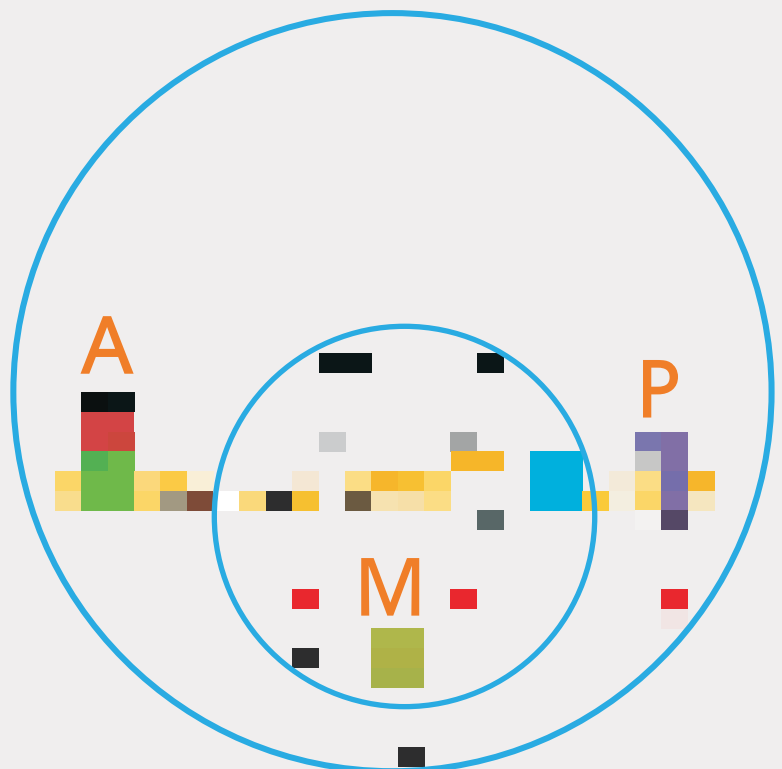


EFFECTS OF DRUGS THAT MODIFY THE INTRACELLULAR LEVELS OF CYCLIC AMP IN RING OF AORTA OF RAT AND IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS





UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**EFFECTOS DE FÁRMACOS QUE MODIFICAN LOS NIVELES
INTRACELULARES DE AMP CÍCLICO EN ANILLOS DE AORTA DE
RATA Y EN MIOCITOS VASCULARES**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Andrea Cuññas Lavandeira

Santiago de Compostela, 2013



La presente memoria ha sido realizada gracias a la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-22051) y por la Xunta de Galicia (INCITE08PXIB203092PR).

Diseño de portada: Sara RC ©

D. Manuel Campos Toimil, profesor titular del departamento de Farmacología de la Universidade de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Efectos de fármacos que modifican los niveles intracelulares de AMP cíclico en anillos de aorta de rata y en miocitos vasculares”** ha sido elaborada por la licenciada en Farmacia Dña. Andrea Cuíñas Lavandeira en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia bajo su dirección. Y considerando que se encuentra concluida, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste, expide y firma el presente informe en Santiago de Compostela a 15 de mayo de 2013.



Fdo. Manuel Campos Toimil



Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

- **Cuíñas, A, Elíes, J, Orallo F, Campos-Toimil M.** Cyclic AMP relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated in part by depletion of intracellular Ca^{2+} stores and inhibition of capacitative calcium entry. *Vascular Pharmacology* 2013; 58: 98-104".

Y presentados y discutidos en los siguientes congresos:

- **Cuíñas A, Elíes J, Campos-Toimil M.** Expression and distribution of protein kinase A and Epac proteins in vascular smooth muscle cells. Effect of cAMP-elevating agents. 33º Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. Vol 109, supl 2, 2011. Málaga 3-5 de octubre.
- **Cuíñas A, Cairrão E, Verde I, Campos-Toimil M.** Forskolin increases L-type Ca^{2+} currents and $[Ca^{2+}]_c$ via a mechanism independent of PKA or Epac activation in vascular smooth muscle cells. 10th International Symposium on Resistance Arteries. P2.20. Rebild (Dinamarca) 8-12 de mayo de 2011.
- **Cuíñas A, Orallo F, Campos-Toimil M.** *cAMP depletes Ca^{2+} from thapsigargin-sensitive and -insensitive intracellular stores in vascular myocytes. Role of PKA and EPAC proteins.* 32º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología. *European Journal of Clinical Pharmacology*. P-16. Vol 66, supl 1, 2010. León 15-17 de septiembre.
- **Cuíñas A, Elíes J, Campos-Toimil M.** *Epac proteins as a determinant for forskolin-induced vasorelaxant effect and cAMP inhibition of store-operated Ca^{2+} entry in vascular myocytes.* 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. Paper nº 2967. Vol 107. Supplement 1, 2010. Copenhague 17-23 de julio.
- **Cuíñas A, Elíes J, Campos-Toimil M, Orallo F.** *The role of phosphodiesterase 4 in the vasorelaxation of rat aortic vascular smooth muscle is dependent on cyclic AMP levels.* 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* PO-007. Vol 30, supl 2, 2009. Sevilla 16-18 de septiembre.
- **Cuíñas A, Elíes J, Campos-Toimil M, Orallo F.** *Forskolin inhibits the release of intracellular Ca^{2+} and capacitative Ca^{2+} entry in endothelium-denuded isolated rat aortic rings.* 30º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* PO-004. Vol 30, supl 2, 2008. Bilbao 17-19 de septiembre.





El mundo actual capitalista tiene como referencia el dinero, de todo se hace mercancía. Estamos viviendo un momento de transformación y la ciencia es la punta de lanza.

José Luis Sampedro, 15 de mayo de 2012





A la memoria de mi madre



Agradecimientos

A mis directores:

- Al Dr. Manuel Campos. Gracias Manolo, por todas las oportunidades que me ha brindado para poder llegar hasta aquí, por animarme siempre a continuar, por tu paciencia sin perder la sonrisa, por la entrega y dedicación absoluta a esta Tesis. Gracias también por tu amistad y tu apoyo en los momentos difíciles. Tengo que agradecer además a Iria, Manuel y Divina el tiempo robado.
- Al Dr. Francisco Orallo, co-director en principio de este trabajo y fallecido durante la realización del mismo. Gracias Paco, por la oportunidad de integrarme en tu grupo de investigación, por tu generosidad y por enseñarme a trabajar como a ti te gustaba, “al borde de la perfección”.

A los profesionales que han condicionado la ejecución de este trabajo:

- Al Dr. José Leiro del Instituto de Investigación e Análises Alimentarias de la USC y al Dr. Juan José Arranz por su buena disposición, ayuda y orientación en los experimentos llevados a cabo en su laboratorio
- Al Dr. Manuel Veiga del Departamento de Microbiología de la USC y a Javier, por su ayuda desinteresada en los experimentos de transfección celular.
- Al Dr. Viacheslav O. Nikolaev y al Dr. Martin J. Lohse, del Instituto de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Würzburg (Alemania) por habernos facilitado desinteresadamente la sonda empleada en los experimentos de transfección celular.
- Ao Dr. Ignacio Verde e a Dra. Elisa Cairrão, do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Portugal). Obrigada pela oportunidade de fazer uma estadia no seu laboratorio. Agradeço a atenção desde o primeiro dia e tudo que aprendi em tão pouco tempo.

A mis maestras y amigas:

- Á Dra. Rosa Villar, por abrirme a porta do Departamento de Farmacología, pola túa amizade e por transmitirme o amor primeiro á Farmacognosia e á Farmacología despois. Grazas tamén por adicarlle o teu tempo a isto, polas valiosas correccións e suxerencias aportadas a este traballo.
- A la Dra. Maribel Cadavid, por tu apoyo, buenos consejos y capacidad de hacer sencillo lo difícil.
- A la Dra. Reyes Laguna, porque tu conversación siempre es agradable.

A los míos:

- A mis compañeros del laboratorio de Farmacología Cardiovascular: Jacobo, Mati, Laura, Verónica, Javier y Dolores. Por todo lo que he aprendido de cada uno de vosotros, como farmacólogos pero sobre todo como personas, por la cantidad de vivencias compartidas a lo largo de este camino y, sobre todo, por vuestra amistad.
- A mis compañeros del Departamento de Farmacología con los que he compartido estos años: a Rocío, Silvia, Pepo, Óscar, siempre dispuestos a echar una mano. Gracias especialmente a Sonia Lage. E a Belén Espiñeira, por ser unha compañeira máis.
- A Ana Arrese, por la ayuda prestada con los animales de experimentación, siempre con buen humor.
- Al personal de la Facultad de Farmacia y del Edificio Emprendia: limpieza, fotocopias, biblioteca, conserjería, donde siempre me han echado un cable con una sonrisa.
- A Susana, Alejandro y a mis compañeros de la farmacia Pontus Veteris, especialmente a Nico, gracias por el soporte moral.
- A Miguel Suárez, gracias pola axuda prestada no deseño e maquetación deste libro, polas charlas de ciencia ou do que fixese falla no autobús pero sobre todo pola túa amizade.
- A mi amiga Minchiña, por el estrés soportado en los últimos meses y por darme otra visión de la señalización mediada por las proteínas Epac. También a nuestro guía en la montaña, Mon Cernadas. Y a Sara RC, por tu amistad y tu creatividad en el diseño de esta portada que me has regalado.
- A mis amigas “de siempre”: Eva, María, Titi, Ana y Raquel, por vuestra amistad incondicional. A mis otras doctoras: Sara Ares, Chus Ruíz y Ali (y Germán y Nora). A mis boticarias: Sara Coca y Luz Moldes. A mi prima Ana. A María Luaces. A Dolores Burgo.
- A mi hermana, por apoyarme en todas las decisiones tomadas, buenas y malas. También por tus consejos de redacción. A mi abuela, por ser tan especial. A mis primas Loli y Carmen, por vuestro cariño.
- A mis padres, por vuestro esfuerzo y tesón en proporcionarme una formación académica, gracias a la cual hoy puedo escribir estas letras.
- A Pedro, por dedicarte a todo lo que yo no he podido por falta de tiempo. Por acompañarme en este camino con infinita paciencia.

Primavera de 2013

Índice

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1 CONTRACTILIDAD EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR	11
1.1 ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR	12
1.2 ESTRUCTURA DEL MÚSCULO LISO VASCULAR	13
1.3 EL PROCESO CONTRÁCTIL EN EL MÚSCULO LISO	14
1.4 PAPEL DEL ENDOTELIO EN EL MANTENIMIENTO DEL TONO VASCULAR	16
1.5 MODULACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS	17
1.5.1. Papel del AMPc en la proliferación del músculo liso vascular	18
1.5.2. Otros factores que influyen en la proliferación del músculo liso vascular	19
2 HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} EN EL MÚSCULO LISO	21
2.1 AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN CÁLCICA CITOPASMÁTICA	22
2.1.1. Entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática	22
2.1.2. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares	28
2.2 DESCENSO DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} CITOPASMÁTICA	33
2.2.1 Salida de Ca^{2+} al medio extracelular	33
2.2.2 Captación de Ca^{2+} por los reservorios intracelulares	34
2.3 PAPEL DEL NÚCLEO Y LA MITOCONDRIA EN LA HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+}	34
2.4 COMPARTIMENTACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN CÁLCICA	36
3 MECANISMOS MODULADORES DE LA MOVILIZACIÓN DE Ca^{2+} EN EL MÚSCULO LISO	39
3.1 CICLO DEL FOSFATIDILINOSITOL	39
3.2 MECANISMOS QUE CONTROLAN LA SENSIBILIDAD AL Ca^{2+} DE LOS MIOFILAMENTOS	40
3.2.1 Proteínas G	41
3.2.2 Proteína cinasa C	42
3.2.3 Rho A/cinasa Rho	43
3.3 OTROS MECANISMOS REGULADORES	44
3.3.1 Proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina	44
3.3.2 Tirosina cinasas	45
3.3.3 MAP cinasas	46
4 RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR POR AMPc	49

4.1	EFFECTORES DE LA SEÑALIZACIÓN DEL AMPc	51
4.1.1	Proteína cinasa dependiente de AMPc	51
4.1.2	Proteínas EPAC	53
4.1.3	Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos	57
4.2	GMPC	59
4.3	CANALES DE K ⁺	60
4.3.1	Canales de K ⁺ voltaje-dependientes	61
4.3.2	Canales de K ⁺ Ca ²⁺ -dependientes	62
4.3.3	Canales de K ⁺ ATP-dependientes	63
4.3.4	Canales de K ⁺ rectificadores de entrada	63
4.4	PROTEÍNAS AKAP	64
5	REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE AMPc Y COMPARTIMENTACIÓN DE LA SEÑAL	65
5.1	ADENILIL CICLASAS	65
5.2	FOSFODIESTERASAS	69
5.3	COMPARTIMENTACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DEL AMPc	73
6	TÉCNICAS DE MEDICIÓN DEL AMPc	77
6.1	MÉTODOS BASADOS EN LA DISOCIACIÓN DE LA PKA	77
6.2	MÉTODOS QUE EMPLEAN CANALES CNG	79
6.3	SENSORES BASADOS EN LAS PROTEÍNAS EPAC	81
OBJETIVOS		83
MATERIAL Y MÉTODOS		87
1	SELECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES	89
2	EXPERIMENTOS DE CONTRACTILIDAD EN AORTA AISLADA	89
3	CULTIVOS CELULARES	91
3.1	CULTIVO PRIMARIO DE MIOCITOS DE AORTA DE RATA	91
3.2	CULTIVO DE CÉLULAS A7R5	93
4	TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA	93
4.1	DESCRIPCIÓN DEL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA	93
4.2	DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA	94
4.3	MEDIDA DE CALCIO MEDIANTE FURA-2	95
4.4	ESTUDIOS DE FRET	97
4.4.1	Purificación de ADN plasmídico	97

4.4.2	Transfección de los miocitos vasculares con Epac-camps	98
4.5	DETERMINACIÓN DE AMPC EN CÉLULA VIVA	101
5	CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	101
5.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN LAS MUESTRAS	101
5.2	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS	102
5.3	ELECTROTRANSFERENCIA Y <i>WESTERN BLOT</i>	103
6	AMPLIFICACIÓN POR RETROTRANSCRIPCIÓN-PCR	104
6.1	EXTRACCIÓN DEL ARN	104
6.2	RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	105
7	ESTUDIOS DE <i>PATCH-CLAMP</i>	106
7.1	EQUIPO UTILIZADO	107
7.2	CONFIGURACIONES DE <i>PATCH-CLAMP</i>	108
7.2.1	Protocolo experimental para la obtención de la configuración de célula entera	108
7.2.2	Protocolo experimental para la obtención de la configuración de parche perforado	110
7.3	SOLUCIONES	110
7.3.1	Soluciones externas	110
7.3.2	Soluciones internas	111
8	ENZIMOINMUNOENSAYO	111
9	FÁRMACOS Y REACTIVOS	113
10	EXPRESIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	115
RESULTADOS		117
1	EFFECTOS DE LOS INCREMENTOS DE AMPC SOBRE LA CONTRACTILIDAD VASCULAR	119
1.1	EFFECTOS DE LA FORSKOLINA, DIBUTIRIL AMPC Y ROLIPRAM SOBRE LA CONTRACCIÓN CON FENILEFRINA	119
1.2	EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA P38 MAP KINASA SOBRE LA VASORRELAJACIÓN INDUCIDA POR FORSKOLINA Y DIBUTIRIL AMPC	121
1.3	EFFECTO DE DIVERSOS BLOQUEANTES DE CANALES DE K ⁺ SOBRE LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR FORSKOLINA O DIBUTIRIL AMPC	123
1.4	EFFECTO DE INHIBIDORES DE CANALES DE Ca ²⁺ TIPO L SOBRE LA VASORRELAJACIÓN INDUCIDA POR FORSKOLINA	124

1.5	EFFECTO DEL ÁCIDO FLUFENÁMICO Y DEL SKF-96365 SOBRE LA VASORRELAJACIÓN INDUCIDA POR FORSKOLINA	125
1.6	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA PKA SOBRE LA VASORRELAJACIÓN INDUCIDA POR FORSKOLINA	126
1.7	EFFECTO DE LOS ACTIVADORES DE LAS PROTEÍNAS PKA Y EPAC SOBRE LA CONTRACCIÓN CON FENILEFRINA	128
1.8	IMPLICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR EN LOS EFECTOS VASODILADORES DEL AMPC	129
1.8.1	Efecto de la forskolina y dibutilil AMPc sobre la contracción con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+}	129
1.8.2	Efecto del TMB-8 sobre la acción vasodilatadora de la forskolina	131
1.8.3	Efecto de los activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la contracción con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+}	131
1.9	IMPLICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CANALES DE Ca^{2+} OPERADOS POR DEPLECIÓN EN LOS EFECTOS VASODILADORES DEL AMPC	132
1.9.1	Efecto de forskolina y dibutilil AMPc sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras depleción de reservorios con fenilefrina y tapsigargina	132
1.9.2	Efecto de los inhibidores de la PKA sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras depleción con fenilefrina	135
1.9.3	Efecto de activadores de las proteínas Epac y PKA sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras depleción con fenilefrina	136
1.10	EXPERIMENTOS EN MEDIO DESPOLARIZANTE	136
1.10.1	Efecto de la forskolina y el rolipram sobre la contracción inducida con $CaCl_2$	136
1.10.2	Efecto de la nifedipina y el SKF96365 sobre la contracción inducida con $CaCl_2$	138
2	EFFECTOS SOBRE LA HOMEOSTASIS CÁLCICA	139
2.1	EFFECTO DE LOS AGENTES QUE INCREMENTAN EL AMPC Y DE ACTIVADORES DE LAS PROTEÍNAS PKA Y EPAC SOBRE LA $[Ca^{2+}]_i$ BASAL	139
2.1.1	Medio con Ca^{2+}	139
2.1.2	Medio libre de Ca^{2+}	141
2.2	EFFECTO DE LOS AGENTES QUE INCREMENTAN EL AMPC Y DE ACTIVADORES DE LAS PROTEÍNAS PKA Y EPAC SOBRE LA RESPUESTA A VASOPRESINA	142
2.2.1	Medio con Ca^{2+}	142

2.2.2	Medio libre de Ca^{2+}	144
2.3	EFFECTO DE LOS AGENTES QUE INCREMENTAN EL AMPC Y DE ACTIVADORES DE LAS PROTEÍNAS PKA Y EPAC SOBRE LA REENTRADA DE Ca^{2+} INDUCIDA POR VASOPRESINA	146
2.4	EFFECTO DE LOS AGENTES QUE INCREMENTAN EL AMPC Y DE ACTIVADORES DE LAS PROTEÍNAS PKA Y EPAC SOBRE LA RESPUESTA DE LA TAPSIGARGINA	149
3	EFFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPC EN TIEMPO REAL	151
4	EFFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	153
4.1	EXPRESION DE PROTEÍNAS PKA Y EPAC EN MIOCITOS VASCULARES	153
4.2	EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE 24 H CON FÁRMACOS QUE AUMENTAN EL AMPC SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PKA Y EPAC	153
5	ESTUDIOS DE PATCH-CLAMP	157
5.1	EFFECTO DE LA FORSKOLINA Y DE LOS ACTIVADORES DE LA PKA Y EPAC SOBRE LAS CORRIENTES DE Ca^{2+} TIPO L EN CÉLULAS A7R5	157
5.2	EFFECTO SOBRE LAS CORRIENTES DE K^+ EN CÉLULAS A7R5	158
6	EFFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPC EN CULTIVOS CELULARES	159
DISCUSIÓN		163
1	EFFECTOS DE AGENTES QUE INCREMENTAN LA $[AMPC]_i$ SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO VASCULAR EN MEDIO CON Ca^{2+} EXTERNO.	166
1.1	PAPEL DE LA P38 MAPK	169
1.2	PAPEL DE LOS CANALES DE K^+	170
1.3	PAPEL DE DIVERSOS TIPOS DE CANALES TRANSMEMBRANA PERMEABLES AL Ca^{2+}	171
1.4	PAPEL DE LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}	176
2	EFFECTOS DE LOS AGENTES QUE INCREMENTAN LA $[AMPC]_i$ SOBRE LA CONTRACCIÓN PROVOCADA POR LA LIBERACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR	178
3	EFFECTOS DE LOS AGENTES QUE INCREMENTAN EL AMPC SOBRE $[Ca^{2+}]_c$ BASAL	181
4	PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ACTIVADAS POR AMPC, PKA Y EPAC, EN LOS EFFECTOS DEL AMPC SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR	184
4.1	PAPEL DE LA PKA Y DE LA EPAC EN EL EFFECTO VASODILATADOR DEL AMPC	185
4.2	PAPEL DE LA PKA Y DE LA EPAC EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS CÁLCICA POR EL AMPC EN LOS MIOCITOS VASCULARES	188
5	AUMENTO DE AMPC EN TIEMPO REAL	191
CONCLUSIONES		193



Índice de figuras

Figura 1. Esquema general propuesto por Sutherland para explicar el mecanismo de acción de la adrenalina y otras hormonas	6
Figura 2. Esquema del ciclo de los puentes cruzados	16
Figura 3. Esquema general de la homeostasis del Ca^{2+} en el músculo liso.....	21
Figura 4. Esquema general de los mecanismos moduladores de la movilización de Ca^{2+} en el músculo liso.	39
Figura 5. Regulación de la cascada de MAP cinasas por AMPc-PKA-Epac.....	48
Figura 6. Conversión del ATP a AMPc catalizada por el enzima adenilil ciclasa.	49
Figura 7. Efectores de la señalización del AMPc.....	51
Figura 8. Estructura de la PKA. R: subunidad reguladora. C: subunidad catalítica.....	52
Figura 9. Representación esquemática de la organización de los dominios de las proteínas Epac. Modificado de Schmidt <i>et al.</i> , 2007.	54
Figura 10. Papel de las proteínas Epac en la movilización de Ca^{2+} mediada por AMPc. Modificada de Holz <i>et al.</i> , 2006.....	56
Figura 11. Estructura de las adenilil ciclasas. Modificado de Willoughby y Cooper, 2007....	66
Figura 12. Estructura de la forskolina e interacción con el enzima adenilil ciclasa.	69
Figura 13. Estructura de las fosfodiesterasas. Modificado de Menniti <i>et al.</i> , 2006.	71
Figura 14. Complejos multiproteicos de señalización mediada por AMPc.....	74
Figura 15. Representación esquemática de un sensor para el AMPc basado en la técnica de FRET. La eficiencia de la transferencia de energía entre CFP e YFP depende de la concentración de AMPc. Modificado de Nikolaev y Lohse, 2006.	81
Figura 16. Esquema general de un microscopio de fluorescencia.	95
Figura 17. Espectro de excitación del fura-2 en medios con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (0-3,98 μM)	96
Figura 18. Mapa de restricción de los plásmidos Epac1-camps y Epac2-camps.	98
Figura 19. Esquema básico de un equipo de <i>patch-clamp</i>	107
Figura 20. Configuraciones de <i>patch-clamp</i>	108
Figura 21. Principio del enzimoimmunoensayo.....	111
Figura 22. Curva acumulativa concentración-relajación de la forskolina en anillos de aorta de rata sin endotelio precontraídos con fenilefrina (1 μM).	120
Figura 23. Efecto del rolipram sobre la relajación inducida por forskolina y db-cAMP de las contracciones inducidas por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio.....	120
Figura 24. Efecto de la preincubación con db-cAMP y forskolina sobre la contracción inducida con fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio	121

Figura 25. Efecto del SB-203580 sobre la relajación inducida por forskolina y db-cAMP de la contracción con fenilefrina de los anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio.....	122
Figura 26. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por fenilefrina y efectos e la posterior adición de SB-203580 y db-cAMP en un anillo de aorta de rata sin endotelio.....	122
Figura 27. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por fenilefrina y efectos de la posterior adición de glibenclamida y forskolina en un anillo de aorta de rata sin endotelio.....	123
Figura 28. Efecto de caribdotoxina, apamina y glibenclamida sobre la relajación inducida por forskolina y db-cAMP en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio precontraídos con fenilefrina	124
Figura 29. Efecto de nifedipina y verapamilo sobre la relajación inducida por forskolina de la contracción por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 6 valores.	125
Figura 30. Efecto del ácido flufenámico sobre la relajación inducida por forskolina de las contracciones inducidas por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio.....	126
Figura 31. Efecto del KT5720 sobre la relajación inducida por forskolina de la contracción con fenilefrina en presencia o en ausencia de rolipram en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio	127
Figura 32. Efecto de la preincubación con Rp-cAMPs y KT5720 sobre el efecto inhibitor de la contracción con fenilefrina causado por la forskolina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio.....	128
Figura 33. Efecto de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, pCPT-cAMP y una combinación de ambos sobre la contracción por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio.....	129
Figura 34. Efecto de la preincubación con forskolina, forskolina e IBMX y db-cAMP sobre la contracción por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio en medio libre de Ca^{2+}	130
Figura 35. Efecto de la preincubación con pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la contracción por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio en medio libre de Ca^{2+}	132
Figura 36. Registro representativo de la contracción de un anillo de aorta sin endotelio con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+} y posterior contracción por reintroducción de Ca^{2+} en el medio (figura superior). Disminución de la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras preincubación con db-cAMP (100 μ M) (figura inferior).....	133
Figura 37. Efecto de la forskolina y forskolina e IBMX (A) y del db-cAMP (B) sobre la contracción inducida por reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios con fenilefrina (1 μ M) en medio libre de Ca^{2+} en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio.....	134
Figura 38. Efecto de Rp-cAMPs y KT5720 sobre la inhibición inducida por la forskolina de la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+} en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio ..	135

