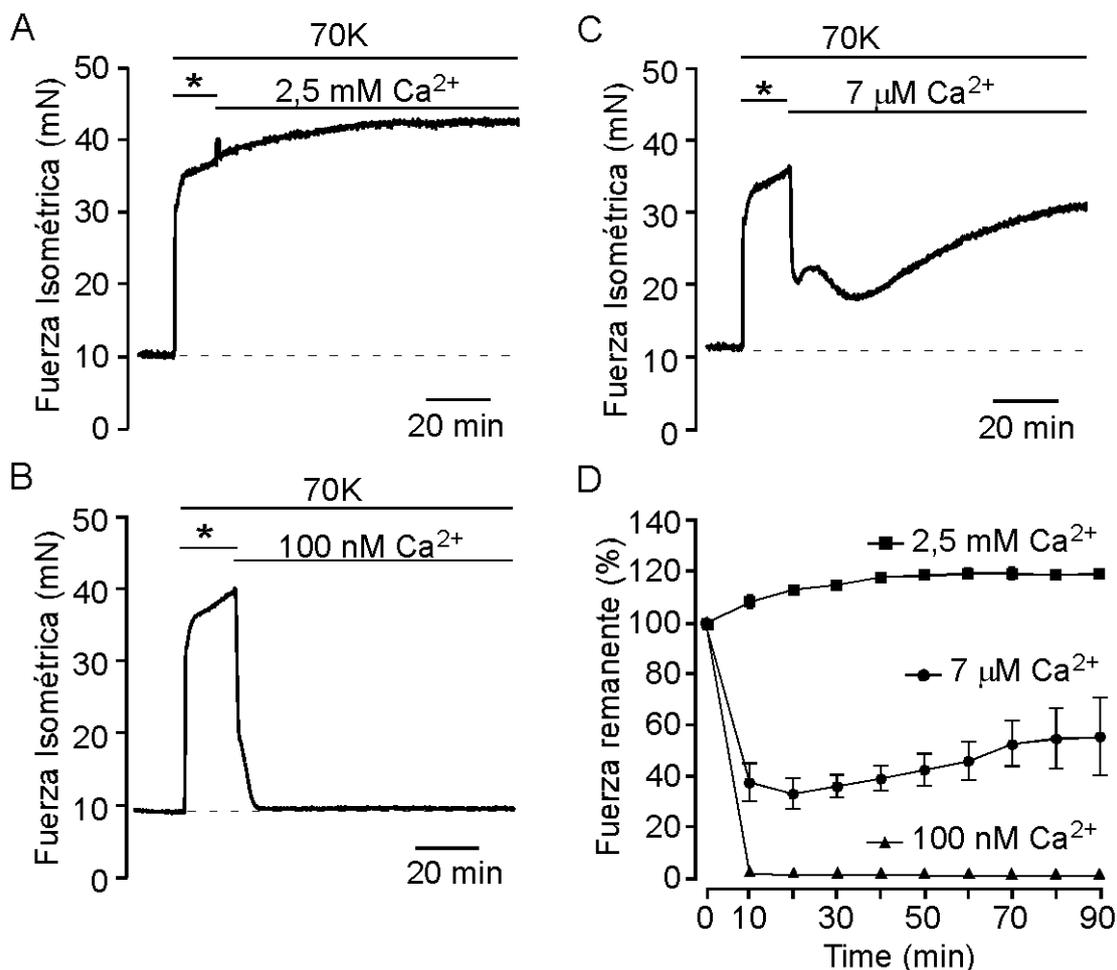


Figura 29: Efecto de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ durante la contracción mantenida inducida por despolarización en arteria femoral de rata. (A-C) Registros representativos de la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (A, 2,5 mM ; B, 100 nM; C, 7 μM). * Indica 2,5 mM Ca^{2+} en la solución extracelular. (D) Análisis cuantitativo de los datos (2,5 mM Ca^{2+} , n= 4; 7 μM Ca^{2+} , n= 3-4; 100 nM Ca^{2+} , n= 4). Los valores se muestran relativizados respecto a la fuerza máxima de cada anillo antes de aplicar las soluciones despolarizantes con distinta $[\text{Ca}^{2+}]_e$.

A continuación, quisimos comprobar si este efecto se producía cuando preincubábamos los anillos arteriales en las soluciones con distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ antes de aplicar el estímulo despolarizante. Para asegurarnos de lavar bien las cámaras donde se encuentran los anillos se realizaron tres tandas de dos lavados consecutivos completos de las mismas con la solución de interés (2,5 mM Ca^{2+} , 7 μM Ca^{2+} o 100 nM Ca^{2+}). Entre cada tanda se dejaba transcurrir un minuto para que el posible Ca^{2+} intersticial fuera eliminado, y una vez transcurrido un minuto desde el último lavado se aplicaba la

solución de alto K^+ (figura 30). La contracción inducida por un estímulo despolarizante de larga duración en presencia de $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ va inicialmente aumentando a lo largo del tiempo, manteniéndose hasta el final del estímulo (figura 30A y D). Sin embargo los anillos arteriales tratados con 100 nM Ca^{2+} generaron una contracción rápida y transitoria que disminuye hasta el nivel basal a los 10 min de la aplicación (figura 30B y C). De manera interesante, al aplicar el estímulo despolarizante en presencia de una $[\text{Ca}^{2+}]_e$ muy baja (Ca^{2+} contaminante, $\sim 7 \mu\text{M}$), la contracción generada presenta una fase inicial rápida y transitoria que decae un 54% a los 30 min y, posteriormente, una aumenta lentamente, llegando a alcanzar prácticamente el mismo nivel inicial de contracción a los 90 min de la aplicación del estímulo (figura 30C y D).

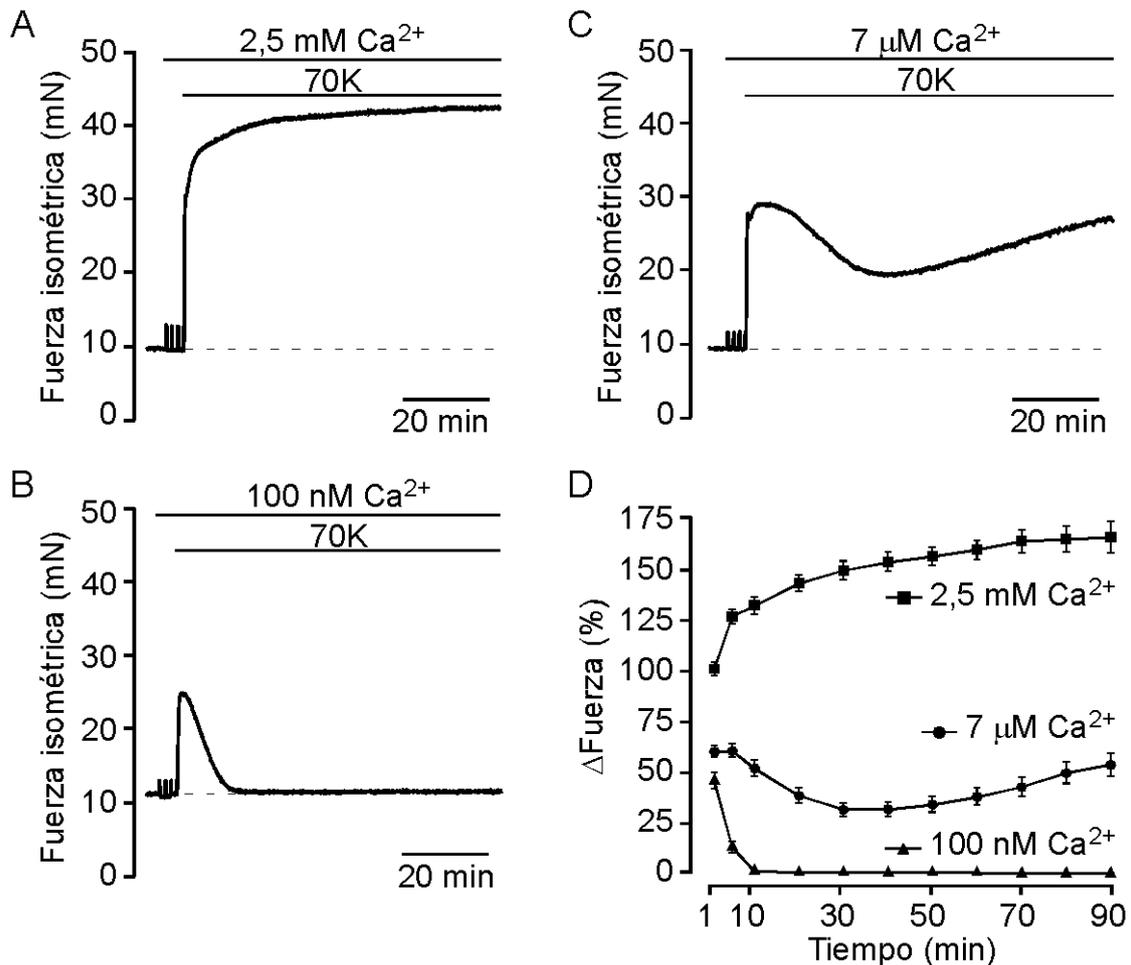


Figura 30: Curso temporal y dependencia del Ca^{2+} extracelular en la contracción inducida por despolarizaciones de larga duración. (A, B y C) Registros representativos del efecto de la contracción inducida por 70K en presencia de distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en anillos de arteria femoral de rata (A, $2,5 \text{ mM}$; B, 100 nM ; C, $7 \mu\text{M}$). (D) Análisis cuantitativo de los datos ($2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ n = 18-31; $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ n = 32-34; 100 nM Ca^{2+} n = 14). Los datos se muestran normalizados respecto a la fuerza media generada al minuto de aplicar la solución despolarizante en presencia de $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$.

Estos datos indican que la contracción generada por un estímulo despolarizante de larga duración (90 min), superior a la que normalmente se utiliza (10-20 min), genera una contracción a través de un mecanismo que es regulado por muy bajos niveles de Ca^{2+} .

3.2. Cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la despolarización, dependencia del Ca^{2+} extracelular.

Con el fin de estudiar el papel del Ca^{2+} en la fuerza generada por los anillos, se midieron los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en miocitos aislados de arteria femoral de rata obtenidos tras tratamiento enzimático. La aplicación de la solución despolarizante 70K en presencia de 2,5 mM Ca^{2+} provoca la respuesta típica con un incremento rápido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que decrece posteriormente hasta un nivel en el que se mantiene constante mientras el estímulo despolarizante está presente (figura 31A). Si durante esta fase disminuimos drásticamente la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye hasta niveles basales aunque el estímulo siga presente, y lo hace con una cinética similar, incluso más rápida, a la que se observa cuando se termina el estímulo en situación control, con una $[\text{K}^+]_e$ de 3 mM (3K 2,5 mM Ca^{2+}) (figura 31B).

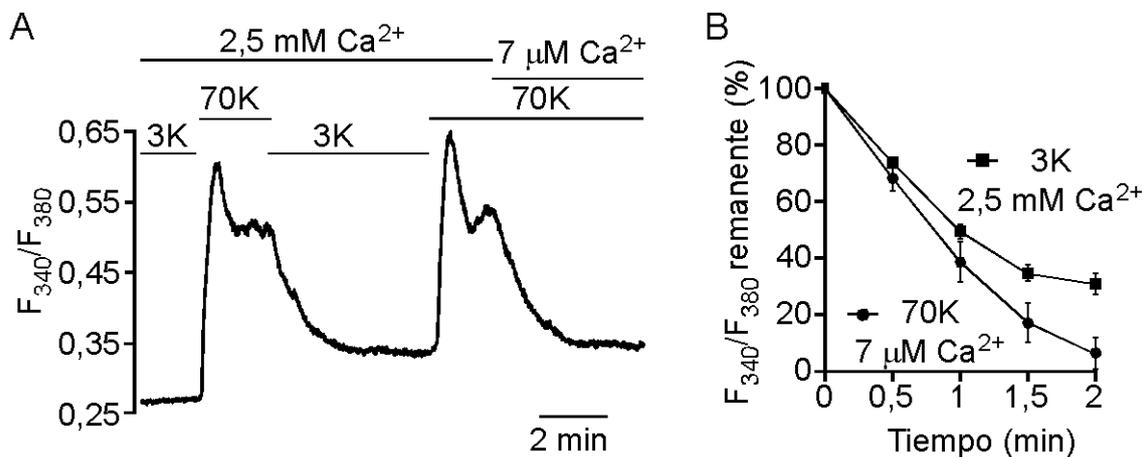


Figura 31: Efecto de la disminución del $[\text{Ca}^{2+}]_e$ durante los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por 70K en miocitos arteriales aislados. (A) Registro representativo de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (representado como F_{340}/F_{380}), inducidos por 70K en presencia de 2,5 mM Ca^{2+} , y efecto de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en esta respuesta. **(B)** Curso temporal de los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la aplicación de una solución control (3 K 2,5 mM Ca^{2+} ; n= 10 células) o una solución despolarizante con baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (70K 7 μM Ca^{2+} ; n= 10 células) en células previamente estimuladas con solución 70K 2,5 mM Ca^{2+} . Los datos se muestran relativizados respecto a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ antes de aplicar la solución control o 70K 7 μM Ca^{2+} en cada célula.

Estos experimentos nos indican que durante la contracción mantenida en presencia de muy baja $[Ca^{2+}]_e$ (7 μM) el Ca^{2+} intracelular disminuye hasta niveles basales. Sin embargo, hemos observado que este nivel de $[Ca^{2+}]_i$ es capaz de mantener de la contracción (ver figura 30C), ya que en presencia de un quelante de Ca^{2+} como es el EGTA, no se genera una contracción mantenida (ver figura 30B).

3.4. Papel del endotelio en contracción inducida por la despolarización en presencia de 7 μM Ca^{2+} extracelular.

Se sabe que el endotelio juega un papel muy importante en la regulación de la contracción del músculo liso, produciendo sustancias tanto vasoconstrictoras (como tromboxano, prostaglandinas, endotelina-I, angiotensina II) como vasodilatadoras (Oxido Nítrico (NO), Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (EDHF) y prostaciclina). Para descartar que la fuerza generada en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$ se deba a la interacción de alguna de estas sustancias producidas por el endotelio sobre las células del músculo liso, diseñamos experimentos en los que se eliminó mecánicamente el endotelio de los anillos arteriales.

En la figura 32A se muestra un registro representativo de la respuesta a la solución despolarizante en ausencia de endotelio cuando las $[Ca^{2+}]_e$ en el medio extracelular es baja (7 μM). La contracción inducida por la solución despolarizante con 7 μM Ca^{2+} no se vio afectada significativamente por la ausencia de endotelio (figura 32B). La pérdida del efecto vasorelajante inducido por acetilcolina (ACh) en la contracción inducida por endotelina-I (ET-I) se utilizó como control para indicar la ausencia de endotelio funcional en esos (figura 32C). Estos resultados sugieren que la contracción observada con la despolarización durante 90 min en presencia de 7 μM Ca^{2+} es resultado de un mecanismo independiente del endotelio, regulado por las propias células musculares lisas.

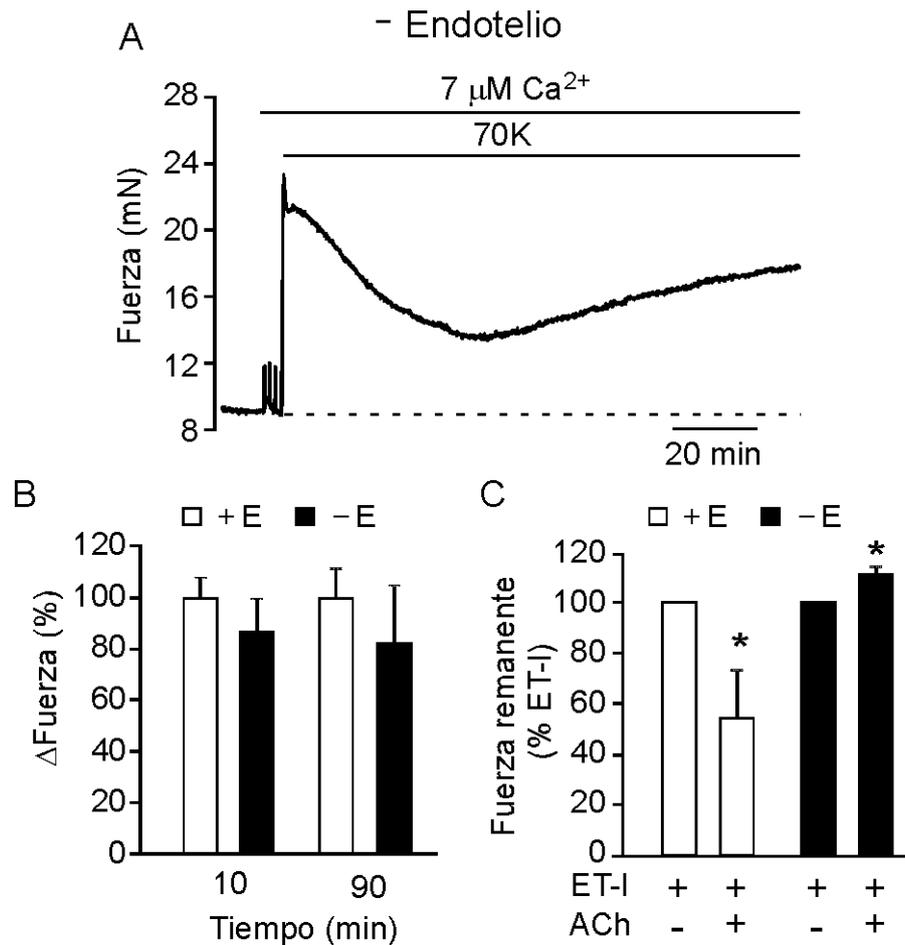


Figura 32: Papel del endotelio en la contracción inducida por 70K en presencia de bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. (A) Registro representativo de la contracción generada por 70K en anillos de arteria femoral de rata sin endotelio funcional en anillos bañados con 7 μM Ca^{2+} externo. (B) Análisis cuantitativo de la respuesta generada a los 10 y 90 min de exposición a 70K 7 μM Ca^{2+} en anillos con endotelio (+E; $n = 44$ y $n = 32$, respectivamente) y sin endotelio funcional (-E; $n = 12$ y $n = 6$, respectivamente). Los valores se muestran normalizados respecto a la fuerza generada a los 10 min en anillos con endotelio funcional. No se encontraron diferencias significativas (*U* de Mann-Whitney test $p > 0.2$). (C) El diagrama representa el efecto de la acetilcolina (ACh) en la contracción generada por endotelina-I (ET-I) en anillos con endotelio funcional (+E; $n = 9$ anillos) y en anillos sometidos a daño mecánico del endotelio (-E; $n = 6$ anillos). Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza generada por ET-I en cada anillo antes de la aplicación de ACh. * $p < 0.05$ versus ET-I en cada condición.

3.5. Participación de RhoA/ROCK en el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ extracelular.

Una vez que se ha descartado la influencia del endotelio en la contracción inducida en bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$, queremos estudiar si esta contracción está generada por la puesta en marcha de los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} , ya que estos mecanismos pueden inducir contracción de manera independiente a los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Para comprobar si ROCK está participando en la contracción mantenida en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$, aplicamos concentraciones crecientes de fasudil. En la figura 33A se muestra un registro representativo del efecto del fasudil sobre la fase mantenida de la contracción inducida por despolarización en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$. La figura 33B muestra la cuantificación de la relajación inducida por fasudil en condiciones fisiológicas ($2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$) y en $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$. En presencia de baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ el IC_{50} de fasudil es de $1,5 \mu\text{M}$, mientras que cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es de $2,5 \text{ mM}$ el IC_{50} es de $4,7 \mu\text{M}$.

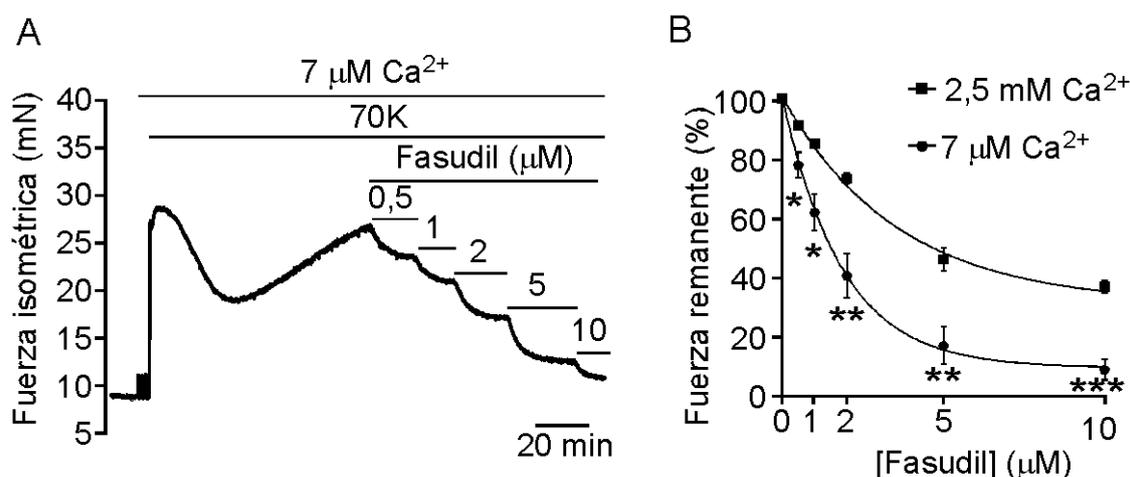


Figura 33: Implicación de ROCK en la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. (A) Registro representativo del efecto del fasudil sobre la fase mantenida de la contracción inducida por despolarización en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ en un anillo de arteria femoral de rata. (B) Curvas dosis-respuesta del efecto vasorrelajante del fasudil en la contracción inducida por 70K en presencia de $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ (IC_{50} $4,7 \mu\text{M}$, $n=4$ anillos), y en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (IC_{50} $1,5 \mu\text{M}$, $n=5$ anillos). Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar fasudil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Estos resultados nos sugieren que ROCK está participando en la contracción inducida por despolarización en presencia de muy bajas $[Ca^{2+}]_e$. Ya que ROCK es el principal efector de RhoA, comprobamos si esta proteína está implicada también en este proceso. Para ello, los anillos se congelaron en nitrógeno líquido a los 90 min de tratamiento con la solución despolarizante con el fin de medir la actividad de RhoA.

La figura 34A muestra la actividad de RhoA tras 90 min de despolarización en presencia de 2,5 mM, 7 μ M y 100 nM Ca^{2+} . Como control se analizaron anillos incubados en solución fisiológica (2,5 mM Ca^{2+} y bajo K^+). Como era de esperar, la aplicación de la solución despolarizante durante 90 min en presencia de 2,5 mM Ca^{2+} generó un aumento de la actividad de RhoA de un $(66 \pm 0,09 \%)$, el cual se corresponde con un aumento de la fuerza isométrica (figura 34B). En presencia de 100 nM Ca^{2+} , la solución despolarizante induce un pequeño aumento de actividad de RhoA $(8 \pm 0,02\%)$, que no es suficiente para generar contracción. De manera interesante, en presencia de Ca^{2+} contaminante (7 μ M) se induce un incremento de la actividad de RhoA de un $22 \pm 0,03\%$, suficiente para generar fuerza.