- Figura 39.** Efecto de pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+} en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio..... 136
- Figura 40.** (A) Registro representativo de la contracción de un anillo de aorta sin endotelio en medio despolarizante sin Ca^{2+} y posterior contracción por reintroducción de Ca^{2+} en el medio (B) Disminución de la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras preincubación con forskolina (C) db-cAMP y (D) forskolina/IBMX..... 137
- Figura 41.** Efecto de la preincubación con forskolina, forskolina e IBMX y db-cAMP sobre la contracción inducida con CaCl_2 (1,5 mM) en medio despolarizante en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio 138
- Figura 42.** Registro representativo de las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (expresado como $\Delta F_{340/380}$) en dos células A7r5 en medio con Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con forskolina y posterior adición de vasopresina e ionomicina 140
- Figura 43.** Efecto del tratamiento con forskolina, forskolina/IBMX, db-cAMP y pCPT-cAMP/pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre los niveles de Ca^{2+} basales (expresado como $\Delta F_{340/380}$) en células A7r5 en medio con Ca^{2+} 140
- Figura 44.** Efecto del tratamiento con forskolina, forskolina /IBMX y db-cAMP sobre los niveles de Ca^{2+} basales en células A7r5 en medio libre Ca^{2+} 141
- Figura 45.** (A) Efecto de la preincubación con forskolina y forskolina e IBMX sobre el incremento máximo de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) inducido por vasopresina en medio con Ca^{2+} en células A7r5. (B) Efecto de la preincubación con db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre el incremento máximo de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) inducido por vasopresina en medio con Ca^{2+} en células A7r5. 143
- Figura 46.** Efecto de la preincubación durante 30 min con pCPT-cAMP sobre la respuesta cálcica (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducida por vasopresina en medio con Ca^{2+} en células A7r5. 144
- Figura 47.** Registro representativo de las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (expresado como $\Delta F_{340/380}$) de la respuesta a vasopresina en medio 2 mM de Ca^{2+} y en medio libre de Ca^{2+} en células A7r5 145
- Figura 48.** Efecto de la preincubación con forskolina; forskolina e IBMX, db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre el incremento máximo de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) inducido por vasopresina en medio libre de Ca^{2+} en células A7r5... 146
- Figura 49.** Registro representativo de las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (expresado como $F_{340/380}$) en una célula A7r5 en medio libre de Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con vasopresina, posterior reintroducción de Ca^{2+} en el medio y adición de ionomicina al final del experimento. 147
- Figura 50.** Efecto de la preincubación durante 10 min con forskolina e IBMX sobre la respuesta cálcica (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducida por depleción de reservorios con vasopresina y posterior reentrada de Ca^{2+} en células A7r5. 148
- Figura 51.** Efecto de la preincubación durante 10 min con forskolina, forskolina/IBMX y db-cAMP sobre el máximo incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducido por depleción de reservorios con vasopresina y posterior reentrada de Ca^{2+} en células A7r5 148
- Figura 52.** Efecto de la preincubación con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta F_{340/380}$) inducido por tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} en células A7r5..... 149

Figura 53. Efecto de 10 min de con forskolina (FSK) /IBMX sobre la respuesta cálcica (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducida por depleción de reservorios con taspigargina (0,5 μM) y posterior reentrada de Ca^{2+} en células A7r5.	150
Figura 54. Imágenes digitalizadas de FRET de los efectos de una concentración maximal estimulante con forskolina (10 μM)/IBMX (100 μM) en células RASMC 48 h post-transfección con la sonda Epac1-camps.	151
Figura 55. Registro representativo de los cambios en la intensidad (A) y en el ratio de FRET (B) medidos con la sonda Epac1-camps en respuesta a una estimulación con forskolina (FSK)/IBMX en células A7r5.	152
Figura 56. Geles de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de un fragmento de los genes PKA RII α , Epac 1, Epac 2 y β -actina de células A7r5 y RASMC.	153
Figura 57. <i>Western blot</i> representativo de cantidades iguales de lisados de células A7r5 tratadas con forskolina (FSK 1 μM), forskolina (10 μM)/IBMX (100 μM), forskolina (10 μM)/rolipram (ROL 100 μM) y db-cAMP (100 μM), durante 24 h, marcados con anticuerpo anti-PKA. La primera banda representa la proteína de 50 kDa del marcador de peso molecular.	154
Figura 58. Efecto de 24 h de tratamiento con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, forskolina/rolipram (ROL) y db-cAMP sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la subunidad RII α de la PKA en células A7r5.	154
Figura 59. Gel de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de un fragmento de 612 pb del gen PKA RII α de células A7r5 tratadas con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP y pCPT-cAMP durante 24 h.	155
Figura 60. Niveles relativos de expresión de PKA RII α en células A7r5 tras 24 h de tratamiento con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP y pCPT-cAMP valores normalizados respecto a la intensidad de la banda control)	156
Figura 61. Efecto de la forskolina (FSK) en la $I_{\text{Ca,L}}$ basal en células A7r5.	157
Figura 62. Efecto de pCPT-cAMP en la $I_{\text{Ca,L}}$ basal en células A7r5.	158
Figura 63. Efecto de la forskolina (FSK) en la I_{K} basal en células A7r5.	158
Figura 64. Medida de la $[\text{AMPC}]_i$ en RASMC por enzimoimmunoensayo. El aumento de la $[\text{AMPC}]_i$ inducido por la forskolina es potenciado en presencia del inhibidor de la PDE4 rolipram.	159
Figura 65. Medida de la $[\text{AMPC}]_i$ en RASMC por enzimoimmunoensayo. En presencia de fenilefrina (PHE, 1 μM), el rolipram (ROL) induce un incremento significativo de la $[\text{AMPC}]_i$, y el incremento de la $[\text{AMPC}]_i$ inducido por forskolina (FSK) o por rolipram + forskolina está aumentado significativamente.	160
Figura 66. Medida de la $[\text{AMPC}]_i$ en RASMC por enzimoimmunoensayo. El pretratamiento de las células con SB-203580 (10 μM) no modificó significativamente la $[\text{AMPC}]_i$ basal o en presencia de forskolina	161

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación de las adenilil ciclasas y su regulación.	67
Tabla 2: Clasificación de la familia de fosfodiesterasas.	72
Tabla 3: Secuencia de cebadores empleados en PCR.	105
Tabla 4: Valores máximos de tensión (g) alcanzados por la fenilefrina en presencia de diferentes tratamientos con forskolina, IBMX y db-cAMP	130
Tabla 5: Efecto de la forskolina y el db-cAMP en la contracción inducida por reintroducción de Ca^{2+} en el medio tras la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} con tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} , en anillo de aorta de rata sin endotelio	135
Tabla 6: Efecto de la forskolina, forskolina e IBMX, db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la respuesta cálcica de la vasopresina en células A7r5 en medio con Ca^{2+}	142



Abreviaturas

AC	adenilil ciclasa
ADNp	ADN plasmídico
AKAP	proteínas de anclaje a la PKA
AMPC	AMP cíclico (3'-5' monofosfato cíclico de adenosina)
[AMPC]_i	concentración de AMPc intracelular
APA	apamina
ATII	angiotensina II
AVP	arginina-vasopresina
BSA	seroalbúmina bovina
BK_{Ca}	canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺ de gran conductancia
[Ca²⁺]_c	concentración de Ca ²⁺ libre citoplasmática
CaM	calmodulina
CaMKII	proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ -CaM
CCE	entrada capacitativa de Ca ²⁺
CHTX	caribdotoxina
CIF	factor de la entrada de Ca ²⁺
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , en inglés
CICR	liberación de Ca ²⁺ provocada por el Ca ²⁺
CMLV	célula de músculo liso vascular
CNBD	dominio de unión de nucleótidos cíclicos
CNG	canales activados por nucleótidos cíclicos
CRAC	canales de Ca ²⁺ activados por liberación de Ca ²⁺
CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i> , en inglés
DAG	diacilglicerol
db-cAMP	dibutiril AMP cíclico
EDHF	factor hiperpolarizante derivado de endotelio
Epac	<i>exchange proteins activated by cAMP</i> , en inglés
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i> , en inglés
ET	endotelina
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i> , en inglés
FFA	ácido flufenámico
FSK	forskolina
GAP	proteínas activadoras de GTPasa
GC	guanilil ciclasa
GDI	inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina

GDP	difosfato de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
GEF	factores intercambiadores de nucleótidos de guanina
GLIB	glibenclamida
GMPc	GMPc (3'-5' monofosfato cíclico de guanosina)
GPCR	receptor acoplado a proteínas G
HSP	<i>heat shock protein</i>
I_{Ca,L}	corriente de Ca ²⁺ de tipo L
I_K	corriente de K ⁺
IGF-1	factor de crecimiento insulínico de tipo 1
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
K_v	canales de K ⁺ voltaje-dependientes
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , en inglés
MIM	membrana interna mitocondrial
MLC₂₀	cadena ligera de miosina de 20 kDa
MLCK	cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MYPT	<i>myosin phosphatase targeting protein</i> , en inglés
NIF	nifedipina
NA	noradrenalina
NCA	bomba de Ca ²⁺ -ATPasa nuclear
NCX	intercambiador Na ⁺ -Ca ²⁺
NE	envoltura nuclear
NO	óxido nítrico
NPC	poro nuclear
NSCC	canales catiónicos no selectivos
PDE	fosfodiesterasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHE	fenilefrina
PGI₂	prostaciclina
PIP₂	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PKG	proteína cinasa G
PLC	fosfolipasa C

PLD	fosfolipasa D
PMCA	<i>plasma membrane Ca²⁺/calmodulin dependent ATPase</i> , en inglés
RASMC	célula muscular lisa de aorta de rata
RE	retículo endoplasmático
RhoA	<i>ras-homolog gene family, member A</i> , en inglés
ROCC	canales de Ca ²⁺ operados por receptor
ROK	<i>rho-associated protein kinase</i> , en inglés
ROL	rolipram
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
RyR	receptor de rianodina
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i> , en inglés
SN	solución externa normal
SOCa²⁺	solución externa libre de Ca ²⁺
SOCC	canales de Ca ²⁺ operados por depleción
SOCE	entrada de Ca ²⁺ activada por depleción
STIM	<i>stromal-interacting molecule</i> , en inglés
TK	tirosina cinasa
TP	tapsigargina
TX-A₂	tromboxano A ₂
TRP	receptor de potencial transitorio
VOCC	canales de Ca ²⁺ operados por voltaje
VRP	verapamilo
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , en inglés





Introducción



Una de las líneas de trabajo que viene desarrollando desde hace varios años nuestro grupo de investigación (GI 1683, Farmacología Cardiovascular e Plaquetaria) consiste en la evaluación farmacológica y en el estudio del mecanismo de acción de moléculas de origen natural y sintético como potenciales agentes vasodilatadores, importantes en el tratamiento de patologías como la hipertensión arterial, la insuficiencia o la isquemia cardíaca y que constituyen unos de los problemas de salud pública más importantes en los países desarrollados. La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado dentro de esta línea de trabajo y se centra en el mecanismo de acción del AMP cíclico (AMPC) y de las rutas de interconexión AMPC- Ca^{2+} , así como su efecto en la contractilidad vascular.

El músculo liso vascular desempeña un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo, la microcirculación y otras funciones cardiovasculares, pero a pesar de los grandes avances en este campo, los mecanismos moleculares y celulares por los que se regula la contractilidad del músculo liso vascular no se conocen con precisión.

El control del tono del músculo liso mediante el uso de fármacos vasodilatadores que actúan directamente sobre la célula muscular lisa es una estrategia farmacológica ampliamente utilizada para el estudio de la función vascular. Existen diversos puntos sobre los que pueden actuar estos fármacos, entre los que figuran:

- Modificación de la entrada de Ca^{2+} por bloqueo directo de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.
- Hiperpolarización de la membrana.
- Liberación o recaptación de Ca^{2+} por el retículo endoplasmático (RE).
- Modulación de las enzimas que determinan la sensibilidad al Ca^{2+} .

A través de estos mecanismos actúan los antagonistas del Ca^{2+} , los activadores de los canales de K^+ y los fármacos que modifican las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos. Muchos de estos fármacos son clínicamente importantes y se emplean en el tratamiento de problemas frecuentes como la hipertensión arterial, la angina de pecho y la insuficiencia cardíaca.

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular que controla multitud de procesos bioquímicos y está implicado en diversos mecanismos fisiológicos como la secreción, la diferenciación, la división y la comunicación celular. La importancia del Ca^{2+} como desencadenante de la contracción muscular se conoce desde el siglo XIX a través del trabajo de Sydney Ringer.

Los descubrimientos más recientes en el campo de la señalización cálcica se deben en buena parte a la invención de la técnica de *patch-clamp* y a los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} . El método de *patch-clamp* descrito por Neher y Sakmann en 1981 terminó con casi 20 años de larga búsqueda de una forma de detectar el flujo de corrientes iónicas a través de canales. En poco tiempo se hizo universal y se convirtió en una herramienta de trabajo fundamental en fisiología celular.

Al mismo tiempo de la aparición del *patch-clamp*, surgieron los indicadores fluorescentes sensibles al Ca^{2+} . El descubrimiento de la proteína aequorina (proteína luminiscente sensible al Ca^{2+}), a pesar de sus limitaciones, fue clave para la obtención de los primeros registros de Ca^{2+} citosólico.

Muchos de los problemas iniciales comenzaron a solucionarse cuando Roger Tsien desarrolló la primera sonda fluorescente de Ca^{2+} , quin-2. Fue de crucial importancia el hecho de que la desarrollase en forma de acetoximetiléster para, de esta forma, poder atravesar la membrana y retener el componente fluorescente soluble en el citosol gracias a la acción de las esterasas celulares. El gran avance vino de la mano de la segunda generación de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} : fura-2 e indo-1, los cuales poseían mejores características y se podían utilizar a concentraciones más bajas.

En el músculo liso vascular, las variaciones en los niveles de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) desempeñan un papel clave en el mantenimiento del tono; tanto directamente, regulando la contracción o la relajación del músculo liso, como indirectamente, controlando los procesos de síntesis y liberación de sustancias vasoactivas endoteliales, procesos todos ellos regulados por diferentes rutas de señalización.

Entre los numerosos factores que participan en la regulación de la $[Ca^{2+}]_c$ está su interacción con el AMPc. Este segundo mensajero fue descubierto en 1957 por Earl W. Sutherland y sus colaboradores de la Case Western Reserve University en Cleveland (Ohio, EE. UU.), mientras trataban de explicar cómo actuaba la adrenalina en el metabolismo del glucógeno. Gracias a los hallazgos en cuanto al mecanismo de acción de las hormonas por medio de segundos mensajeros, Sutherland fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1971.

En un principio, Sutherland descubrió que la adrenalina actúa por activación del enzima fosforilasa que da lugar a la formación de glucosa a partir del glucógeno. Más tarde descubrió que esta activación estaba mediada por una sustancia desconocida hasta el momento. El descubrimiento y caracterización química de este intermediario, denominado “segundo mensajero” (la hormona sería el primer mensajero), fue fundamental para la comprensión del mecanismo de acción de la adrenalina y otras hormonas. Esta nueva sustancia, identificada como un nucleótido, es lo que se denomina AMPc.

El descubrimiento de Sutherland implica que la adrenalina induce la formación de AMPc en las células hepáticas y éste, a su vez, activa el enzima fosforilasa, el cual permite la formación de glucosa. Entonces se planteó la cuestión de cómo la hormona estimula a la célula para que forme AMPc, y descubrió que esto tenía lugar por medio de un enzima desconocido hasta el momento denominado adenilil ciclasa (AC) (figura 1).

La idea principal en el esquema de Sutherland es que la adrenalina y otras hormonas no atraviesan la membrana celular sino que interaccionan con ésta. Ello conduce a la activación de la formación de AMPc que, en la célula, activa o inhibe varios procesos metabólicos. Esta hipótesis general fue inicialmente criticada por científicos de la época, ya que parecía improbable que una sustancia como el AMPc pudiese ocasionar efectos, más o menos específicos, cuya causa se atribuía a diferentes hormonas. Hoy se sabe que, junto con la adrenalina, un gran número de hormonas ejercen sus efectos por la vía postulada por Sutherland. La especificidad de cada hormona dependerá de su receptor y de la serie de reacciones químicas que acontezcan o no en el interior de la célula.

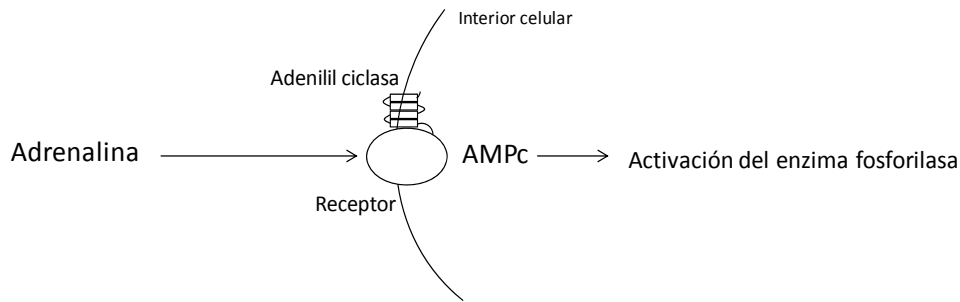


Figura 1. Esquema general propuesto por Sutherland para explicar el mecanismo de acción de la adrenalina y otras hormonas. Modificado de "Physiology or Medicine 1971 – Press Release". Disponible en la Web: <<http://www.nobelprize.org/nobelprizes/medicine/laureates/1971/press.html>> [Consulta: 9-8-2012].

Este descubrimiento supuso el nacimiento del concepto de segundo mensajero. Clásicamente, se define como una molécula de señalización intracelular que se genera en respuesta a una señal externa (primer mensajero) detectada por la célula. El segundo mensajero difunde en el interior de la célula e interacciona con otras moléculas de señalización originando una respuesta celular en respuesta a la señal externa.

Desde su descubrimiento, al AMPc le han sido atribuidas numerosas funciones celulares importantes para el normal funcionamiento celular en un amplio rango de especies. Entre estos procesos se incluyen las funciones cardiovasculares, la fototransducción, el olfato, el transporte de glucosa, la adhesión celular mediada por integrinas, el crecimiento celular o la apoptosis, entre otras. A pesar de que el AMPc se conoce desde hace más de medio siglo, hay cuestiones acerca de su regulación para las que todavía no hay respuesta.

En el músculo liso vascular el AMPc produce relajación por mecanismos no del todo conocidos y a veces contradictorios. Así, por ejemplo, existen evidencias de que fármacos que aumentan el nivel de AMPc reducen la entrada de Ca^{2+} a la célula, probablemente debido al bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo L. Sin embargo, los resultados publicados sobre la regulación de canales de Ca^{2+} por el AMPc son bastante contradictorios debido, en parte, a las dificultades para obtener resultados electrofisiológicos satisfactorios en este tipo de células. A su vez, la regulación de

los niveles intracelulares de AMPc es un fenómeno complejo en el que la $[Ca^{2+}]_c$ o el pH intracelular son factores determinantes.

Las interacciones entre el AMPc y el Ca^{2+} son amplias y numerosas, y refuerzan aun más la versatilidad de ambos mensajeros. El Ca^{2+} , por ejemplo, regula la síntesis y la degradación del AMPc, así como muchos efectos del principal efector del AMPc, la proteína cinasa A (PKA). Por otra parte, el AMPc regula la formación y la fosforilación del 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3), la actividad de los canales y bombas de Ca^{2+} , y la formación de otros mensajeros que movilizan Ca^{2+} . Muchas de las proteínas involucradas en la señalización del Ca^{2+} y del AMPc existen en múltiples isoformas, que se diferencian entre sí en su comportamiento y expresión. Además, ambos mensajeros pueden antagonizarse mutuamente, por ejemplo, en la contracción muscular, o potenciarse mutuamente, como puede ocurrir en el control de procesos como la secreción hormonal. Esta diversidad añade más complejidad a las rutas de señalización, aunque su significado fisiológico no se conozca exactamente.

Entre los fármacos que modifican los niveles intracelulares de AMPc se encuentra la forskolina. Descubierta en 1974, este diterpeno procede de las raíces del *Coleus forskohlii*, planta originaria de Asia ampliamente utilizada desde tiempos ancestrales por la medicina ayurvédica para el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, el asma y otras patologías. Los estudios clínicos de la planta y de la forskolina corroboran sus usos tradicionales. La forskolina aumenta los niveles de AMPc y las acciones mediadas por este nucleótido, por activación del enzima AC.

Aunque tradicionalmente se pensaba que el AMPc ejercía sus efectos principalmente por activación de la PKA, en los últimos años se ha demostrado la existencia de una nueva clase de proteínas implicadas en la transducción de la señal mediada por el AMPc. Se trata de las denominadas proteínas Epac (*exchange proteins directly activated by cAMP*) y su descubrimiento ha abierto nuevos horizontes en la investigación en el campo del AMPc.

Uno de los grandes problemas encontrados hasta la fecha para el estudio de la función del AMPc ha sido la carencia de un método de medida que permitiese la

determinación continua de los niveles de este nucleótido en las células vivas. Los métodos tradicionales implicaban la destrucción de la muestra y por tanto una medición en el punto final. Estos métodos tampoco consideran conceptos que han surgido en las últimas décadas como la compartimentación, que asume diferentes concentraciones de AMPc en las distintas partes de la célula.

En los últimos años ha habido un auge de nuevas técnicas que permiten el seguimiento de la concentración de AMPc intracelular ($[AMPc]_i$) en tiempo real. Estas técnicas, basadas en métodos fluorescentes y electrofisiológicos, utilizan los tres efectores del AMPc conocidos: la PKA, los canales activados por nucleótidos cíclicos y las proteínas Epac.

Consideramos que el presente trabajo tiene un interés práctico muy importante, ya que un mejor conocimiento del mecanismo de acción de la forskolina y de la interconexión de las rutas de señalización en las que intervienen el AMPc y el Ca^{2+} , en el músculo liso vascular, permitirá avanzar en la identificación de procesos patológicos en los que intervengan ambos mensajeros y, por consiguiente, contribuir a establecer las bases para el desarrollo de nuevas líneas terapéuticas.

El análisis detallado de la literatura demuestra que todavía quedan muchas incógnitas por resolver en relación a los efectos del AMPc, y su interconexión con el Ca^{2+} , en la contractilidad vascular.



Revisión bibliográfica



1 Contractilidad en el músculo liso vascular

El músculo liso de cada órgano se distingue del de la mayoría de los restantes órganos, en varios aspectos: dimensiones físicas, organización en haces o vainas, respuesta a diferentes estímulos, características de su innervación o función, etc. Sin embargo, los sistemas de clasificación son imperfectos y no representan su diversidad.

Históricamente, el músculo liso se ha clasificado en multiunitario y unitario en base a su innervación y a la respuesta generada (Bozler, 1948), y así lo recogen la mayoría de los libros de texto de fisiología actuales (Guyton, 2007). El primero está formado por fibras musculares lisas separadas que operan de manera independiente y están innervadas individualmente por una única terminación nerviosa. Algunos ejemplos son el músculo ciliar del ojo, el iris, el vaso deferente o los vasos sanguíneos. En el músculo liso unitario, en cambio, las células individuales están acopladas eléctricamente y se contraen todas a la vez, como una única unidad. Este tipo de músculo liso, también conocido como músculo liso sincitial o visceral, se encuentra por ejemplo en el tracto gastrointestinal y en el sistema urogenital.

Otro sistema de clasificación se basa en el estado de contracción (Fisher, 2010). Si el músculo liso de un determinado órgano está contraído por un determinado periodo de tiempo, se denomina músculo liso fásico. Es el caso, por ejemplo, del músculo liso de la vejiga o del útero. Este tipo muscular depende de la despolarización de la membrana para que tenga lugar la entrada de Ca^{2+} a la célula. Esta despolarización puede estar inducida por neurotransmisores. El músculo liso continuamente activo (músculo liso tónico) es menos dependiente de la despolarización de la membrana. En cambio, tiene un mecanismo de marcapasos endógeno para generar pulsos periódicos de Ca^{2+} . Un ejemplo de este tipo es el músculo liso vascular, pulmonar y cuerpo cavernoso (Berridge, 2008).

En comparación con el músculo esquelético, el músculo liso está compuesto por fibras mucho más pequeñas. No posee la disposición estriada de los filamentos de actina y miosina característica del músculo esquelético, aunque ambas proteínas

interactúan de forma similar en ambos tipos de músculo. Tampoco contiene el complejo de troponina normal, necesario para el control de la contracción, de forma que el mecanismo de ese control es diferente. Además, existen importantes diferencias entre la organización física del músculo liso y el esquelético, en el acoplamiento excitación-contracción, la regulación por el Ca^{2+} , la duración de la contracción y la cantidad de energía necesaria para ello (Webb, 2003).

1.1 Estructura de la pared vascular

Los vasos sanguíneos constan de tres capas concéntricas, que tienen una composición y espesor diferentes en función del tipo de vaso (Guyton, 2007). Las tres capas de la pared vascular, desde la luz hacia afuera son (Ross *et al.*, 2005):

- **Túnica íntima:** es la capa más interna, en contacto con la sangre circulante. Está constituida por endotelio (células epiteliales) y una capa conjuntival subendotelial que contiene la membrana elástica interna, cuyas fenestraciones permiten que las sustancias difundan con facilidad y alcancen las células más profundas del vaso.
- **Túnica media:** se extiende desde la membrana elástica interna hasta la membrana elástica externa. Está compuesta por células de músculo liso vascular (CMLV) rodeadas de tejido conectivo y fibras de elastina y colágeno secretadas por la propia célula. En las grandes arterias la capa media suele estar formada por más de 40 capas de CMLV, disminuyendo su número a medida que disminuye el diámetro de los vasos. Desde el punto de vista fisiológico, esta capa muscular es la que provee de fuerza mecánica a los vasos sanguíneos, estableciendo así su grado de contracción.
- **Túnica adventicia:** es la capa más externa. Está formada por tejido conjuntivo, fundamentalmente colágeno y fibras elásticas. A través de ella discurren los vasos encargados de la nutrición de la pared arterial o *vasa vasorum*, y las fibras nerviosas autónomas, o *nervi vascularis*, que transmiten estímulos de vasoconstricción al músculo liso de las paredes del vaso.

1.2 Estructura del músculo liso vascular

La principal función del músculo liso vascular es la contracción y el mantenimiento del tono vascular. Las CMLV que lo conforman tienen un tamaño longitudinal de entre 20-100 μm y un grosor que, en su zona central, alcanza aproximadamente los 5 μm (Guyton, 2007). El interior de la célula está ocupado por tres tipos de miofilamentos:

- Filamentos finos: contienen fundamentalmente monómeros de actina (actina G), una proteína contráctil globular de 42 kDa, que se dispone formando un filamento helicoidal con la proteína tropomiosina (proteína en forma de fibra de 70 kDa). También contienen caldesmona (proteína de 120-150 kDa), que se une a la actina F (actina polimerizada) y bloquea el sitio de unión para la miosina. Las acciones de la tropomiosina y de la caldesmona están controladas por la acción dependiente de Ca^{2+} de diversas moléculas reguladoras.

- Filamentos intermedios: formados por desmina (proteína de 52 kDa) y vimentina (57 kDa). Son parte del citoesqueleto de la célula, donde funcionan como soporte estructural.

- Filamentos gruesos: contienen miosina (proteína contráctil de 470 kDa). La miosina está conformada por dos subunidades de alto peso molecular (cadenas pesadas) y cuatro de bajo peso molecular (cadenas ligeras), también denominadas esenciales y reguladoras respectivamente. Las cadenas pesadas se enrollan una sobre la otra formando una doble hélice. En la región terminal de la molécula la estructura da lugar a una región sobresaliente, o cabezas de miosina, que son los lugares con actividad ATPasa y los lugares de unión a la actina durante la contracción. Asociadas a las cabezas de miosina se encuentran las cadenas ligeras reguladoras. Éstas tienen aminoácidos específicos que pueden ser fosforilados por el ATP (reacción catalizada por la cinasa de la cadena ligera de miosina o MLCK, del inglés *myosin light chain kinase*). Cuando esto ocurre pueden interactuar de forma cíclica con la actina y producirse el ciclo de los puentes cruzados.

Otra estructura importante de la CMLV son los cuerpos densos. Éstos son una parte del citoesqueleto y constituyen un sitio de fijación de los filamentos finos e

intermedios a la membrana plasmática (lo hacen por medio de la proteína α -actinina). Los cuerpos densos existentes en las membranas de células adyacentes pueden unirse entre sí por puentes proteicos, lo que permite la transmisión de la contracción de unas células a otras.

1.3 El proceso contráctil en el músculo liso

En condiciones fisiológicas, el aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ necesario para la contracción muscular puede proceder de cambios en el potencial de membrana (acoplamiento electromecánico) o de la unión de un agonista contráctil a su receptor específico en la superficie celular, y la consiguiente activación de un segundo mensajero que difunde dentro de la célula hasta el lugar de acción (acoplamiento farmacomecánico) (Somlyo y Somlyo, 1968). En esta forma de regulación se pueden producir cambios en el potencial de membrana de manera secundaria. Ambos mecanismos pueden tener lugar simultáneamente en la CMLV (Orallo, 1996).

Cuando, por alguno de los dos mecanismos anteriores, los niveles de Ca^{2+} citoplasmático aumentan por encima de $0,1 \mu M$, los iones se fijan a los sitios de unión de la calmodulina (CaM), proteína de unión al Ca^{2+} de aproximadamente 17 kDa. La unión de cuatro iones Ca^{2+} a una molécula de CaM activa la MLCK, formándose un complejo holoenzimático que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP- Mg^{2+} a un residuo de serina en posición 19 (Ser₁₉) de la cadena ligera de miosina de 20 kDa (MLC₂₀). Esta fosforilación permite la activación de la miosina-ATPasa por la actina (actomiosina), lo que conlleva un aumento de la hidrólisis de ATP. Así tiene lugar, de manera repetida, el ciclo de puentes cruzados y, en consecuencia, el desarrollo de fuerza de contracción (Orallo, 1996) (figura 2).

La miosina fosforilada tiene la capacidad de unirse repetidamente al filamento de actina, de manera similar a como ocurre en el músculo esquelético, pero de manera más lenta. Una posible explicación a esta lenta contracción que tiene lugar en el músculo liso es que las cabezas de los puentes cruzados tienen menos actividad ATPasa que en el músculo esquelético, de forma que la degradación del ATP, que suministra energía a los movimientos de las cabezas está muy disminuida,

con la correspondiente ralentización de la frecuencia de ciclos. Sólo se requiere una molécula de ATP por ciclo, independientemente de su duración. Esta economía de gasto es importante para poder mantener una contracción muscular tónica casi indefinidamente.

Mediante el empleo de fluoróforos sensibles al Ca^{2+} , se ha visto que la fuerza contráctil desarrollada para un nivel dado de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ varía en función del estímulo excitador, así, la fuerza inducida por agonistas es mayor que la inducida por despolarización con niveles altos de K^+ . Este mecanismo fue denominado “aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} ” de la maquinaria contráctil (ver apartado 3.2) (Pfitzer, 2001; Somlyo y Somlyo, 1968).

Una vez que ha tenido lugar la contracción muscular, para producir la relajación del músculo liso se deben retirar los iones Ca^{2+} del medio intracelular. Esto se consigue mediante una bomba que transporta iones Ca^{2+} al exterior de la célula (*plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase*, PMCA), o hacia el RE (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*, SERCA) (ver apartado 2.2). Estas bombas actúan lentamente, en comparación con la bomba de Ca^{2+} del músculo esquelético.

Cuando los niveles de Ca^{2+} disminuyen, éste se disocia de la CaM, la cinasa se inactiva y la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP, *myosin light chain phosphatase*) desfosforila la miosina, volviéndola inactiva. De este modo, el ciclo de los puentes cruzados se interrumpe y el músculo se relaja.

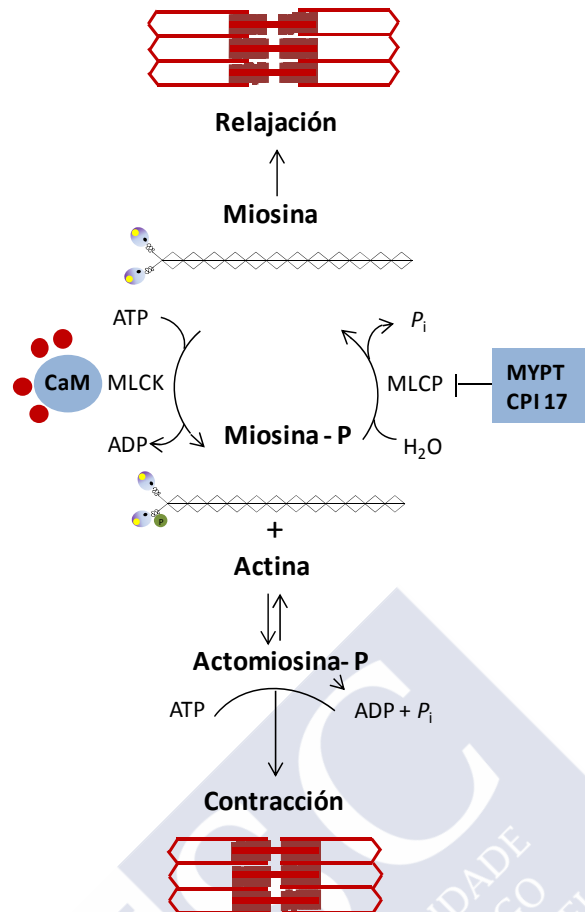


Figura 2. Esquema del ciclo de los puentes cruzados

1.4 Papel del endotelio en el mantenimiento del tono vascular

El endotelio desempeña una función crucial en el control de la presión arterial, regulando el tono del músculo liso vascular en respuesta a estímulos mecánicos y humorales por medio de la síntesis de agentes vasodilatadores, entre los que destacan el NO, el EDHF, la PGI₂, o factores contracturantes, como la endotelina (ET), que es liberada ante estímulos como la hipoxia, la distensión arterial o la exposición a sustancias vasoactivas. A este control del tono vascular contribuyen, también, otras sustancias liberadas por la pared endotelial (histamina, bradicinina, sustancia P, etc.) y la angiotensina, en cuya cascada de síntesis participa el endotelio (Serban *et al.*, 2010).

Además, el endotelio participa en otras importantes funciones homeostáticas independientes del tono vascular, como son la regulación de la coagulación intravascular, la inflamación y la modulación inmune, y tiene capacidad de influir en el crecimiento y proliferación de las CMLV que conforman la capa media de los vasos sanguíneos.

El NO es un gas con las propiedades de radical libre que actúa como una molécula mensajera. Está implicado en procesos fisiológicos como la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria, la neurotransmisión o la regulación inmunológica, y es sintetizado por una amplia variedad de tipos celulares que incluye células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias (Gómez-Jimenez y Salgado-Remigio, 1993; Rodrigo *et al.*, 2000).

Una vez sintetizado, el NO difunde desde las células endoteliales sin requerir ningún tipo de transportador de membrana y estimula en las CMLV su principal receptor, la guanilil ciclasa soluble (GC), que cataliza la síntesis de 3'-5' monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este nucleótido activa su principal efector, la cinasa dependiente de GMPc (PKG, proteína cinasa G) e induce la relajación muscular por aumento de la recaptación de Ca^{2+} por el RE y activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}) que conducen a una hiperpolarización y reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Dong *et al.*, 1998) (ver apartado 4.2).

Hay dos tipos de PKG, I y II, de la cual la PKG tipo I es la cinasa más importante en la mediación de la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria. La actividad del GMPc finaliza por su conversión a 5'-GMP por las fosfodiesterasas (PDE) (Kwan *et al.*, 2009). En consecuencia tiene lugar la vasodilatación y la regulación del flujo y de la presión sanguínea. El NO, además, tiene efectos no dependientes de GMPc y que son relevantes en enfermedades vasculares como, por ejemplo, en la adhesión monocitaria.

1.5 Modulación fenotípica de las células musculares lisas

Las CMLV de los vasos sanguíneos maduros son células altamente especializadas que presentan un fenotipo contráctil o quiescente, diferenciado, caracterizado por la expresión de marcadores contráctiles específicos del músculo

liso, canales iónicos y moléculas de señalización necesarias para la función contráctil, únicas en este tipo celular (Maurice *et al.*, 2003). Estas células presentan baja actividad proliferativa y baja actividad sintética y, a diferencia de los miocitos cardíacos o esqueléticos, poseen una alta plasticidad, es decir, pueden cambiar reversiblemente de fenotipo en respuesta a cambios locales. Así, los miocitos y las células endoteliales de arterias sanas no dañadas regulan el diámetro luminal del vaso sanguíneo coordinando la contracción y la relajación.

Durante el desarrollo, o en respuesta a un daño vascular como el que ocurre tras una angioplastia, *stent* o *bypass*, las CMLV se desdiferencian y entran de nuevo en el ciclo celular. Aumenta, entonces, la tasa de proliferación, migración y síntesis de componentes de la matriz extracelular y, al mismo tiempo, disminuye la expresión de los marcadores contráctiles específicos. En este estado, las CMLV presentan lo que se denomina un fenotipo sintético o activado, no poseen capacidad contráctil y tienen disminuida su respuesta a variaciones normales en la demanda cardiovascular.

En la patogénesis de enfermedades como la aterosclerosis, hiperplasia de la íntima, hipertensión, asma o aneurisma vascular se produce una proliferación y migración de las CMLV que puede ocasionar un estrechamiento de la luz del vaso y contribuir al desarrollo de complicaciones cardiovasculares severas.

Las CMLV y las células endoteliales, aisladas de vasos sanguíneos y propagadas en cultivos de tejidos, comparten muchas de las características de las células de fenotipo sintético o activado.

1.5.1. Papel del AMPc en la proliferación del músculo liso vascular

El AMPc es un inhibidor de la proliferación celular. En los vasos sanguíneos sanos, las células musculares poseen alta capacidad de sintetizar AMPc y de esta manera contribuyen a mantener el fenotipo contráctil (Indolfi *et al.*, 2000). Tras un daño vascular se produce una disminución en la síntesis de AMPc y un aumento de la proliferación de las células.

Aunque no se conocen con precisión las cascadas de señalización implicadas en este proceso, la ruta AMPc/PKA fue la primera implicada en la regulación de la

proliferación de las CMLV. Trabajos más recientes, en miocitos de aorta, sugieren que la Epac y la PKA actúan sinérgicamente en la inhibición de la proliferación de manera independiente de Rap1 (principal efector de las proteínas Epac y que veremos con detalle en el apartado 4.1.2), mientras que la acción individual de estas rutas apenas afecta a la proliferación (Hewer *et al.*, 2011).

Este mismo hecho se ha puesto de manifiesto en un reciente trabajo llevado a cabo por el grupo de la Dra. Schmidt (Roscioni *et al.*, 2011) en células de músculo liso respiratorio humano en el que Epac y PKA previenen el cambio de fenotipo contráctil a fenotipo proliferativo inducido por exposición de las células al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Otro reciente trabajo concluye que el potente inhibidor de la PDE3, cilostazol, incrementa la expresión de marcadores contráctiles en CMLV e induce la diferenciación celular desde un fenotipo proliferativo (Chen *et al.*, 2011). Además, se ha observado que tras la angioplastia aumentan los niveles de PDE3A/4B y disminuyen los niveles de AMPc, lo que aumenta el potencial beneficioso de los inhibidores de fosfodiesterasas (Zhao *et al.*, 2008).

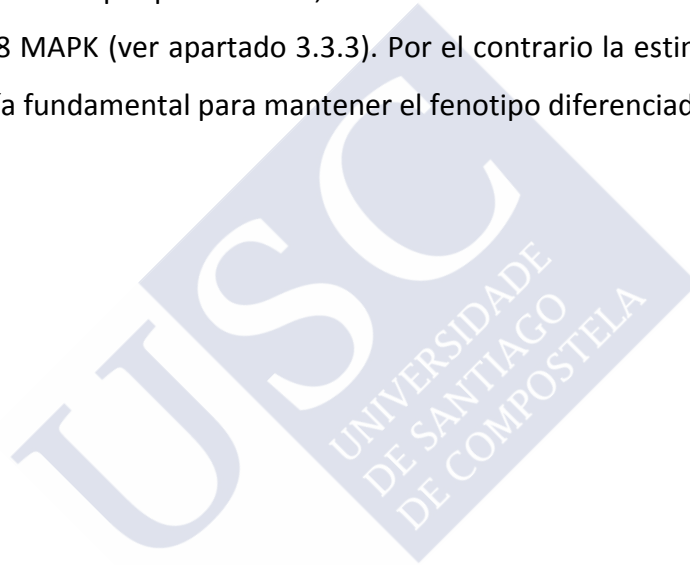
Un análogo de la PGI₂, el iloprost, promueve el cambio a fenotipo contráctil (aumenta la expresión de marcadores de diferenciación específicos de músculo liso) y cambios en la morfología. Rzucidlo y sus colaboradores han sugerido la participación de la ruta AMPc/PKA en esta inducción (Rzucidlo *et al.*, 2007).

1.5.2. Otros factores que influyen en la proliferación del músculo liso vascular

- Células endoteliales: contribuyen a mantener las CMLV en un fenotipo diferenciado. Así, tras un daño arterial, una rápida endotelialización de la superficie arterial disminuye la hiperplasia de la íntima. En esta diferenciación fenotípica inducida por las células endoteliales están involucradas la ruta de señalización de la cinasa de 3-fosfoinositol/ proteína cinasa B (PI₃K/PKB-Akt) y su efector, la proteína calcineurina. Además, un activador de esta ruta, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I, *insulin-like growth factor I*,) es fundamental para mantener el fenotipo diferenciado, pero se desconoce si existe un componente endotelial responsable de

este hecho. En este punto no hay consenso sobre la participación de esta ruta en la modulación fenotípica (Hayashi *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2000).

• Suero bovino: el cultivo de CMLV en presencia de suero bovino induce proliferación celular y desdiferenciación de las células, así como una regulación a la baja de los niveles de expresión de proteínas contráctiles y receptores de la superficie celular, lo que se traduce en una pérdida de contractilidad (Campbell y Campbell, 1993). El Dr. Hayashi y sus colaboradores (Hayashi *et al.*, 2001) han sugerido que los ácidos lisofosfatídicos insaturados extraídos de la fracción lipídica del suero son los responsables de la desdiferenciación de las CMLV y, que en este cambio hacia un fenotipo proliferativo, intervienen de manera coordinada las cinasas ERK y p38 MAPK (ver apartado 3.3.3). Por el contrario la estimulación de la ruta PI₃K/Akt sería fundamental para mantener el fenotipo diferenciado.



2 Homeostasis del Ca^{2+} en el músculo liso

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular utilizado por numerosas hormonas y neurotransmisores. Es un sistema ubicuo, con gran número de implicaciones fisiológicas entre las que se encuentran la contracción muscular o la liberación de neurotransmisores, la proliferación celular, la plasticidad sináptica o la apoptosis.

La contractilidad del músculo liso vascular depende de cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ finamente regulados. Para esta regulación de la homeostasis del Ca^{2+} , la célula dispone de distintos mecanismos que controlan, por un lado, la entrada y la salida de Ca^{2+} desde/hacia el espacio extracelular y/o los depósitos intracelulares y, por otro, los sistemas de transporte activo desde el citosol hacia el medio externo o hacia los depósitos (Berridge, 1997; Floyd y Wray, 2007).

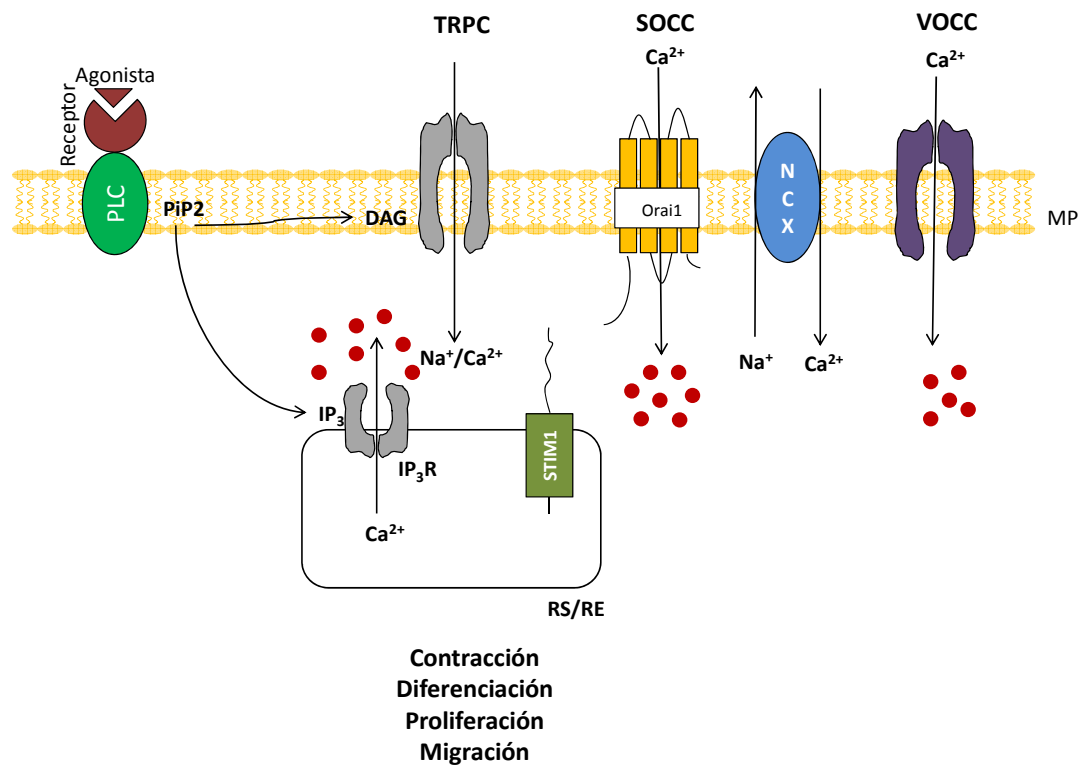


Figura 3. Esquema general de la homeostasis del Ca^{2+} en el músculo liso. NCX: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. VOCC: canales de Ca^{2+} operados por voltaje. SOCC: canales de Ca^{2+} operados por depleción de reservorios.

2.1 Aumento de la concentración cálcica citoplasmática

En un miocito que se encuentra en situación de reposo, la $[Ca^{2+}]_e$ en el medio extracelular (1-2 mM) es muy superior a la $[Ca^{2+}]_c$ (0,1 μ M). Para que se produzca una activación de la maquinaria contráctil es necesario que la $[Ca^{2+}]_c$ se incremente hasta un rango de entre 1 y 10 μ M (Akata,2007a; Bolton, 1979; Marin *et al.*, 1999).

La $[Ca^{2+}]_c$ puede incrementarse por una liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, o bien por una entrada del ión en la célula a través de canales específicos existentes en la membrana plasmática, aunque normalmente el Ca^{2+} procede de ambas rutas (Sanders, 2001; Akata,2007a).

2.1.1. Entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática

El Ca^{2+} procedente del medio extracelular puede entrar al citoplasma de la CMLV a través de varios tipos de canales (Marchand *et al.*, 2012). Los principales tipos se describen a continuación.

a. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje

Los canales de calcio operados por voltaje (VOCC, *voltage-operated Ca^{2+} channels*) constituyen la vía de entrada de Ca^{2+} más importante en las CMLV. Una despolarización, es decir, una variación del potencial de membrana hacia valores más positivos, puede inducir la apertura de estos canales, generando así un flujo de entrada de Ca^{2+} que permite la activación de la maquinaria contráctil. La presencia de los VOCC ha sido demostrada en gran cantidad de CMLV, y han sido caracterizados tres tipos mediante métodos farmacológicos y electrofisiológicos.

• *Canales operados por voltaje tipo L*

Su denominación procede del inglés *long-lasting large capacitance* (larga duración y gran capacidad). Son los mayoritarios y más importantes desde el punto de vista funcional en los vasos sanguíneos. Entre todos los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, los tipo L son los únicos sensibles a dihidropiridinas (DHP), por lo que también se suelen denominar canales de Ca^{2+} sensibles a DHP. La regulación de la entrada de Ca^{2+} externo a través de este tipo de canales es un destacado medio de control del estado de contractilidad del músculo liso. Diversos vasodilatadores

ejercen su acción regulando la probabilidad de apertura de los canales tipo L. Su inactivación depende del voltaje y de la propia $[Ca^{2+}]_c$ (Richard, 2005; Sanders, 2001).