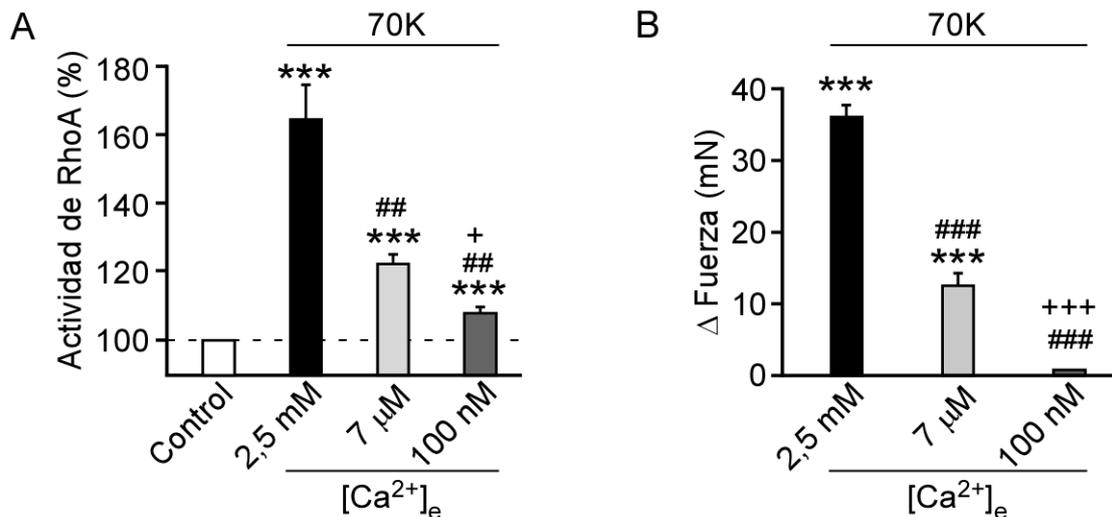


Figura 34: Implicación de RhoA en la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$. (A) El diagrama representa la actividad de RhoA en anillos arteriales tratados durante 90 min con 70K en presencia de 2,5 mM (n= 17), 7 μ M (n= 11) y 100 nM Ca^{2+} (n= 3). Los valores se representan como la actividad de RhoA relativizada respecto a la actividad presente en la condición basal (control) en cada ensayo bioquímico. (B) El diagrama representa la contracción media inducida por 70K en anillos arteriales contraídos durante 90 min con 70K en presencia de 2,5 mM (n= 18), 7 μ M (n= 32 anillos) y 100 nM Ca^{2+} (n= 14 anillos). Los datos se representan en valores absolutos.

Dado que la contracción inducida por la despolarización en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ presenta una dinámica con una fase inicial de contracción rápida y transitoria que va decayendo lentamente en el tiempo hasta una segunda fase donde se estabiliza (~ 30 min), y posteriormente comienza a aumentar (ver figura 30C y D), quisimos estudiar el curso temporal de la actividad de RhoA durante este proceso. Para ello se midió la actividad de RhoA a los 30 y 90 min tras la aplicación de la solución despolarizante en presencia de $2,5 \text{ mM}$ o $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (figura 35A y B). En presencia de $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ no se detecta un aumento significativo la actividad de RhoA respecto al tiempo de al estímulo despolarizante aunque si se observa un pequeño aumento ($\sim 10\%$) de la fuerza desarrollada. En presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ la actividad de RhoA aumenta significativamente y este incremento se acompaña de un mayor aumento ($\sim 40\%$) de la fuerza desarrollada.

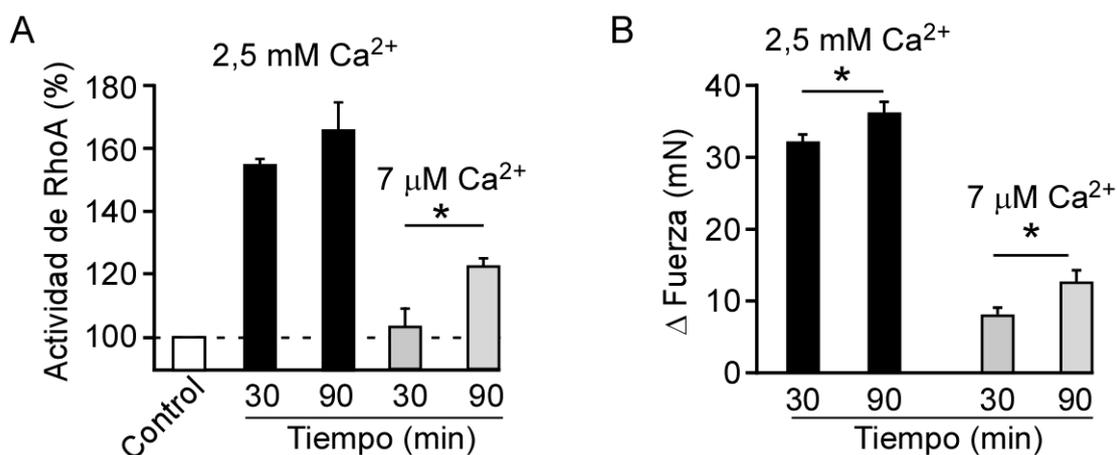


Figura 35: Curso temporal de la activación de RhoA durante la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. (A) El diagrama representa la actividad de RhoA en anillos arteriales tratados durante 30 y 90 min con 70K en presencia de $2,5 \text{ mM}$ ($n = 3$ y $n = 17$, respectivamente) y $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($n = 4$ y $n = 11$, respectivamente). Los valores se representan como la actividad de RhoA relativizada respecto a la actividad presente en la condición control en cada ensayo bioquímico. (B) El diagrama representa incremento de contracción inducida por 70K en anillos arteriales tratados durante 30 y 90 min con 70K en presencia de $2,5 \text{ mM}$ ($n = 31$ y $n = 18$ anillos, respectivamente) y $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($n = 44$ y $n = 32$ anillos, respectivamente). Los datos se representan en valores absolutos.

Los resultados obtenidos indican que la ruta RhoA/ROCK está participando en la contracción inducida por despolarizaciones mantenidas en presencia de bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$, y que la actividad de RhoA es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$.

3.6. Activación de RhoA/ROCK por Ca^{2+} .

En los experimentos previos en anillos arteriales se aplica, durante un largo periodo de tiempo (90 min), una solución despolarizante con muy baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (7 μM). En estas condiciones, la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs está altamente comprometida y por lo tanto RhoA estaría siendo activada por niveles de Ca^{2+} muy bajos. Con objeto de determinar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se requiere para activar RhoA y la contracción arterial, se realizaron experimentos en arterias permeabilizadas con β -escina, una saponina que permeabiliza la membrana celular a la vez que preserva la señalización celular de receptores acoplados a proteína G. De esta forma, se tiene control de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, ya que el ion entrará a favor de gradiente químico al interior celular a través de los poros creados por la β -escina, y se igualarán las concentraciones dentro y fuera de la célula, permitiendo así la contracción asociada a los mecanismos de sensibilización.

En la figura 36A se muestra un registro representativo de la contracción inducida por cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en anillos permeabilizados con β -escina (trazo gris). En ausencia de β -escina (trazo negro), el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ no induce contracción, ya que el Ca^{2+} no puede entrar al interior celular. En la figura 36B se muestra la cuantificación de la contracción generada con las distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. La contracción está relacionada directamente con la $[\text{Ca}^{2+}]$ y se pone de manifiesto para niveles de Ca^{2+} muy bajos.

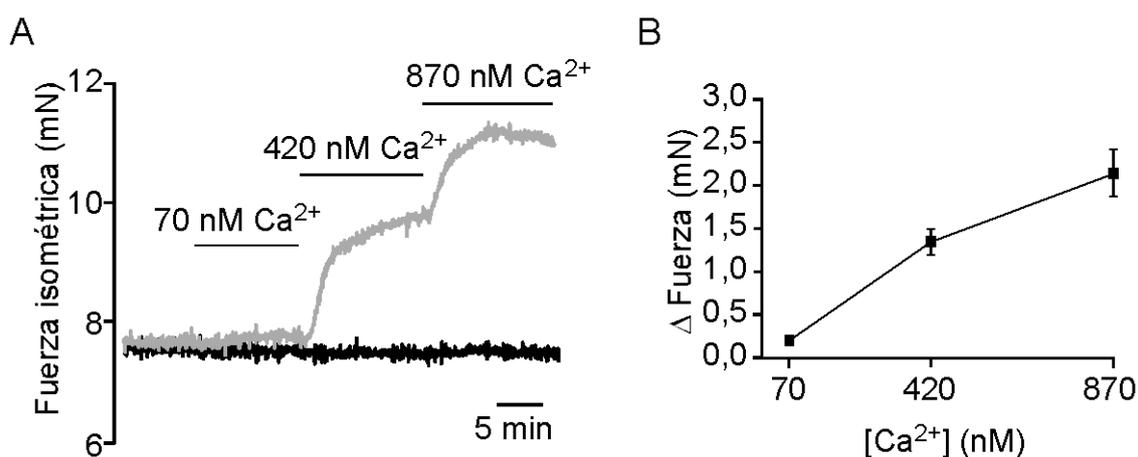


Figura 36: Curva de contracción inducida por Ca^{2+} en anillos permeabilizados con β -escina. (A) Registro representativo del efecto del Ca^{2+} en un anillo de arteria femoral de rata intacto (trazo negro) o permeabilizado con β -escina (trazo gris). (B) Curva dosis-respuesta del efecto vasocontráctil del Ca^{2+} en anillos permeabilizados con β -escina (n= 9 anillos). Los datos se representan en valores absolutos.

Para comprobar si en esa contracción está implicada la ruta RhoA/ROCK, se aplicó fasudil para inhibir ROCK. En la figura 37A se muestra el curso temporal de la contracción inducida por aumento de la $[Ca^{2+}]_e$ y el efecto del inhibidor de ROCK en dicha contracción (trazo gris). Como se puede observar, el fasudil reduce la contracción generada por aumento de $[Ca^{2+}]_e$ en anillos permeabilizados con β -escina (figura 37B).

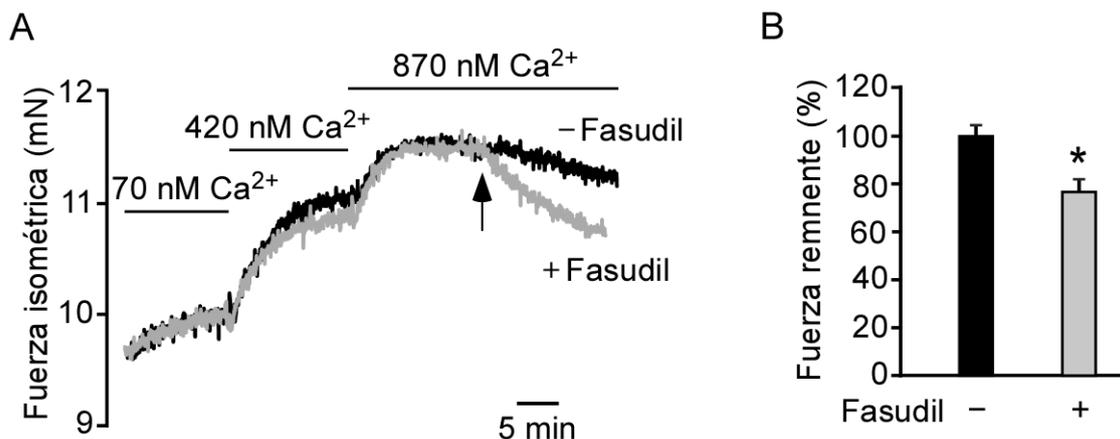


Figura 37: Efecto del fasudil en la contracción inducida por Ca^{2+} en anillos permeabilizados con β -escina. (A) Registro representativo de la contracción inducida por Ca^{2+} en anillos de arteria femoral de rata permeabilizados con β -escina y el efecto del fasudil (5 μ M) en dicha contracción (trazo gris, la flecha indica el momento de aplicación de fasudil). (B) Análisis estadístico de la contracción inducida por Ca^{2+} en ausencia (n= 4), o presencia de fasudil (n= 4 anillos). Los valores se representan normalizados respecto a la media de la fuerza en ausencia de inhibidor.

Estos resultados nos indican que una $[Ca^{2+}]_e$ inferior a 1 μ M, es suficiente para activar la ruta RhoA/ROCK.

3.7. Participación de los LTCCs en el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización en presencia de 2,5 mM Ca^{2+} .

Dado que RhoA/ROCK se puede activar por un nivel muy bajo de Ca^{2+} citosólico, estudiamos si en los experimentos donde se mantiene la despolarización, la débil entrada de Ca^{2+} al interior celular se lleva a cabo a través de los LTCCs.

Debido a que en este caso estamos utilizando la arteria femoral, primeramente caracterizamos el efecto de la nifedipina (un CCB) sobre la contracción inducida por 70K en este tipo arterial en condiciones control (2,5 mM $[Ca^{2+}]_e$). La figura 38 muestra el registro representativo (figura 38A) y el análisis estadístico (figura 38B) del efecto de

la aplicación de nifedipina en las distintas fases de la contracción inducida por despolarización en arteria femoral de rata. Al igual que ocurría en arteria basilar, la nifedipina presenta un mayor efecto inhibitorio en la fase tónica de la contracción. Al aplicar 10 nM no se afecta la fase transitoria de la contracción, sin embargo se reduce la fase tónica un 40%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente cuando se aplicaba una solución de 70K a anillos de arteria basilar de rata (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011).

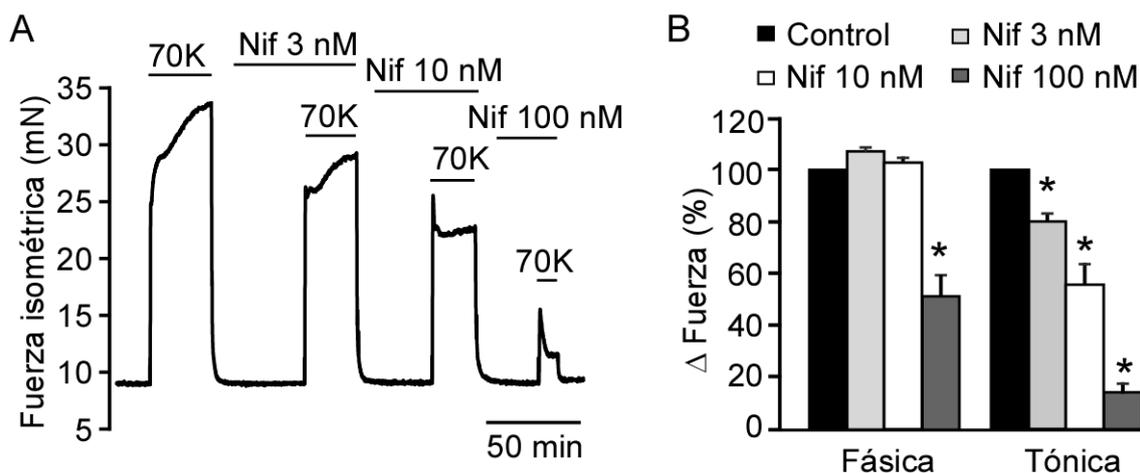


Figura 38: Efecto de la nifedipina sobre las distintas fases de la contracción inducida por 30K en arteria femoral de rata. (A) Registro representativo de la fuerza generada por la solución 70K en un anillo de arteria femoral de rata en presencia de distintas concentraciones de nifedipina. (B) Análisis cuantitativo del incremento de fuerza isométrica en las dos fases de la contracción inducido por 70K en ausencia (control) o presencia de 3 nM, 10 nM y 100 nM de nifedipina (n=3). Los valores se representan normalizados respecto a la condición control en cada fase. * $p < 0,05$ versus control.

A continuación, quisimos comprobar el efecto de la nifedipina a distintas concentraciones cuando se aplica en la fase mantenida de la contracción durante periodos de tiempo largos en presencia de 2,5 mM $[Ca^{2+}]_e$. La figura 39A, B y D muestra como la aplicación de 20 nM y 5 nM de nifedipina durante 90 min produce un gran efecto vasorrelajante y casi permanente en anillos precontraídos con 70K. Llama la atención que, de forma similar al efecto de la solución de 7 μ M Ca^{2+} , la aplicación de 3 nM de nifedipina provoca una relajación transitoria, alcanzando la máxima relajación (un 50%) a los 20 minutos y volviendo a aumentar (un 20%) a los 90 minutos de tratamiento (Figura 39C y D).

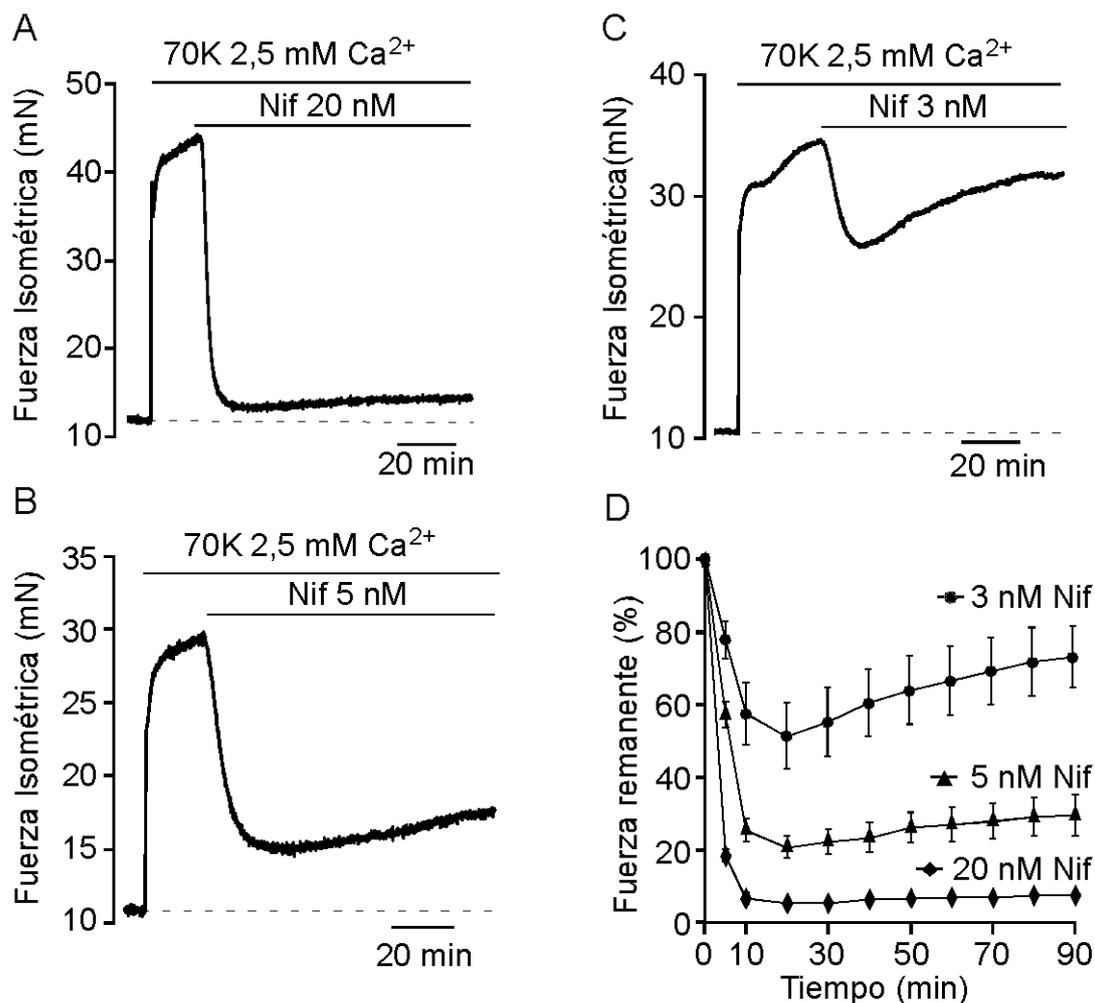


Figura 39: Efecto de la nifedipina en la contracción mantenida inducida por despolarización de larga duración en arteria femoral de rata. (A-C) Registros representativos del efecto de 20 nM (A) 5 nM (B) y 3 nM (C) nifedipina en la contracción mantenida inducida por despolarización de larga duración. **(D)** Análisis cuantitativo de los datos (3 nM, n=5; 5 nM, n=6; 20 nM, n=3). Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar nifedipina.

Estos efectos vasorrelajantes de la nifedipina no se han descrito en la literatura dado que la duración de los estímulos despolarizantes descritos en la bibliografía es normalmente de 10-20 min. Para apreciar el efecto de "rebote" que produce la aplicación de bajas concentraciones de nifedipina es necesario aplicar despolarizaciones duraderas (figura 39C y D). Estos resultados sugieren que el efecto de la nifedipina podría estar mimetizando en cierto modo lo que ocurre cuando hay poca $[Ca^{2+}]_e$ donde el flujo de Ca^{2+} al interior celular está disminuido pero es suficiente para seguir manteniendo activos los mecanismos implicados en el mantenimiento de la contracción.

3.8. Participación de los LTCCs en el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$.

Una vez caracterizado el efecto de la nifedipina en la contracción inducida por despolarización en condiciones fisiológicas ($[\text{Ca}^{2+}]_e = 2,5 \text{ mM}$), estudiamos su efecto durante la fase mantenida de la contracción en bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ($7 \mu\text{M}$). En estas condiciones experimentales el flujo de Ca^{2+} será extremadamente débil, ya que los LTCCs estarán fundamentalmente inactivados (despolarización duradera) y además la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es muy baja. En la figura 40 se muestran un registro representativo (figura 40A) y el análisis estadístico (figura 40B) de la aplicación de nifedipina 1 nM durante la fase mantenida de la contracción. Obsérvese que 1 nM de nifedipina es capaz de relajar $\sim 70\%$ de la contracción inducida con $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$, efecto que se mantiene a lo largo del tiempo.

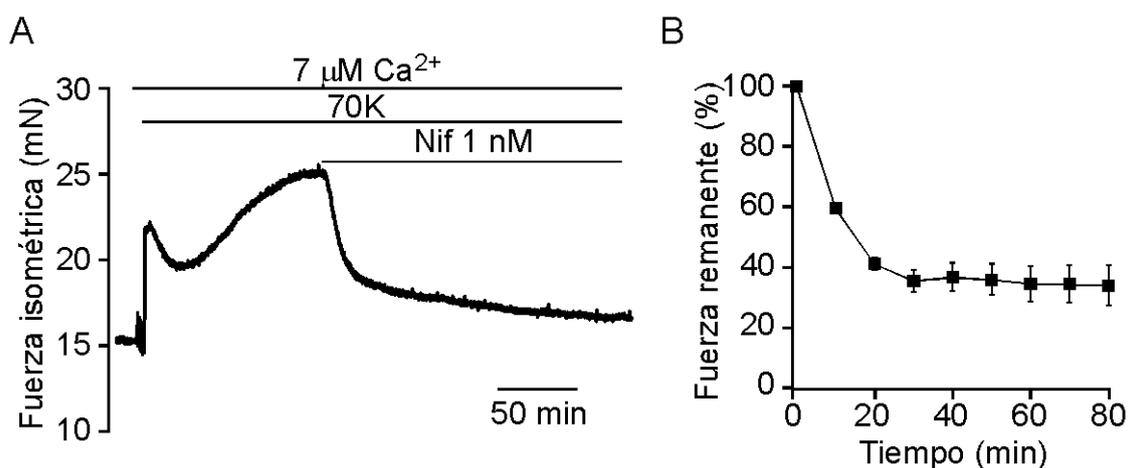


Figura 40: Papel de los LTCCs durante la contracción mantenida inducida por despolarización en presencia de $7 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_e$ en anillos arteriales de arteria femoral de rata. (A) Registro representativo del efecto de 1 nM nifedipina en la contracción mantenida inducida por 70K en presencia de una baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ($7 \mu\text{M}$). **(B)** Análisis cuantitativo de los datos ($n=3$). Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar nifedipina.

Estos resultados indican que aunque la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs sea muy pequeña, es suficiente para activar el mecanismo de sensibilización responsable del mantenimiento de la contracción.

3.9. Papel del retículo sarcoplásmico la contracción inducida por despolarización en presencia de $7 \mu\text{M Ca}^{2+}$.

Trabajos previos del laboratorio pusieron de manifiesto que en condiciones fisiológicas la activación de los LTCCs activa RhoA/ROCK a través de una ruta metabotrópica que implica la activación de una proteína G, la fosfolipasa C (PLC), producción de InsP_3 , y liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). Dado que los resultados anteriores indican que los LTCCs y RhoA/ROCK están implicados en la contracción arterial generada en presencia de bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ($7 \mu\text{M}$), se comprobó si el RS también estaba participando en el mantenimiento de esta contracción. Para abordar este punto, se inhibió la ATPasa del RS con ácido ciclopiazónico (ACP), lo que reduce el contenido de Ca^{2+} en el RS. La figura 41A muestra que la aplicación de $10 \mu\text{M}$ ACP durante la fase mantenida produce inicialmente una contracción transitoria, debida al Ca^{2+} acumulado en el citosol por la inhibición de la ATPasa, y tras ella el anillo comienza a relajarse ($\sim 50\%$ de relajación) en presencia de con $20 \mu\text{M}$ ACP (figura 41B).

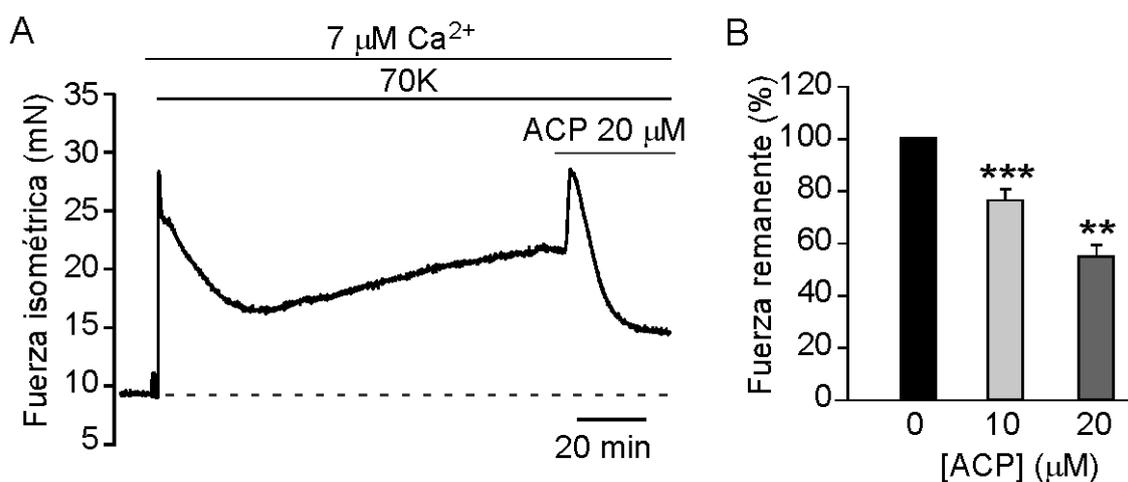


Figura 41: Papel del RS durante la contracción inducida por 70K en presencia de $7 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_e$ en arteria femoral de rata. (A) Registro representativo del efecto del ACP en la contracción inducida por 70K en presencia de $7 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_e$. (B) El diagrama representa la cuantificación del efecto del ACP ($10 \mu\text{M}$, $n=10$ anillos; $20 \mu\text{M}$, $n=5$ anillos) en la contracción inducida por 70K en presencia de $7 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_e$. Los valores se representan relativizados respecto a la fuerza de cada anillo antes de aplicar ACP ($0 \mu\text{M}$ ACP). * $p < 0,05$ versus $0 \mu\text{M}$ ACP.

Estos resultados sugieren que la contracción del músculo liso arterial inducida por despolarización en presencia de bajas $[Ca^{2+}]_e$, depende de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares.

3.10. Efecto del nivel de despolarización en la contracción arterial inducida por despolarización en presencia de $7 \mu M Ca^{2+}$.

Dado que la solución de despolarizante de 70K desplazaría el potencial de membrana (V_m) de los miocitos arteriales a ~ -22 mV (estimado mediante un simulador de la ecuación de Nerst/Goldman, Universidad de Arizona), quisimos comprobar lo que ocurre con niveles de despolarización más bajos. Con un menor nivel de despolarización el número de LTCCs que se van a abrir con el estímulo es menor y por tanto habrá una menor entrada de Ca^{2+} al interior celular.

En este caso utilizamos una solución de 20 mM de K^+ (20K), que estaría desplazando el V_m a ~ -45 mV. Al igual que ocurría con la solución de 70K (ver figura 29C y D), cuando se aplica la solución de 20K con 2,5 mM Ca^{2+} externo, se genera una contracción mantenida que disminuye rápidamente si reducimos la $[Ca^{2+}]_e$. No obstante si se mantiene el estímulo despolarizante, la contracción tiende a aumentar aún estando en presencia de bajo Ca^{2+} extracelular ($7 \mu M$) (figura 42A y C). Al aplicar el estímulo despolarizante en anillos preincubados en solución con $7 \mu M Ca^{2+}$ (figura 42C y D) la respuesta contráctil sigue la misma dinámica que al aplicar la solución despolarizante de 70K (ver figura 30C y D), inicialmente se genera una contracción equivalente a $\sim 50\%$ de la contracción que se genera con 20K y 2,5 mM de Ca^{2+} externo, que comienza a aumentar si el estímulo continua presente.

Este resultado indica que la contracción inducida por despolarización está muy finamente regulada por la $[Ca^{2+}]_i$, aunque sea reducido el número de LTCCs que se abren en respuesta a pequeñas despolarizaciones, sería suficiente para generar y mantener la contracción.

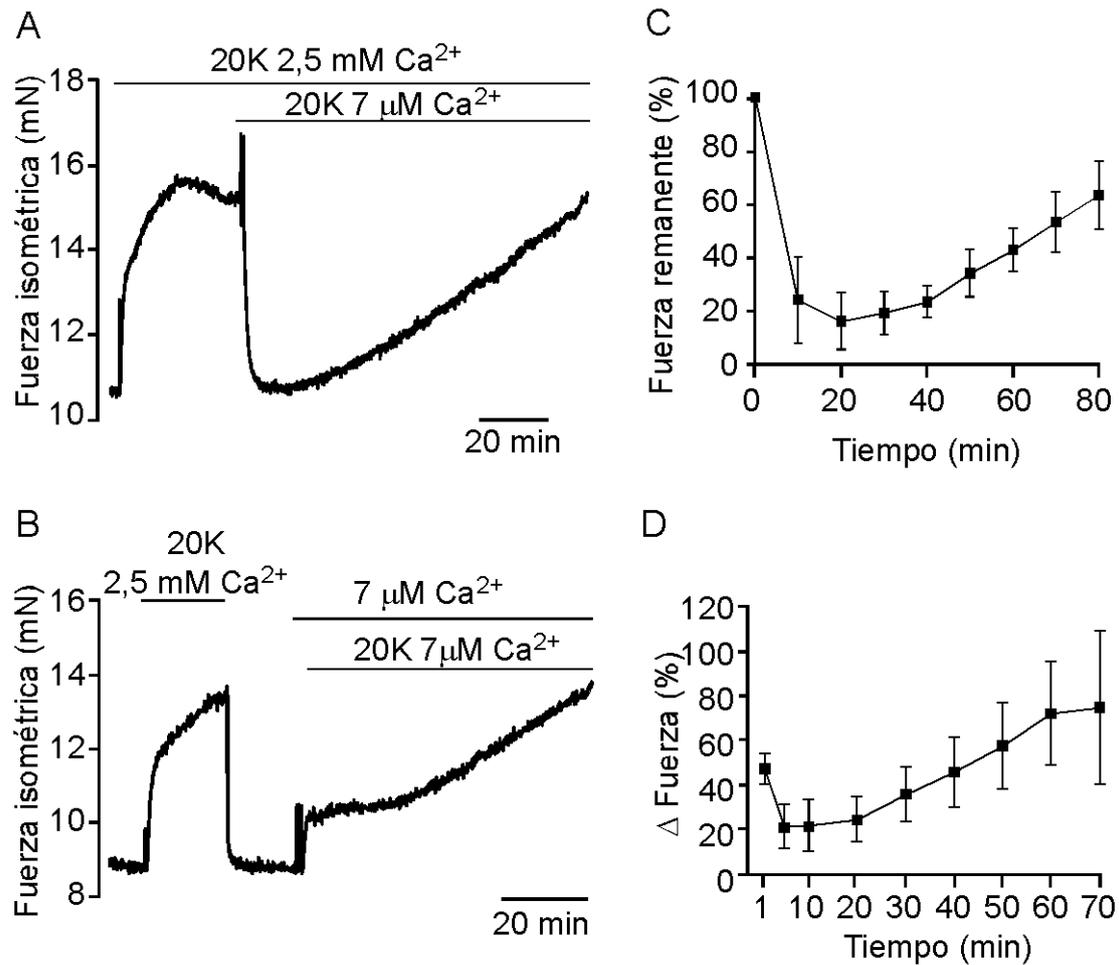


Figura 42: Efecto de los niveles de despolarización en la contracción inducida en presencia de bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en arteria femoral de rata. (A) Registro representativo del efecto de la disminución de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en la contracción inducida por 20K 2,5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$. (B) Registro representativo de la contracción inducida por 20K en presencia 7 μM $[\text{Ca}^{2+}]_e$. (C) Análisis cuantitativo de los datos en A (n= 3 anillos). Los valores se muestran relativizados respecto a la fuerza máxima de cada anillo antes de aplicar la solución 20K con 7 μM $[\text{Ca}^{2+}]_e$. (D) Análisis cuantitativo de los datos en B (n= 6 anillos). Los datos se muestran normalizados respecto a la fase fásica de la contracción inducida por 20K en presencia de 2,5 mM Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos avalan el mecanismo descrito previamente en nuestro laboratorio en el cual se describe una regulación de la ruta RhoA/ROCK por los LTCCs, sugiriendo que dicho mecanismo se mantiene durante despolarizaciones de larga duración aún cuando la entrada de Ca^{2+} está muy comprometida ($[\text{Ca}^{2+}]_e \sim 7 \mu\text{M}$). Un pequeño flujo de Ca^{2+} sería suficiente para activar RhoA y la contracción.

4. Estudio de la implicación de los LTCCs, RS y RhoA/ROCK en la patología hipertensiva.

Los resultados descritos anteriormente indican que los LTCCs, el RS y la ruta de sensibilización RhoA/ROCK participan activamente en el mantenimiento de la contracción inducida por la despolarización. Con objeto de estudiar la implicación de este fenómeno en procesos patológicos, hemos iniciado el estudio del papel de estas vías en el tono vascular de ratas hipertensas.

4.1. Medida de la presión arterial.

Como modelo experimental de hipertensión esencial se han utilizado Ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR, “Spontaneously Hypertensive Rat”) y sus respectivos controles (WKY, “Wistar Kyoto Rats”).

Estos animales desarrollan hipertensión entre las 7-15 semanas de edad (Janvier labs). Los animales llegaron al laboratorio con 13-14 semanas. Para asegurarnos que, efectivamente, habían desarrollado hipertensión a la edad de estudio, medimos la presión arterial en 12 animales, 6 SHR y 6 WKY. Con el fin de obtener registros fiables, se realizaron varias medidas durante las primeras semanas, permitiendo que los animales se habitúen a la técnica y sufran menos estrés durante el proceso.

La figura 43A muestra los valores de presión arterial sistólica y diastólica de los 12 animales estudiados en las semanas 15-16. En la figura 43B se muestra que la media de presión arterial sistólica y diastólica de los 6 animales SHR es mayor que en los animales WKY.

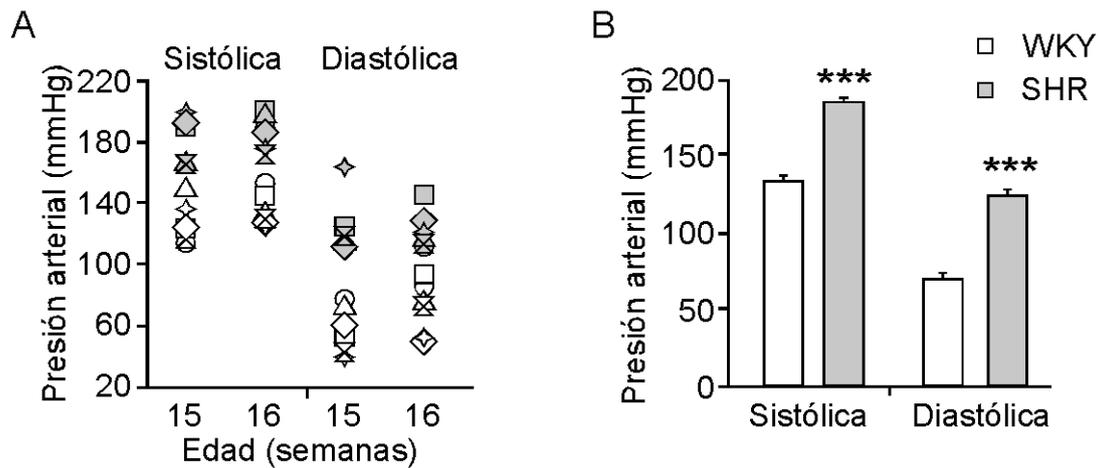


Figura 43: Presión arterial en ratas SHR y WKY. (A) Valores de presión arterial sistólica y diastólica en 6 animales SHR y 6 WKY en las medidas realizadas en las semanas 15-16 de edad. Cada símbolo representa a un animal. (B) Media de la presión arterial sistólica y diastólica en cada grupo de animales. Los datos se muestran en valores absolutos. *** $p < 0,001$ versus WKY.

4.2. Contracción producida por activación de los LTCCs en ratas hipertensas.

Para determinar el papel funcional de los LTCCs en esta patología hipertensiva, caracterizamos la respuesta vasoconstríctil de las arterias a la solución despolarizante.

La figura 44 muestra registros representativos de la curva dosis-respuesta de la contracción arterial, con distintas de $[K^+]_e$ en ratas normotensas (figura 44A) e hipertensas (figura 44B). Los anillos arteriales procedentes de ratas hipertensas muestran una mayor vasorreactividad al estímulo despolarizante en todas las concentraciones estudiadas (figura 44C). Al normalizar la contracción producida con cada $[K^+]_e$ con respecto a contracción máxima (70K) se observa que a bajas $[K^+]_e$ la contracción es mayor en arterias procedentes de animales hipertensos (figura 44D).

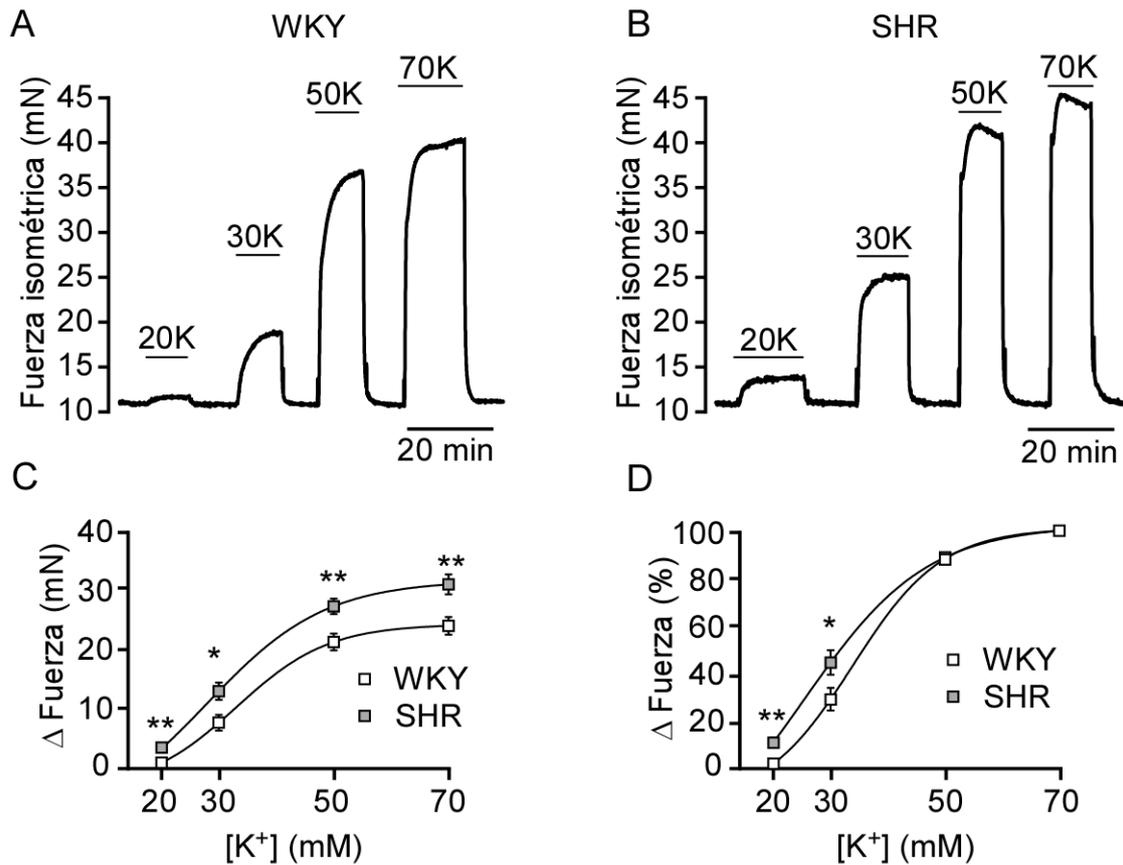


Figura 44: Efecto de la $[K^+]_e$ sobre la contracción arterial en ratas SHR. Registros representativos de la fuerza isométrica generada por un anillo de arteria femoral procedente de una rata WKY (A) y SHR (B) al ser sometidos a distintas $[K^+]_e$. (C y D) Curvas dosis-respuesta de la $[K^+]_e$ y la fuerza generada en arterias procedentes de ratas normotensas (WKY, n= 20 anillos) e hipertensas (SHR, n=20 anillos) expresadas en valores absolutos (C) o en tanto por ciento de la contracción máxima en cada anillo (D). *p<0,05; **p<0,01.

El papel funcional de los LTCCs puede ser estudiado también mediante la caracterización de la respuesta vasoconstríctil a agonistas farmacológicos de de estos canales como (\pm) Bay K 8644 y FPL64176. En este caso hemos utilizado (\pm) Bay K8644, un análogo estructural de la nifedipina con una acción positiva sobre los LTCCs. La figura 45 muestra el efecto de este agonista sobre los dos tipos de anillos arteriales. La contracción inducida por (\pm) Bay K 8644 fue mayor en arterias procedentes de animales hipertensos a todas las concentraciones estudiadas (figura 45A y B), mostrando una mayor sensibilidad a concentraciones más bajas, al igual que en el caso de la curva de $[K^+]_e$ (figura 45C).

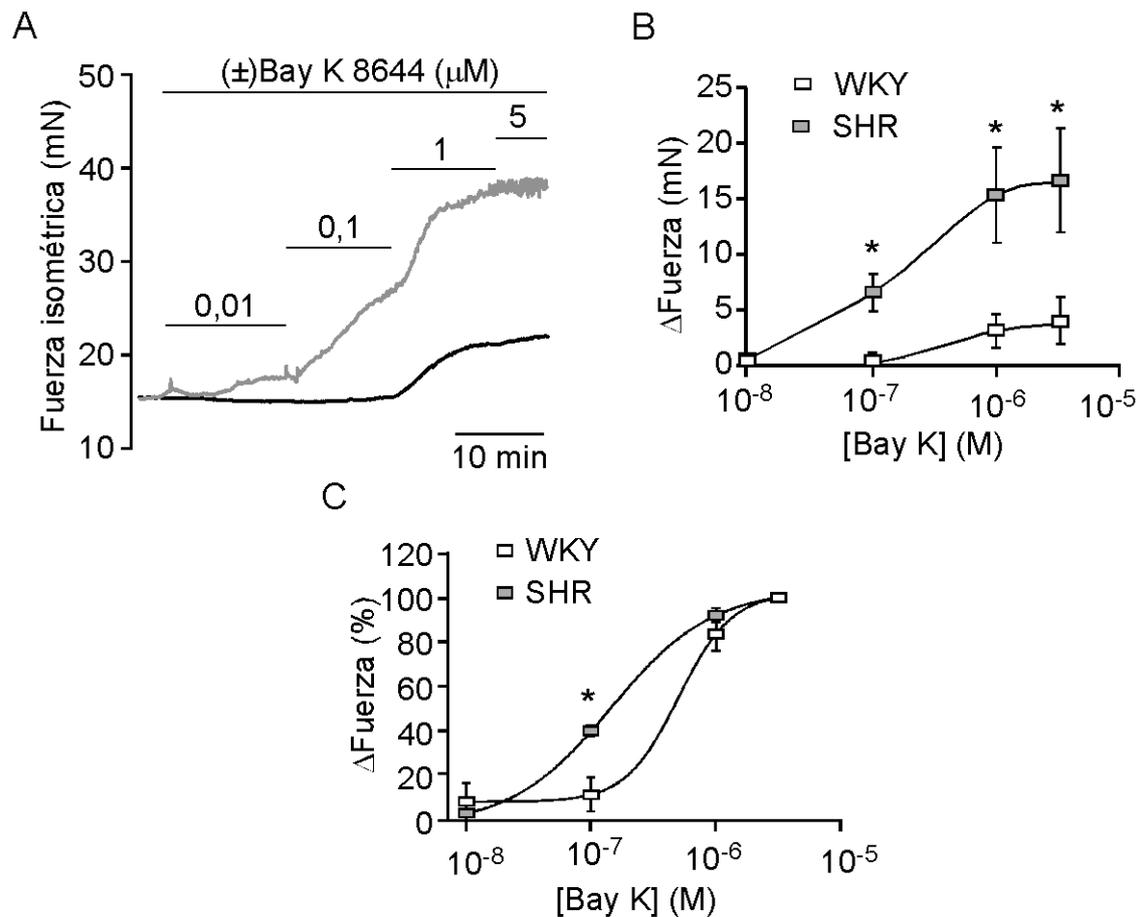


Figura 45: Contracción producida por (\pm) Bay K 8644 en anillos de arteria femoral de ratas hipertensas. (A) Registro representativo de la contracción producida por (\pm) BayK 8644 en anillos arteriales procedentes de animales normotensos (trazo negro) e hipertensos (trazo gris). (B y C) Curvas dosis-respuesta de (\pm) Bay K 8644 en anillos arteriales procedentes de animales normotensos (n= 4 anillos) e hipertensos (n= 4 anillos) expresados en valores absolutos (B) o en tanto por ciento de la contracción máxima en cada anillo (C). * $p < 0,05$.

Estos resultados indican que las arterias procedentes de animales hipertensos presentan una potenciación de la contracción y inducida por la activación de los de los LTCCs, mostrando una mayor sensibilidad a los agonistas de estos canales.