En las CMLV, al contrario de lo que ocurre en los cardiomiocitos, el aumento de AMPc inhibe el flujo de Ca^{2+} a través de estos canales y, por tanto, suprime la contracción inducida por despolarización de la membrana. En esta inhibición probablemente interviene la PKA (Orlov *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2003).

- *Canales operados por voltaje tipo T*

Su nombre procede del término inglés *transient* (transitoria). Su inactivación es muy rápida y parece ser únicamente dependiente de voltaje. Su presencia ha sido descrita en diferentes tipos de músculo liso, incluyendo el vascular (Rodman *et al.*, 2005) donde su función todavía no es del todo conocida aunque no parecen contribuir significativamente a la vasoconstricción arterial.

La expresión de los canales T se ha asociado a la proliferación patológica de las CMLV. Concretamente se ha vinculado a las fases G1 y S del ciclo celular, periodo importante para la señalización de la expresión génica necesaria para el crecimiento, progresión del ciclo y finalmente la división celular (Cribbs, 2006; Perez-Reyes, 2004; Tzeng *et al.*, 2012).

- *Canales operados por voltaje tipo R*

Su nombre deriva del término inglés *resting* (reposo) y han sido identificados en miocitos de aorta y de arterias renales. Su papel fisiológico no se conoce con exactitud, pero se ha planteado la posibilidad de que estén implicados en la entrada permanente de Ca^{2+} en la célula durante la fase de contracción tónica que tiene lugar en las preparaciones de músculo liso por despolarización con concentraciones extracelulares elevadas de K^+ (Akata, 2007a; Orallo, 1996).

b. Canales catiónicos no selectivos

Los canales catiónicos no selectivos (NSCC, *non-selective cationic channels*) son permeables también a iones monovalentes como Na^+ y K^+ , pero se desconoce en gran medida el mecanismo por el que se activan. Algunos agonistas pueden activar corrientes de entrada de diferentes cationes en las CMLV a través de los NSCC pero

la entrada de Ca^{2+} a través de este tipo de canales se cree que es poco importante. Sin embargo, el incremento de la conductancia al Na^+ de los NSCC conlleva a una despolarización de la membrana, con la subsiguiente activación de los VOCC (Akata, 2007a; Orallo, 1996).

En las CMLV estos canales se activan tras la estimulación del receptor ET_A , con lo cual la mayor parte de la respuesta de la ET-1 es mediada por los NSCC (Wynne *et al.*, 2009).

c. Canales de Ca^{2+} operados por receptor

Los canales operados por receptor (ROCC, *receptor-operated Ca^{2+} channels*) son un tipo de canales de Ca^{2+} de estructura similar a los VOCC, cuya activación se debe únicamente a la interacción de un agonista con su receptor de membrana (van Bre.e.m.en y Saida, 1989) y no a la despolarización de la membrana plasmática. Tras la unión del ligando (NA, ATP, AVP) al receptor, estos canales se activan por un mecanismo mediado por proteínas G, para generar 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG) por acción de la fosfolipasa C (PLC) y así desencadenar la liberación de Ca^{2+} necesaria para producir la vasoconstricción (Wynne *et al.*, 2009).

En la actualidad se cree que los ROCC son un tipo de NSCC con cierta selectividad por los cationes divalentes pero que, en condiciones fisiológicas, dejan pasar fundamentalmente iones Na^+ , por lo que se ha discutido ampliamente si incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ suficientemente como para activar la contracción (Akata, 2007a).

Dentro de los ROCC podemos distinguir canales activados por ligando como el purinoceptor P2X, que se abre en respuesta a la unión extracelular de ATP, y otros canales acoplados a proteínas G. Algunos miembros de la familia de canales TRP (receptor de potencial transitorio o *transient receptor potential*) (ver sección e.) también han sido clasificados dentro de los ROCC (TRPC3, TRPC6 y TRPC7) (Large, 2002; Wynne *et al.*, 2009).

d. Canales operados por depleción y entrada capacitativa de Ca^{2+}

Se ha descrito que una depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , fundamentalmente del RE, está acoplada a la activación de una ruta de entrada de

Ca^{2+} en numerosos modelos celulares, entre los que se encuentran las CMLV. Este fenómeno se conoce como entrada de Ca^{2+} activada por depleción (SOCE, *store-operated calcium entry*) o entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE, *capacitative calcium entry*) y fue propuesta por JW Putney en la década de los 90 (Putney, 1990). La depleción de los reservorios intracelulares que da lugar a la CCE puede iniciarse con la unión de un agonista (hormona o factor de crecimiento) a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR, *G-protein coupled receptor*) o a un receptor de cinasas de tirosina (RTK, *receptor tyrosine kinase*). La activación del receptor desencadena una cascada de señalización que implica la síntesis de IP_3 y DAG mediada por la PLC. El IP_3 se une a sus receptores en la membrana del RE (IP_3R) y, de este modo, se produce la liberación de parte del Ca^{2+} almacenado en el interior de esta organela (Byron y Taylor, 1995; Matsuki-Fukushima *et al.*, 2009).

La CCE de Ca^{2+} desempeña un papel crucial en el relleno de los reservorios intracelulares deplecionados (Noguera *et al.*, 1997), sin embargo, la contribución directa de este proceso al acoplamiento estímulo-contracción depende del tipo de músculo liso. Concretamente, en el músculo liso vascular parece participar de modo importante en la regulación del tono (Gibson *et al.*, 1998; Utz *et al.*, 1999), pero también es importante en la proliferación celular y la apoptosis (Wamhoff *et al.*, 2006).

Los canales implicados en este proceso se han denominado tradicionalmente canales operados por depleción (SOCC, *store-operated Ca^{2+} channels*). Aunque no se conocen sus características con exactitud los SOCC son altamente selectivos para el Ca^{2+} y otros cationes divalentes. Los canales SOCC que mejor se conocen son los canales de Ca^{2+} activados por liberación de Ca^{2+} (CRAC, *Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels*) y su presencia ha sido descrita en diferentes tipos de CMLV, entre ellas en las células A7r5 (Potier *et al.*, 2009). Algunos miembros de la familia de los TRPC han sido propuestos como posibles SOCC en diferentes tipos de músculo liso, incluido el vascular (Walker *et al.*, 2001) (ver sección e.). Las isoformas TRPC1, 4, 5 y 7 son las que contribuyen a la CCE pero sus propiedades son diferentes a las de los canales CRAC. Mientras que los CRAC son altamente selectivos para iones Ca^{2+} , los canales TRPC son NSCC. Las isoformas de

TRPC activadas por la depleción de los reservorios forman un canal catiónico no selectivo, permeable al Ca^{2+} , distinto de los canales CRAC (Smyth *et al.*, 2010).

A pesar de los grandes avances en los últimos años, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos que conducen a la apertura de los SOCC tras el vaciado de los reservorios. Algunos autores han propuesto la existencia de un mensajero, el CIF (*calcium influx factor*), que se libera tras la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} y migra a la membrana plasmática, donde activa los SOCC y la consecuente entrada de Ca^{2+} . Esta hipótesis se conoce como hipótesis del mensajero difusible y su máximo representante es el grupo de Victoria Bolotina, de la Universidad de Boston (Trepakova *et al.*, 2000). La primera evidencia experimental de la existencia de este mensajero es fruto de un trabajo previo de Randriamampita y Tsien (Randriamampita y Tsien, 1993) en el que activan la entrada de Ca^{2+} en oocitos de *Xenopus*, con extractos celulares fraccionados y purificados. Sin embargo, la estructura molecular del CIF no ha sido caracterizada hasta la fecha.

Otros investigadores proponen la posibilidad de una interacción directa entre el RE y la membrana plasmática. Irvine fue el primero en describir un mecanismo de comunicación entre el RE y la membrana plasmática mediante una interacción directa proteína-proteína (Irvine, 1990). Este planteamiento se conoce con el nombre de hipótesis del acoplamiento conformacional.

Los trabajos más recientes parecen indicar que la entrada capacitativa de Ca^{2+} necesita dos familias de proteínas: las proteínas STIM (*stromal-interacting molecule*) y Orai. Las primeras están localizadas en la membrana del RE, y tras la depleción de los reservorios de Ca^{2+} se reordenan en lugares muy próximos a la membrana plasmática. En estos lugares de unión entre el RE y la membrana plasmática las proteínas STIM interaccionan y activan la subunidad formadora de poro de los canales SOCC (constituída por las proteínas Orai). Este descubrimiento ha proporcionado información crucial acerca del mecanismo de acoplamiento entre los reservorios y la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOCC (Berna-Erro *et al.*, 2012; Soboloff *et al.*, 2006; Smyth *et al.*, 2010). Tras el descubrimiento de las

proteínas Orai y STIM las nuevas investigaciones van encaminadas a dilucidar si los TRPC funcionan de manera coordinada con estas proteínas (Salido *et al.*, 2011).

En las CMLV de fenotipo proliferativo la entrada capacitativa de Ca^{2+} está aumentada con respecto a los miocitos contráctiles, y ello se correlaciona con un aumento de la expresión de STIM1 y Orai1. En un reciente trabajo, mediante el empleo de ratones *knockdown* para STIM1 y Orai1, se ha visto que se reduce significativamente la entrada capacitativa de Ca^{2+} activada por tapsigargina o por el PDGF, así como la proliferación y la migración celular. Esto mismo no ocurre para otros subtipos de Orai y STIM ni para los TRPC 1, 4 y 6 (Zhang y Trebak, 2011).

e. Canales TRP

Los canales TRP (*transient receptor potential*) fueron descritos inicialmente en los fotorreceptores de la mosca *Drosophila*, pero actualmente se conoce su existencia en las células de los mamíferos, incluidas las CMLV (Walker *et al.*, 2001), en las que se conocen al menos 10 isoformas de TRP. Estos canales son insensibles a cambios en el potencial de membrana, en cambio son canales catiónicos no selectivos, permeables a diferentes cationes monovalentes y divalentes, incluido el Ca^{2+} (Firth *et al.*, 2007). La mayoría se localizan en la membrana plasmática y forman una gran familia de canales catiónicos con diversas funciones fisiológicas.

La mayoría de los canales TRP se activan por múltiples estímulos. La relevancia fisiológica de tal estimulación dependerá del contexto celular específico (estado de fosforilación, ambiente lipídico, interacción con proteínas, concentración de ligandos relevantes, etc). En base al estímulo que los activa y a la homología de sus secuencias se pueden dividir en 3 grandes subfamilias (Yang *et al.*, 2010):

- TRPC (*canonical*): esta subfamilia está formada por 7 miembros. En el músculo liso vascular son importantes debido a su función como SOCC (TRPC1), que pueden ser activados por depleción de los reservorios de Ca^{2+} , y como ROCC (TRPC3 y C6), que se activan por DAG y permiten la entrada de Ca^{2+} de manera independiente de la PKC. En general, los canales TRPC son importantes en la vasoconstricción inducida por los

agonistas del α -adrenoceptor, en la proliferación del músculo liso vascular y en el remodelado inducido por factores de crecimiento o mitógenos.

- TRPV (*vanilloid-related*): se han identificado 6 miembros. Se activa específicamente con 12,13-didecanoato de 4 α -forbol (4 α -PDD) e induce un aumento progresivo de Ca^{2+} dependiente del Ca^{2+} extracelular en las CMLV (Tanaka *et al.*, 2008).
- TRPM (*melastatin-related*): en mamíferos consta de 8 miembros. Su activación específica por mentol induce una respuesta cálcica que puede ser inhibida por Ni^{2+} .

2.1.2. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares

El RE es el principal reservorio de Ca^{2+} y el orgánulo celular más importante en el mantenimiento de la homeostasis cálcica en miocitos. En su interior, la $[\text{Ca}^{2+}]$ puede llegar a alcanzar los 15 mM (Sanders, 2001), lo que supone entre cientos o miles de veces la concentración en el citosol. Esta capacidad de almacenamiento se debe a la existencia en el RE de proteínas fijadoras de Ca^{2+} , principalmente calreticulina y calsecuestrina (Wray y Burdyga, 2010; Yáñez *et al.*, 2012).

El RE tiene una parte superficial, próxima a la membrana plasmática, y otra más profunda. La porción próxima a la membrana está en contacto con microdominios ricos en componentes de señalización y sirve para atenuar la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana. Esta proximidad del RE a los canales de la membrana plasmática así como la limitación en la difusión de Ca^{2+} permite un aumento del Ca^{2+} muy localizado en estas áreas, que puede alcanzar el nivel necesario para activar canales (K^+ y Cl^-), intercambiadores ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) o bombas (Ca^{2+} -ATPasa) (Wray *et al.*, 2005). La parte más profunda del RE es la encargada de proporcionar el Ca^{2+} que se une a la calmodulina (junto con la entrada directa de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática) para posteriormente activar los miofilamentos.

Se han descrito tres tipos de estructuras en la membrana del RE, que pueden actuar como canales de liberación de Ca^{2+} intracelular: los receptores de IP_3 (IP_3R),

los receptores de rianodina (RyR) y, más recientemente los denominados canales de dos poros (TPC, *two-pore channels*).

- Receptor de IP₃

El 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) es una molécula de pequeño tamaño, segundo mensajero de la transducción de la señal celular. Se produce, junto con el DAG, por hidrólisis del fosfolípido de membrana bifosfato de 4,5-fosfatidil inositol (PIP₂) en una reacción catalizada por la PLC cuando un agonista vasoconstrictor se une a un GPCR en la membrana celular. El IP₃ difunde a gran velocidad por el citosol y se une a su receptor específico situado en la membrana del RE, denominado receptor de IP₃ (IP₃R) (Berridge, 1993).

El IP₃R es un canal de Ca²⁺ formado por grandes proteínas que conforman un tetrámero de subunidades idénticas. Cada subunidad está constituida por seis dominios transmembrana. La unión del IP₃ a su sitio de unión (IBC o *IP₃-binding core*) en el tetrámero desencadena una serie de cambios conformacionales que dará lugar a la apertura del poro central y a la salida de Ca²⁺ del RE al citosol (Taylor *et al.*, 2009). En los vertebrados existen tres subtipos de este receptor (IP₃R1, -2 y -3), donde su expresión, distribución celular y asociación con proteínas accesorias varía en función del fenotipo celular y determinará la sensibilidad al Ca²⁺ (Parys y De Smedt, 2012).

En homogenados frescos de aorta el IP₃R1 es la forma mayoritaria mientras que en las células en cultivo y en homogenados de aorta de ratas neonatas aumenta la expresión de las formas 2 y 3. Ello indica que cada subtipo tiene una función específica en la regulación del [Ca²⁺]_i durante la proliferación del músculo liso vascular (Tasker *et al.*, 2000).

Además de en la membrana del RE, el IP₃R se encuentra en otras localizaciones de la célula que también contribuyen a la señalización cálcica como son la membrana plasmática, vesículas secretoras, envoltura nuclear, retículo nucleoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas. Estas estructuras tienen una capacidad limitada de almacenaje de Ca²⁺.

Como consecuencia de la unión del IP_3 a su receptor, el canal se abre y permite la salida de iones Ca^{2+} del RE, lo que conduce a un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$. Esta liberación de Ca^{2+} , dependiente de IP_3 , también depende de la $[Ca^{2+}]_c$. Es una regulación bifásica, es decir, es necesaria una cierta concentración citoplasmática de Ca^{2+} ($\sim 0,3 \mu M$) para que se active la liberación de Ca^{2+} dependiente de IP_3 , pero si los niveles aumentan por encima de $\sim 1 \mu M$, se inhibe la liberación. Por este motivo, este mecanismo (inicialmente descrito en CMLV y posteriormente en otros modelos celulares) tiene la propiedad inherente de ser regenerativo, es decir, cuando hay una liberación de Ca^{2+} local, en una parte de la célula, se libera Ca^{2+} en sitios adyacentes, así se generará una ola de Ca^{2+} que permite la transmisión de las señales cálcicas de un sitio de la célula a otro de una manera que recuerda a la propagación de los potenciales de acción nerviosos (Iino, 2010).

Así, cuando la concentración de IP_3 aumenta, se desencadenan una serie de señales cálcicas que comienzan con la apertura de un canal (se produce lo que se denomina un *blip* de Ca^{2+}) que dará lugar a la apertura coordinada de un grupo de canales IP_3R (Ca^{2+} *puffs*) y finalmente, si hay suficiente IP_3 aumenta la $[Ca^{2+}]_c$ (ola de Ca^{2+} o Ca^{2+} *wave*) de manera que invade toda la célula (Parkash y Asotra, 2012; Taylor y Tovey, 2010).

Un ejemplo de conexión entre las rutas del AMPc y del Ca^{2+} lo encontramos en el hecho de que los tres subtipos del IP_3R en mamíferos son fosforilados por la PKA y, al menos para los subtipos 1 y 2, ello causa un aumento de su sensibilidad al IP_3 (Taylor y Tovey, 2012). En miocitos cardíacos, la proteína Epac1 es un nexo de unión con la señalización cálcica, ya que la unión del AMPc a Epac1 cataliza la unión de GTP a Rap2B, con la consecuente activación de la isoforma ϵ de la PLC y la liberación de Ca^{2+} de sus reservorios intracelulares (Schmidt *et al.*, 2001). La isoforma ϵ es la única entre todas las isoformas de la PLC que posee actividad fosfolipasa y actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF, *guanine-nucleotide exchange factor*). Ambas acciones son necesarias para la liberación de Ca^{2+} mediada por el β -adrenoceptor (y dependiente de Epac) en el corazón.

El Dr. CW Taylor y sus colaboradores han descrito que la hormona paratiroidea (PTH), y otros receptores que estimulan la formación de AMPc, se

comunican con el receptor de IP_3 a través de las denominadas uniones de AMPc (*cAMP junctions*), donde el AMPc pasa directamente de una isoforma específica de AC (AC6) a un subtipo específico del IP_3R (IP_3R2) para así aumentar su sensibilidad al IP_3 (Tovey, 2008). Esta asociación selectiva entre la AC6 y el IP_3R2 sería suficiente para producir la liberación de Ca^{2+} dependiente de IP_3 desencadenada por la PTH.

Esta observación ha sido definida como señalización binaria: el AMPc se libera en su diana a concentraciones muy altas y la activa mediante una respuesta del tipo todo o nada. En estos complejos queda restringido el acceso de las PDE. La otra manera se denomina señalización análoga, donde dianas que se encuentran alejadas de las AC, como la PKA o las Epac, responden a cambios graduales en el AMPc. En este tipo de señalización es necesaria una degradación local del AMPc por las enzimas PDE para finalizar la respuesta y mantener la organización espacial de la señal.

- Receptor de rianodina

Los receptores de rianodina (RyR) son canales presentes en la membrana del RE que liberan Ca^{2+} al citosol, sensibles a la cafeína y al alcaloide natural rianodina. Su principal modulador alostérico fisiológico es la ADP-ribosa cíclica (cADPR). En los miocitos el principal activador de estos canales es el Ca^{2+} citoplasmático, por este motivo los RyR están considerados como los canales de liberación de Ca^{2+} inducida por el Ca^{2+} o CICR (*Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*). Actualmente se conocen tres isoformas (RyR1, 2 y 3), siendo la isoforma tipo 3 la mayoritaria en el músculo liso (Zhang *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2003) y en aorta (Ledbetter *et al.*, 1994).

Una activación de los RyR, por Ca^{2+} o por cafeína, da lugar a un aumento global en la $[Ca^{2+}]_c$ y a una contracción transitoria. Mientras que una activación de un grupo pequeño de RyR da lugar a las señales cálcicas denominadas *sparks*, que actúan en la membrana plasmática en las proximidades de canales iónicos sensibles al Ca^{2+} , sin alterar directamente la concentración citosólica global de Ca^{2+} (Wellman y Nelson, 2003). Estas señales son bloqueadas por agentes que deplecionan Ca^{2+} del RE, como la tapsigargina y el ácido ciclopiazónico.

La cADPR, nucleótido de adenina sintetizado a partir del NAD^+ por el enzima ADP-ribosil ciclasa, incrementa la sensibilidad del RyR al Ca^{2+} e induce la liberación de este ión por un mecanismo de CICR (Guse, 2002).

La estructura primaria del IP_3R y del RyR son muy similares: ambos son proteínas homólogas y funcionan como una canal liberador de Ca^{2+} en la membrana del RE. La principal diferencia entre los dos tipos de liberación de Ca^{2+} es que mientras que el RyR es activado solamente por Ca^{2+} , el IP_3R necesita simultáneamente IP_3 y Ca^{2+} para su activación. Otra diferencia importante es que el Mg^{2+} es un potente inhibidor del mecanismo de CICR inducido por el RyR, mientras que apenas afecta a la dependencia del Ca^{2+} del IP_3R (Iino, 2010). En cultivos proliferativos de células musculares lisas de aorta de rata (RASMC, *rat aortic smooth muscle cells*) se pierde la expresión del RyR, con la consecuente pérdida del mecanismo de CICR sensible a la cafeína (la expresión del IP_3R no se ve afectada) (Vallot *et al.*, 2000).

- Canales de dos poros

Existe un tercer grupo de canales de Ca^{2+} intracelulares implicados en la señalización cálcica, en principio independientes de los IP_3R y los RyR: se trata de los canales TPC (*two-pore channels*), activados por NAADP (*nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate*). Este segundo mensajero, producido a partir del enzima ADP-ribosil ciclasa, controla la liberación de Ca^{2+} intracelular por un mecanismo diferente al del IP_3 o al de la cADPR, ya que permite la liberación específica de Ca^{2+} mediante microsomas en gran variedad de células y líneas celulares (Yusufi *et al.*, 2002).

La activación de los canales de dos poros induce una liberación de Ca^{2+} de receptores ácidos, como lisosomas y endosomas (Galione y Chuang, 2012), por un mecanismo inicialmente descrito por Genazzani y Galione (Genazzani y Galione, 1996). En un reciente trabajo se ha descrito que estas proteínas participan en la contractilidad mediada por NAADP en algunos tipos de músculo liso vascular (Tugba Durlu-Kandilci *et al.*, 2010).

2.2 Descenso de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática

Una vez que ha tenido lugar el proceso de contracción muscular se deben retirar los iones Ca^{2+} del líquido intracelular para que tenga lugar la relajación. Para disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ existe una serie de transportadores que se encargan de expulsar el Ca^{2+} al medio extracelular, o bien, de mediar su recaptación por parte de los reservorios intracelulares, así contribuyen a mantener niveles bajos de Ca^{2+} en la célula en condiciones de reposo (Floyd y Wray, 2007).

2.2.1 Salida de Ca^{2+} al medio extracelular

A nivel de la membrana plasmática hay dos mecanismos principales encargados de disminuir los niveles de Ca^{2+} citoplasmático (Nishimura, 2006). Estos sistemas de transporte son fundamentales en la homeostasis cálcica de los miocitos arteriales y en el mantenimiento del tono y la presión arterial.

- Bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática

Es el principal mecanismo de expulsión de Ca^{2+} de la membrana plasmática y el único de alta afinidad. Esta bomba de Ca^{2+} (PMCA) posee actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , es regulada por la CaM y transporta activamente Ca^{2+} desde el citosol hacia el líquido extracelular. Este Ca^{2+} es intercambiado por dos protones, lo que supone una disminución del pH citoplasmático, que es compensada por el intercambiador Na^+/H^+ .

Está codificada por cuatro genes, de los cuales las isoformas 1 y 4 predominan en la mayoría de los tejidos, mientras que las 2 y 3 son tejido-específicas. En miocitos arteriales predomina la isoforma 4. Dentro de una misma célula, las diferentes isoformas pueden estar localizadas en diferentes partes de la membrana plasmática y ser responsables de funciones diferentes (Floyd y Wray, 2007; Szewczyk *et al.*, 2010).

- Intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) intercambia, en cada ciclo, un único ion Ca^{2+} por tres iones Na^+ y, para ello, utiliza el gradiente de Na^+ procedente de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Es un intercambiador electrogénico y bidireccional, es decir, puede

mediar tanto la entrada como la salida de Ca^{2+} de las células, dependiendo de las variaciones en los gradientes de Na^+ y de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2010).

Está presente en la mayoría de los tipos celulares del que se conocen tres isoformas, de las cuales sólo la isoforma 1 (y dos variantes, NCX 1.3 y 1.7) está presente en el músculo liso arterial (Karashima *et al.*, 2007).

2.2.2 Captación de Ca^{2+} por los reservorios intracelulares

Estos mecanismos, además de reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, devuelven la capacidad de respuesta a las células. La membrana del RE, principal reservorio de Ca^{2+} , no es permeable al Ca^{2+} , ya que existe una bomba selectiva para este ión denominada Ca^{2+} -ATPasa del RE o SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca-ATPase*), que genera y mantienen un gradiente de concentración 10000 veces mayor dentro del RE con respecto al citoplasma. Se han identificado diferentes grupos de SERCA (1, 2 y 3), con diferentes variantes espliceosomales de cada grupo (Lompre, 1998). Las isoformas 2a y 2b están presentes en los miocitos, siendo la isoforma 2b la más abundante en la mayoría de los tejidos. Su actividad puede ser inhibida por la taspigargina, que impide el llenado del reservorio y en consecuencia activa los canales de Ca^{2+} operados por depleción (Floyd y Wray, 2007).