4.3. Contenido de Ca^{2+} en el RS de las ratas hipertensas.

Dado que el RS también interviene junto con los LTCCs en el mantenimiento de la contracción, se diseñaron experimentos para determinar si existen diferencias en la cantidad de Ca^{2+} contenido en el RS de las ratas SHR con respecto a sus controles. Para ello estudiamos la contracción inducida por cafeína, un agonista específico de los canales de rianodina del RS.

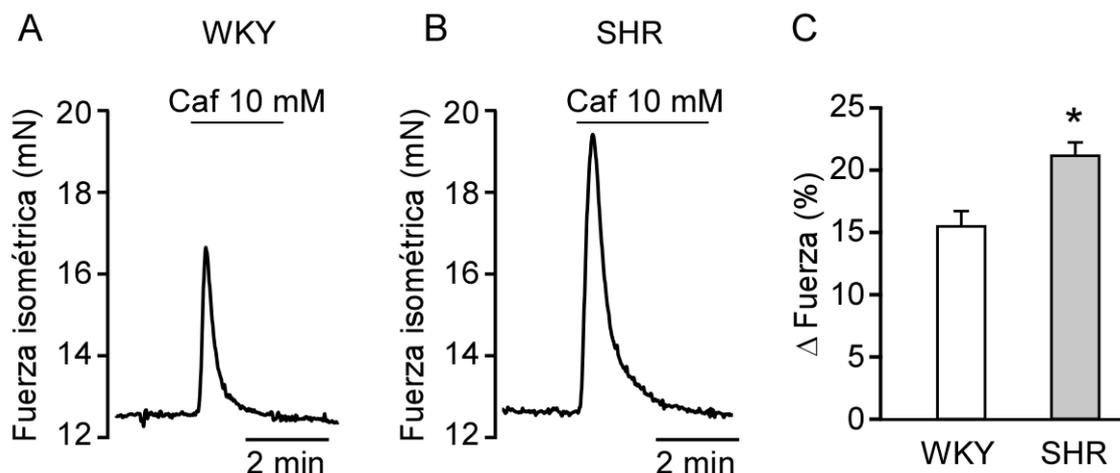


Figura 46: Contracción producida por cafeína en arterias de ratas hipertensas. Registro típico de la contracción producida por cafeína (10 mM) en anillos de arteria femoral de ratas WKY (A) y SHR (B). (C) El diagrama representa el incremento de fuerza isométrica media generada por 10 mM cafeína, normalizada con respecto a la contracción inducida por la aplicación de la solución 70K con 2,5 mM Ca^{2+} externo, en cada tipo de animal (WKY n= 38 anillos, SHR n= 36 anillos). * $p < 0,05$.

La cafeína aplicada en anillos de arteria femoral de ratas SHR y WKY produjo una contracción transitoria que fue mayor en ratas SHR (Figura 46).

Otra maniobra experimental que se usa para estudiar el Ca^{2+} almacenado en el RS es el uso de un inhibidor de la ATPasa del RS, en este caso el ácido ciclopiazónico (ACP). Al bloquear la entrada de Ca^{2+} al RS con ACP se genera un incremento de Ca^{2+} que provoca una contracción transitoria. El ACP generó una mayor contracción en arterias procedentes de ratas hipertensas (figura 47). En anillos procedentes de arterias de ratas normotensas (figura 47A y C) la contracción inducida por ACP fue de ~14% de la contracción máxima, mientras que en anillos procedentes de arterias de ratas hipertensas (figura 47B y C) la contracción inducida por ACP fue de ~42%.

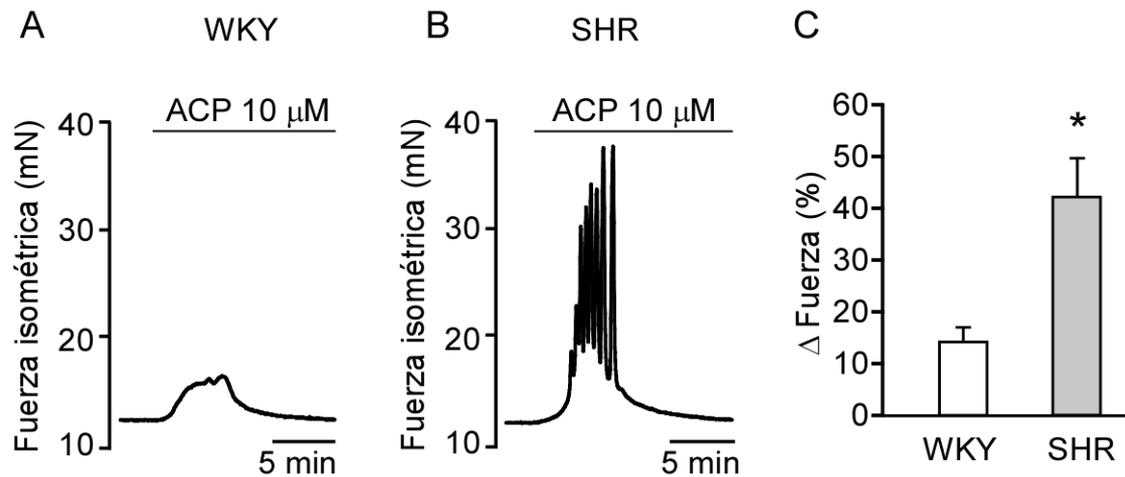


Figura 47: Contracción producida por ACP en arterias de ratas hipertensas. Registros representativos de la contracción producida por ACP (10 μM) en anillos de arteria femoral de ratas WKY (A) y SHR (B). (C) El diagrama representa la fuerza isométrica media generada por ACP 10 μM normalizada respecto a la contracción inducida por 70K con 2,5 mM Ca^{2+} externo, en cada tipo de animal (WKY n= 4 anillos; SHR n= 4 anillos). * $p < 0,05$.

Estos resultados sugieren que las arterias de ratas hipertensas almacenan una mayor cantidad de Ca^{2+} en el RS que las ratas controles.

4.4. RhoA en ratas hipertensas.

Como se ha descrito anteriormente, la vía de señalización RhoA/ROCK está directamente implicada en el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización. Para estudiar este elemento, determinamos si existían diferencias en los niveles y actividad de RhoA en arterias procedentes de animales SHR y WKY.

Mediante la técnica de *Western Blot* se analizaron los niveles de RhoA en anillos arteriales, y se observó que las muestras arteriales de ratas hipertensas presentaron un mayor nivel de proteína RhoA comparado con las de ratas normotensas (Figura 48A y B). Mediante la técnica G-lisa se cuantificó la actividad basal de RhoA, presentando una mayor actividad de RhoA las muestras arteriales procedentes de ratas hipertensas respecto a los controles normotensos (figura 48C).

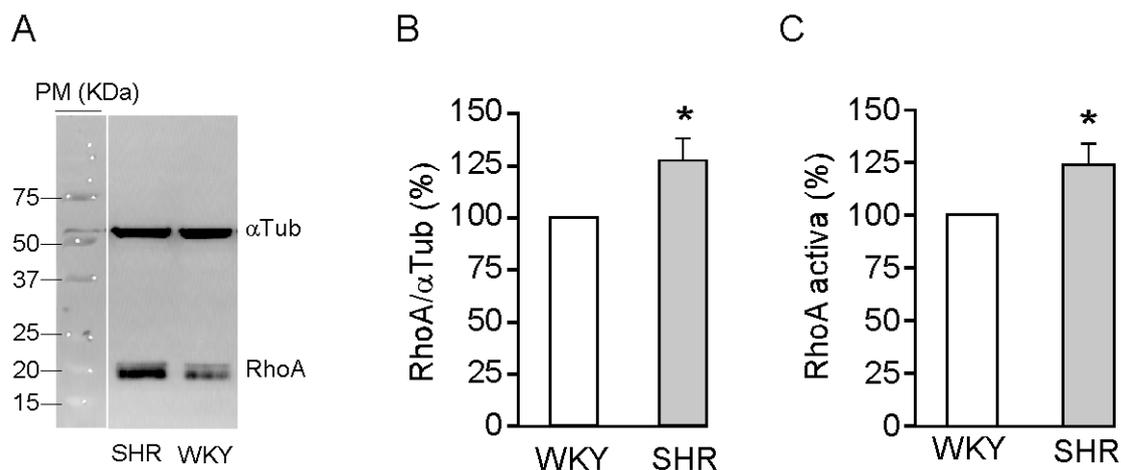


Figura 48: Nivel y actividad de RhoA en arterias de ratas hipertensas. (A) *Western Blot* representativo de los niveles de proteína RhoA en muestras arteriales procedentes de ratas SHR y WKY. (B) Análisis densiométrico de RhoA en muestras procedentes de arterias de ratas SHR y WKY (n= 6). Los valores se representan relativizados respecto las muestras WKY. (C) Análisis de la actividad de RhoA basal en muestras procedentes de arterias de ratas SHR y WKY (n= 10). Los valores se representan relativizados respecto a la actividad presente en las ratas WKY en cada ensayo.

Estos resultados sugieren que la ruta RhoA podría estar implicada en el aumento de fuerza generada por la activación de los LTCCs presente en hipertensión.

4.5. Contracción producida por activación de los LTCCs en ausencia de Ca^{2+} externo en ratas hipertensas.

Como se ha mostrado en el bloque anterior, la contracción arterial inducida por despolarización depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$. En ausencia de Ca^{2+} extracelular (solución con 1 mM EGTA = ~ 100 nM $[\text{Ca}^{2+}]_e$), un estímulo despolarizante provoca una contracción transitoria debida a la activación de los LTCCs, liberación de Ca^{2+} desde el RS y activación de RhoA/ROCK (papel metabotrópico de los LTCCs). Los tres elementos de la ruta están potenciados en ratas SHR, y por ello quisimos estudiar esta ruta en este modelo hipertensión (figura 49). La aplicación de la solución despolarizante en ausencia de Ca^{2+} externo, produjo una mayor contracción en anillos arteriales procedentes de ratas hipertensas (figura 49A y B). Dado que en condición control (2,5 mM Ca^{2+}) la respuesta a 70K es mayor en ratas SHR, la cuantificación de la respuesta en ausencia de Ca^{2+} se ha normalizado respecto a la contracción máxima (70K en presencia de 2,5 mM Ca^{2+}) de cada anillo (figura 50C). En ausencia de Ca^{2+} extracelular en arterias de ratas hipertensas la solución despolarizante induce una contracción que equivale al 80% de la

contracción máxima (inducida con 70K 2,5mM Ca^{2+}), mientras que en arterias de ratas normotensas esta contracción es de un 60%.

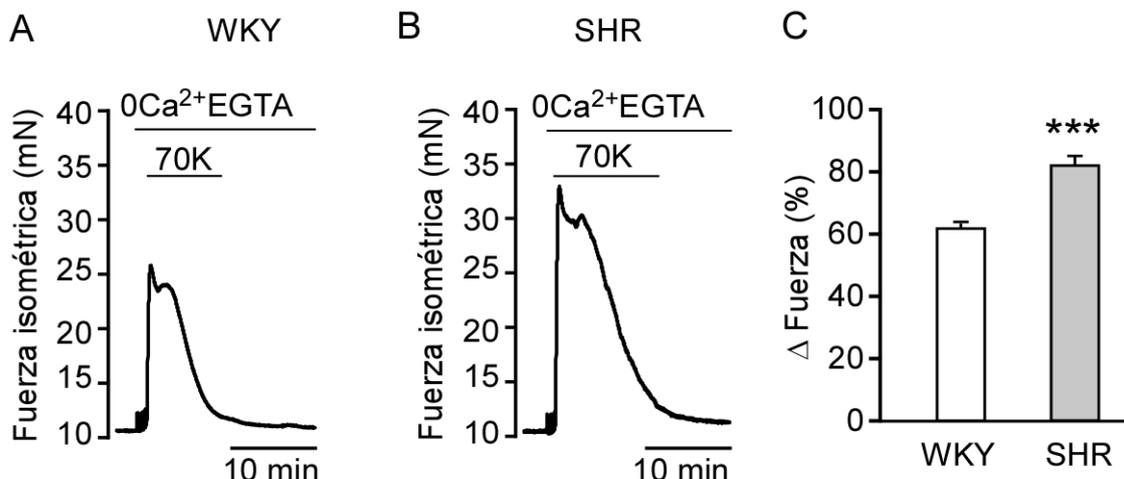


Figura 49: Contracción producida por 70K en ausencia de Ca^{2+} externo en anillos de arteria femoral de ratas hipertensas. Registros de la contracción producida por 70K en ausencia de Ca^{2+} en arterias procedentes de animales normotensos (A) e hipertensos (B). Se realizaron cinco recambios de la solución control con solución 0Ca^{2+} con 1 mM de EGTA añadido. (C) Fuerza isométrica media generada por la aplicación de 70K en ausencia de Ca^{2+} externo en cada tipo de animal (n= 92 anillos WKY, n= 87 anillos SHR). Los datos se muestran relativizados respecto a la contracción máxima (70K 2,5mM Ca^{2+}) en cada anillo. *** p<0,001.

Para corroborar que efectivamente esta contracción producida por despolarización en ausencia de Ca^{2+} externo se debe a la activación de los LTCCs, bloqueamos específicamente estos canales con nifedipina. Como hemos visto anteriormente, es necesario aplicar una concentración de 100 nM de nifedipina para bloquear ambos componentes de la contracción inducida por 70K en arteria femoral de rata (ver figura 38). La aplicación de 100 nM nifedipina redujo la contracción generada por 70K en ausencia de Ca^{2+} externo tanto en ratas hipertensas como en normotensas (figura 50).

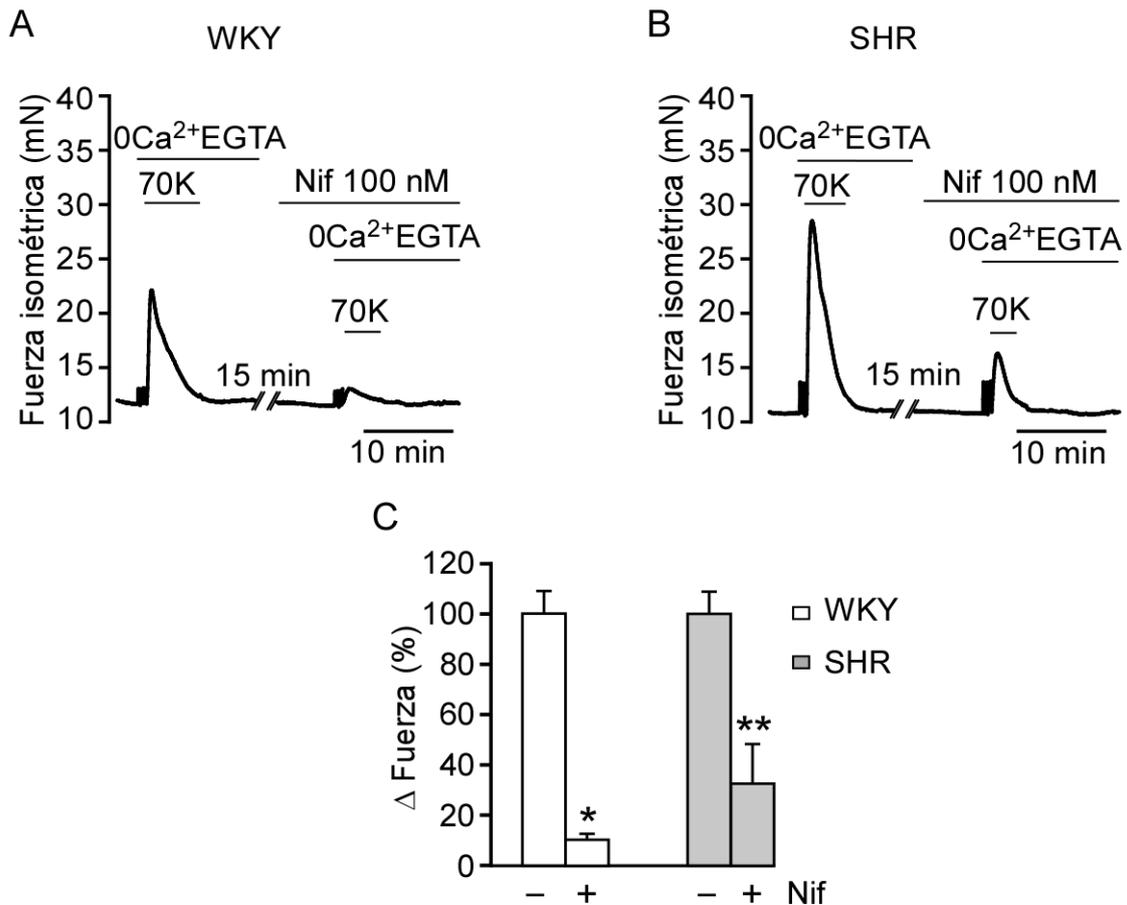


Figura 50: Efecto de la nifedipina en la contracción producida por 70K en ausencia de Ca^{2+} externo en anillos de arteria femoral de ratas hipertensas. Registros representativos de la contracción producida por 70K en ausencia de Ca^{2+} ($0\text{Ca}^{2+}\text{EGTA}$) en situación control o en presencia de 100 nM nifedipina en anillos de ratas normotensas (A) e hipertensas (B). La nifedipina estaba presente en solución control cinco minutos antes de pasar a $0\text{Ca}^{2+}\text{EGTA} + \text{nif}$. (C) El diagrama representa el tanto por ciento de reducción media de la fuerza generada por 70K, en ausencia de Ca^{2+} externo, producido por la aplicación de 100 nM, en cada tipo de animal, (WKY n= 4 anillos; SHR n= 4 anillos). Los datos se representan normalizados respecto a la media de la fuerza inducida por 70K en ausencia de Ca^{2+} externo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Debido a que la despolarización puede activar otras rutas de señalización (Ben-Chaim *et al.*, 2006; Mahaut-Smith *et al.*, 2008), repetimos el experimento induciendo la contracción arterial con FPL64176. La aplicación de FPL en ausencia de Ca^{2+} externo también produjo una contracción que fue mayor en las arterias procedentes de ratas hipertensas (figura 51). Esta contracción fue ~23% de la contracción máxima en anillos de arterias procedentes de ratas normotensas, y ~40% en anillos de arterias procedentes de ratas hipertensas.

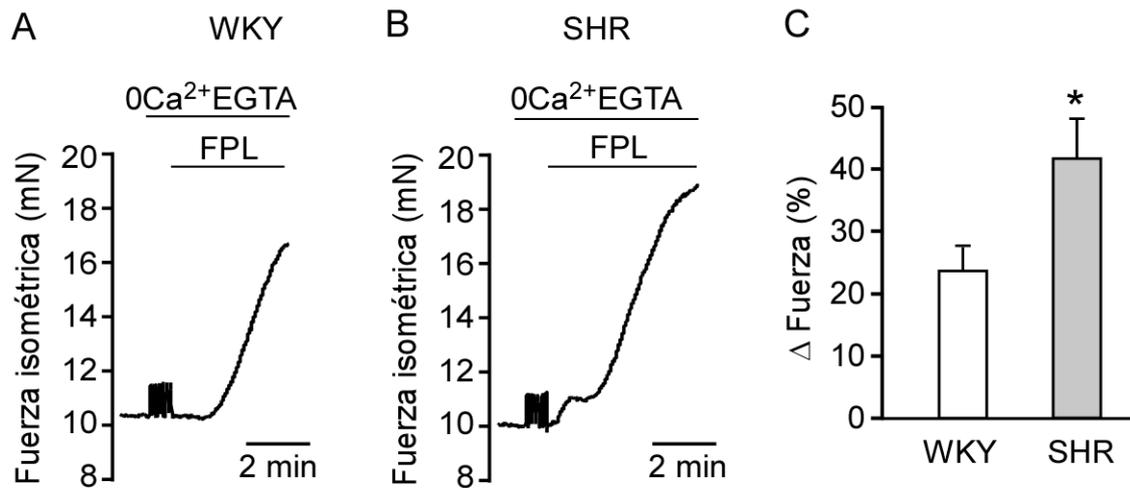


Figura 51: Contracción producida por FPL en ausencia de Ca²⁺ externo en arterias de ratas hipertensas. Registros de la contracción producida por FPL (0,5 μM) en anillos de arteria femoral de ratas WKY (A) y SHR (B). (C) El diagrama representa el incremento de fuerza isométrica media generada por FPL en ausencia de Ca²⁺ externo, normalizada con respecto a la contracción inducida por 70K con 2,5 mM Ca²⁺ externo en cada tipo de animal (WKY n= 14 anillos, SHR n= 14 anillos). * p<0,05.

Estos resultados refuerzan los obtenidos anteriormente, otorgando a los LTCCs un papel fundamental en la contracción inducida en ausencia de Ca²⁺ externo.

4.6. Papel funcional del acoplamiento LTCCs-RS en ratas hipertensas.

Ya que hemos observado que el CCICR se encuentra potenciado en las arterias procedentes de los animales hipertensos, quisimos comprobar si este mecanismo podría tener algún papel funcional en la contracción inducida por despolarización en condiciones fisiológicas (2,5mM Ca²⁺ extracelular). Una maniobra experimental para poder ver el papel de esta ruta metabotrópica consiste en provocar el vaciado de los reservorios intracelulares incubando el anillo con el inhibidor de la SERCA (ACP) en una solución sin Ca²⁺ extracelular (con 1 mM EGTA añadido). Tras comprobar que los reservorios se encuentran vacíos, mediante la aplicación de cafeína, se aplicó la solución despolarizante en presencia de 2,5mM Ca²⁺ externo, manteniendo presente en todo momento el ACP (figura 52). El vaciado de los reservorios intracelulares en arterias de ratas hipertensas provocó una disminución de la fuerza durante la fase mantenida, tras

los 15 min de estimulación, igualando los valores de contracción arterial a los presentes en los controles normotensos (figura 52C y D).