Otra proteína implicada en estos procesos es la proteína fosfolamban. Ésta, cuando está defosforilada, interacciona con la SERCA para disminuir su actividad y sensibilidad al Ca^{2+} . Por el contrario, cuando es fosforilada (acción llevada a cabo por la PKA) se disocia de su estructura pentamérica y disminuye su interacción con la SERCA, por lo que aumenta el transporte de Ca^{2+} hacia el RE (Wray y Burdyga, 2010).

2.3 Papel del núcleo y la mitocondria en la homeostasis del Ca^{2+}

La señalización cálcica en el núcleo de la célula contribuye de manera directa a la transcripción génica, a la apoptosis y al crecimiento celular, sin embargo, aunque se regula independientemente del Ca^{2+} citosólico, no se conoce el mecanismo exacto. En esta función es fundamental el papel de la envoltura nuclear (NE, *nuclear envelope*), que forma una red continua con el RE. Además, el núcleo

contiene proteínas que regulan y responden a cambios en la concentración de Ca^{2+} nuclear (Echevarría y Wihelma, 2003; Malviya y Rogue, 1998).

El Ca^{2+} nuclear puede proceder del propio núcleo, ya que la NE posee sus propios elementos de señalización cálcica: IP_3R , RyR y SERCA (Wray y Burdyga, 2010) o provenir del Ca^{2+} citosólico, que entra al núcleo por difusión pasiva a través del poro nuclear (NPC, *nuclear pore complex*). Se trata de un gran complejo proteico, de aproximadamente 125 kDa, que permite el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. Las moléculas solubles en agua atraviesan la NE por difusión simple. Otras como ARN, ribosomas, proteínas o moléculas de señalización difunden con la ayuda de las proteínas nucleoporinas.

En ambos casos la señal de Ca^{2+} nuclear se propaga por el nucleoplasma por difusión simple. A continuación, este Ca^{2+} sale al citoplasma por el NPC, o vuelve a los depósitos de Ca^{2+} nuclear mediante la bomba de Ca^{2+} -ATPasa nuclear (NCA) (Malviya y Rogue, 1998).

Echevarría *et al* han propuesto la existencia de un retículo nucleoplásmico capaz de regular las señales cálcicas nucleares. Esto proporciona un mecanismo potencial mediante el cual el Ca^{2+} puede regular simultáneamente muchos procesos independientes en el núcleo (Malviya y Rogue, 1998; Echevarría y Wihelma, 2003).

Existen evidencias de que las mitocondrias participan en la homeostasis del Ca^{2+} en CMLV, ya que están implicadas en la regulación de canales iónicos y transportadores de Ca^{2+} (Gilabert y Parekh, 2000).

La principal ruta de entrada de Ca^{2+} en la mitocondria es a través de un uniportador de la membrana interna mitocondrial (MIM), de baja afinidad por el Ca^{2+} , y que emplea el gradiente eléctrico generado por la expulsión de iones H^+ de la cadena respiratoria, para introducir Ca^{2+} en la mitocondria (Orallo, 1996). Debido a esta baja afinidad del uniportador se cree que este mecanismo de acumulación rápida de Ca^{2+} solamente es importante cuando se alcanzan niveles patológicos de Ca^{2+} en el citoplasma (Wray y Burdyga, 2010). En estas circunstancias, la mitocondria acumula Ca^{2+} en forma de fosfatos insolubles y, así, se evitaría la

activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} letales para la célula (calpaínas, fosfolipasas y endonucleasas).

La MIM también posee un intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, que utiliza energía del flujo de Na^+ transmembrana para extraer Ca^{2+} de la mitocondria. El Ca^{2+} mitocondrial activa varias enzimas del ciclo de Krebs, aumentando así los niveles de NADH, que entra en la cadena respiratoria y se oxida a NAD^+ , liberándose un protón al espacio intermembrana. Así se produce un aumento en la diferencia de potencial de la membrana interna mitocondrial y se favorece el flujo de Ca^{2+} a través del uniportador.

En estudios de microscopía electrónica y confocal se ha visto que la membrana mitocondrial y el RE están muy próximos, a una distancia menor de 10 nm. Esta proximidad entre ambos orgánulos crea microdominios óptimos para la señalización cálcica (Wray y Burdyga, 2010).

Las mitocondrias están implicadas en la regulación de la CCE, ya que recaptan Ca^{2+} liberado de los reservorios dando lugar a una depleción mayor de los mismos y a una activación mayor de los canales CRAC (Parekh, 2008) . De la misma manera la mitocondria también es capaz de liberar Ca^{2+} en las proximidades del RE, acelerar el relleno de los reservorios y promover la desactivación de los CRAC.

2.4 Compartimentación de la señalización cálcica

Muchos de los elementos que participan en la homeostasis del Ca^{2+} han sido localizados en ciertos microdominios de la membrana plasmática conocidos como caveolas. Las caveolas son un tipo de balsas lipídicas, ricas en colesterol y esfingolípidos, que forman pequeñas invaginaciones en la membrana plasmática. Por sus características favorecen la inclusión de diversas proteínas y la exclusión de otras, bien como resultado de la acumulación de proteínas con grupos hidrofóbicos o bien, más específicamente, por la interacción con la caveolina, una proteína de 22 kDa propia de estas estructuras. Todas estas propiedades hacen que las caveolas constituyan microdominios de la membrana plasmática que incrementan la eficiencia de diversas rutas de señalización celular (Gratton *et al.*, 2004) (ver apartado 5.3).

Para los componentes de las rutas de señalización intracelular que están concentrados en las caveolas, la regulación puede ser tanto negativa como positiva, dependiendo de si los diferentes tipos de caveolinas inhiben o incrementan la eficiencia de la señalización (Patel *et al.*, 2008).

En las células vasculares, las caveolas contienen, por ejemplo, la subunidad α de la proteína cinasa C (PKC), la RhoA (ver apartado 3.2.3), la ERK (un tipo de MAP cinasa), el enzima encargado de la síntesis de NO, la eNOS, y varias isoformas de la AC (AC3, 5, 6 y 8). Así, las caveolas están implicadas en el control de multitud de mecanismos bioquímicos vasculares y, en consecuencia, contribuyen a la regulación del tono vascular (Crossthwaite *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2008).





3 Mecanismos moduladores de la movilización de Ca^{2+} en el músculo liso

Los mecanismos que regulan la movilización de Ca^{2+} en el músculo liso están involucrados en la regulación del tono vascular en condiciones fisiológicas. En estas condiciones los aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que dan lugar a una contracción están causados, bien por una despolarización de la membrana plasmática (acoplamiento electromecánico), o por la unión de un agonista vasoconstrictor a un receptor GPCR el cual, mediante la activación de la PLC hidroliza el fosfolípido de membrana bifosfato de 4,5-fosfatidilinositol (PIP_2) en dos segundos mensajeros: IP_3 y DAG (acoplamiento farmacomecánico) (Akata, 2007a; Morgado *et al.*, 2012)

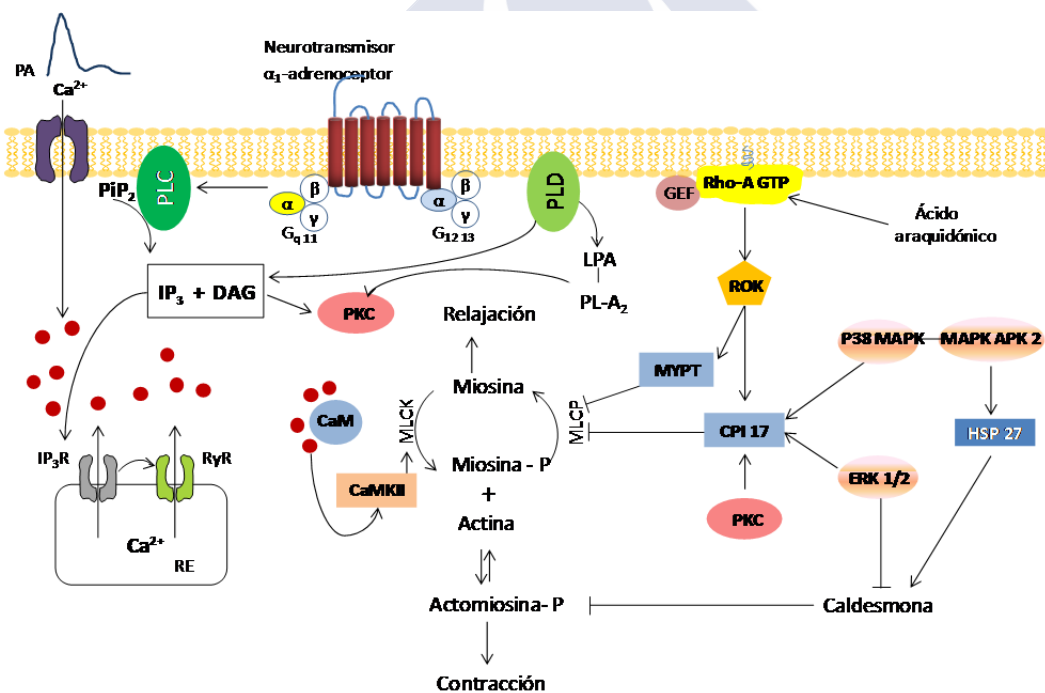


Figura 4. Esquema general de los mecanismos moduladores de la movilización de Ca^{2+} en el músculo liso.

3.1 Ciclo del fosfatidilinositol

La primera etapa de la contracción (etapa fásica) causada por agonistas es mediada por el IP_3 generado por la activación de la PLC, que difunde desde la

membrana al citosol, donde estimula los receptores del IP_3 del RE provocando la liberación de Ca^{2+} desde este reservorio hasta el citosol. El Ca^{2+} liberado, por medio de su unión a la CaM, activa las proteínas contráctiles e inicia la contracción, lo que constituye el principal mecanismo para el inicio de la señalización cálcica en células no excitables (Orallo, 1996).

A su vez, el aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ mediado por el IP_3 induce la liberación de más Ca^{2+} mediado por el RyR por el mecanismo de CICR. También en respuesta a este incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ se produce la migración de la PKC hacia la membrana plasmática, donde interacciona con el DAG para ser activada.

En algunos tipos celulares, entre los que se encuentran las CMLV de aorta de rata, también se ha visto que la acción de la fosfolipasa D (PLD) puede generar DAG (pero de manera mucho más lenta que por acción de la PLC) (Freeman *et al.*, 1995). La PLD hidroliza la fosfatidilcolina de la membrana para generar ácido fosfatídico (LPA) y colina. A su vez el LPA puede dar lugar a DAG o servir como sustrato para la fosfolipasa A_2 , liberando ácido lisofosfatídico y ácidos grasos de 20 carbonos, que también modulan la actividad de la PKC y sirven de sustrato para la síntesis de eicosanoides.

3.2 Mecanismos que controlan la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos

Hemos visto anteriormente (apartado 1.3) que la actividad dependiente de Ca^{2+} de la MLCK y la fosforilación de la MLC_{20} son los mecanismos primarios para el desarrollo de fuerza contráctil en las CMLV (Orallo, 1996). Sin embargo la relación entre la $[Ca^{2+}]_c$ y la fosforilación de la MLC_{20} varía durante el desarrollo y mantenimiento de la fuerza contráctil, lo que indica que la sensibilidad al Ca^{2+} de la fosforilación de la MLC_{20} es modulada por otras rutas de transducción de señales.

Se define sensibilidad al Ca^{2+} como el fenómeno por el cual los agonistas contráctiles producen contracción del músculo liso sin apenas variación de la $[Ca^{2+}]_c$. Esta sensibilidad puede deberse a modificaciones en los mecanismos de fosforilación de la MLC_{20} (Yang *et al.*, 2010) pero también a cambios en la regulación

de la actividad de las proteínas inhibidoras de unión a la actina, que regulan la disponibilidad de actina para interactuar con la miosina (Kim *et al.*, 2008).

3.2.1 Proteínas G

Las proteínas G son proteínas de membrana, monoméricas o heterotriméricas, con especial afinidad por los nucleótidos de guanina (GTP, difosfato de guanosina). Su función es transducir las señales que llevan información desde un receptor de membrana de la familia de los GPCR hasta uno o varios efectores. Estos efectores regulados por la proteína G comprenden enzimas como la AC, la PLC, las PDE y los canales iónicos de la membrana plasmática selectivos para el Ca^{2+} y K^+ .

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres subunidades proteicas: α , β y γ . En su forma inactiva las tres subunidades se encuentran unidas. Cuando un agonista se une a un receptor de la familia de GPCR se produce en éste un cambio conformacional que permite la activación de una proteína G, separándose las subunidades β y γ de la α . La subunidad α (subunidad que posee la actividad GTPasa) pierde su afinidad por el receptor y queda libre para unir una molécula de GTP, activándose a su vez la proteína efectora. Cuando el GTP se hidroliza en GDP (difosfato de guanosina) la proteína G vuelve a su estado basal (inactivo) (Akata, 2007a).

Se han identificado varios tipos de subunidades α :

- α_s : estimula la AC que, a su vez, convierte el ATP en AMPc y activa la PKA, que transfiere un grupo fosfato terminal del ATP a los sitios activos de ciertas proteínas.
- α_i : inhibe la AC.
- α_q : estimula la cascada del fosfatidilinositol.

En las CMLV, la relación fuerza/ $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es mucho mayor durante la estimulación con agonistas de un receptor que durante la despolarización de la membrana en CMLV, por tanto, la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles aumenta tras la estimulación del receptor. Los principales mecanismos que subyacen a este hecho son los aumentos en la fosforilación de la MLC_{20} y la

inhibición de la miosina fosfatasa. Dado que el complejo proteína G-receptor está separado físicamente de la miosina fosfatasa, estrechamente unida a la miosina en condiciones fisiológicas, otros segundos mensajeros y rutas de señalización deben inhibir la miosina fosfatasa (Akata, 2007b).

En las CMLV el aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos inducida por agonistas es dependiente de GTP, ya que se ha visto que esta acción es mimetizada por GTP γ S (un análogo no hidrolizable de GTP que activa las proteínas G) y es inhibida por GDP β S (un análogo no hidrolizable de GDP que inhibe de forma competitiva la activación de las proteínas G) (Kitazawa *et al.*, 1991).

3.2.2 Proteína cinasa C

La PKC engloba a una familia de 12 isoformas clasificadas en 3 grupos que fosforilan sustratos de serina y/o treonina en sus proteínas diana, y desempeña un papel fundamental en la activación e inhibición de un gran número de funciones celulares. Las diferentes isoformas de la PKC se diferencian en base a su activación por Ca^{2+} , DAG, ésteres de forbol y fosfatidilserina (Akata, 2007b; Salamanca y Khalil, 2005; Zeng *et al.*, 2012).

La PKC fosforila proteínas reguladoras de membrana. La proteína MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*), sustrato de la PKC, está unida a la actina-F y funciona como un puente de unión entre el filamento de actina y la membrana plasmática. Cuando es fosforilada por la PKC se inhibe su asociación con la actina y con la membrana plasmática y se libera al citoplasma. La PKC también fosforila la proteína G_i y, así, facilita la disociación de la subunidad α_1 de la AC, y por tanto, su inhibición (Salamanca y Khalil, 2005; Khalil, 2010).

La PKC también interacciona con canales y bombas de la membrana plasmática: a) Inhibe la actividad del canal BK_{Ca} (ver apartado 4.3.2) en el músculo liso pulmonar b) Está involucrada en la inhibición de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) por parte del TX- A_2

También fosforila y activa Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática y del RE, acción que promueve la extrusión de Ca^{2+} y puede explicar la naturaleza transitoria

del aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por agonistas en el músculo liso. Además, en CMLV fosforila proteínas reguladoras de los microfilamentos.

La interacción de la PKC con sus sustratos activa una cascada de cinasas que en último lugar da lugar a la contracción del músculo liso vascular. Además de aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos, la PKC fosforila la proteína CPI-17, que a su vez inhibe la MLCP, aumenta la fosforilación de la MLC y aumenta la contracción muscular (Kitazawa, 2010).

La proteína de unión a la actina, calponina, cuando es fosforilada por la PKC revierte la inhibición de la miosina ATPasa activada por actina, lo cual permite que haya más actina disponible para unirse a la miosina y aumentar la contracción muscular.

En la línea celular COS1 se ha encontrado otro ejemplo de conexión entre las rutas del AMPc y del Ca^{2+} : la inducción de determinados genes mediadores en la respuesta antiinflamatoria, como el gen SOCS3 tiene lugar a través de la estimulación de la proteína Epac1 por el AMPc y la activación de la isoforma α de la PKC. De esta manera se promueve la movilización de determinados factores de transcripción y la inducción génica (Borland *et al.*, 2009).

3.2.3 Rho A/cinasa Rho

La actividad contráctil se activa por la interacción Ca^{2+} -CaM, lo que estimula la fosforilación de la MLC, pero cuando la $[Ca^{2+}]_c$ empieza a disminuir se activa la ruta Rho A/ROK. RhoA (*ras homolog gene family, member A*) es una proteína G pequeña perteneciente a la superfamilia Ras que se activa por diversos agonistas contráctiles. Como la mayoría de las GTPasas, RhoA es activa cuando está unida a GTP e inactiva cuando el nucleótido que une es GDP. En reposo, la forma inactiva de la RhoA está complejada con el inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI, *guanine-nucleotide dissociation inhibitor*) en el citoplasma.

La cinasa Rho (ROK, *rho-associated protein kinase*) es una serina-treonina cinasa que pertenece a la familia AGC (PKA, PKG, PKC) (Ishikura *et al.*, 2005). Cuando el complejo RhoA-GDI es estimulado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF, *guanine-nucleotide exchange factors*), el GTP

reemplaza al GDP en la RhoA. Entonces, la forma activa de RhoA (RhoA-GTP) se disocia del complejo y se transloca del citosol a la membrana (mientras que GDI es retenido en el citoplasma), donde activa a la ROK (Akata, 2007b). Esta última, a su vez, fosforila a la subunidad de unión a la miosina, la proteína MYPT (*myosin phosphatase targeting protein*), la cual inhibe la actividad catalítica de la MLCP. De este modo, aumenta la fosforilación de la MLC_{20} (catalizada por la $MLCK Ca^{2+}$ -CaM dependiente) y, por tanto, la contracción del músculo liso (Kawano *et al.*, 2002; Wynne *et al.*, 2009).

Otra proteína reguladora de la MLCP es la proteína citosólica CPI-17, la cual puede ser fosforilada por ROK o por un mecanismo dependiente de PKC (Azam *et al.*, 2007).

La ruta RhoA/ROK está implicada en la fase tónica de mantenimiento de la fuerza contráctil en respuesta a varios agonistas, por lo que se han propuesto diversos inhibidores de esta ruta como potenciales antihipertensivos. De hecho diversos inhibidores de ROK reestablecen los niveles normales de presión arterial en varios modelos de rata hipertensa (Swärd *et al.*, 2003).

El ácido araquidónico liberado mediante hidrólisis de fosfolípidos, llevada a cabo por la fosfolipasa A_2 , activa a la ROK de manera independiente de RhoA, contribuyendo así a aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} mediada por ROK (Akata, 2007b).

En un reciente trabajo llevado a cabo por el grupo de Somlyo (Zieba *et al.*, 2011), se ha descrito un mecanismo de señalización mediado por AMPc por el cual la activación de Epac daría lugar a una desensibilización cálcica de la fuerza de contracción, de manera dependiente de Rap1 e independiente de PKA, a través de una regulación a la baja de RhoA.

3.3 Otros mecanismos reguladores

3.3.1 Proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina

La proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} -CaM (CaMKII) es una proteína cinasa específica para serina y treonina regulada por el complejo Ca^{2+} -CaM. Está

formada por una familia de cuatro isoformas (α , β , γ y δ) con múltiples variantes espliceosomales para cada isoforma. La isoforma δ es la predominante en las CMLV pero la proporción de las diferentes isoformas varía en función del fenotipo celular (Braun y Schulman, 2005).

En su forma inactiva, un dominio autoinhibidor bloquea el sitio activo de la molécula, pero la asociación Ca^{2+} -CaM interrumpe esta autoinhibición y el enzima se activa. A continuación tiene lugar una autofosforilación en las posiciones treonina 286/287 que desacopla el dominio autoinhibidor, en consecuencia la cinasa adquiere autonomía que mantiene incluso a bajas concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Además, de esta manera se incrementa hasta 1.000 veces su afinidad por la CaM. Esta capacidad de retención de la actividad tras haber sido previamente activada por Ca^{2+} se denomina memoria molecular, proceso que ha sido vinculado a la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. En el músculo liso ocurre algo similar para prolongar el tono vascular (Kim *et al.*, 2008).

Sin embargo, la CaMKII fosforila la MLCK cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es elevada en respuesta a agentes vasoconstrictores, lo que disminuiría la sensibilidad al Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2008; Trebak *et al.*, 2010). Se ha propuesto que esto actuaría como un mecanismo de regulación negativa para evitar altos niveles de fosforilación de la MLC (Pfitzer, 2001).

3.3.2 Tirosina cinasas

Las tirosina cinasas (TK) son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP al aminoácido tirosina de una proteína. Las TK están asociadas al crecimiento celular, la diferenciación y la proliferación, pero también participan en procesos de señalización que dan lugar a la contracción del músculo liso vascular (Suenaga y Kamata, 2002). Algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico o el PDGF, producen contracciones del músculo liso vascular. Además, los inhibidores de las TK atenúan las respuestas contráctiles inducidas por algunos agonistas de GPCR en diferentes tipos arteriales (Berk y Corson, 1997).

3.3.3 MAP cinasas

Además de la PKC hay otras familias de proteínas cinasas activadas por Ca^{2+} , las cinasas activadas por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), que también juegan un papel importante en la contracción vascular (Park *et al.*, 2003). Las MAPK no están directamente acopladas a receptores sino que necesitan efectores para transmitir la señal del receptor a la ruta correspondiente. Estos efectores son muy buenos candidatos para el entrecruzamiento con otras rutas celulares.

En mamíferos se conocen tres isoformas de la familia de las MAP cinasas:

- Cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, *extracelular signal-regulated kinases*). Se activan por agonistas (ET-1, ATII y fenilefrina) e inducen la contracción del músculo liso por un mecanismo dependiente de la producción de anión superóxido (Ding *et al.*, 2007; Do *et al.*, 2009) y de la presencia de endotelio, ya que el tratamiento con inhibidores de la ruta de ERK_{1/2} inhibe la generación de anión superóxido pero no el tono espontáneo de la aorta.
- Cinasas C-jun (JNK, *C-Jun N-terminal kinases*). Están implicadas en procesos celulares que intervienen en el desarrollo de la aterosclerosis, como la homeostasis lipídica en macrófagos (Sumara *et al.*, 2005).
- p38 MAP cinasa (p38 MAPK). Esta cinasa está relacionada con la intensidad de la contracción en el músculo liso vascular ya que en CMLV de aorta la angiotensina II (Ang II) aumenta de manera rápida y transitoria la actividad de la p38 a través del receptor AT1. Esta respuesta es mediada por activación de la MAPKAP cinasa 2 (*MAP kinase activated protein*) y la HSP27 (*heat shock protein 27*), se reproduce por exposición de las células al H_2O_2 y disminuye por pretratamiento de las células con antioxidantes. El tratamiento con SB-230580 (inhibidor de la p38 MAPK) bloquea la activación de la MAPKAP cinasa-2 y de la HSP27. También disminuye la potencia con la que la Ang II contrae los anillos de aorta, lo que sugiere que la ruta de la p38 MAP cinasa modula selectivamente la acción vasoconstrictora de la Ang II en músculo liso vascular (Meloche *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que las MAPK regulan la miosina indirectamente a través de la caldesmona. Esta proteína inhibe la actividad ATPasa de la actomiosina (inhibición que desaparece cuando la caldesmona es fosforilada por las MAPK) pero este mecanismo no se ha podido demostrar *in vivo*. La mayor parte de los trabajos sugieren que la fosforilación de la caldesmona por las MAPK no participa en los mecanismos que aumentan la sensibilidad al Ca^{2+} (Somlyo y Somlyo, 2003).

Las proteínas G pequeñas son efectoras de las MAPK también interconectadas con rutas de señalización en las que interviene el AMPc. La ruta de la PKA y la cascada de las MAPK modulan procesos comunes en la célula, uno de ellos consiste en la inhibición de la ERK_{1/2} mediada por RAF1 y dependiente de PKA. Pero también se ha encontrado que la PKA puede activar a ERK_{1/2} de manera dependiente de B-RAF (Gerits *et al.*, 2008) (figura 10).

Otra asociación que da lugar a múltiples interconexiones entre las rutas es la establecida entre la proteína mAKAP, isoforma muscular de las proteínas de anclaje a la PKA (*A-kinase anchoring protein*) (ver apartado 4.4), y varios integrantes de las rutas PKA y MAPK, entre los que se encuentran Epac1, PKA, determinadas isoformas de PDE y Erk5 (Dodge-Kafka y Kapiloff, 2006). Rap1 interacciona con las cinasas RAF1 y B-RAF, lo que establece un vínculo adicional entre el AMPc y la señalización mediada por MAPK (figura 5).

En un trabajo llevado a cabo por Manganiello y colaboradores (Begum *et al.*, 2011) han estudiado el papel de las isoformas 3A y 3B de PDE en el control de la proliferación de las CMLV, y han visto que lo hacen fundamentalmente por dos mecanismos: por inhibición de la fosforilación de Raf-1 mediada por la PKA, lo que interferiría en la señalización llevada a cabo por las MAPK, y por inhibición de la progresión del ciclo celular en diferentes fases por modulación de determinadas proteínas reguladoras, acción llevada a cabo por la PKA y el factor de transcripción CREB (*cAMP-responsive element binding protein*).

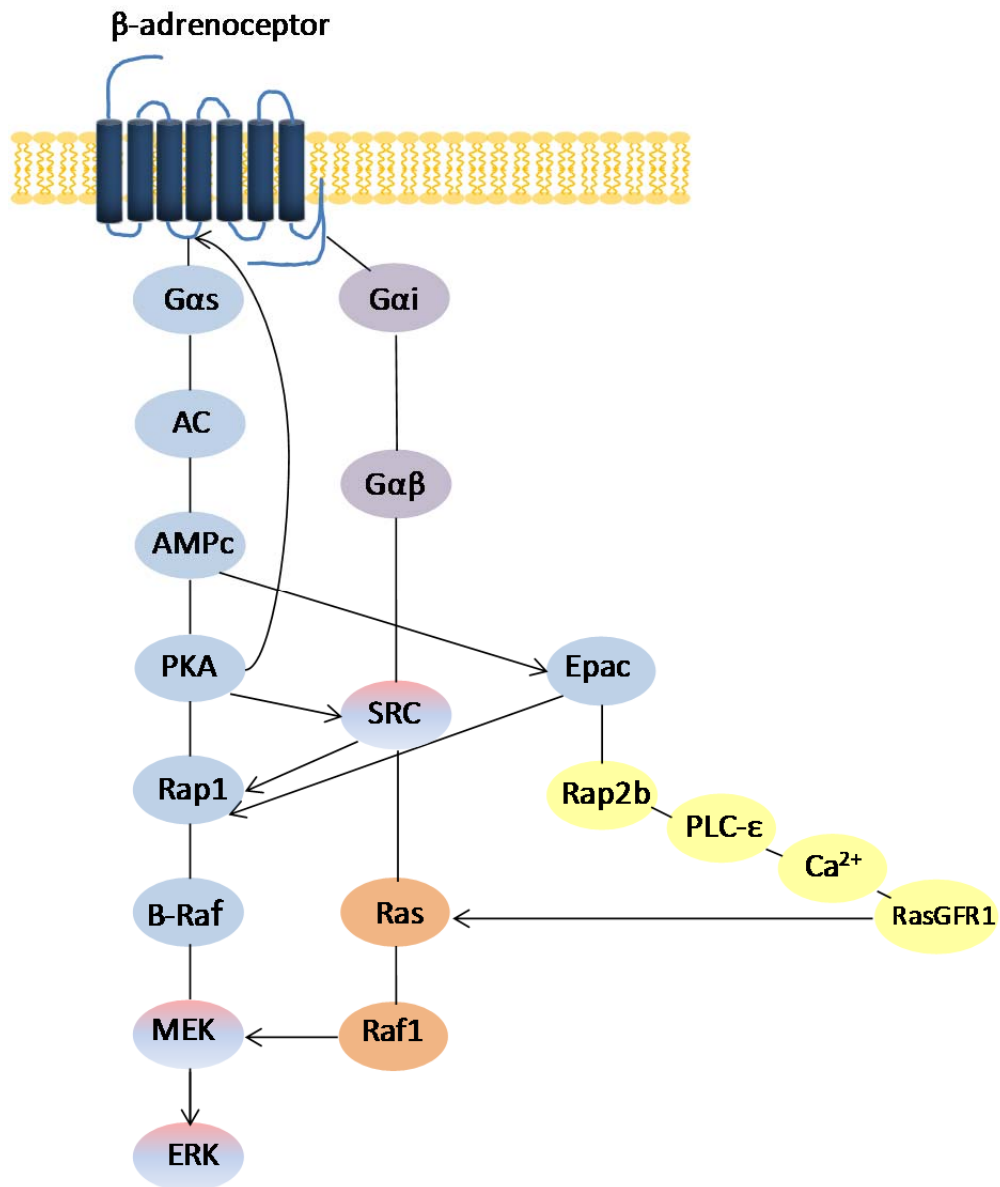


Figura 5. Regulación de la cascada de MAP cinasas por AMPc-PKA-Epac. Modificado de Gerits *et al.*, 2008.

4 Relajación del músculo liso vascular por AMPc

En el sistema cardiovascular, junto con el Ca^{2+} citoplasmático y el IP_3 , el AMPc y el GMPc están implicados en la regulación de una gran cantidad de funciones en prácticamente todos los tipos celulares (Maurice, 2005).

En las CMLV, disminuyen el tono vascular y, en las células endoteliales el AMPc inhibe la migración y proliferación de las mismas necesaria para la angiogénesis (Matsumoto *et al.*, 2003; Netherton y Maurice, 2005). En los cardiomiocitos, el aumento de AMPc produce un aumento de la contractilidad en respuesta a una activación simpática (Vandecasteele *et al.*, 2006). En las plaquetas, el AMPc y el GMPc son los principales inhibidores de la activación de las mismas (Kim y Liao, 2008). Estas funciones son independientes y están reguladas por hormonas o fármacos que actúan por modificación de los niveles de AMPc o GMPc.

El AMPc fue el primer segundo mensajero descubierto (Rall y Sutherland, 1958). Es sintetizado a partir del ATP por el enzima AC localizado en la membrana celular (figura 6), mientras que su degradación es catalizada por las PDE. Controla diferentes funciones fisiológicas, como el crecimiento y la diferenciación celular, la regulación de la transcripción, la apoptosis y la relajación del músculo liso.

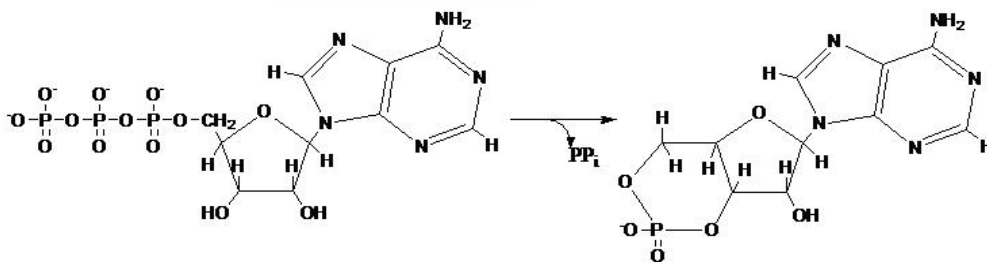


Figura 6. Conversión del ATP a AMPc catalizada por el enzima adenilil ciclasa.

El aumento citosólico de los niveles de AMPc relaja muchos tipos de músculo liso, incluido el vascular, sin embargo no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales este segundo mensajero inhibe la contracción muscular. Estos mecanismos varían entre los diferentes tipos de vasos sanguíneos, entre diferentes

especies e incluso dependen del estímulo desencadenante de la vasoconstricción previa. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la relajación del músculo liso vascular mediada por AMPc e independiente de endotelio (Morgado *et al.*, 2012):

1) Disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ necesaria para la fosforilación de la MLC_{20} y el desarrollo de fuerza contráctil, por secuestro y extrusión del Ca^{2+} libre:

- Inhibición del flujo de entrada de Ca^{2+} en las células posiblemente por inhibición de los VOCC tipo L.
- Aumento de la extrusión del Ca^{2+} de la célula a través de la PMCA o del NCX (Raymond y Wendt, 1996).
- Estimulación de la recaptación de Ca^{2+} por parte de los reservorios intracelulares, proceso que parece estar mediado por fosforilación de la proteína fosfolamban, por parte de la PKA y de la PKG (Raymond y Wendt, 1996; Liu *et al.*, 1997).
- Inhibición de la liberación de Ca^{2+} del RE, posiblemente por inhibición de la producción de IP_3 o por inhibición de la movilización de Ca^{2+} dependiente de IP_3 .
- Reducción de la sensibilidad de la maquinaria contráctil, bien por una disminución de la sensibilidad a la $[Ca^{2+}]_c$ de la fosforilación de la MLC_{20} o por un desacoplamiento entre la contracción y la fosforilación de la MLC_{20} .

2) Hiperpolarización de la membrana, principalmente por activación de canales de K^+ y reducción de la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCC, inactivación de los canales de Na^+ y/o inactivación de otros canales.

3) Desacoplamiento de la fuerza de contracción de la fosforilación de la MLC_{20} , independientemente de la $[Ca^{2+}]_i$, y regulación de los filamentos finos. Las proteínas de unión a los filamentos finos contribuyen a la actividad contráctil de la célula, pero hay pocos trabajos que las vinculen con los segundos mensajeros. En este proceso se ha propuesto la intervención de la HSP20 (*heat shock protein*) en la despolimerización de la actina y en la inhibición de la actomiosina.

4.1 Efectores de la señalización del AMPc

La $[AMPc]_i$ basal es aproximadamente 10^7 M. Una señal extracelular puede incrementar este valor 20 veces en pocos segundos (Lim *et al.*, 2008). Cuando la concentración de AMPc aumenta se activan tres clases diferentes de dianas intracelulares con dominios de unión para el AMPc (figura 7).

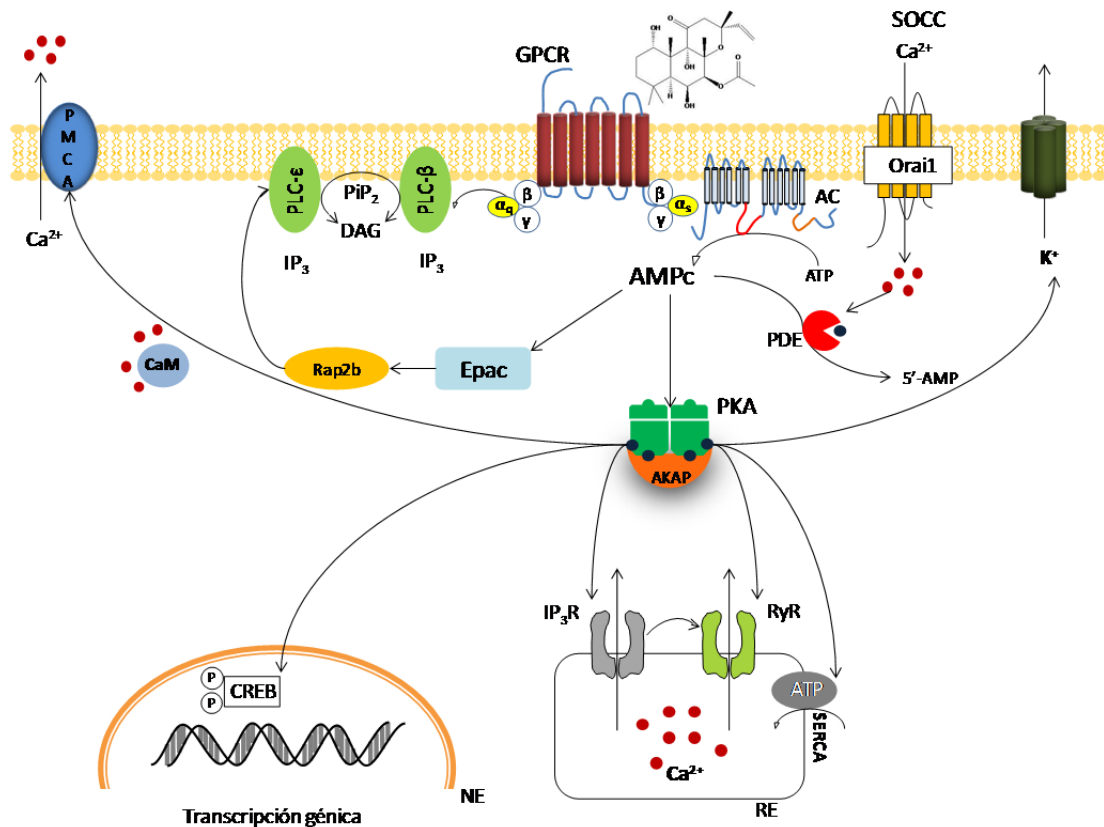


Figura 7. Efectores de la señalización del AMPc.

4.1.1 Proteína cinasa dependiente de AMPc

La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) es la responsable de las acciones fisiológicas de numerosas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, y es el principal efector intracelular para el AMPc (Haynes *et al.*, 1992). La ruta del AMPc/PKA se activa por la unión de diferentes ligandos a sus correspondientes receptores, y la consiguiente transducción de la señal por acoplamiento a las proteínas G, que interaccionan con la AC en la membrana de la célula, para activar o inhibir la producción de AMPc.

Estructuralmente la PKA es una serina-treonina cinasa holotetramérica, formada por un dímero de subunidades reguladoras (R) donde cada subunidad R está unida a una subunidad catalítica (C). Cuando aumentan los niveles de AMPC éste se une a sus sitios de unión en las subunidades R, lo que da lugar a la liberación de las subunidades C (Cheng *et al.*, 2008) (figura 8).

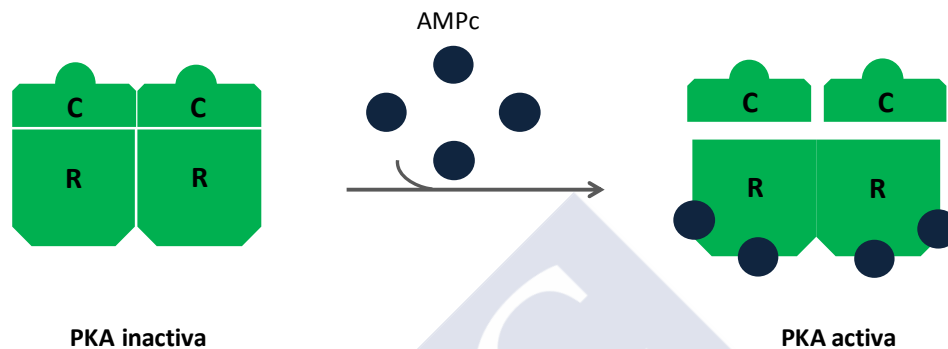


Figura 8. Estructura de la PKA. R: subunidad reguladora. C: subunidad catalítica.

Existen tres genes que codifican para la subunidad C ($C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$). $C\alpha$ y $C\beta$ presentan una alta homología entre sus secuencias y se expresan ampliamente, mientras que $C\gamma$ presenta menor homología con las otras subunidades y se halla principalmente en los testículos (Kim *et al.*, 2007).

Para la subunidad R, se han identificado cuatro genes ($R1\alpha$, $R1\beta$, $R2\alpha$, $R2\beta$). $R1$ sólo se asocia con otras subunidades $R1$, mientras que $R2$ sólo se asocia con subunidades $R2$. $R1\alpha$ y $R2\alpha$ son las isoformas R predominantes en la mayoría de los tejidos. Las isoformas β se encuentran principalmente en el SNC y en los tejidos reproductores. Las subunidades $R1$ predominan en el citosol mientras que las $R2$ están asociadas a la membrana (formas particuladas). Estas diferencias en la localización de las isoformas de la PKA contribuyen a la especificidad de la señalización del AMPC. Las subunidades R poseen en su extremo carboxilo terminal el dominio de unión del AMPC (CBD) (Cheng *et al.*, 2008).

Se ha visto que algunas hormonas activan una subunidad R determinada, lo que contribuiría a explicar las diferencias encontradas entre los efectos causados

por la activación de las isoformas citosólicas (efectos globales) y los derivados de la activación de las isoformas particuladas (efectos locales) (Pidoux y Taskén, 2010).

Las subunidades R (fundamentalmente las isoformas particuladas) están recluidas en localizaciones diferenciadas dentro de la célula debido a su anclaje a las proteínas AKAP (ver apartado 4.4). Esta unión contribuye a aumentar la especificidad así como a la regulación espacial y temporal de la ruta AMPc-PKA (Pidoux y Taskén, 2010).

Una vez producida la unión del AMPc a las subunidades R, tiene lugar la liberación de las subunidades C, que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a un residuo de serina o treonina de su proteína sustrato, entre los que se encuentra el factor de transcripción nuclear CREB. Para ello, la PKA se transloca al núcleo y fosforila el factor CREB en una serina 133, lo que permite la estimulación de la transcripción génica (Johannessen y Moens, 2007).

La activación cruzada de la PKG por el AMPc también influye en su acción vasodilatadora, de hecho, cada nucleótido cíclico puede activar ambas cinasas: PKA y PKG. La PKG puede ser activada por AMPc aunque para ello necesita una [AMPc]_i 10 veces mayor que la necesaria para ser activada por GMPc. De la misma manera, la PKA también es susceptible de ser activada por GMPc. En el músculo liso la [AMPc]_i basal es del orden de 10 veces mayor que la [GMPc]_i. Así un aumento de la [AMPc]_i podría activar ambas cinasas, mientras que un aumento de la [GMPc]_i activaría solamente a la PKG (Lincoln y Cornwell, 1990; Rembold, 1992; Akata, 2007a; Morgado *et al.*, 2012).

4.1.2 Proteínas EPAC

Aunque inicialmente todos los efectos del AMPc fueron atribuidos a la PKA, hoy en día se conocen otras dianas intracelulares con dominios de unión para el AMPc. Así, en los últimos años se ha demostrado la existencia de una nueva clase de proteínas implicadas en la transducción de la señal mediada por el AMPc. Se trata de las denominadas cAMP-GEF (*cAMP-specific guanine nucleotide exchange factors*), también conocidas como Epac (*exchange proteins directly activated by cAMP*) (de Rooij *et al.*, 1998). Se conocen dos isoformas de estas proteínas: Epac1 o

cAMP-GEF I, y Epac2 o cAMP-GEF II. Ambas están presentes en la mayoría de los tejidos, pero con diferentes niveles de expresión. Epac1 es muy abundante en los vasos sanguíneos, en los riñones, tejido adiposo, ovario y útero, mientras que Epac2 se expresa preferentemente en el SNC, glándula adrenal y páncreas (Métrich *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2013).

Estructuralmente las dos proteínas Epac están formadas por los siguientes dominios (Schmidt *et al.*, 2007) (figura 9):

- AMPc-B: es el dominio de unión de AMPc de alta afinidad, homólogo al que está presente en la PKA (Cheng *et al.*, 2008). Está situado en el extremo amino terminal. La Epac2 posee un dominio adicional de baja afinidad por el AMPc (AMPc-A), de función biológica desconocida.
- DEP (*dishevelled*, *Egl-10*, *pleckstrin*): es el dominio responsable de la asociación a la membrana.
- REM (*ras-exchanger motif*): dominio que se cree que interacciona con el dominio GEF.
- RA: dominio de asociación a las GTPasas de la familia Ras.
- CDC25: es un dominio GEF autoinhibidor situado en el extremo carboxilo terminal. Promueve el intercambio GDP/GTP en su principal efector Rap1.

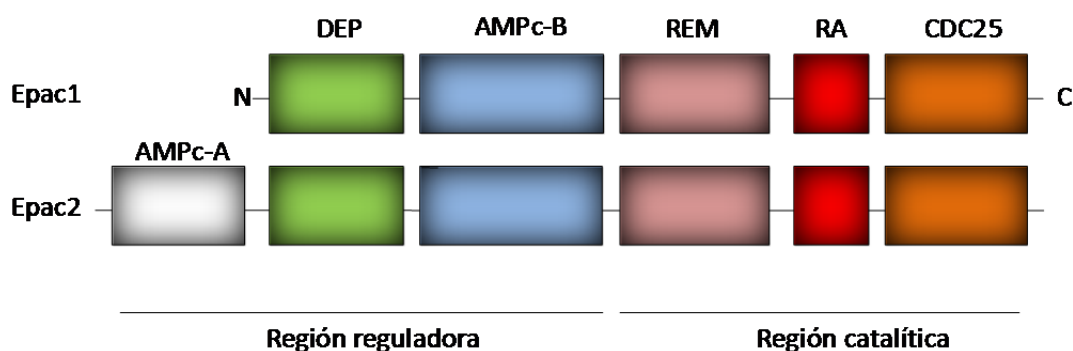


Figura 9. Representación esquemática de la organización de los dominios de las proteínas Epac. Modificado de Schmidt *et al.*, 2007.

In vitro, las dos isoformas de Epac unen AMPc prácticamente con la misma afinidad que la PKA (K_d 2,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ para la Epac1; 2,9 $\mu\text{mol l}^{-1}$ para la PKA). Sin embargo, la CE_{50} del AMPc es del orden de 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ para la Epac1 frente a 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ para la PKA. Esta diferencia es un reflejo de la cooperatividad positiva entre los dos sitios de unión de AMPc en la PKA y, en la práctica, se traduce en que la PKA se activa con pequeños aumentos de AMPc mientras que son necesarias mayores [AMPc] para activar las Epac (Purves *et al.*, 2009).

La proteína Rap1 es el principal efector conocido hasta el momento de las proteínas Epac. Su localización es ubicua: se puede encontrar en la membrana plasmática, en compartimentos intracelulares y en la región perinuclear. Rap1 es una pequeña proteína citosólica con actividad GTPasa, perteneciente a la superfamilia Ras de proteínas G, que actúa como un interruptor celular en la transducción de señales. Las GTPasas se inactivan con la unión de GDP y se activan cuando unen GTP. Su actividad es regulada por las proteínas activadoras de GTPasa (GAP, *GTPase activating proteins*), las cuales promueven la forma que une GDP, y las proteínas con actividad GEF, que promueven la forma de unión de GTP. Epac actúa como un GEF para Rap1 (Roscioni *et al.*, 2008).

Otra proteína susceptible de ser activada por Epac1 es R-Ras, conocida por modular la adhesión celular mediada por integrinas. Koopman y sus colaboradores (Koopman *et al.*, 2003) han descrito que R-Ras produce alteraciones en el Ca^{2+} celular por disminución del contenido de Ca^{2+} del RE en células CHO.

Hay descrito un vínculo entre la estimulación de algunas isoformas de PLC y la activación de GTPasas pequeñas, que se realiza a través de factores GEF y GAP, que promueven la formación de las formas de unión a GTP (activas) y GDP (inactivas), respectivamente. Ada-Nguema *et al.* (2006) han propuesto que la isoforma ϵ de la PLC es un efector de R-Ras, lo que tendría su efecto en la homeostasis del Ca^{2+} celular. Dado que Epac es capaz de modular tanto R-Ras como la PLC- ϵ , la señalización cálcica mediada por Epac converge a nivel de esta isoforma de PLC (Bunney y Katan, 2006; Roscioni *et al.*, 2008).

En miocitos cardiacos, para que tenga lugar la CICR inducida por la estimulación de los β -adrenoreceptores, son necesarias tanto la actividad hidrolítica

del PIP_2 de la $\text{PLC}\epsilon$, como la actividad GEF de Rap1, acción también llevada a cabo por la isoforma ϵ de la PLC. Ello requiere la activación de Rap1 por las proteínas Epac (Oestreich *et al.*, 2009) (figura 10).