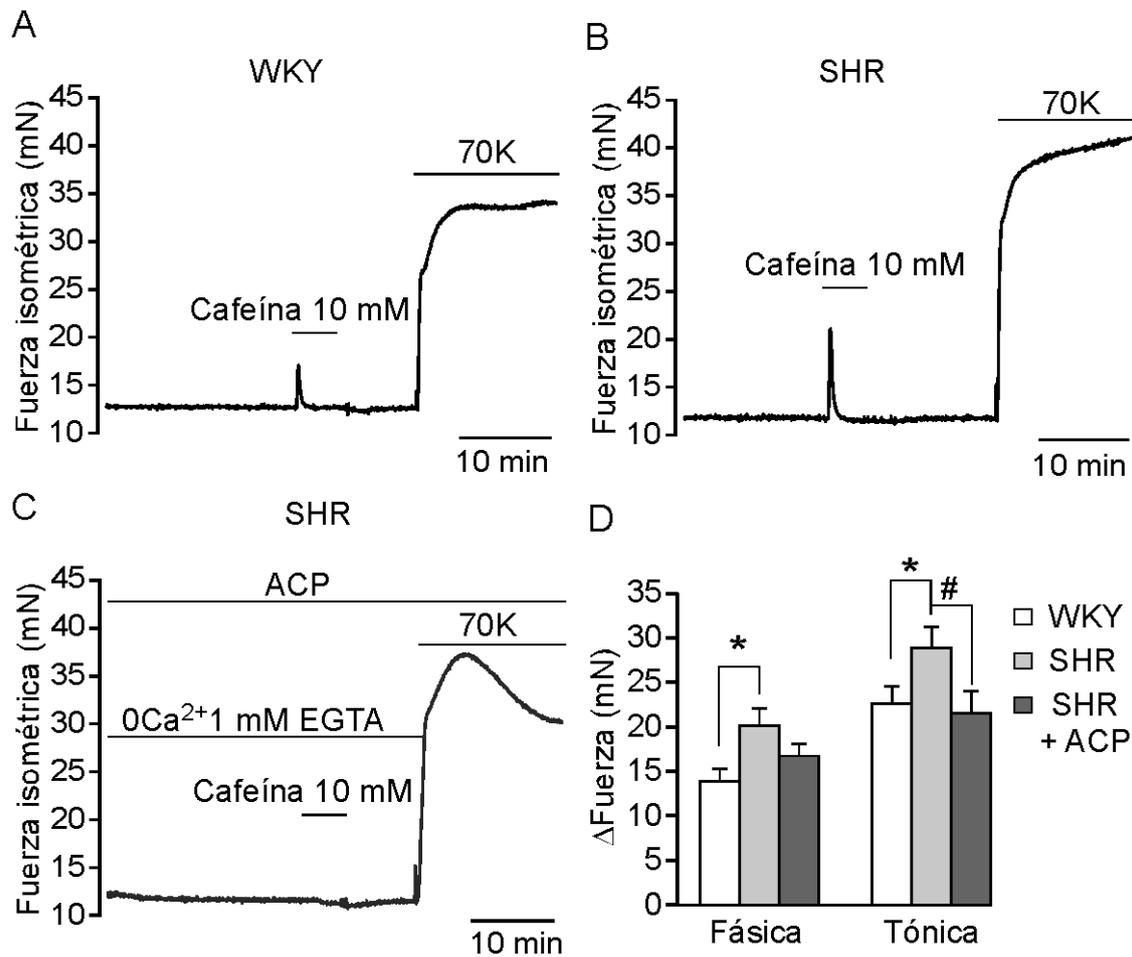


Figura 52: Papel del RS en el aumento de contracción inducida por la despolarización en arteria femoral de rata SHR. (A-C) Registros representativos de la contracción producida por cafeína (10 mM) y 70K en anillos de ratas normotensas (A; WKY, n= 10 anillos), hipertensas en condiciones normales (B; SHR, n=10 anillos), e hipertensas tras el vaciado de los reservorios preincubando con ACP (20 μ M) en una solución sin Ca^{2+} y con 1 mM de EGTA añadido (C; SHR+ACP, n= 10 anillos). (D) Análisis cuantitativo de los datos. La contracción se midió a los 15 min tras la aplicación de 70K. Los datos se representan en valores absolutos. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$.

En conjunto, estos resultados sugieren que los LTCC, la liberación metabotrópica de Ca^{2+} del SR y la vía RhoA/ROCK podrían participar en la potenciación del componente tónico de la contracción evocada por la despolarización en arterias procedentes de ratas hipertensas.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La discusión de este trabajo se ha dividido en tres apartados (1-3) correspondientes a los tres grandes bloques de resultados. En el primer apartado se analiza el uso combinado de los CCBs junto con inhibidores de RhoA/ROCK para el tratamiento del vasoespasma arterial. El segundo apartado trata sobre la sensibilidad de RhoA/ROCK y la contracción arterial a bajos niveles de Ca^{2+} citosólico durante despolarizaciones prolongadas y el papel de los LTCCs en esta contracción. El último apartado analiza la implicación de la ruta metabotrópica inducida por la activación de los LTCCs/RS y RhoA/ROCK en la vasorreactividad arterial en la hipertensión esencial.

1. Combinación de bajas concentraciones de inhibidores de ROCK y CCBs para la inhibición selectiva de la contracción arterial mantenida inducida por despolarización

Los LTCCs han sido ampliamente estudiados en VSMCs debido a su importante papel en la contracción arterial. Previamente, nuestro grupo describió que durante las despolarizaciones sostenidas los LTCCs pueden activar una vía metabotrópica que conduce a la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y a la activación de RhoA/ROCK, un mecanismo que favorece el mantenimiento de la contracción de la arteria con un flujo de Ca^{2+} transmembrana relativamente pequeño (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). Ya que tanto la ruta RhoA/ROCK como los LTCCs están participando activamente en el mantenimiento de la contracción, propusimos que la aplicación simultánea de bajas concentraciones de bloqueantes de los LTCCs e inhibidores de ROCK podría tener potencial aplicabilidad clínica para antagonizar la contracción arterial tónica (Abernethy y Schwartz, 1999; Vicari *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2011) minimizando los efectos adversos indeseables de dosis más altas de CCBs. En este trabajo hemos probado el efecto vasorelajante de dosis bajas de fasudil aplicado solo o en combinación con nifedipina o verapamil, dos CCBs que difieren en su selectividad entre el tejido cardíaco y vascular (Abernethy y Schwartz, 1999). Nuestros resultados indican que tanto los CCBs como los inhibidores de ROCK en concentraciones inferiores a las que se sabe que existen en el plasma durante los tratamientos clínicos estándar (Renwick *et al.*, 1988; Cremers *et al.*, 1997; Shibuya *et al.*, 2005) pueden inhibir el componente tónico que se genera durante despolarizaciones moderadas de la membrana plasmática, dejando prácticamente inalterado el componente fásico. De acuerdo con resultados anteriores (Sun y Triggle, 1995), hemos demostrado que la nifedipina es más potente, más eficaz con una menor concentración, como agente vasodilatador que el verapamil. Además, nuestros datos indican que la aplicación simultánea de antagonistas de los LTCCs y fasudil a dosis inferiores a las necesarias para reducir el componente fásico de la contracción arterial inducida por la despolarización, presenta un poderoso efecto inhibitorio sobre el tono arterial mantenido. Ya que los LTCC están presentes tanto en los miocitos vasculares como cardíacos, hemos comprobado si este tratamiento farmacológico combinado altera la actividad eléctrica de ambos tipos de miocitos. Es interesante señalar que las dosis bajas de CCBs junto con fasudil, en el intervalo que relajan selectivamente las contracciones

tónicas en los anillos arteriales, no tienen efecto sobre los potenciales de acción y las corrientes de Ca^{2+} , responsables del flujo de Ca^{2+} transmembrana rápido que conduce a la contracción de los miocitos. De acuerdo con los registros electrofisiológicos, en corazones aislados este tratamiento (bajas concentraciones de verapamil más fasudil) no afecta a la contractilidad cardíaca, mientras que concentraciones mayores de verapamil ejercen una acción inotrópica negativa (Schwinger *et al.*, 1990). Bajo condiciones fisiológicas, los miocitos cardíacos y vasculares generan potenciales de acción espontáneos o evocados que inducen rápidas y cortas despolarizaciones rápidas y cortas de la membrana (<1 s), un flujo de Ca^{2+} a través de los LTCCs y una contracción transitoria de los miocitos (Gokina *et al.*, 1996). Por el contrario, en los procesos fisiopatológicos como la hipertensión o la hemorragia subaracnoidea (Pesic *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 2011) las VSMCs están permanentemente despolarizadas con un aumento del tono. Es precisamente durante estas despolarizaciones sostenidas de la membrana, una condición que mantiene los canales de Ca^{2+} predominantemente en estado inactivado, cuando son particularmente sensibles a los inhibidores de los LTCCs (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011).

Aunque futuros experimentos deben ser llevados a cabo para estudiar con más detalle los efectos de los inhibidores de ROCK y LTCCs, en este trabajo mostramos que la combinación de concentraciones bajas de ambos antagonistas podría ser una estrategia terapéutica potencial contra espasmos arteriales patológicos, disminuyendo los efectos secundarios sobre los cambios del potencial de membrana rápidos que se producen de manera fisiológica en los miocitos vasculares.

2. Regulación de RhoA/ROCK y contracción arterial mantenida por bajos niveles de Ca^{2+} citosólico durante despolarizaciones prolongadas.

Durante la fase mantenida de la contracción generada por una solución despolarizante, tanto el flujo continuo de Ca^{2+} como la sensibilización a este ion llevada a cabo por RhoA/ROCK son necesarios para que dicha contracción se mantenga a lo largo del tiempo. En este trabajo hemos querido estudiar la sensibilidad de este mecanismo a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y para ello hemos restringido la entrada de Ca^{2+} al interior celular mediante dos estrategias experimentales, disminuyendo drásticamente la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (7 μM y 100 nM) o bloqueando los LTCCs con nifedipina.

Los LTCCs están sujetos a inactivación dependiente de voltaje y de la $[Ca^{2+}]_i$, de manera que en VSMCs aisladas un 50% de los LTCCs se inactivan cuando el potencial de membrana se mantiene a ~ -24 mV durante 2 segundos en $[Ca^{2+}]_e$ fisiológicas (Rubart *et al.*, 1996). Sin embargo, en la mayoría de los estudios electrofisiológicos, los pulsos despolarizantes utilizados para estudiar las corrientes de Ca^{2+} son demasiado cortos (menos de 1 segundo) para llegar a la inactivación de los LTCC, por lo que las corrientes de Ca^{2+} registradas en estas condiciones no son representativas de lo que podría estar sucediendo en algunas patologías donde se ha demostrado que VSMCs están permanentemente despolarizadas, como la hemorragia subaracnoidea (Aihara *et al.*, 2004) o la hipertensión (Pesic *et al.*, 2004). Debido a las limitaciones técnicas que existen para determinar las corrientes de Ca^{2+} en miocitos aislados sometidos a depolarizaciones de larga duración, hemos utilizado una solución externa de alto K^+ para despolarizar el potencial de membrana durante más de una hora y evaluar el papel de los LTCC y RhoA/ROCK. Nuestros resultados revelan un aumento de la respuesta vasocontractil después de 20-30 min de despolarización en condiciones fisiológicas ($[Ca^{2+}]_e$ 2,5 mM). Esta observación no ha sido descrita previamente, ya que los anillos arteriales típicamente son despolarizados durante no más de 10-20 min, (Mita *et al.*, 2002; Sakurada *et al.*, 2003; Ratz *et al.*, 2005), tiempos cortos para detectar el aumento final en la fuerza isométrica. La contracción arterial sostenida inducida por 70K se abolió cuando el flujo de Ca^{2+} a través de LTCCs fue bloqueado con 20 nM nifedipina o cuando el Ca^{2+} externo fue retirado casi en su totalidad (solo 100 nM $[Ca^{2+}]_e$), tratando a los anillos arteriales con una solución sin Ca^{2+} añadido y con 1mM EGTA. De manera interesante, cuando se aplicó una solución con tan solo 7 μ M $[Ca^{2+}]_e$, la fuerza isométrica presentó una disminución transitoria llegando a un valor donde se estabilizó y lentamente comenzó a aumentar hasta alcanzar un nivel que se mantuvo hasta el final del estímulo. Una respuesta cualitativamente similar se observó cuando el flujo de Ca^{2+} se bloqueó parcialmente con 3 nM nifedipina en presencia de $[Ca^{2+}]_e$ fisiológico. Este curso temporal de la nifedipina no ha sido previamente descrito, dado que la mayoría de los estudios se han realizado aplicando despolarizaciones cortas o usando concentraciones supramáximas de los antagonistas de LTCCs (1-10 μ M nifedipina), aunque su valor IC_{50} esté en el intervalo nM (McDonald *et al.*, 1994).

Los experimentos realizados en miocitos aislados no mostraron un incremento de la $[Ca^{2+}]$ citoplásmico cuando se disminuyó la $[Ca^{2+}]$ extracelular de 2,5 mM a 7 μ M

durante la aplicación de la solución despolarizante, sino que disminuyó la señal de $[Ca^{2+}]_i$ con la misma dinámica, o incluso más rápida, que cuando se repolarizó la célula en solución control con 3 mM K^+ y 2,5 mM Ca^{2+} . Este hecho podría ser explicado debido a que el RS está dispuesto muy cerca de la membrana plasmática, creando una barrera para el flujo de Ca^{2+} , y disminuyendo la fracción del ion que llega a la zona donde se encuentra la maquinaria contráctil (van Breemen *et al.*, 1995). En este sentido el Ca^{2+} entraría a través de los LTCCs y sería rápidamente recaptado por la SERCA para posteriormente ser liberado localmente sin provocar cambios en $[Ca^{2+}]_i$ global. Esto ocurre con los "sparks" de Ca^{2+} , que son aumentos de locales Ca^{2+} provocados por la apertura coordinada de un grupo de receptores de rianodina. Un solo "spark" es capaz de producir un aumento local de Ca^{2+} muy alto (10-100 μ M), sin embargo, el aumento global de Ca^{2+} que genera es < 2 nM (Jaggar *et al.*, 2000).

La contracción mantenida inducida por despolarización en presencia de muy bajas $[Ca^{2+}]_e$ (7 μ M) fue: a) independiente de endotelio, lo que sugiere que el mecanismo de mantenimiento de la contracción en estas condiciones depende exclusivamente de las células musculares lisas; b) muy sensible a los CCBs, la aplicación de 1 nM nifedipina produjo un potente efecto vasorrelajante que permaneció hasta el final del estímulo, lo que indica que los LTCCS están implicados activamente en esta contracción; c) sensible al bloqueo de la ATPasa del RS: la aplicación de ACP durante la fase mantenida produjo inicialmente un aumento transitorio de la contracción, debido al Ca^{2+} acumulado en el citoplasma al bloquear la ATPasa. Este aumento nos indica que durante la fase mantenida la presencia de 7 μ M sería suficiente para que el poco Ca^{2+} que esté entrando al interior celular esté siendo rápidamente recaptado por el RS. Tras la contracción transitoria inicial, el nivel de contracción disminuyó lo que pone de manifiesto la necesidad una liberación continua de Ca^{2+} desde el RS para el mantenimiento de la contracción inducida por despolarización (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011); y d) sensible al inhibidor de ROCK: la concentración de fasudil necesaria para disminuir al 50% la contracción en presencia de 7 μ M fue 3 veces inferior que en condición control (2,5 mM Ca^{2+}). La participación de RhoA/ROCK en la contracción arterial sostenida en anillos arteriales despolarizados en condiciones fisiológicas se había puesto de manifiesto anteriormente (Sakurada *et al.*, 2003; Ratz *et al.*, 2005; Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). Sin embargo, estos estudios se llevaron a cabo aplicando despolarizaciones de corta duración (10-20 min), y la dependencia del Ca^{2+} de

la actividad de RhoA/ROCK se estudió inhibiendo el flujo de Ca^{2+} extracelular con altas concentraciones de CCBs (en el rango micromolar) o suprimiendo el Ca^{2+} extracelular con EGTA. Aunque estos estudios concluyen que la actividad de RhoA es dependiente de Ca^{2+} , no se conoce el nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ requerido para activar RhoA en los anillos arteriales durante las despolarizaciones de larga duración. Nuestros resultados muestran que la activación RhoA/ROCK es muy sensible a la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCCs. La medida de la actividad de RhoA en los anillos arteriales despolarizados durante 90 minutos indica que: a) en condiciones fisiológicas (anillos arteriales bañados con Ca^{2+} 2,5 mM) la contracción arterial aumentó con el tiempo, aunque no se detectaron cambios significativos en la actividad de RhoA; b) los anillos arteriales expuestos a $7 \mu\text{M}$ Ca^{2+} desarrollaron una marcada reducción de la contracción y actividad RhoA con respecto a 2,5 mM Ca^{2+} ; y c) curiosamente, en los anillos arteriales tratados con $7 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , el aumento de la contracción arterial observado después de 30 minutos de despolarización fue acompañado por un aumento significativo en la actividad de RhoA, lo que sugiere que se requiere un nivel de Ca^{2+} muy bajo para activar RhoA. Estos resultados se confirmaron con los experimentos en los que se permeabilizan las arterias con β -escina, en los que se observa una contracción arterial dependiente de Ca^{2+} y que es sensible a fasudil.

Cuando se aplicó una solución que provoca una menor despolarización de la membrana (solución 20K) en presencia de $7 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_e$ se generó también una contracción mantenida. Esta solución estaría desplazando el V_m a ~ -45 mV (Fransen *et al.*, 2012), suficiente para generar un pequeño aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando se aplica en presencia de 2,5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (ver figura 13). Sin embargo, aunque el número de canales que se puedan abrir con este nivel de despolarización sea muy reducido, no habría un alto nivel de inactivación dependiente de voltaje de los LTCCs, lo que generaría igualmente una corriente estacionaria de Ca^{2+} (Langton y Standen, 1993; Rubart *et al.*, 1996). Según estos datos, la ruta descrita estaría interviniendo en la respuesta vasoconstrictiva mediada por agonistas que pueden provocar pequeños cambios en el V_m del miocito arterial. En las VSMCs procedentes de aorta de rata, la vasopresina, la trombina y la endotelina, desplazan el V_m de $-50,8 \pm 11,3$ mV a $-43,3 \pm 3,6$ mV (Neylon *et al.*, 1994), suficiente para que esta ruta participe en la contracción.

A modo de resumen, la figura 53 muestra un modelo de los eventos que se producirían durante un pulso despolarizante de larga duración. De acuerdo con este

modelo, al inicio de la despolarización de la membrana plasmática se produce la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los LTCCs, activación de la ruta $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{MLCK}$ generando la componente rápida de la contracción. Si el estímulo es de larga duración, una gran proporción de LTCCs pasan a un estado inactivado. En condiciones fisiológicas (2,5 mM extracelular), existe un moderado flujo continuo de Ca^{2+} que se almacenaría en RS y liberado de manera continua al citoplasma a través de la vía LTCCs/PG/PLC/InsP₃R, manteniendo activa la ruta RhoA/ROCK y la contracción mediante la inhibición de MLCP. Este mecanismo puede también activarse cuando la entrada de Ca^{2+} está muy comprometida ($[\text{Ca}^{2+}]_e \sim 7 \mu\text{M}$). En estas condiciones el reducido flujo de Ca^{2+} sería suficiente para activar RhoA y la contracción. Una solución con $[\text{Ca}^{2+}]_e \sim 100 \text{ nM}$, resulta insuficiente para mantener activo este mecanismo, generándose una contracción transitoria.

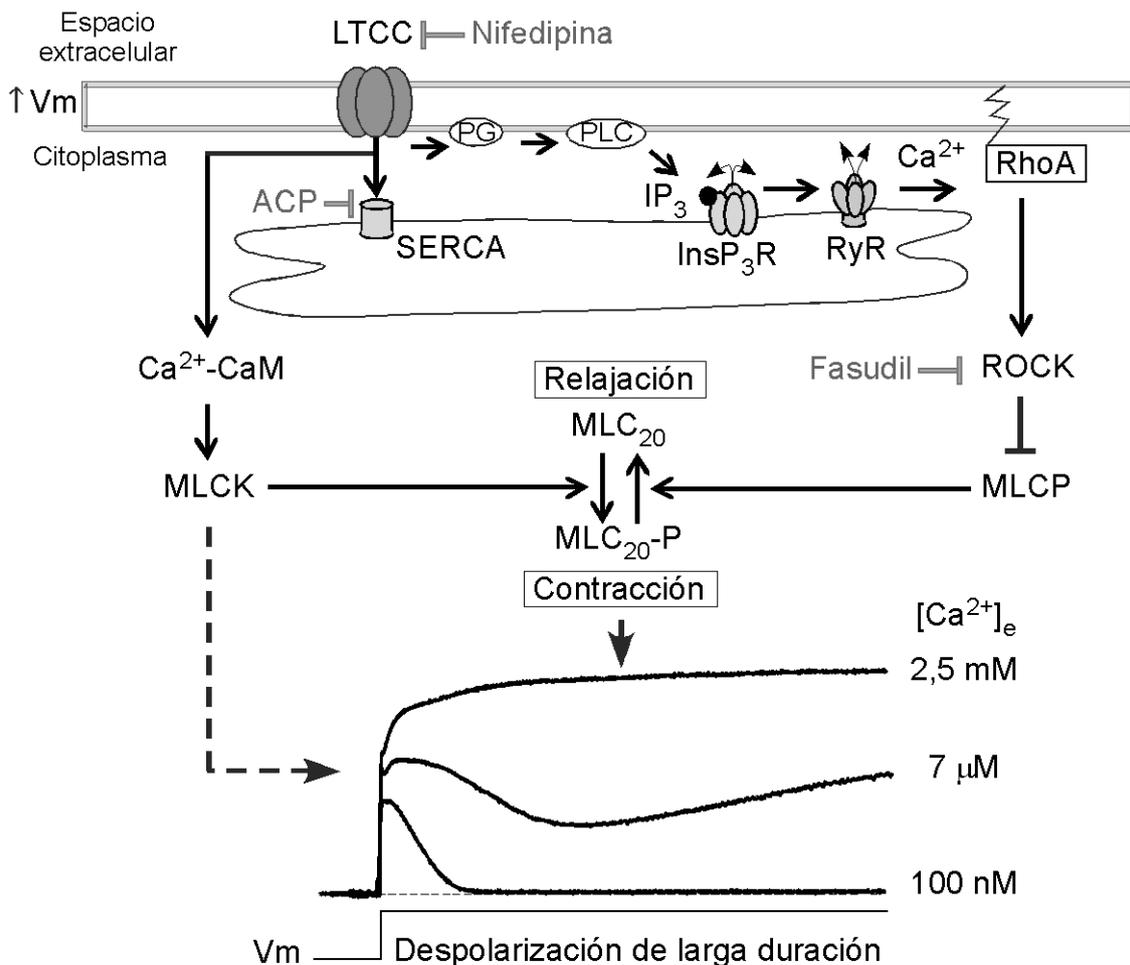


Figura 53: Modelo de los mecanismos implicados en la contracción mantenida inducida por despolarización de larga duración. Ver explicación en el texto. CaM, Calmodulina; InsP₃R, Receptor Inositol Trifosfato; PG, proteína G; PLC, fosfolipasa C; LTCCs, L-Type Calcium Channels; RS, Retículo Sarcoplásmico; RyR, Receptor de Rianodina.

Nuestros resultados proporcionan evidencias de que en situaciones fisiopatológicas donde las arterias permanecen despolarizadas durante largos períodos de tiempo (más de una hora), el aumento del tono arterial podría atribuirse a un pequeño flujo "constante" de Ca^{2+} a través de los LTCCs que no se han inactivado completamente, suficiente para activar la ruta RhoA/ROCK, la cual es muy sensible al nivel de Ca^{2+} citosólico.

3. Contribución del acoplamiento LTCCs-RS y RhoA/ ROCK en la contractilidad arterial en ratas espontáneamente hipertensas.

Con el fin de estudiar si la vasorreactividad mediada por el acoplamiento LTCCs-SR y los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} por la vía RhoA/ROCK pueden estar implicados en patologías vasculares, hemos realizado experimentos en un modelo animal de hipertensión esencial. Las ratas hipertensas presentaron una mayor respuesta contráctil tanto al estímulo despolarizante como a la activación directa por (\pm) Bay K 8644, un agonista de los LTCCs, lo que sugiere que pueden tener una mayor densidad de canales en la membrana plasmática (Pratt *et al.*, 2002; Pesic *et al.*, 2004). Las arterias procedentes de animales hipertensos no solo desarrollaron una mayor respuesta contráctil, sino que también presentaron una mayor sensibilidad al estímulo generando más fuerza con intensidades bajas de estímulo, lo que sugiere que los LTCCs pueden presentar diferencias en la cinética de activación e inactivación (Cox y Lozinskaya, 2008). Ya que durante la fase mantenida de la contracción inducida por activación de los LTCCs pueden estar interviniendo el RS y RhoA, es posible que este aumento de sensibilidad sea también debido a que estos elementos se encuentren alterados. La aplicación de cafeína y ACP, activador de RyR e inhibidor de la ATPasa del RS, respectivamente, indujo una contracción transitoria marcadamente potenciada en las arterias de animales SHR. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos (Kanagy *et al.*, 1994; Asano y Nomura, 2002). El RS puede estar jugando un papel importante reduciendo el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico consecuencia del aumento del flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} (Toyoda *et al.*, 1995). Al igual que muestran otros autores (Seasholtz *et al.*, 2001), el análisis de RhoA reveló un aumento de los niveles de esta proteína así como de su actividad en animales hipertensos. Por tanto, el aumento de contracción generado por la activación de los

LTCCs en ratas hipertensas podría estar mediado por la acción metabotrópica de los LTCCs a través de la liberación de Ca^{2+} desde el RS y la activación de RhoA (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011). Para evaluar el papel metabotrópico de los LTCCs, estos fueron activados mediante un estímulo despolarizante, en ausencia de Ca^{2+} externo (1 mM EGTA $[\text{Ca}^{2+}]_e = 100$ nM), generándose una respuesta transitoria que fue mayor en arterias de ratas SHR. Esta contracción se bloqueó con antagonistas de los LTCCs (nifedipina) y se mimetizó con agonistas (FPL 64176). Ya que este agonista no provoca cambios en el potencial de membrana (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2012), este resultado nos permite descartar que la contracción generada por 70K esté mediada por la activación de otras vías de señalización activadas por despolarización (Pitt *et al.*, 2005; De Crescenzo *et al.*, 2006; Mahaut-Smith *et al.*, 2008). Para comprobar si efectivamente el aumento de contracción inducido por la solución despolarizante en arterias procedentes de animales SHR en condiciones fisiológicas puede estar mediado por el CCICR se indujo el vaciado de los reservorios intracelulares en anillos de ratas SHR los que provocó una disminución de la fase mantenida de la contracción inducida por la solución despolarizante en presencia de calcio externo, hasta niveles similares a los registrados en arterias normotensas.

Aunque son necesarios más experimentos para determinar exactamente el grado de implicación del CCICR en la patología hipertensiva, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la potenciación de la respuesta mediada por la activación de los LTCCs, el RS y RhoA/ROCK en la hipertensión. Previamente, hemos demostrado que la aplicación aislada o conjunta de bajas concentraciones de bloqueantes de los LTCCs y / o inhibidores de ROCK reducen selectivamente el componente tónico de la contracción en la arterias despolarizadas, sin afectar la actividad eléctrica de los miocitos vasculares o la contractilidad de los miocitos cardíacos. Por esta razón, futuros experimentos irán orientados a comprobar la efectividad de tratamiento en este modelo de hipertensión arterial.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1.- La combinación CCBs e inhibidores de la ruta RhoA/ROCK a concentraciones bajas podría constituir una potencial estrategia terapéutica contra espasmos arteriales patológicos, disminuyendo los efectos secundarios.

1.1.- Bajas concentraciones de CCBs o inhibidores de la ruta RhoA/ROCK inhiben de manera selectiva la fase mantenida de la contracción arterial inducida por despolarización.

1.2.- La aplicación simultánea de ambos inhibidores a dosis inferiores a las necesarias para reducir el componente fásico de la contracción arterial inducida por la despolarización presenta un poderoso efecto inhibitorio sobre el tono arterial mantenido.

1.3.- Estos inhibidores, a las concentraciones estudiadas, no afectaron a las propiedades eléctricas de los miocitos vasculares ni a la contractilidad cardíaca.

2.- En situaciones fisiopatológicas donde las arterias permanecen despolarizadas durante largos períodos de tiempo (más de una hora), el aumento del tono arterial podría atribuirse a un pequeño flujo de Ca^{2+} a través de los LTCCs que no se han inactivado completamente, suficiente para activar la ruta RhoA/ROCK, que es muy sensible al Ca^{2+} citosólico.

2.1.- Durante un estímulo despolarizante, la contracción y la actividad de RhoA aumentan proporcionalmente al incrementar la $[Ca^{2+}]_e$.

2.2.- La aplicación de 20 nM nifedipina o la drástica disminución de Ca^{2+} en el medio extracelular (100 nM Ca^{2+}) reduce completamente la contracción inducida por la despolarización.

2.3.- En presencia de 7 μ M Ca^{2+} en el medio extracelular la despolarización generó una contracción mantenida que mostró el mismo curso temporal que la actividad de RhoA, y fue sensible a fasudil, nifedipina y ACP.

2.4.- El aumento de Ca^{2+} en anillos permeabilizados con β -escina, provocó una contracción arterial sensible a fasudil.

3.- La ruta metabotrópica que incluye la activación de los LTCCs, liberación de Ca^{2+} desde el RS y activación de RhoA se encuentra potenciada en el modelo animal de hipertensión SHR.

3.1.- Las ratas hipertensas presentaron una mayor respuesta contráctil y una mayor sensibilidad al estímulo despolarizante y a los agonistas de los LTCCs.

3.2.- La aplicación de cafeína y ACP indujeron una contracción transitoria marcadamente potenciada en las arterias de animales hipertensos.

3.3.- El análisis de RhoA reveló un aumento de los niveles de esta proteína así como de su actividad en animales hipertensos.

3.4.- En ausencia de Ca^{2+} externo (1 mM EGTA, $[\text{Ca}^{2+}]_e = 100 \text{ nM}$), el estímulo despolarizante provocó una respuesta transitoria que fue mayor en arterias de ratas hipertensas. Esta contracción se bloqueó con antagonistas de los LTCCs (nifedipina) y se mimetizó con agonistas.

3.5.- El vaciado de los reservorios intracelulares en anillos de ratas hipertensas provocó una disminución de la fase mantenida de la contracción inducida por la solución despolarizante en presencia de Ca^{2+} externo hasta niveles similares a los registrados en arterias normotensas

3.6.- El uso combinado de los bloqueantes de los LTCCs e inhibidores de ROCK podría constituir un tratamiento efectivo para reducir la hipertensión en este modelo animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Las distintas técnicas utilizadas en el este estudio se han clasificado en ocho apartados (1-8). En el primer apartado está relacionado con la obtención de muestras, en el segundo se explica cómo se llevan a cabo los cultivos celulares. En el tercer apartado se explican las técnicas fisiológicas realizadas en células, como la electrofisiología o la medida de Ca^{2+} citoplasmático. El cuarto apartado va dirigido a los registros fisiológicos realizados en tejido completo, como la medida de fuerza en arterias. Un quinto apartado está relacionado con medidas fisiológicas en animal completo, como es la medida de presión arterial en ratas. El sexto apartado recoge las técnicas bioquímicas, el séptimo apartado es para el análisis estadístico de los datos y en el último apartado se detalla la composición de las soluciones, tampones y reactivos utilizados para los experimentos.

1. Obtención de Muestras

1.1. Muestras animales

Para llevar a cabo los experimentos se han utilizado varios modelos animales. Se utilizaron ratas Wistar machos de entre 250-400 gramos de peso para la obtención de arterias basílicas, femorales y corazones para los estudios funcionales *in vitro*. Los cultivos de miocitos cardíacos se realizaron a partir de corazones de rata Wistar neonatales (0-3 días) de ambos sexos. Los estudios relacionados con la hipertensión se realizaron en un modelo de hipertensión sistémica con arterias femorales procedentes de ratas espontáneamente hipertensas (cepa “SHR”) y sus correspondientes controles (cepa “WKY”), usando machos adultos (15-20 semanas) con pesos comprendidos entre los 300-400 gramos de peso.

Todos los animales recibieron un tratamiento de acuerdo con la normativa vigente, Directiva 2010/63/UE respecto al uso de animales de experimentación y otros fines científicos y el Real Decreto 53/2013, del 8 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Las ratas adultas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de tiopental sódico. Las arterias fueron extraídas en solución Hank's (pH= 7,4; 4 °C) y, con mucho cuidado, se limpiaron de tejido adherente bajo la lupa. Para la medida de la contractilidad cardíaca, los animales se anestesiaron mediante administración intraperitoneal de una mezcla de Ketamina/Xylacina (80 mg/10 mg, respectivamente por kg de peso). Una vez anestesiado el animal, se procedió rápidamente a la extracción del corazón en solución Kreb's control a 4 °C. Las ratas neonatas se sacrificaron mediante decapitación, los corazones se extrajeron en solución PBS (pH= 7,4; 4 °C) y posteriormente bajo la lupa se eliminaron las dos aurículas y las válvulas aórtica y pulmonar, para la obtención de los ventrículos.

1.2. Muestras humanas

Las arterias coronarias humanas fueron proporcionadas por la Unidad de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario Virgen del Rocío (H.U.V.R). Se obtuvieron de 3 pacientes sometidos a trasplante cardíaco ortotópico que habían sufrido insuficiencia cardíaca por cardiomiopatía dilatada de origen isquémico (estadios II-IV de la New York Heart Association). Las arterias carótidas humanas se obtuvieron de 3 donantes y fueron proporcionadas por la Unidad de Coordinación de Trasplantes del H.U.V.R. La experimentación con tejidos humanos fue aprobada por el Comité Ético en Investigación Humana del H.U.V.R de Sevilla, siguiendo la normativa recogida en la Declaración de Helsinki.

2. Cultivos celulares

2.1. Cultivos de células musculares lisas

Las arterias tras ser extraídas y limpiadas en solución Hank's, se incubaron en una solución enzimática que contenía colagenasa (Sigma tipo IA, 725 unidades/ml), elastasa (Sigma tipo III, 0.5 mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA 2.5 mg/ml, disueltos en solución Hank's) durante 4 horas a 4 °C, y posteriormente a 37 °C 5-10 minutos. A continuación el tejido se transfirió a un tubo con solución Hank's donde, con la ayuda de una pipeta de vidrio pulida, se realizó una dispersión mecánica suave. Dependiendo del grado de disgregación del tejido tras el tratamiento mecánico, éste podía ser puesto de nuevo en solución enzimática a 37 °C. Las células dispersas fueron sembradas en pequeños cubres, dejando transcurrir entre 15 y 30 min para que éstas se adhieran a las superficie de los cubres antes de comenzar los experimentos (Figura 54). Al tratarse de un cultivo en agudo, las células se utilizaron en las dos horas siguientes a su dispersión.



Figura 54: Fotografía de las células obtenidas tras una dispersión de arteria basilar

2.2. Cultivos de miocitos cardíacos

Una vez obtenidos los ventrículos, se lavaron en PBS frío y estéril en la campana de flujo laminar, se trocearon en fragmentos de $\sim 1\text{mm}^3$ y posteriormente se procedió a una dispersión enzimática mediante 4 tripsinizaciones (Sigma, 0,25% p/v) sucesivas de 20 minutos cada una en un baño a 37 °C con agitación suave. Tras cada tripsinización la fracción dispersa se recogió con una pipeta, se pasó a un tubo limpio y para la inactivación de la enzima se les añadió 1ml de suero bovino fetal (FBS). Para retirar completamente la enzima del medio, estas fracciones se centrifugaron durante 5 min a 1.500 rpm, el pellet resultante se resuspendió en 1ml de FBS y se mantuvo en un intubador (95% aire, 5% CO₂ a 37 °C) hasta la dispersión completa del tejido. Una vez disperso todo el tejido, se unieron las fracciones y se volvieron a centrifugar durante 8 min a 1500rpm y el pellet de células se resuspendió en medio completo para cardiomiocitos. Dado que los fibroblastos se pegan a las placas de cultivo más rápido que los cardiomiocitos (Polinger, 1970), se realizó un preplaqueo de las células de ~ 1 h en el incubador. Tras este tiempo se recogieron las células no adheridas (principalmente cardiomiocitos) y fueron sembradas en pequeños cubres dispuestos en placas de cultivo y se mantuvieron en el incubador hasta el día siguiente (Figura 55). Los cultivos fueron usados hasta un máximo de 72 h tras su obtención.

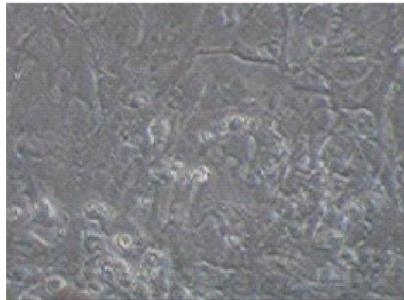


Figura 55: Cultivo de cardiomiocitos neonatos de rata

3. Técnicas electrofisiológicas y microfluorimétricas en células dispersas

3.1. Registros electrofisiológicos mediante la técnica de "patch-clamp" en células aisladas

El registro de las corrientes macroscópicas de Ca^{2+} se realizó mediante la técnica "patch-clamp" en su configuración "whole-cell". Para ello se coloca un electrodo en contacto con el interior celular (Electrodo de registro) y otro con el medio externo (Electrodo de referencia), permitiendo registrar los cambios eléctricos que se producen en la célula completa. Los pequeños cubreobjetos con las células adheridas se pasan a una cámara de metacrilato colocada en un microscopio invertido (Zeiss Axiovert 200). La cámara está continuamente perfundida mediante gravedad con solución fisiológica de registro a temperatura ambiente. En esta cámara donde se encuentran las células, se introduce una micropipeta de vidrio rellena con la solución interna conectada a un amplificador mediante un hilo de plata clorurada. Con mucho cuidado y con ayuda de un micromanipulador (Newport PZC200-KT) se coloca la pipeta cerca de la membrana celular y se produce la unión de la membrana a la pipeta (establecimiento del sello). Una vez realizado el sello se aplica una pequeña presión negativa al interior de la pipeta que provoca la rotura de la membrana delimitada por ésta, de esta forma el contenido de la pipeta difunde al citoplasma y el electrodo queda en contacto con el interior celular. En este punto se puede fijar el potencial de membrana de la célula a distintos valores y registrar las corrientes iónicas que se generan como consecuencia de la apertura de los canales dependientes de voltaje (modalidad fijación de voltaje), o registrar los cambios en el potencial de membrana (modalidad fijación de corriente).

Las corrientes de Ca^{2+} se registraron con un amplificador EPC-7 (HEKA). La señal se filtró a 3 kHz y se digitalizó con un intervalo de muestreo de 20 μs (para el pulso de 10ms) o 40 μs (para el pulso de 500 ms) mediante una interfaz A/D LIH1600 (HEKA). Para el registro y el análisis de las corrientes se utilizaron los programas Pulse y Pulsefit (versión 8.64, HEKA) (Figura 56).

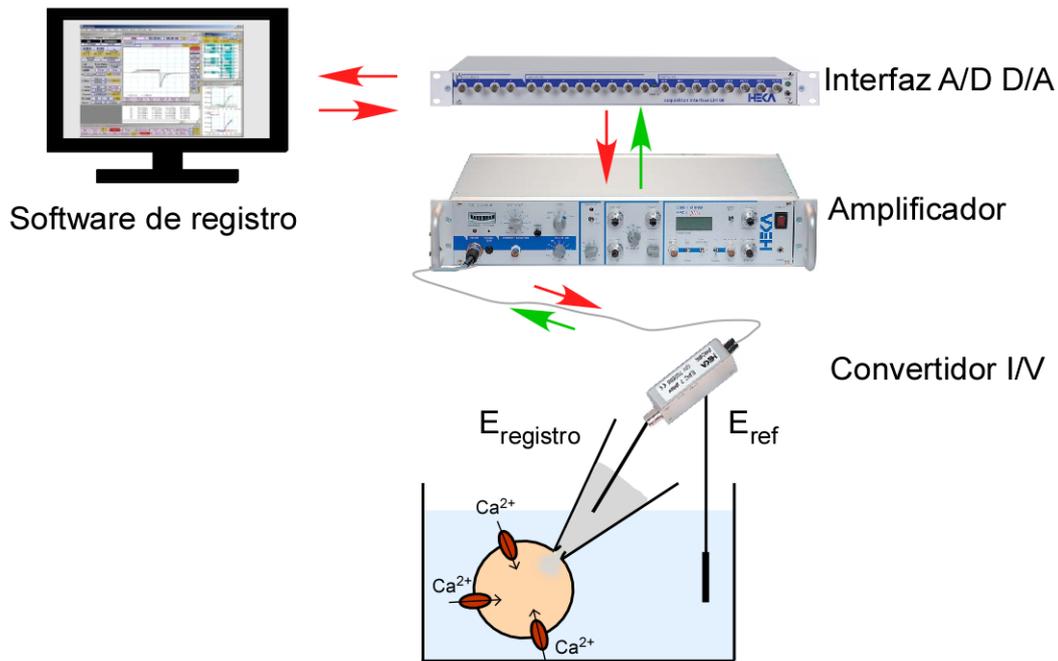


Figura 56: Esquema del "set up" utilizado para el registro de corrientes de Ca^{2+} . Una vez abierto el sello, el electrodo queda en contacto con el interior celular, este electrodo está conectado a un convertidor I/V y este a un amplificador. La señal analógica procedente de la célula (flecha verde) se digitaliza gracias a la interfaz. Mediante un software que funciona a la vez de osciloscopio se registra la señal.

Los registros de los potenciales de acción en cardiomiocitos se llevaron a cabo con un amplificador EPC-10 UBS (HEKA). La señal se filtró a 10 kHz y se digitalizó con un intervalo de 20 μ s. Para la adquisición de los datos se utilizó el programa PatchMaster (versión v2x73.3, HEKA) y para el análisis el programa IGOR PRO (versión 6.22A).

3.2. Registro de la concentración de Ca^{2+} citosólico en células aisladas

La medida de la $[Ca^{2+}]$ citosólico se realizó mediante el uso de la forma permeable del indicador fluorescente Fura-2 (Fura-2 AM). El Fura-2 es una molécula derivada del BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), con capacidad de unirse a Ca^{2+} libre con mayor afinidad que otros iones divalentes (Grynkiewicz et al, 1985).

Este indicador muestra una característica, su espectro de excitación varía según la concentración de Ca^{2+} (Figura 57). Esto permite trabajar con la ratio de las fluorescencias emitidas cuando se excita a dos λ distintas, de tal forma que los cambios observados solo serán debidos a los cambios en la concentración del ion y no a otros efectos experimentales no deseados como la concentración y distribución del colorante dentro de las células, cambios en el volumen celular o el efecto de la pérdida de la fluorescencia producido por el fotoblanqueo. En el caso del Fura-2, la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico viene determinada por la intensidad de la fluorescencia emitida a 510 nm, registrada cuando se excita el colorante a 340 nm (F_{340}) y a 380 nm (F_{380}), ya que son dos λ de excitación donde los cambios de intensidad son más sensibles a la concentración de Ca^{2+} .

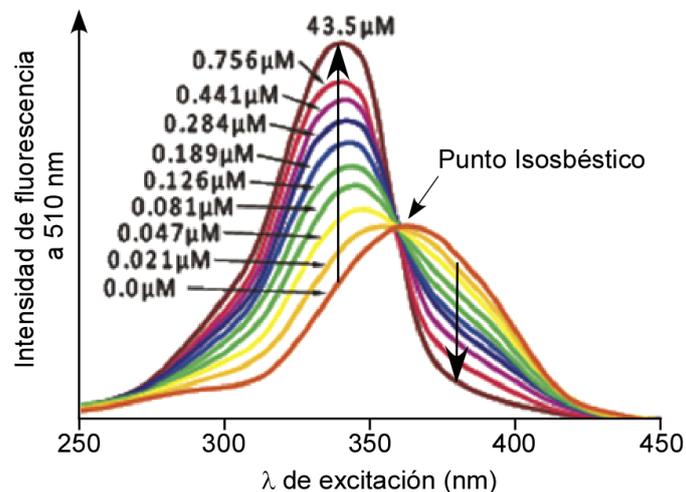


Figura 57: Espectro de excitación del Fura-2. Cuando el fura es excitado con una longitud de onda (λ) entre 250-360 nm, la intensidad de la fluorescencia emitida a 510 nm aumenta conforme incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$ presentando un máximo a 340 nm, cuando el rango de excitación está entre 360-450 nm, esta relación se invierte, disminuyendo la fluorescencia a medida que aumenta la concentración del ion. El punto que delimita estos dos intervalos se denomina "punto isobéptico". En este punto, la intensidad de fluorescencia es independiente de la concentración de Ca^{2+} .

Una vez realizada la dispersión celular, las células sembradas en los cubres, se incubaron a temperatura ambiente en solución Hank's + 1,4 μM de Fura-2 AM, durante 30 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo se pasaron a una placa con Hank's para lavar el exceso de colorante. Uno de los cubres se deposita en la camarita de metacrilato situada en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 equipado con un sistema de epifluorescencia. Una bomba peristáltica perfunde continuamente la cámara con

solución fisiológica de registro (PSS, "physiological saline solution") a temperatura ambiente.

En la figura 58 se representa el dispositivo experimental usado para medir la [Ca] citosólico. Un monocromador (Polichron V, T.I.L.L. Photonics) equipado con una lámpara de Xenón (Ushio) selecciona y emite alternativamente las dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm). El haz de luz viaja por una fibra óptica y es reflejado hacia la muestra por un espejo dicróico (BPS430). La fluorescencia emitida por la muestra atraviesa el espejo dicróico, un filtro de emisión (ET510/80m, Chroma), y es detectada por una cámara CCD (C11440 Orac-Flash 4.0, Hamamatsu). La información procedente de la cámara es monitorizada a tiempo real gracias al programa de registro Acuacosmos 2.6 (Hamamatsu). Este programa permite controlar el sistema determinando los parámetros de excitación y adquisición. En este caso los experimentos se realizaron con una resolución espacial de 4x4 píxeles, un tiempo de exposición de 10 ms, y un intervalo de muestreo de 500 ms.

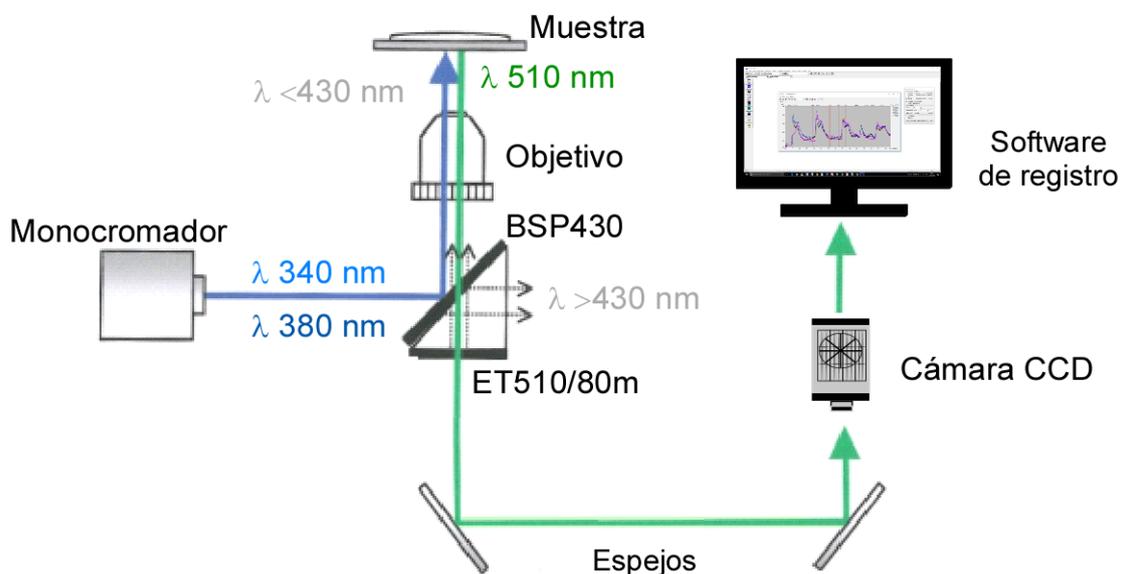


Figura 58: Esquema representativo del "set up" para el registro de la concentración de Ca^{2+} citosólico en células dispersas. El monocromador selecciona y emite las dos λ de excitación (340 y 380 nm), mientras que el haz de luz es reflejado hacia la muestra por un espejo dicróico (BPS430). La fluorescencia emitida por la muestra atraviesa el espejo dicróico y un filtro de emisión (ET510/80m), y finalmente es detectada por una cámara CCD y monitorizada mediante el software de registro.