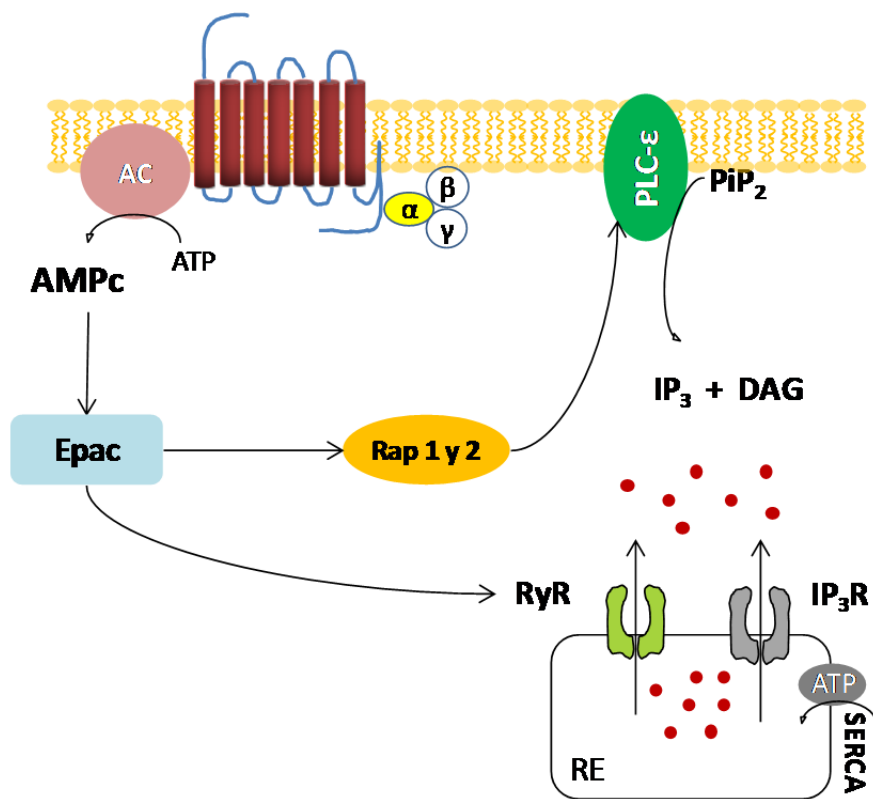


Figura 10. Papel de las proteínas Epac en la movilización de Ca^{2+} mediada por AMPC. Modificada de Holz *et al.*, 2006.

Existe un papel, hasta hace poco desconocido, de las proteínas Epac en la regulación de canales iónicos dependiente de AMPC. Un ejemplo de ello es la inhibición de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) en células β pancreáticas, donde Epac 1 y 2 interactúan con la subunidad SUR1 del canal. A través del mecanismo Epac-Rap-PLC- ϵ y posterior hidrólisis del PIP_2 disminuiría la concentración del inositol necesaria para la activación del K_{ATP} (Holz *et al.*, 2006; Roscioni *et al.*, 2008).

En el músculo liso, los estudios realizados sugieren que la Epac desempeña un papel destacado en la regulación del tono vascular (Schmidt *et al.*, 2007). A pesar de ello el conocimiento sobre la función de las Epac en las CMLV es muy limitado. Algunos trabajos preliminares sugieren que la activación de las Epac puede inhibir la

vasoconstricción de los anillos de aorta torácica de rata y disminuir la movilización de Ca^{2+} (Grandoch *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2007), procesos supuestamente mediados por R-Ras. Zieba *et al.* (2011) han propuesto que la activación de la Epac en el músculo liso produce una disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de la fuerza de contracción por un mecanismo independiente de PKA y dependiente de Rap1 a través de una regulación a la baja de la proteína RhoA. En las células endoteliales se ha demostrado que la ruta Epac-Rap1 aumenta la funcionalidad de la barrera endotelial (Schmidt *et al.*, 2007).

En función de su abundancia relativa, su distribución y localización, así como del ambiente celular, Epac y PKA pueden actuar de manera independiente, de forma sinérgica o de forma opuesta, en la regulación de una función celular específica (Cheng *et al.*, 2008). Por ejemplo, en células de tiroides (modelo prototípico para la mitogénesis mediada por AMPc) se ha visto que tanto la PKA como la Epac son necesarias para la acción mitogénica de la tirotrópina (TSH). Ambas rutas actúan de manera sinérgica para que el AMPc ejerza una eficiente respuesta proliferativa (Hochbaum *et al.*, 2008). Otro ejemplo de sinergia es la acción conjunta entre la PKA y ambas isoformas de las proteínas Epac, para modular la respuesta inflamatoria, a través de Rap1 y ERK1/2, en el músculo liso de las vías respiratorias (Roscioni *et al.*, 2009). En las CMLV, Epac y PKA actúan de manera sinérgica por un mecanismo independiente de Rap1, para inhibir la proliferación de las mismas (Hewer *et al.*, 2011).

4.1.3 Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos

Los canales activados por nucleótidos cíclicos son canales catiónicos no selectivos que se abren por la unión directa de AMPc o GMPc al canal. Su activación está directamente acoplada al flujo de entrada de cationes extracelulares al citoplasma y a la despolarización de la membrana plasmática (Biel y Michalakis, 2009). Inicialmente fueron identificados en los fotorreceptores de la retina y en las neuronas sensoriales olfatorias.

Se han identificado dos familias, pertenecientes a la superfamilia de canales activados por voltaje (aunque su dependencia del voltaje es pequeña). Ambas

presentan alta similitud de secuencias y difieren en su modo de activación (Kaupp y Seifert, 2002):

a. Canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG, *cyclic nucleotide-gated*).

Son proteínas de membrana, altamente especializadas, que abren un poro permeable a iones en respuesta a la unión de nucleótidos cíclicos. Se expresan ampliamente en diferentes tipos de músculo liso, incluido el vascular. Aunque su función no es del todo conocida se ha podido establecer su participación en la contracción del músculo liso vascular inducida por Tx-A₂ (Leung *et al.*, 2010).

b. Canales modulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN).

Aunque los canales HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated*) se activen por voltaje, y los canales CNG sean, en principio, independientes de voltaje, ambos son activados por nucleótidos cíclicos y poseen estructuras similares. Sin embargo realizan diferentes funciones fisiológicas (Craven y Zagotta, 2006).

Existe un tercer grupo de canales, denominados canales de K⁺ *Eag-like*, que estructuralmente son muy similares a los CNG y a los canales de K⁺ dependientes de voltaje. Se activan por voltaje y son muy sensibles a la concentración extracelular de Mg²⁺, pero se desconoce la relevancia fisiológica del dominio de unión de nucleótidos cíclicos (CNBD, *cyclic nucleotide binding domain*) y de los nucleótidos cíclicos en estos canales (Ludwig *et al.*, 2000). Se han caracterizado tres subfamilias de estos canales: *Eag*, *Erg* (*eag-related gene*) y *Elk* (*eag-like K⁺ channel*). Algunos estudios indican que el AMPc no modula estos canales directamente (Brelidze *et al.*, 2009).

En el músculo liso de diferentes órganos del sistema gastrointestinal se ha visto, mediante estudios de electrofisiología, que las corrientes *Erg* contribuyen al mantenimiento del potencial de reposo. Un bloqueo farmacológico de las corrientes mediadas por estos canales despolarizaría la membrana e induciría contracciones espontáneas, presumiblemente, debido a un aumento de la [Ca²⁺]_i producido por la apertura de canales VOCC (Schwarz y Bauer, 2004).

4.2 GMPc

Diferentes compuestos, exógenos y endógenos, entre los que se encuentran toxinas, hormonas y neurotransmisores, producen respuestas celulares mediadas por el GMPc (Lucas *et al.*, 2000). Los mecanismos bioquímicos por los que tienen lugar estas respuestas incluyen la síntesis de GMPc por las guanilil ciclasas, la interacción con sus diferentes dianas y su degradación por las PDE.

La PKG es el principal mediador intracelular del GMPc en el músculo liso vascular, ya que cataliza la fosforilación de proteínas que regulan la actividad contráctil de las CMLV, algunos de estos sustratos son comunes con la PKA y otros son específicos para la PKG. La familia de la PKG está formada por dos genes: *prkg1* y *prkg2* que codifican para la PKGI (isoforma mayoritaria en el músculo liso) y PKGII respectivamente. La PKGI, a su vez, está formada por dos isoformas: PKGI α y PKGI β , que difieren en su dominio de cremallera de leucina del extremo N terminal (Surks, 2007). Ambas isoformas se expresan en el músculo liso y contribuyen a la relajación del mismo.

La ruta NO/GMPc/PKG participa en el control del fenotipo de las CMLV, ya que en miocitos frescos, se ha visto que el GMPc inhibe los aumentos de Ca²⁺ (efecto que no se ha podido reproducir en miocitos en cultivo, donde ocurre una regulación a la baja de la expresión de la PKG) (Surks, 2007).

Muchos de los mecanismos implicados en la relajación del músculo liso, en los que participa la ruta del NO/GMPc/PKG, son comunes a aquellos descritos para la ruta del AMPc-PKA y se pueden resumir en los siguientes tres puntos (Lincoln *et al.*, 2001):

1) Disminución de la [Ca²⁺]_c y la consiguiente desfosforilación de la MLC por secuestro y extrusión de [Ca²⁺]_c libre por varios mecanismos:

- Inhibición directa de los VOCC por fosforilación de una proteína fosfatasa.
- Inhibición del acoplamiento receptor-proteína G.
- Hiperpolarización de la membrana plasmática debido a un aumento de la actividad de los canales BK_{Ca}, bien por una activación directa del canal por la

PKG o por aumento de la actividad espontánea de los canales STOC (*spontaneous transient outward currents*).

- Regulación del IP₃R de músculo liso. Varios estudios han puesto de manifiesto que la PKG fosforila directamente este receptor e impide la liberación de Ca²⁺ del RE. La proteína IRAG (*IP₃-receptor associated PKGI substrate*) es necesaria para la fosforilación del receptor.
- Activación de la recaptación del Ca²⁺ por los reservorios intracelulares (por fosforilación de la proteína fosfolamban y activación de la SERCA).
- Aumento de la extrusión de Ca²⁺ (por estimulación de la PMCA y del NCX).

2) Disminución de la sensibilidad al Ca²⁺. La PKG ejerce efectos opuestos a la inhibición de la MLCP por parte de la ruta Rho/cinasa Rho, ya que se une a la subunidad de unión a la miosina (MBS) de la MLCP y de esta manera activa la subunidad catalítica de la fosfatasa. Otros trabajos sugieren que la ruta GMPc/PKG interfiere con la activación dependiente de Rho de la cinasa Rho, posiblemente, por fosforilación de Rho.

3) Regulación de los filamentos finos. VASP (*vasodilatory-regulated phosphoprotein*) y HSP20 son dos proteínas de unión a los filamentos finos, potencialmente dianas de la PKG y, posiblemente involucradas en la regulación de la contracción del músculo liso.

4.3 Canales de K⁺

Los canales de K⁺ situados en la membrana plasmática son fundamentales para mantener el potencial de membrana, el principal determinante del tono vascular, también regulado por la permeabilidad de la membrana a los iones K⁺, Ca²⁺, Na⁺ y Cl⁻ (Morgado *et al.*, 2012). Otros sistemas de transporte de iones que contribuyen a la regulación del tono vascular son la bomba Na⁺/K⁺ y el transportador de aniones. Debido a la estrecha relación entre el potencial de membrana y el tono arterial, pequeños cambios en el potencial de membrana están asociados con grandes cambios en el diámetro arterial. Estos canales, junto con el incremento de los nucleótidos cíclicos, son los principales mecanismos responsables de la vasodilatación en condiciones fisiológicas en el músculo liso vascular (Akata,

2007b). Tras una activación de los canales de K^+ se produce una entrada de K^+ a través de la membrana plasmática, por lo que se hiperpolariza y disminuye el flujo de Ca^{2+} a través de los VOCC, dando lugar a una reducción en la entrada de Ca^{2+} y consecuentemente a la vasodilatación.

Factores fisiológicos como la $[Ca^{2+}]_c$, las proteínas G, los nucleótidos cíclicos, el pH o las proteínas cinasas alteran la actividad de los canales de K^+ . La alteración de la actividad de los canales de K^+ puede explicar modificaciones en el tono vascular observadas en algunas patologías como la hipertensión o el shock.

En el músculo liso vascular existen, al menos, 4 tipos distintos de canales de K^+ , distribuidos y regulados por distintos factores dependiendo del tipo de vaso sanguíneo (Ko *et al.*, 2008).

4.3.1 Canales de K^+ voltaje-dependientes

Los canales de K^+ voltaje-dependientes (K_v) se encuentran en gran cantidad de tejidos. Se abren en respuesta a una despolarización del potencial de membrana, así permiten un flujo de entrada de K^+ a la célula que da como resultado una repolarización y el retorno al potencial de reposo de la membrana. Si la despolarización se vuelve sostenida, algunos subtipos de canales pueden inactivarse.

Una pequeña despolarización en las CMLV da lugar a un flujo de entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tipo L y activación de la maquinaria contráctil, lo que indica que la función de los K_v es limitar la despolarización de la membrana y mantener el tono vascular en reposo (Brayden, 2002).

Estos canales se inhiben por el Ca^{2+} y Mg^{2+} intracelular y se pueden bloquear farmacológicamente por la 4-aminopiridina (4-AP), sin afectar, a las dosis de trabajo más habituales, a las corrientes a través de canales BK_{Ca} , que también se activan por despolarización, o a los K_{ir} . En cambio sí afectan a los K_{ATP} . Otros compuestos que afectan a las corrientes de K^+ como el Ba^{2+} , glibenclamida (GLIB) e iberiotoxina no afectan a las corrientes K_v .

4.3.2 Canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes

Los K_{Ca} están presentes, prácticamente, en todas las células excitables. Concretamente en el músculo liso vascular se activan por despolarización de la membrana y por el $[Ca^{2+}]_c$ (Ledoux *et al.*, 2006). Se clasifican en función de la conductancia en:

a. De gran conductancia, BK_{Ca}

El canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}) es el canal de K^+ más abundante en las CMLV. Se activan por cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} y por despolarización, y contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana en pequeños vasos miogénicos (Ko *et al.*, 2008).

Algunos vasodilatadores endógenos como la adenosina, el NO o la PGI_2 , actúan en parte por activación de los canales BK_{Ca} . En las arterias coronarias, la adenosina probablemente actúa por incremento del AMPc y activación de la PKA. En cambio, el NO actúa por incremento en el GMPC y activación de la PKG. Por el contrario, su inhibición está detrás de la respuesta contráctil a la $ATII$ o de la estimulación de receptores de $Tx-A_2$.

Estos canales se pueden bloquear farmacológicamente con los compuestos tetraetilamonio, caribdotoxina e iberitoxina (estos dos últimos son bloqueantes selectivos).

b. De conductancia intermedia, IK

Son poco importantes en el músculo liso de aorta de rata. Farmacológicamente se inhiben con caribdotoxia y tetraetilamonio.

c. De pequeña conductancia, SK

Se encargan de mediar la hiperpolarización producida por el EDHF y producir la consiguiente vasorrelajación en varios lechos arteriales (Murphy y Brayden, 1995), aunque sus propiedades, en el músculo liso vascular, todavía no están bien definidas. Son sensibles a la apamina y al tetraetilamonio.

4.3.3 Canales de K⁺ ATP-dependientes

Los canales de K⁺ ATP-dependientes (K_{ATP}) son un tipo de ROCC y están ampliamente distribuidos en varios tipos celulares y vasos sanguíneos. Se inhiben por exposición en la cara interna de la membrana plasmática al ATP, y su sensibilidad al mismo puede alterarse por cambios en el ratio ADP/ATP o el pH intracelular. En su activación también participan el AMPc y las proteínas G.

La apertura de estos canales produce hiperpolarización de la membrana, disminución en el flujo de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ tipo L y vasorrelajación del músculo liso. Fisiológicamente la activación tónica de estos canales contribuye a disminuir la resistencia vascular en reposo.

Los K_{ATP} pueden ser inhibidos selectivamente por compuestos con estructura sulfonilurea como la glibenclamida (Wang *et al.*, 2007) o no selectivos como el TEA. Los vasodilatadores farmacológicos, cromakalim y minoxidilo, actúan por activación de estos canales.

En las células de músculo liso arterial de rata los K_{ATP} están expuestos a una activación mediada por la PKA y dependiente de la situación espacial de las AC y los K_{ATP}. Se ha descrito que estos canales, al igual que las AC sensibles al Ca²⁺ (3, 5 y 6), se localizan dentro de la célula en caveolas. La interacción con la proteína caveolina podría estar mediada por la subunidad formadora de poro del canal, la proteína Kir6, conocida por su interacción con varias moléculas de señalización asociadas a caveolas (Sampson *et al.*, 2004).

4.3.4 Canales de K⁺ rectificadores de entrada

Los canales de K⁺ rectificadores de entrada (K_{ir}) son abundantes en el músculo liso de los vasos de resistencia de pequeño diámetro. Se activan por hiperpolarización y pueden inhibirse por iones como el Ba²⁺ y el Cs⁺, mientras que otros bloqueantes de canales de K⁺ apenas les afectan.

En las células de músculo liso vascular los K_{ir} median corrientes de entrada (*inward*) a potenciales de membrana negativos con respecto al potencial de equilibrio del K⁺ (E_K), así como pequeñas corrientes de salida (*outward*) a potenciales de membrana positivos con respecto a E_K (Hibino *et al.*, 2010).

Los K_{ir} se activan por incrementos en el K^+ extracelular. Cuando esto sucede se produce una gran hiperpolarización y consecuentemente la vasodilatación. En los vasos de resistencia y en las células endoteliales estos canales probablemente contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana en reposo (Ko *et al.*, 2008).

4.4 Proteínas AKAP

Las proteínas de anclaje a la PKA (AKAP, *A-kinase-anchoring proteins*) son un grupo de, al menos, 50 proteínas estructuralmente diferentes que comparten la función de unirse a la subunidad reguladora de la PKA y recluirla en localizaciones diferenciadas dentro de la célula. De esta manera contribuyen a la regulación espacial y temporal de la ruta AMPc-PKA y al mantenimiento de su especificidad (Pidoux y Tasken, 2010). También unen otros componentes de señalización como PDE, fosfatasas y otras cinasas.

Las AKAP aseguran la especificidad en la transducción de señales ya que aproximan enzimas a sus efectores y sustratos. El control temporal se consigue porque sitúan la PKA en pequeños *pools* de AMPc diferenciados y la dirigen a sus sustratos específicos.

Las AKAP se unen al dominio N terminal de la subunidad R de la PKA a través de una secuencia de 14-18 aminoácidos, formando una hélice anfipática común para todas las AKAP caracterizadas. La mayoría de las AKAP tienen afinidad en el rango nanomolar por las subunidades RII de la PKA (particulada y confinada en estructuras subcelulares y compartimentos a los que se ancla mediante AKAP), mientras que la afinidad por la RI (bioquímicamente soluble y de localización citoplasmática) es del rango micromolar.

Las proteínas AKAP denominadas *dual-specific* son capaces de anclar los dos tipos de PKA.

5 Regulación de los niveles de AMPc y compartimentación de la señal

La regulación de las concentraciones intracelulares de AMPc ($[AMPc]_i$) es uno de los mecanismos más destacados en el control de las funciones celulares. El descubrimiento de las múltiples isoformas del enzima responsable de su síntesis (adenilil ciclasa) puso de manifiesto, además de una compleja regulación por GPCR, numerosos puntos de interacción con diferentes rutas de señalización. Por otra parte, los mecanismos que limitan la difusión del AMPc son importantes para generar respuestas específicas a estímulos concretos. En el interior celular las fosfodiesterasas (PDE) están distribuidas en sitios clave para controlar la intensidad y la duración de la señalización mediada por AMPc.

En los últimos años se han empezado a conocer los detalles de la localización de los enzimas involucrados en las rutas de señalización del AMPc en diferentes compartimentos de la célula, así como su asociación o integración en complejos macromoleculares, ricos en componentes de señalización y en sus reguladores. La localización celular de estos complejos de señalización y la interacción con otras moléculas dará lugar a diferentes respuestas funcionales. De esta manera se mantiene un estrecho control de los eventos dependientes de AMPc y una minuciosa organización espacio-temporal (Morgado *et al.*, 2012; Ostrom *et al.*, 2002; Stangherling y Zaccolo, 2012; Willoughby y Cooper, 2007).

5.1 Adenilil ciclasas

El principal control en la biosíntesis del AMPc a partir del ATP tiene lugar con la activación del enzima AC. Estructuralmente las AC pertenecen a la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), entre los que se encuentran la proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), la glucoproteína P y el receptor de sulfonilureas (SUR) (Cooper, 2005). La proteína CFTR, que forma un canal de Cl^- , también se expresa en el músculo liso de aorta de rata (Robert *et al.*, 2004). El gen que la codifica está mutado en la fibrosis quística.

De igual forma que sucede en el caso de los transportadores ABC, las AC pueden existir en estados de organización como dímeros o tetrámeros e incluso pueden oligomerizar con otros elementos reguladores para dar lugar a la formación de grandes complejos heteromultiméricos. Esta forma de organización proporcionaría una estrecha asociación con elementos que forman parte de los canales de entrada de Ca^{2+} (Willoughby y Cooper, 2007).

La estructura general de las AC comprende: el NH_2 terminal, el primer dominio transmembrana (TM1), el primer lazo citoplasmático (C1a y C1b), el segundo dominio transmembrana (TM2) con dominios extracelulares de N-glicosilación y el segundo lazo citoplasmático que contiene los dominios C2a y C2b. C1a y C2a son dominios de unión al ATP que dimerizan para formar la región catalítica. Los dominios C1b y C2b están menos conservados (Willoughby y Cooper, 2007) (figura 11).

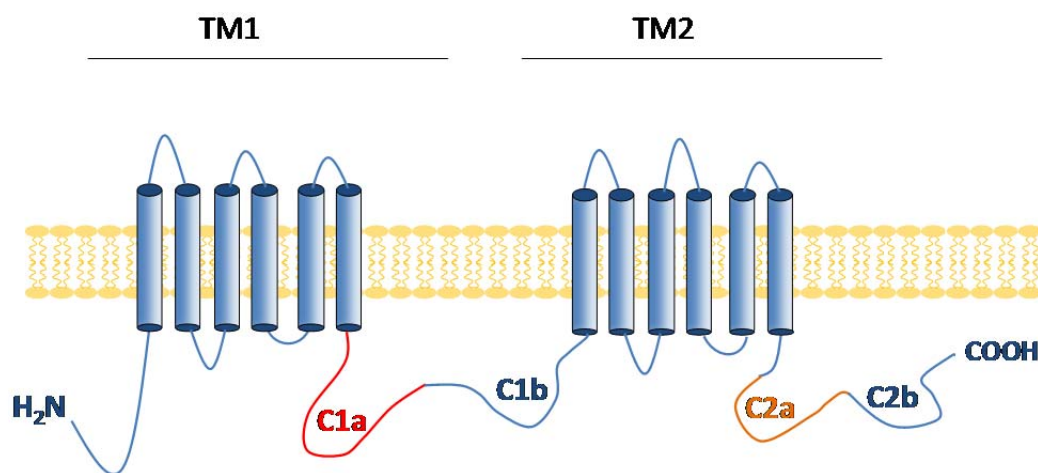


Figura 11. Estructura de las adenilil ciclasas. Modificado de Willoughby y Cooper, 2007.

En mamíferos se conocen al menos nueve isoformas ancladas a la membrana y una isoforma soluble. Las isoformas adheridas a la membrana son glucoproteínas de aproximadamente 120 kDa, que poseen actividad enzimática regulada por la unión de las proteínas G activadoras o inhibidoras (Cooper, 2005). Asimismo, difieren en su distribución tisular, en las propiedades bioquímicas y en la sensibilidad a diferentes moléculas reguladoras, como las subunidades α y $\beta\gamma$ de las

proteínas G, la PKA (inhibe la actividad de las AC5 y AC6), PKC, CaMKII y el Ca^{2+} (directamente o a través de su unión a la CaM). En función de su regulación cada isoforma se distribuye en órganos o tejidos de una manera específica (Gros *et al.*, 2006) (tabla 1).

Todas las AC identificadas son estimuladas por $G_{\alpha s}$, sin embargo, la expresión de un GPCR específico y de las AC en un dominio subcelular concreto podría dar lugar a las diferencias encontradas en la sensibilidad a la estimulación por $G_{\alpha s}$. En cuanto a la regulación por $G_{\alpha i}$, la mayoría de las isoformas de AC son inhibidas por esta proteína (ver tabla 1) y las que no lo son (AC2, AC4 y AC7) es porque los receptores acoplados a $G_{\alpha i}$ están ausentes de los tejidos donde esas isoformas se expresan de manera mayoritaria (pulmón e hígado) (Wettschureck y Offermanns, 2005).

Tabla 1. Clasificación de las adenilil ciclasas y su regulación. Estimulación, inhibición o sin efecto se representan por \uparrow , \downarrow o \rightarrow respectivamente (Willoughby y Cooper, 2007).