4. Registros funcionales en órganos

4.1. Medida de la fuerza isométrica.

Para la medida de la fuerza isométrica ejercida por las arterias se usó un miógrafo de Mulvany-Halpern multicámara DMT 610M (Cibertec) y el programa de análisis AcqKnowledge 3.8.1(Figura 59A). Las arterias, tras su extracción y cuidadosa limpieza en solución Hank's, fueron cortadas en anillos de aproximadamente 2 mm de longitud.

Para el montaje de los anillos en el miógrafo se usaron dos hilos de acero inoxidable de 40 μm de diámetro, que se introdujeron a través del anillo arterial y se fijaron a unos soportes sumergidos en el interior de cada uno de los baños del miógrafo. Uno de los soportes está conectado a un micrómetro, lo que permite controlar la distancia entre los soportes y medir la circunferencia interna del vaso. El otro soporte esta unido a un transductor de fuerza capaz de medir la tensión desarrollada (figura 59B, C y D).

Los anillos arteriales estaban bañados en solución fisiológica Kreb's burbujeada constantemente con carbógeno (5% de CO_2 y 95% de O_2), a 30 °C en el caso de arteria basilar, o 37 °C en el caso de arteria femoral. Tras el montaje, los anillos se dejaron durante 30 min sin tensión para su estabilización. La normalización de la tensión se realizó con el programa MyoNorm. Mediante este proceso se determinó la tensión basal óptima a la que debe estar sometida cada anillo arterial, que se correspondería con un 90% de la tensión que tendría una arteria *in vivo* con una presión transmural de 100 mmHg (Mulvany y Halpern, 1977). Los anillos se mantuvieron con la tensión basal obtenida al menos durante 30 min, para su estabilización antes de comenzar los experimentos.

El recambio de las cámaras se realizó de manera discontinua con ayuda de una bomba de vacío y la administración de la nueva solución mediante una jeringa. Los fármacos utilizados fueron administrados directamente en la cámara. El estímulo de alto K^+ se realizó mediante el recambio de la cámara con una solución isosmótica con la concentración de K^+ deseada.

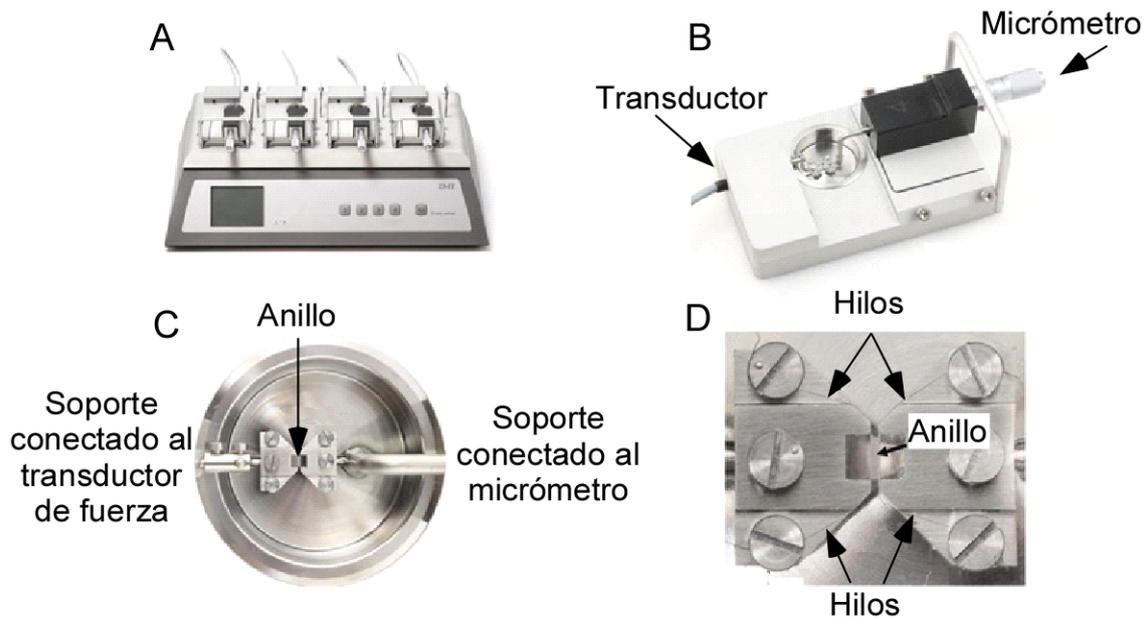


Figura 59: Sistema de registro de fuerza isométrica en anillos arteriales. (A) Miógrafo de Mulvany-Halpern con cuatro cámaras de registro. (B) Cada cámara contiene un transductor de fuerza (izquierda) y un micrómetro (derecha), los cuales están conectados a los soportes que mantienen el anillo en el interior de la cámara. (C) Detalle de la cámara con los soportes y un segmento arterial montado. (D) Detalle del anillo arterial anclado a los soportes por unos hilos de acero inoxidable.

4.1.1 Permeabilización de los anillos arteriales con β -escina

Con objeto de controlar la $[Ca^{2+}]$ citosólico en anillos arteriales, se realizaron experimentos en arterias permeabilizadas con β -escina. β -escina, es una saponina que se ha utilizado ampliamente para estudios fisiológicos y farmacológicos en músculo liso, ya que permeabiliza la membrana celular preservando al mismo tiempo la señalización celular de receptores acoplados a proteínas G (Akagi *et al.*, 1999).

La permeabilización se llevo a cabo siguiendo las indicaciones de protocolos previos (Choi *et al.*, 2009). Los anillos arteriales se montaron en el miógrafo en solución Hepes a temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}C$) y se sometieron a la tensión optima tras la normalización. Primero se testó la viabilidad de los anillos con una solución Hepes con alto K^{+} , y posteriormente se incubaron en solución de relajación durante 5 min. La permeabilización celular se obtuvo incubando con β -escina (100 μM) en solución de relajación durante 50 min a temperatura ambiente. Antes de comenzar a aplicar las soluciones con distintas concentraciones de Ca^{2+} , la β -escina fue retirada de las cámaras mediante varios lavados con solución de relajación.

4.2 Registro simultáneo de los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico y el diámetro arterial.

Las arterias, tras su extracción y retirada de las meninges, fueron incubadas en solución Hank's en presencia de Fura-2 AM (4 μM) durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, fueron montadas en un arteriógrafo (CH-1, Living Systems Instrumentation). Para ello, los extremos de la arteria se introducen en unas micropipetas de vidrio de 150-200 μm de diámetro y se anclan con hilos de monofilamento de poliamida 10/0 (Figura 60, recuadro). Este arteriógrafo consta de una cámara acoplada a un equipo de presión (PS-200, Living Systems Instrumentation), que perfunde internamente la arteria con solución Hank's manteniendo la presión transmural a 60 mmHg. Externamente la arteria está bañada por una solución fisiológica (Kreb's) burbujeada con carbógeno (5% CO_2 y 95% de O_2), a una temperatura de 30 °C, la cual es recambiada continuamente con una bomba peristáltica (Ismatec).

Para realizar las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico y el diámetro arterial, la cámara se coloca en un microscopio Zeiss Axiovert 35 equipado con epifluorescencia (Figura 60). Un monocromador (Polichron IV, T.I.L.L. Photonics) excita el colorante a 340 y 380 nm. Estas λ son desviadas hacia la muestra por un espejo dicróico (BSP430). La fluorescencia emitida pasa por el espejo dicróico y el filtro de emisión (LWP 470). La selección definitiva de la radiación cercana a 510 nm se realizó con un espejo dicróico (585DCXR) que desvía fluorescencia emitida a un tubo multiplicador (PMT) (Ion Optix). La señal recogida pasa a un sistema de interfaz de fluorescencia (Ion Optix) y se monitoriza mediante el software de registro Ion Wizard 4.4 (Ion Optix). Para registrar simultáneamente el diámetro arterial y $[\text{Ca}^{2+}]$ necesitamos obtener la imagen de la arteria. Para ello el condensador del microscopio dispone de un filtro rojo que bloquea aquella $\lambda < \sim 600$ nm. El haz de luz roja es recogido por la cámara CCD MyoCam (Ion Optix) y proporciona una imagen continua de la arteria. Mediante el software de registro Ion Wizard 4.4 (Ion Optix) se detectan los bordes, obteniéndose el diámetro arterial.

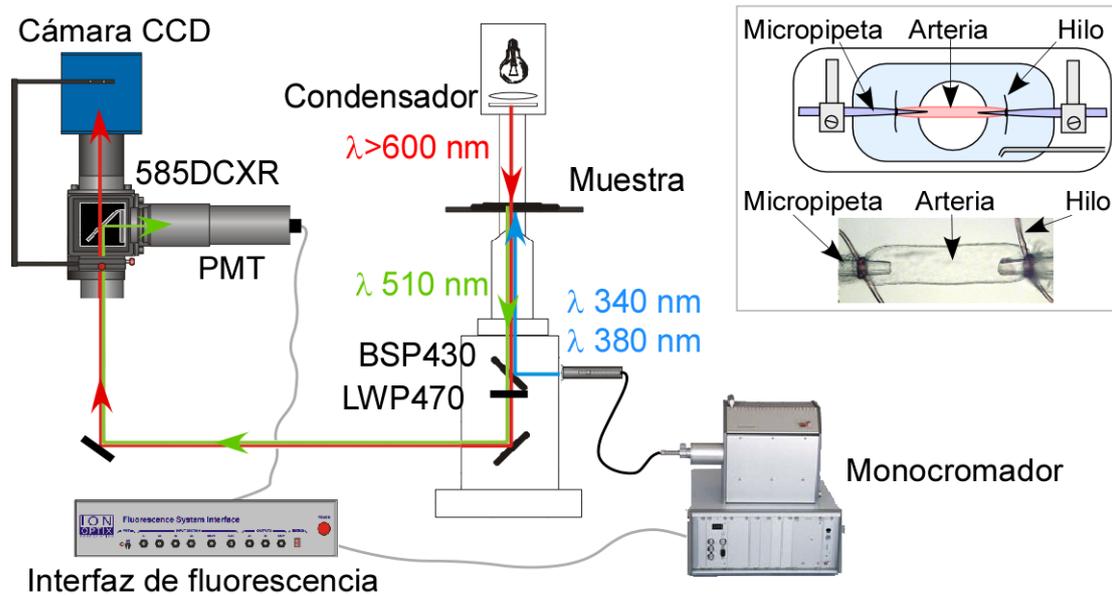


Figura 60: Esquema del Set-up para el registro simultáneo de la $[Ca^{2+}]$ y el diámetro arterial. El monocromador selecciona y emite las dos λ de excitación (340 y 380 nm), el haz de luz es reflejado hacia la muestra por un espejo dichroico (BSP430). La fluorescencia emitida por la muestra atraviesa el espejo dichroico y un filtro de emisión (LWP 470), finalmente es detectada por una cámara CCD y monitorizada mediante el software de registro. La selección definitiva se realiza con un espejo dichroico (585DCXR) que desvía la fluorescencia emitida a un tubo multiplicador (PMT), la señal recogida pasa a un sistema de interfaz de fluorescencia. Para la obtención de la imagen de la arteria, un filtro rojo en el condensador selecciona $\lambda < \sim 600$ nm. Este haz de luz roja será definitivamente recogido por la cámara CCD. El recuadro a la derecha es una representación esquemática del arteriógrafo.

4.3. Registro de la contractilidad cardíaca en corazón aislado mediante el sistema

Langendorff.

Una vez extraído el corazón, es sumergido en solución Krebs control 4 °C. Rápidamente se introduce una cánula en la aorta y se fija con un hilo de seda. La cánula se conecta al sistema de perfusión que va a perfundir de manera retrógrada el corazón. La solución fisiológica (Krebs control burbujeado con carbógeno a 37 °C) es bombeada a través de la aorta con una velocidad constante, manteniendo una presión de perfusión adecuada (60-80 mmHg). El flujo se desvía hacia las coronarias, nutriendo la masa ventricular, sin existir llenado ventricular. Un transductor de presión registra la presión de perfusión coronaria (PPC) (Figura 61).

Para realizar la evaluación de la función isovolumétrica del ventrículo izquierdo se introduce un balón de látex en el mismo. Este balón está conectado a una jeringuilla de precisión rellena de agua destilada y a un transductor de presión. Mediante esta

jeringuilla se infla el balón hasta alcanzar una presión de 8-12 mmHg, manteniendo este volumen constante durante toda la experiencia.

Por último, se colocan dos electrodos marcapasos (uno en la aurícula derecha y otro en la izquierda) para mantener la frecuencia cardíaca constante (290 latidos/min) durante todo el experimento, y tres electrodos (uno en la aurícula derecha, otro en la izquierda y otro en el ápex del corazón) para el registro del electrocardiograma.

La adquisición de estas variables analógicas se realizó con el sistema de registro Power Lab (AD instruments) y el programa informático Chart 5.0 (AD instruments). La medida de la contractilidad cardíaca se obtiene de manera indirecta a través de la derivada I en el tiempo de la presión del ventrículo izquierdo ($\pm dp/dt$). Antes de comenzar el experimento se deja un periodo de estabilización de 30 minutos. Los diferentes tratamientos se administraron mediante una bomba de jeringa (Vial Medical Program 2 Becton Dickinson).

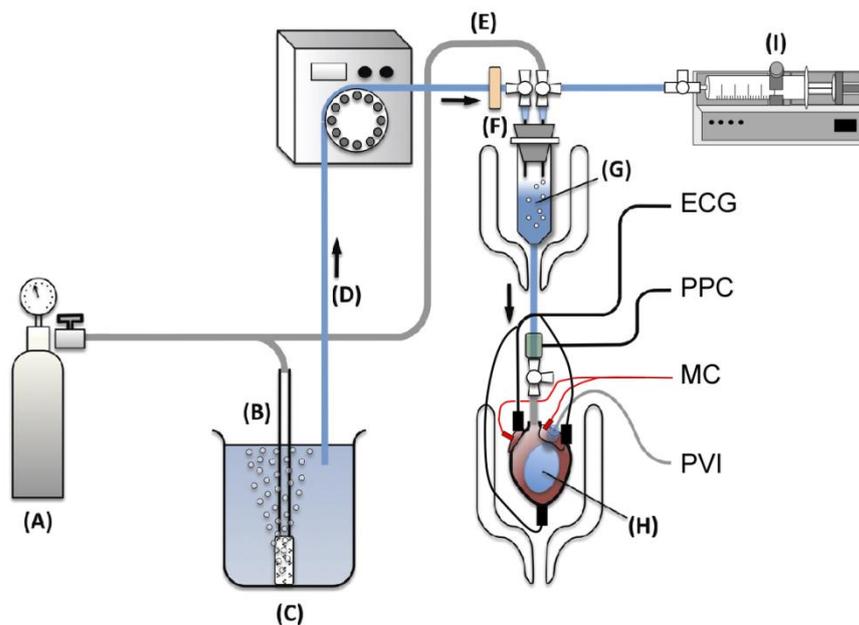


Figura 61: Esquema del sistema Langendorff. (A) Bombona de carbógeno, (B) tubo de dispersión de gas, (C) depósito Krebs a 37 °C, (D) tubo de perfusión, (E) tubo para distribuir el carbógeno, (F) filtro atrapaburbujas, (G) cámara, (H) globo, (I) Bomba de jeringa. Un marcapasos (MC) mantiene la frecuencia cardíaca, el registro electrocardiográfico (ECG) del corazón se obtiene mediante tres electrodos colocados en el epicardio. La presión de perfusión coronaria (PPC) se mide a través de un transductor de presión colocado en la línea de perfusión aórtica. La presión del ventrículo izquierdo (PVI) se mide a través de un balón, insertado en dicha cámara, conectado a un transductor de presión. La infusión de agentes farmacológicos se llevó a cabo mediante una bomba de jeringa colocada a la entrada de la línea de perfusión aórtica. (Modificado de Ronglih, et al. 2012).

5. Medida de la presión arterial en ratas

Para la medida de la presión arterial en ratas se utilizó el sistema no invasivo de medida de presión arterial en la cola, BP-2000 series II (Visitech Systems). El equipo se basa en el uso de la fotopletismografía de transmisión, en la que las variaciones en la cantidad de luz transmitida a través de la cola es la señal básica que se analiza para determinar la presión arterial. Cada vez que late el corazón, una onda de presión viaja a través del sistema vascular. Cuando llega a la cola, los vasos se dilatan ligeramente y, por lo tanto, dispersan más la luz roja (esto corresponde a la sístole). A medida que la onda de presión pasa, los vasos de la cola se hacen más pequeños a medida que la presión disminuye y se dispersa menos luz, (esto corresponde a la diástole.)

La medida de presión de arterial se realizó con el animal consciente. Éste se introdujo en un cepo, inmovilizándolo y dejando libre la cola para poder realizar la medición. El cepo con el animal se coloca en la plataforma calefactora donde se encuentran el fotopletismógrafo y el manguito de oclusión (figura 62). Se introduce la cola por el manguito y se coloca encima del pletismógrafo. Éste presenta una luz LED en la parte superior, y en la parte inferior el fotodetector. Un software de registro monitoriza la señal y determina los valores de presión sistólica, diastólica y de pulso.

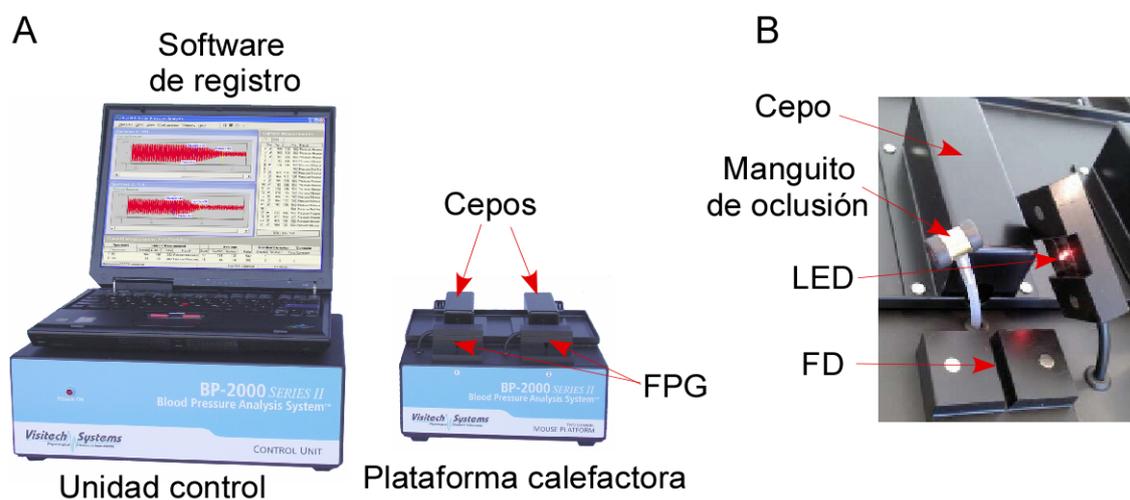


Figura 62: Sistema de medida de presión arterial en ratas. (A) El equipo se compone de una plataforma calefactora donde se coloca el cepo con el animal, donde se encuentran el fotopletismógrafo (FPG) y el manguito de presión. Esta plataforma está conectada a una unidad control y al software de registro. (B) Detalle del FPG, en la parte superior presenta un diodo emisor de luz (LED) y en la parte inferior el fotodetector (FD).

Dado que los animales se encuentran conscientes, éstos fueron entrenados durante dos semanas realizando mediciones en días alternos para obtener resultados más reproducibles. Se realizaron un mínimo de 5 mediciones preliminares en cada sesión hasta detectar un flujo óptimo en la cola, lo que también permite que el animal se habitúe antes de realizar las mediciones reales.

6. Técnicas bioquímicas

6.1. Medida de la actividad de RhoA mediante G-LISA

Para la medida de la actividad de RhoA se usó el kit G-LISA (bk 124, Cytoskeleton), el cual es una modificación de la técnica ELISA convencional ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"). El ensayo del G-LISA utiliza una placa de 96 pocillos cuya base está recubierta de un sustrato con un dominio RBD ("Rho binding domain") presente en las proteínas efectoras de la familia Rho, de tal forma que sólo la forma activa de la proteína (Rho unida a GTP) se unirá a la placa. La determinación de RhoA activa se lleva a cabo por inmunoabsorbancia indirecta, mediante la incubación con un anticuerpo primario específico de RhoA y un anticuerpo secundario conjugado con HRP ("Horseradish Peroxidase"). Esta enzima cataliza una reacción que genera un producto coloreado que puede ser cuantificado midiendo la absorbancia a 490 nm.

Para llevar a cabo este ensayo, los anillos arteriales tras ser incubados con el tratamiento correspondiente fueron rápidamente congelados por inmersión en nitrógeno líquido y guardados a -80 °C hasta su utilización. El día del ensayo, el tejido fue homogenizado mecánicamente en el tampón de lisis proporcionado por el kit a 4 °C, con la ayuda de un kit comercial (Sample Grinding Kit, GE Healthcare). Este kit proporciona una resina abrasiva y un pistilo para disgregar la muestra. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 16100 g a 4 °C. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se volvió a centrifugar durante 10 min a 16100 g a 4 °C para asegurarnos de que las muestras quedan libres de restos celulares. El extracto proteico obtenido fue cuantificado con el reactivo proporcionado por el kit, el cual se torna de rojo a púrpura o azul dependiendo de la cantidad de proteínas, aumentando la absorbancia de la muestra cuando se mide a 600 nm. Una vez que se conoce la concentración de proteínas de cada muestra (~0,7-2 mg/ml), se igualaron entre ellas y se procedió a la realización del

ensayo siguiendo el protocolo proporcionado en el kit. Las muestras se cargaron por triplicado en cada ensayo y al menos se realizaron tres ensayos por experimento.

6.2. Medida de la RhoA mediante *Western blot*

La cuantificación de proteína RhoA en arteria procedentes de ratas hipertensas se realizó por *Western blot*. Para llevar a cabo esta técnica las arterias, tras ser limpiadas y extraídas en Hank's, fueron rápidamente congeladas por inmersión en nitrógeno líquido y guardadas a -80 °C. El tejido fue homogenizado mecánicamente en el tampón de lisis a 4 °C, con la ayuda de un kit comercial (Sample Grinding Kit, GE Healthcare), como se ha comentado en el punto anterior. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas 10 min a 16100 g (4 °C). El sobrenadante se pasó a otro tubo y se volvió a centrifugar durante 10 min a 16100 g (4 °C) para asegurarnos de que las muestras quedan libres de restos celulares. El extracto proteico obtenido fue cuantificado por el método Bradford. Se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 30 µg de proteína. Ese volumen de muestra se mezcló con el tampón de carga y se calentaron 5 minutos a 95°C. Una vez desnaturalizadas, las muestras se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE) en geles al 10% de acrilamida (sistema Mini-Protean, Biorad) a 100 mV. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas Polivinildenedifloride (PVDF) (BioRad), previamente activadas con metanol, en un sistema de transferencia húmeda (Biorad), con un tampón de transferencia, durante 2 horas a 200 mA a 4°C. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, éstas se incubaron en una solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubó toda la noche a 4°C en solución de bloqueo con los anticuerpos primarios (RhoA (dilución 1:500, proporcionado por el Kit de G-LISA; y α Tubulina, Sigma, (dilución 1:10000) como control de carga). Al día siguiente, tras 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario ECL anti-mouse IgG (GE Healthcare), se procedió al revelado de las bandas mediante las soluciones de revelado quimioluminiscente ECL (GE Healthcare) y el sistema ImageQuant LAS 4000 mini, (GE Healthcare) que genera las imágenes para la detección y cuantificación de la quimioluminiscencia. El programa utilizado para el análisis de imágenes fue el ImageQuant LC.

7. Análisis estadístico de los datos

Los datos se presentan como la media \pm error estándar. Las diferencias fueron analizadas mediante el programa estadístico SPSS. Con objeto de buscar relaciones entre variables mediante pruebas paramétricas es necesario comprobar si las variables en cuestión cumplen con los requisitos necesarios para este tipo de pruebas, es decir, si presentan una curva de distribución normal (mediante el test estadístico de Shapiro-Wilk) y uniformidad de las varianzas (se determinó con el estadístico de Levene).

Las pruebas paramétricas utilizadas fueron: *t* de Student, para la comparación de medias entre dos grupos (pareada, para grupos relacionados, o no pareada, para grupos independientes); la comparación entre más de dos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para grupos independientes, seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples; o el análisis de la varianza de medidas repetidas para varios grupos relacionados entre sí.

Si las variables a analizar no presentaron una curva de distribución normal o no cumplieron el criterio de igualdad de varianzas, las comparaciones se llevaron a cabo mediante pruebas no paramétricas: *U* de Mann-Whitney, para dos grupos independientes, o la prueba *H* de Kruskal-Wallis, para las comparaciones entre más de dos grupos independientes, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney para comparaciones dos a dos.

Las diferencias se han considerado significativas cuando *p* es inferior a 0,05 (*), inferior a 0,01(**) o inferior a 0,005 (***)).

8. Soluciones, tampones y reactivos

La composición en mM de las soluciones usadas, fueron las siguientes:

- Solución PBS: NaCl, 137; KCl, 2,68; KH₂PO₄, 1,76; Na₂HPO₄, 4,02 (pH 7,4).
- Solución Hank's: NaCl, 125; KCl, 5,36; KH₂PO₄, 0,44; NaHCO₃, 5; Na₂HPO₄, 0,34; HEPES, 10; Sacarosa 1,5 y Glucosa, 10 (pH 7,4).
- Solución PSS: NaCl, 140; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2,5; HEPES, 10; y Glucosa, 10 (pH 7,4).

- Solución Kreb's: NaCl, 119; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,17; NaHCO₃, 24; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,17 y Glucosa, 5,5 (pH 7,4). Esta solución fue continuamente burbujeada con carbógeno (5% CO₂ y 95% de O₂) manteniendo el pH a 7,4.
- Solución Hepes: NaCl 130, KCl 4, KH₂HPO₄, 1,18, NaHCO₃, 4, CaCl₂, 2,5, MgSO₄, 1,2, glucosa 6, Hepes 10, pH 7,4.
- Solución Relajante: potassium methanesulfonate, 74,1; EGTA, 4; MgSO₄, 4; piperazine-*N,N*-bis[2-ethanesulfonic acid] (PIPES), 30; fosfocreatina, 5; Na₂ATP, 4; calmodulina 0,001 and glucosa 5,5, pH 7,1.
- Soluciones Internas. Para el registro de corrientes de Ca²⁺ en miocitos de rata la composición fue (en mM) CsCl, 130, MgCl₂, 1; EGTA, 5; glucosa, 10; Na₂ATP, 2; GTP, 0,5; Hepes, 10; pH 7,2. Para el registro de potenciales de acción en cardiomiocitos la composición fue (en mM) KCl, 140; MgCl₂, 1; Hepes, 10; phosphocreatina, 5; EGTA, 1; Na-ATP, 4; pH 7,2.
- Soluciones Externas. Para el registro de corrientes de Ca²⁺ en miocitos de rata la composición fue (en mM) NaCl, 130; KCl, 5,4; BaCl₂, 10; glucosa, 10; Hepes, 10; pH 7,4. Para el registro de potenciales de acción en cardiomiocitos la composición fue (en mM) NaCl, 140; KCl, 5; MgCl₂, 2; CaCl₂, 2; Hepes, 15; glucosa, 25; pH 7,4.

Las soluciones de alto K⁺ se consiguieron sustituyendo isosmóticamente NaCl por KCl. En las soluciones Kreb's con 7 μM y 100 nM [Ca²⁺], el CaCl₂ fue omitido. Además, en el caso de la solución de 100 nM se añadió 1 mM de EGTA. La [Ca²⁺] en estas soluciones se midió con el electrodo Orion Calcium Electrode (Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante (Fernandez-Tenorio, et al., 2011).

En el caso de los registros en arterias permeabilizadas, la concentración final deseada de Ca²⁺ libre se obtuvo añadiendo CaCl₂ a la solución de relajación. La cantidad de CaCl₂ que se debía añadir se calculó usando el programa Maxchelator (<http://maxchelator.stanford.edu/>).

La composición de los tampones para las técnicas bioquímicas fue la siguiente:

-Tampón de lisis (en mM): NaCl, 250; KCl, 5; EDTA, 5; Hepes, 50, NP-40, 0,2% (v/v); pH 7,4. En el momento de usar se añadió 5 mM de 1,4-Dithiothreitol (DTT), un cóctel de inhibidores de proteasas (sigma) a una concentración final de 1/100, 1 mM de ortovanadato sódico (Na₃VO₄) y 1 mM de fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF).

-Tampón de carga: Tris base, 250 mM; dodecilsulfato sódico (SDS), 4% (p/v); glicerol, 25% (v/v); azul de bromofenol, 1 mg/ml; pH 6,8. En el momento de utilización se añade β -mercaptoetanol al 5% (v/v).

-Gel separador: Tris base, 375 mM; SDS, 0,1%; Acrilamida/bisacrilamida (29/1), 10% (v/v); perulfato de amonio (APS), 0,15% (p/v); tetrametiletilendiamina (TEMED), 0,1% (v/v); pH 6,8.

-Gel compactador: Tris base, 125 mM; SDS, 0,1%; Acrilamida/bisacrilamida (29/1), 5%; APS, 0,16%; TEMED, 0,16%; pH 8,8.

-Tampón de electroforesis: Tris base, 25 mM; SDS, 0,1%; glicina, 192 mM; pH 8,3.

-Tampón de transferencia: Tris base, 15 mM; glicina, 120 mM; metanol, 20% (v/v); pH 8,3.

-Solución de bloqueo: Leche desnatada en polvo 5% en solución PBS con Tween-20 al 0,05% (v/v).

Todos los reactivos y fármacos se adquirieron en Sigma, salvo el Fura-2AM que fue proporcionado por Thermo Fisher Scientific, y el TEMED, el reactivo de Bradford para cuantificación de proteínas y la Acrilamida/Bisacrilamida que fueron proporcionado por Biorad.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abernethy, D.R. y Schwartz, J.B. (1999). Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med*, 341 (19): 1447-1457.
- Aihara, Y., Jahromi, B.S., Yassari, R., Nikitina, E., Agbaje-Williams, M. y Macdonald, R.L. (2004). Molecular profile of vascular ion channels after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (1): 75-83.
- Akagi, K., Nagao, T. y Urushidani, T. (1999). Responsiveness of beta-escin-permeabilized rabbit gastric gland model: effects of functional peptide fragments. *Am J Physiol*, 277 (3 Pt 1): G736-744.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. y Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 271 (34): 20246-20249.
- Asano, M. y Nomura, Y. (2002). Ca²⁺ buffering function of the sarcoplasmic reticulum is increased in the carotid artery from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 25 (2): 221-230.
- Bean, B.P. (1984). Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (20): 6388-6392.
- Ben-Chaim, Y., Chanda, B., Dascal, N., Bezanilla, F., Parnas, I. y Parnas, H. (2006). Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 444 (7115): 106-109.
- Cox, R.H. y Lozinskaya, I.M. (2008). Ca²⁺ channel inactivation in small mesenteric arteries of WKY and SHR. *Am J Hypertens*, 21 (4): 406-412.
- Cremers, B., Flesch, M., Sudkamp, M. y Bohm, M. (1997). Effects of the novel T-type calcium channel antagonist mibefradil on human myocardial contractility in comparison with nifedipine and verapamil. *J Cardiovasc Pharmacol*, 29 (5): 692-696.
- Choi, S.K., Ahn, D.S. y Lee, Y.H. (2009). Comparison of contractile mechanisms of sphingosylphosphorylcholine and sphingosine-1-phosphate in rabbit coronary artery. *Cardiovasc Res*, 82 (2): 324-332.

De Crescenzo, V., Fogarty, K.E., Zhuge, R., Tuft, R.A., Lifshitz, L.M., Carmichael, J., Bellve, K.D., Baker, S.P., Zissimopoulos, S., Lai, F.A., Lemos, J.R. y Walsh, J.V., Jr. (2006). Dihydropyridine receptors and type 1 ryanodine receptors constitute the molecular machinery for voltage-induced Ca²⁺ release in nerve terminals. *J Neurosci*, 26 (29): 7565-7574.

de Leon, M., Wang, Y., Jones, L., Perez-Reyes, E., Wei, X., Soong, T.W., Snutch, T.P. y Yue, D.T. (1995). Essential Ca(2+)-binding motif for Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Science*, 270 (5241): 1502-1506.

Del Valle-Rodriguez, A., Calderon, E., Ruiz, M., Ordonez, A., Lopez-Barneo, J. y Urena, J. (2006). Metabotropic Ca(2+) channel-induced Ca(2+) release and ATP-dependent facilitation of arterial myocyte contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (11): 4316-4321.

del Valle-Rodriguez, A., Lopez-Barneo, J. y Urena, J. (2003). Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx. *EMBO J*, 22 (17): 4337-4345.

Ehrlich, B.E. y Watras, J. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 336 (6199): 583-586.

Etienne-Manneville, S. y Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420 (6916): 629-635.

Eto, M. (2009). Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem*, 284 (51): 35273-35277.

Fernandez-Tenorio, M., Gonzalez-Rodriguez, P., Porras, C., Castellano, A., Moosmang, S., Hofmann, F., Urena, J. y 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., Porras-Gonzalez, C., Castellano, A., Del Valle-Rodriguez, A., Lopez-Barneo, J. y Urena, J. (2011). Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated

kinase by L-type Ca^{2+} channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. *Circ Res*, 108 (11): 1348-1357.

Fernandez-Tenorio, M., Porrás-González, C., Castellano, A., López-Barneo, J. y Urena, J. (2012). Tonic arterial contraction mediated by L-type Ca^{2+} channels requires sustained Ca^{2+} influx, G protein-associated Ca^{2+} release, and RhoA/ROCK activation. *Eur J Pharmacol*, 697 (1-3): 88-96.

Findlay, I. (2002). Voltage- and cation-dependent inactivation of L-type Ca^{2+} channel currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*, 541 (Pt 3): 731-740.

Fleischmann, B.K., Murray, R.K. y Kotlikoff, M.I. (1994). Voltage window for sustained elevation of cytosolic calcium in smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (25): 11914-11918.

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.

Gagov, H.S., Duridanova, D.B. y Boev, K.K. (1993). Inhibition of Ca^{2+} current in ileal cells by cyclopiazonic acid and ryanodine. *Eur J Pharmacol*, 243 (1): 19-24.

Ganitkevich, V. y Isenberg, G. (1995). Efficacy of peak Ca^{2+} currents (I_{Ca}) as trigger of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in myocytes from the guinea-pig coronary artery. *J Physiol*, 484 (Pt 2): 287-306.

Ganitkevich, V., Shuba, M.F. y Smirnov, S.V. (1987). Calcium-dependent inactivation of potential-dependent calcium inward current in an isolated guinea-pig smooth muscle cell. *J Physiol*, 392: 431-449.

Gluais, P., Edwards, G., Weston, A.H., Vanhoutte, P.M. y Feletou, M. (2005). Hydrogen peroxide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Eur J Pharmacol*, 513 (3): 219-224.

Gokina, N.I., Bevan, R.D., Walters, C.L. y Bevan, J.A. (1996). Electrical activity underlying rhythmic contraction in human pial arteries. *Circ Res*, 78 (1): 148-153.

Gollasch, M., Wellman, G.C., Knot, H.J., Jaggar, J.H., Damon, D.H., Bonev, A.D. y Nelson, M.T. (1998). Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ signals in cerebral arteries: Ca²⁺ sparks as elementary physiological events. *Circ Res*, 83 (11): 1104-1114.

Guilluy, C., Bregeon, J., Toumaniantz, G., Rolli-Derkinderen, M., Retailleau, K., Loufrani, L., Henrion, D., Scalbert, E., Bril, A., Torres, R.M., Offermanns, S., Pacaud, P. y Loirand, G. (2010). The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat Med*, 16 (2): 183-190.

Harder, D.R., Dernbach, P. y Waters, A. (1987). Possible cellular mechanism for cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in the dog. *J Clin Invest*, 80 (3): 875-880.

Hockel, K., Diedler, J., Steiner, J., Birkenhauer, U., Danz, S., Ernemann, U. y Schuhmann, M.U. (2016). Long-Term, Continuous Intra-Arterial Nimodipine Treatment of Severe Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg*, 88: 104-112.

Hu, E. y Lee, D. (2005). Rho kinase as potential therapeutic target for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Expert Opin Ther Targets*, 9 (4): 715-736.

Iizuka, K., Shimizu, Y., Tsukagoshi, H., Yoshii, A., Harada, T., Dobashi, K., Murozono, T., Nakazawa, T. y Mori, M. (2000). Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*, 406 (2): 273-279.

Jaggar, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J. y Nelson, M.T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 (2): C235-256.

Kamishima, T. y McCarron, J.G. (1997). Regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration by Ca²⁺ stores in single smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Physiol*, 501 (Pt 3): 497-508.

Kanagy, N.L., Ansari, M.N., Ghosh, S. y Webb, R.C. (1994). Recycling and buffering of intracellular calcium in vascular smooth muscle from genetically hypertensive rats. *J Hypertens*, 12 (12): 1365-1372.

- Kataoka, C., Egashira, K., Inoue, S., Takemoto, M., Ni, W., Koyanagi, M., Kitamoto, S., Usui, M., Kaibuchi, K., Shimokawa, H. y Takeshita, A. (2002). Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*, 39 (2): 245-250.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P. y Khalequzzaman, M. (2003). Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, 546 (Pt 3): 879-889.
- Koide, M., Nystoriak, M.A., Brayden, J.E. y Wellman, G.C. (2011). Impact of subarachnoid hemorrhage on local and global calcium signaling in cerebral artery myocytes. *Acta Neurochir Suppl*, 110 (Pt 1): 145-150.
- Langton, P.D. y Standen, N.B. (1993). Calcium currents elicited by voltage steps and steady voltages in myocytes isolated from the rat basilar artery. *J Physiol*, 469: 535-548.
- Mahaut-Smith, M.P., Martinez-Pinna, J. y Gurung, I.S. (2008). A role for membrane potential in regulating GPCRs? *Trends Pharmacol Sci*, 29 (8): 421-429.
- Masumoto, A., Mohri, M., Shimokawa, H., Urakami, L., Usui, M. y Takeshita, A. (2002). Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation*, 105 (13): 1545-1547.
- Matsuda, J.J., Volk, K.A. y Shibata, E.F. (1990). Calcium currents in isolated rabbit coronary arterial smooth muscle myocytes. *J Physiol*, 427: 657-680.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. y Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J*, 15 (9): 2208-2216.
- McDonald, T.F., Pelzer, S., Trautwein, W. y Pelzer, D.J. (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 74 (2): 365-507.

- Mita, M., Yanagihara, H., Hishinuma, S., Saito, M. y Walsh, M.P. (2002). Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J*, 364 (Pt 2): 431-440.
- Neylon, C.B., Avdonin, P.V., Dilley, R.J., Larsen, M.A., Tkachuk, V.A. y Bobik, A. (1994). Different electrical responses to vasoactive agonists in morphologically distinct smooth muscle cell types. *Circ Res*, 75 (4): 733-741.
- Nishigaki, K., Inoue, Y., Yamanouchi, Y., Fukumoto, Y., Yasuda, S., Sueda, S., Urata, H., Shimokawa, H. y Minatoguchi, S. (2010). Prognostic effects of calcium channel blockers in patients with vasospastic angina--a meta-analysis. *Circ J*, 74 (9): 1943-1950.
- Nomura, Y. y Asano, M. (2002). Increased Ca²⁺ buffering function of sarcoplasmic reticulum in small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 25 (2): 231-239.
- Pesic, A., Madden, J.A., Pesic, M. y Rusch, N.J. (2004). High blood pressure upregulates arterial L-type Ca²⁺ channels: is membrane depolarization the signal? *Circ Res*, 94 (10): e97-104.
- Pitt, S.J., Martinez-Pinna, J., Barnard, E.A. y Mahaut-Smith, M.P. (2005). Potentiation of P2Y receptors by physiological elevations of extracellular K⁺ via a mechanism independent of Ca²⁺ influx. *Mol Pharmacol*, 67 (5): 1705-1713.
- Post, J.M., Hume, J.R., Archer, S.L. y Weir, E.K. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol*, 262 (4 Pt 1): C882-890.
- Pratt, P.F., Bonnet, S., Ludwig, L.M., Bonnet, P. y Rusch, N.J. (2002). Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension*, 40 (2): 214-219.
- Ratz, P.H., Berg, K.M., Urban, N.H. y Miner, A.S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288 (4): C769-783.

Renwick, A.G., Robertson, D.R., Macklin, B., Challenor, V., Waller, D.G. y George, C.F. (1988). The pharmacokinetics of oral nifedipine--a population study. *Br J Clin Pharmacol*, 25 (6): 701-708.

Rubart, M., Patlak, J.B. y Nelson, M.T. (1996). Ca²⁺ currents in cerebral artery smooth muscle cells of rat at physiological Ca²⁺ concentrations. *J Gen Physiol*, 107 (4): 459-472.

Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. y Takuwa, Y. (2003). Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res*, 93 (6): 548-556.

Schiller, M.R. (2006). Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cell Signal*, 18 (11): 1834-1843.

Schwinger, R.H., Bohm, M. y Erdmann, E. (1990). Negative inotropic properties of isradipine, nifedipine, diltiazem, and verapamil in diseased human myocardial tissue. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15 (6): 892-899.

Seasholtz, T.M., Zhang, T., Morissette, M.R., Howes, A.L., Yang, A.H. y Brown, J.H. (2001). Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res*, 89 (6): 488-495.

Seko, T., Ito, M., Kureishi, Y., Okamoto, R., Moriki, N., Onishi, K., Isaka, N., Hartshorne, D.J. y Nakano, T. (2003). Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res*, 92 (4): 411-418.

Shibuya, M., Hirai, S., Seto, M., Satoh, S., Ohtomo, E. y Fasudil Ischemic Stroke Study, G. (2005). Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurol Sci*, 238 (1-2): 31-39.

Shimokawa, H., Sunamura, S. y Satoh, K. (2016). RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ Res*, 118 (2): 352-366.

Siehl, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 158 (1): 41-49.

Simard, J.M., Li, X. y Tewari, K. (1998). Increase in functional Ca²⁺ channels in cerebral smooth muscle with renal hypertension. *Circ Res*, 82 (12): 1330-1337.

Smirnov, S.V. y Aaronson, P.I. (1992). Ca²⁺ currents in single myocytes from human mesenteric arteries: evidence for a physiological role of L-type channels. *J Physiol*, 457: 455-475.

Somlyo, A.P. y Somlyo, A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372 (6503): 231-236.

Sun, J. y Triggle, D.J. (1995). Calcium channel antagonists: cardiovascular selectivity of action. *J Pharmacol Exp Ther*, 274 (1): 419-426.

Tocci, G., Battistoni, A., Passerini, J., Musumeci, M.B., Francia, P., Ferrucci, A. y Volpe, M. (2015). Calcium channel blockers and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 20 (2): 121-130.

Tolsa, J.F., Marino, M., Peyter, A.C. y Beny, J.L. (2006). Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of isolated mouse main pulmonary artery. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47 (4): 501-507.

Toyoda, Y., Shima, H., Sasajima, H. y Nishio, I. (1995). Increased calcium sequestration by sarcoplasmic reticulum in small muscular arteries in young spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 22 (1): S223-224.

Tybulewicz, V.L. y Henderson, R.B. (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 9 (9): 630-644.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. y Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389 (6654): 990-994.

- Urena, J., del Valle-Rodriguez, A. y Lopez-Barneo, J. (2007). Metabotropic Ca²⁺ channel-induced calcium release in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*, 42 (4-5): 513-520.
- van Breemen, C., Chen, Q. y Laher, I. (1995). Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends Pharmacol Sci*, 16 (3): 98-105.
- Vicari, R.M., Chaitman, B., Keefe, D., Smith, W.B., Chrysant, S.G., Tonkon, M.J., Bittar, N., Weiss, R.J., Morales-Ballejo, H., Thadani, U. y Fasudil Study, G. (2005). Efficacy and safety of fasudil in patients with stable angina: a double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *J Am Coll Cardiol*, 46 (10): 1803-1811.
- Vogalis, F., Publicover, N.G., Hume, J.R. y Sanders, K.M. (1991). Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 260 (5 Pt 1): C1012-1018.
- Wellman, G.C., Cartin, L., Eckman, D.M., Stevenson, A.S., Saundry, C.M., Lederer, W.J. y Nelson, M.T. (2001). Membrane depolarization, elevated Ca(2+) entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281 (6): H2559-2567.
- Woodsome, T.P., Eto, M., Everett, A., Brautigan, D.L. y Kitazawa, T. (2001). Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, 535 (Pt 2): 553-564.
- Yanagisawa, T. y Okada, Y. (1994). KCl depolarization increases Ca²⁺ sensitivity of contractile elements in coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 267 (2 Pt 2): H614-621.
- Zhao, J., Zhou, D., Guo, J., Ren, Z., Zhou, L., Wang, S., Zhang, Y., Xu, B., Zhao, K., Wang, R., Mao, Y., Xu, B., Zhang, X. y Fasudil Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Study, G. (2011). Efficacy and safety of fasudil in patients with subarachnoid hemorrhage: final results of a randomized trial of fasudil versus nimodipine. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 51 (10): 679-683.

Libros:

Blaustein, M.P., Kao, J.P.Y., y Matteson D.R., (2012). *Cellular Physiology and Neurophysiology*. Elsevier - Mosby, 2nd edition. St Louis, United States. ISBN: 978-0-3230-5709-7.

Koeppen, B.M. y Stanton, B.A. (2009). *Berne y Levy Fisiología*. Elsevier - Mosby, sexta edición. Barcelona, España. ISBN: 978-84-8086-434-3.

Patentes:

Urena, J., Porrás-González, C., González-Montelongo M.C. (2015). *Composiciones y preparaciones combinadas para el tratamiento del vasoespasma arterial*. ES 2 534 708 A2. Oficina Española de Patentes y Marcas