Isoforma	Expresión	Respuesta a otras moléculas de señalización					
		$G_s\alpha$	$G_i\alpha$	$G_{\beta\gamma}$	Proteínas cinasas	RGS	Ca^{2+}
AC1	Cerebro	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow CaMK IV \uparrow RTK		\uparrow (Vía CaM)
AC2	Pulmón, cerebro	\uparrow	\rightarrow	\uparrow	\uparrow PKC		\rightarrow
AC3	Epitelio olfatorio,	\uparrow	\downarrow	\rightarrow	\downarrow CaMK II	\downarrow	\uparrow (?) (CaM <i>in vitro</i>)
AC4	Amplia	\uparrow	\rightarrow	\uparrow	\uparrow PKC		\rightarrow
AC5	Corazón, cuerpo estriado	\uparrow	\downarrow	\rightarrow	\uparrow PKC ($\zeta>\alpha$) \downarrow PKA \uparrow RTK	\downarrow	\downarrow
AC6	Corazón, riñón, amplia	\uparrow	\downarrow	\rightarrow	\downarrow o \uparrow PKC \downarrow PKA \uparrow RTK	\downarrow	\downarrow
AC7	Amplia	\uparrow	\rightarrow	\rightarrow	\uparrow PKC (δ)		\rightarrow
AC8	Cerebro, páncreas	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow PKC		\uparrow (vía CaM)
AC9	Testículos, amplia	\uparrow	\downarrow	\rightarrow	\downarrow PKC		\downarrow (vía calcineurina)

Las CMLV, incluidas las RASMC, expresan diferentes isoformas entre las que destacan los subtipos 3, 5 y 6 (Ostrom *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2011) que, además, presentan una distribución preferentemente caveolar. La AC8 se expresa débilmente, pero se ha descrito una regulación al alza en su expresión cuando existe una transformación de la CMLV hacia un fenotipo proliferativo (Gueguen *et al.*, 2010). A pesar de tener una capacidad similar para elevar la $[AMPc]_i$, las distintas isoformas de AC desempeñan funciones diferentes en la regulación de la proliferación o de la contractilidad en las CMLV (Gros *et al.*, 2006), lo que es indicativo de que elevan el AMPc en diferentes subcompartimentos celulares, o que interaccionan de manera selectiva con diferentes efectores/reguladores.

El hecho de que algunos tipos de AC estén reguladas por Ca^{2+} , directamente o indirectamente a través de la CaM, hace que este modo de regulación sea importante como una forma de integrar las actividades de ambos mensajeros (Willoughby y Cooper, 2007). En células no excitables las AC sensibles al Ca^{2+} se localizan en lugares próximos a los componentes específicos de la CCE, mientras que en las células excitables no hay dependencia exclusiva de las AC de la CCE.

Las AC reguladas por Ca^{2+} presentan una alta selectividad por la entrada de Ca^{2+} procedente de la activación de canales SOCC. En un trabajo llevado a cabo por el Dr. Cooper y sus colaboradores se ha visto que en células pancreáticas y en neuronas de hipocampo hay una estrecha vinculación entre la AC8 y la proteína AKAP79, que disminuye la activación de la AC8 por la entrada de Ca^{2+} a través de dichos canales. Dicho efecto regulador de AKAP79 sobre la AC8 es mediado por reclutamiento de la PKA. Esta interacción proteína-proteína reduce la producción de AMPc, y proporciona un mecanismo de retroalimentación negativa para compensar una excesiva activación de la AC8 producida por aumento de Ca^{2+} (Willoughby *et al.*, 2012b).

Otro ejemplo de coordinación entre las señales cálcicas y del AMPc lo encontramos en un trabajo llevado a cabo por el mismo grupo de investigación, en el que han puesto de manifiesto la existencia de microdominios de señalización de AC8 y Orai1. Esto explica como los canales SOCC se pueden reclutar para maximizar la eficiencia de la interconexión entre ambos mensajeros (Willoughby *et al.*, 2012a).

Entre los fármacos activadores de la AC destaca la forskolina, compuesto con estructura diterpenoide ampliamente utilizado en investigación con el fin de incrementar los niveles de AMPc en preparaciones de membranas, células o tejidos.

Su principal mecanismo de actuación es por activación de la AC entre las regiones C1a y C2a, mediante una estimulación por Gas (Dessauer *et al.*, 1997; Seamon y Daly, 1986), pero también interacciona con otras proteínas, como transportadores de glucosa y canales iónicos por mecanismos que no necesariamente implican variación en los niveles de AMPc (Insel y Ostrom, 2003) (figura 12).

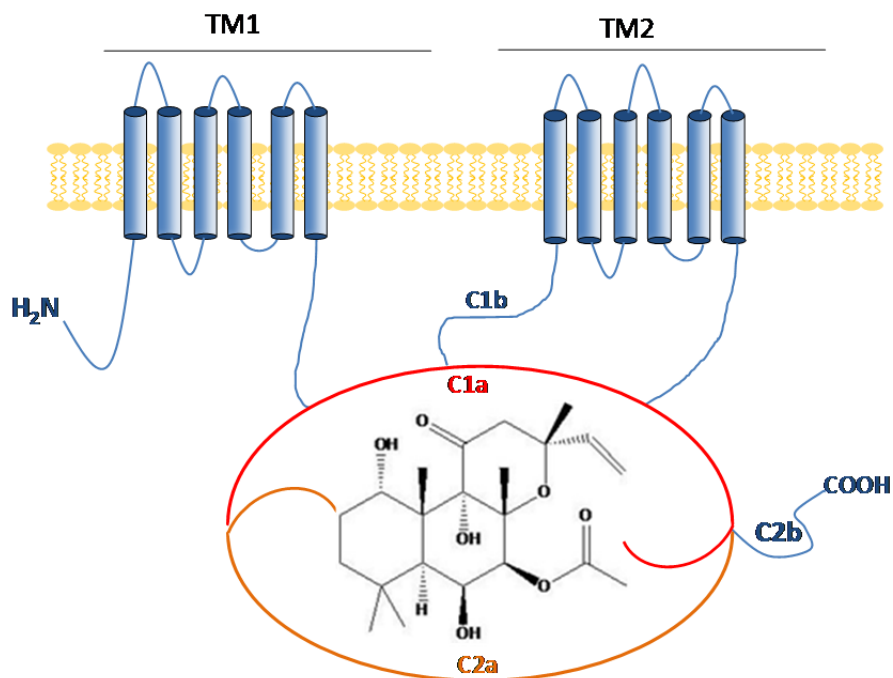


Figura 12. Estructura de la forskolina e interacción con el enzima adenilil ciclasa.

5.2 Fosfodiesterasas

Las PDE son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace 3'-5' fosfodiéster de nucleótidos cíclicos, como el AMPc y el GMPc, enlaces que se establecen en los ácidos nucleicos entre la pentosa de un nucleótido y el grupo fosfato de otro. Estas enzimas tienen como misión finalizar la señalización mediada por los nucleótidos cíclicos y su actividad se modula finamente en coordinación con las AC y GC a través de efectores y rutas de retroalimentación para mantener los

niveles óptimos de nucleótidos cíclicos (Keravis y Lugnier, 2012). La importancia de las PDE como reguladoras de la señalización intracelular se corrobora al utilizarlas como objetivos farmacológicos en enfermedades como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la insuficiencia cardíaca, la aterosclerosis periférica y disfunción eréctil.

Las PDE están comprendidas en 11 familias genéticas (Bender y Beavo, 2006; Tilley y Maurice, 2002;) derivadas de 21 genes. Algunos de estos genes tienen múltiples promotores con distintas características reguladoras y múltiples variantes espliceosomales, que contribuyen a su diversidad, lo que les permite una distribución específica dentro de la célula y en los diferentes tejidos.

Las PDE poseen un dominio regulador, normalmente localizado en el extremo NH₂ terminal, y un dominio catalítico en el COOH terminal (de aproximadamente 250 aminoácidos) donde, además, las PDE4 poseen una serie de características reguladoras. Presentan alta similitud en las secuencias aminoacídicas de sus dominios C, hecho que no se traduce en una similitud funcional (Francis *et al.*, 2011).

Además, poseen dominios proteicos que contribuyen a la regulación y se encuentran en el dominio C, entre los que destacan los dominios GAF (*cGMP-binding PDEs*, *Anabaena adenyl cyclase and Escherichia coli Fh1a*) y UCR (*upstream conserved regulatory*). Los dominios UCR regulan directamente la función de las PDE4, además de interactuar con proteínas heterólogas. En algunas PDE de mamíferos las GAF participan en: 1) interacciones proteína-proteína 2) interacciones proteína-PDE 3) unión de nucleótidos cíclicos. Algunas PDE también contienen regiones modificadas para facilitar su inserción en las membranas (Francis *et al.*, 2011) (figura 13).

El mecanismo propuesto para explicar la especificidad del enzima por el nucleótido cíclico es el de la conmutación de la glutamina (*glutamine switch*) (Zhang *et al.*, 2004). Según esta teoría, en las PDE de las que se conoce su estructura parece que existe un residuo invariante de glutamina que establece la unión del anillo de purina al lugar activo (*binding pocket*). La conformación de los enlaces de hidrógeno del grupo amino del residuo de glutamina sería la responsable de la unión a la

guanina (GMPc) o a la adenina (AMPc). En las PDE que pueden hidrolizar tanto GMPc como AMPc, las glutaminas pueden rotar libremente, y por ello conmutan entre ambas orientaciones.

La mayoría de las PDE conocidas se encuentran como homodímeros, excepto la PDE1 y la PDE6 que, en condiciones fisiológicas, se encuentran como heterotetrámeros. Por ejemplo, la PDE1 en presencia de Ca^{2+} contiene dos subunidades de CaM que interaccionan con dos subunidades catalíticas idénticas (Francis *et al.*, 2011).

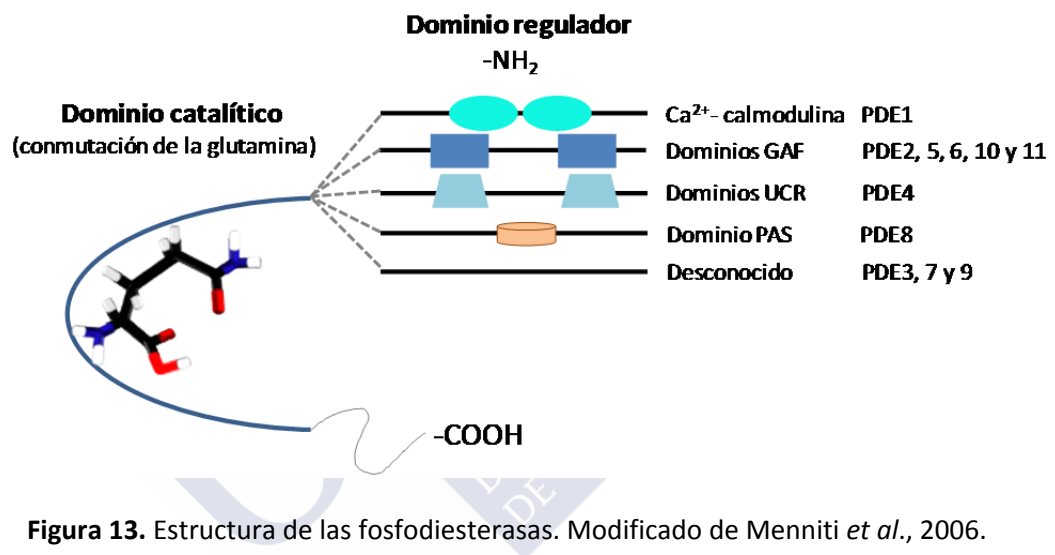


Figura 13. Estructura de las fosfodiesterasas. Modificado de Menniti *et al.*, 2006.

Las células del sistema cardiovascular expresan numerosas familias de PDE. Concretamente, en el músculo liso vascular, predominan las isoformas 1, 3, 4 y 5, entre las cuales, la PDE3 muestra gran afinidad por los dos substratos (AMPc y GMPc), mientras que PDE4 solo tiene alta afinidad para el AMPc (Bender y Beavo, 2006; Komasa *et al.*, 1991). Según un trabajo llevado a cabo por el grupo del Dr. Maurice (Rose *et al.*, 1997) los subtipos 3 y 4 representan el 70% del total de la actividad fosfodiesterasa en la aorta de rata.

Sin embargo, por experimentos realizados en la aorta de rata sin endotelio y en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la PDE1 y la PDE3 parecen tener un papel destacado como moduladoras de la contractilidad del músculo liso. La enzima PDE3 también está implicada en la regulación de la contracción del músculo cardíaco,

además del músculo liso vascular. Ello ha servido de base para el desarrollo de fármacos inhibidores de la PDE3 para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, como la amrinona y milrinona. En cambio la PDE4 y 5 no parecen ser tan relevantes en las mismas condiciones, puesto que sus inhibidores específicos (rolipram y zaprinast) son inefectivos en la relajación de anillos desprovistos de endotelio (Noguera *et al.*, 2001).

Las PDE se clasifican en base a su secuencia aminoacídica (estructura primaria), sus propiedades reguladoras y a la especificidad por el sustrato (hay PDE AMPc-específicas, GMPc-específicas y PDE de acción dual) (Tilley y Maurice, 2002) (tabla 2):

Tabla 2. Clasificación de la familia de fosfodiesterasas. Modificado de Keravis y Lugnier, 2012.

Familia	Sustrato	Propiedades	Inhibidores específicos
PDE1	AMPc, GMPc	Ca ²⁺ -CaM dep	Nimodipino
PDE2	AMPc, GMPc	Activada por GMPc	EHNA
PDE3	AMPc, GMPc	Inhibida por GMPc	cilostazol, milrinona,
PDE4	AMPc	Insensible a GMPc	rolipram, roflumilast
PDE5	GMPc	Fosforilada por PKA/PKG	zaprinast, sildenafilo
PDE6	GMPc	Activada por transducina	zaprinast, sildenafilo
PDE7	AMPc	Insensible a rolipram	BRL 50481, ICI242
PDE8	AMPc	Insensible a rolipram Insensible a IBMX*	PF-04957325
PDE9	GMPc	Insensible a IBMX	BAY-73-6691
PDE10	AMPc, GMPc	Inhibida por AMPc	Papaverina
PDE11	AMPc, GMPc	Especificidad dual	Desconocido

*IBMX es un inhibidor de PDE no selectivo

Aunque el AMPc se elimina principalmente por hidrólisis, llevada a cabo por las PDE, existen proteínas de transporte de la membrana plasmática, con la estructura de las proteínas de resistencia a fármacos (MRP, *multidrug-resistance*

protein) capaces de extrudir nucleótidos cíclicos (Shayo *et al.*, 1997). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de las proteínas ABC y la mayoría funcionan como transportadores para aniones orgánicos y fármacos (ácidos biliares y agentes quimioterápicos como análogos de nucleósidos). En algunos tipos celulares como adipocitos, células epiteliales, neuronas, fibroblastos o células musculares esqueléticas este mecanismo de extrusión es significativamente importante (Hofer y Lefkimiatis, 2007).

5.3 Compartimentación de la señalización del AMPc

El concepto de compartimentación de segundos mensajeros y moléculas de señalización surgió de la observación en células cardíacas de que no todas las señales que generan AMPc ejercen los mismos efectos funcionales (Buxton y Brunton, 1983). Esta regulación espacio-temporal o compartimentación consiste en la diferente localización, propiedades y selectividad de los enzimas implicados en las rutas de los nucleótidos cíclicos, así como su diferente velocidad de síntesis y degradación, en regiones específicas de la membrana plasmática o del citosol (Vandecasteele *et al.*, 2006) (figura 14) De esta manera se explican los distintos mecanismos de transducción de señales desencadenados por el AMPc (Baillie, 2009; Morgado *et al.*, 2012): incrementos pequeños y localizados pueden desencadenar eventos diferentes dependiendo de la zona en la que éstos tengan lugar (Cooper, 2005; Houslay *et al.*, 2007).

El desarrollo de las técnicas de FRET y de *imaging*, en células vivas, ha permitido visualizar los microdominios que presentan altas concentraciones de AMPc, difíciles de capturar con las técnicas bioquímicas tradicionales (Dipilato y Zhang, 2010).

El control temporal y espacial de la señalización mediada por AMPc es llevado a cabo principalmente por los enzimas AC y PDE (Zaccolo *et al.*, 2002). La organización de las AC en dominios se puede explicar desde varios puntos de vista: 1) es una manera de organizar componentes que potencialmente pueden interactuar si están muy próximos; 2) la provisión de un microdominio que está aislado de las fluctuaciones metabólicas en la actividad celular; y 3) proteger el

resto de la célula de la hiperactividad de la señalización del AMPc, por ejemplo mediante la formación de una barrera de PDE para limitar la difusión del AMPc (Willoughby y Cooper, 2007). Otros elementos de señalización que forman parte de los microdominios son:

- Proteínas AKAP: el reclutamiento de la PKA en compartimentos se consigue mediante la asociación con las proteínas AKAP. Ello permite dirigir las acciones de la PKA a sus sustratos particulares y mantener *pools* localizados de actividad cinasa (Dodge-Kafka y Kapiloff, 2006; Gros *et al.*, 2006).
- CaM: el reclutamiento y disponibilidad de CaM es determinante para la actividad de las AC (Willoughby y Cooper, 2007).
- Epac: en cardiomiocitos de ratas neonatas se ha descrito la presencia de un complejo multiproteico de respuesta al AMPc entre Epac1, mAKAP, PKA y la isoforma D3 de la PDE4 (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).
-

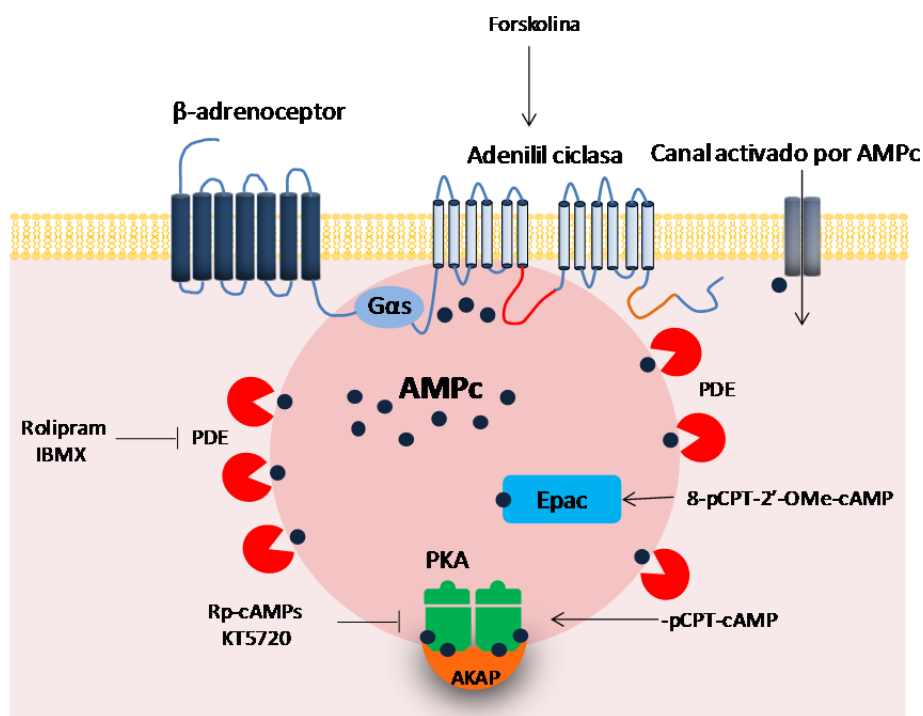


Figura 14. Complejos multiproteicos de señalización mediada por AMPc.

Los receptores acoplados a proteínas G y sus componentes de señalización asociados no están dispersos al azar a lo largo de la membrana celular, sino que en varios modelos celulares se ha visto que la expresión de los β AR y las AC está aumentada en los dominios de la membrana plasmática denominados caveolas (Ostrom *et al.*, 2002). Las caveolas concentran AC y elementos reguladores como proteínas G, receptores y canales de entrada de Ca^{2+} (canales TRP y CNG) y PDE. También se han encontrado las isoformas de AC sensibles al Ca^{2+} (1, 3, 5, 6 y 8) (mientras que las formas insensibles están excluidas) y sus proteínas asociadas. Aunque la localización de las balsas lipídicas puede en parte explicar el acoplamiento selectivo de los GPCR a las AC, la capacidad de las AC para regular vías de señalización descendentes, como la PKA o ERK, requiere de mecanismos adicionales para generar especificidad, como los que se detallan a continuación (Dessauer, 2009):

- Intercambiador sodio-hidrógeno 1

Las AC dependientes de Ca^{2+} son objeto de regulación debido a cambios en el pH. La acidificación y la alcalinización, respectivamente, disminuyen e incrementan la actividad de las AC y alteran la sensibilidad al Ca^{2+} . La hiperactividad del intercambiador Na^+-H^+ 1 (NHE1) en las balsas lipídicas genera un microdominio privilegiado que protege las AC sensibles al Ca^{2+} de cambios locales en la acidez.

- Canales TRPC

Algunos subtipos de canales TRP contribuyen a la CCE activada por taspigargina en CMLV (Potier y Trebak, 2008). Se ha descrito que estos canales forman parte de grandes complejos macromoleculares, por ejemplo, el TRPC1 se localiza en las caveolas donde parece estar asociado con el subtipo 3 del IP_3R y $\text{G}\alpha_q$ (Lockwich *et al.*, 2000). Esto demuestra que los microdominios caveolares proporcionan un entorno óptimo para el ensamblaje de moléculas clave de la señalización cálcica y para la coordinación de las interacciones moleculares que permiten la activación de la CCE.

- Canales de K^+

En las RASMC se ha visto que existe una compartimentación funcional entre los canales K_{ATP} y las AC. En este trabajo sugieren que existe una compartimentación funcional entre los canales K_{ATP} y las AC en caveolas de la superficie de los miocitos (Sampson *et al.*, 2004).



6 Técnicas de medición del AMPc

Uno de los grandes problemas encontrados hasta la fecha para el estudio de la función del AMPc ha sido la carencia de un método de medida que permitiese la determinación continua de los niveles de este nucleótido en las células vivas. Los métodos tradicionales se basaban en la extracción del AMPc de las muestras o tejidos por métodos que implicaban la lisis celular y una medición, por tanto, en el “punto final”. Mediante radioinmunoensayo (RIA) el marcaje con [³H]adenina permite el marcaje radiactivo del *pool* intracelular de ATP, que posteriormente se convertirá en [³H]AMPc, así, el AMPc marcado se determina por conteo de centelleo. Pero éste y otros ensayos *in vitro* sólo proporcionan información acerca de la cantidad total de AMPc en la célula, y no tiene en cuenta conceptos que han surgido en las últimas décadas como la compartimentación, que asume diferentes concentraciones de AMPc en diferentes partes de la célula (Nikolaev y Lohse, 2006).

Ya que en la célula coexisten diferentes *pools* de AMPc, las diferentes sondas de las que se disponen se complementan para analizar la señalización por AMPc en diferentes partes de la célula. La combinación de diferentes puntos de vista nos dará una idea más precisa de los cambios en el AMPc intracelular.

En los últimos años ha habido un auge espectacular de nuevas técnicas que permiten el seguimiento de la [AMPc]_i en tiempo real (Willoughby y Cooper, 2008). Estas técnicas, basadas en métodos fluorescentes y electrofisiológicos, utilizan los tres efectores del AMPc conocidos: la PKA, los canales activados por nucleótidos cíclicos y las proteínas Epac.

6.1 Métodos basados en la disociación de la PKA

FLCRhR (*Flicker*) es un sensor de FRET desarrollado en la década de los 90 (Adams *et al.*, 1991). Fue el primer método fluorescente, y el primer gran avance, para la monitorización de cambios en el AMPc espacio-temporales. Consiste en el marcaje con fluoresceína (FL) y rodamina (Rh) de las subunidades catalítica (C) y reguladora (R) de la PKA. En ausencia de AMPc ambas subunidades forman un holoenzima tetramérico en el que se puede observar una gran señal de FRET entre

la FL y la Rh. Cuando las moléculas de AMPc se unen a la subunidad reguladora, la subunidad catalítica se disocia y disminuye la señal de FRET. Esta técnica, utilizada con éxito para diferentes aplicaciones, permitió por primera vez la evidencia visual de la compartimentación del AMPc en neuronas. En rodajas de cerebro de ratón se empleó para demostrar que los receptores 5-HT₇ de serotonina activan la producción de AMPc en neuronas talámicas. En miocitos ventriculares se empleó en combinación con *patch-clamp* para la medida simultánea de AMPc y de corrientes a través de canales de Ca²⁺ tipo L (Goaillard *et al.*, 2001).

Sin embargo sus limitaciones han impedido su expansión. El marcaje de proteínas es inestable y difícil de conseguir. Deben ser microinyectadas en las células en cantidades del rango micromolar y ésto puede interferir con las cinéticas reales del AMPc.

Con la aparición de la tecnología de la GFP (*green fluorescent protein* o proteína fluorescente verde) se desarrolló una propuesta alternativa más adecuada, y en lugar del par de fluoróforos originariamente utilizados se emplearon dos proteínas variantes de la GFP.

La GFP es una proteína fluorescente de 26,9 kDa aislada de la medusa *Aequoria victoria*. La GFP original de la medusa posee dos picos de excitación: uno menor, a 475 nm, y uno mayor, a 395 nm. Su pico de emisión está a 509 nm, en la zona verde del espectro. El aislamiento del gen que codifica para esa proteína permitió su empleo como marcador. El descubrimiento y desarrollo de esta tecnología les valió a los investigadores Martin Chalfie, Osamu Shimomura y Roger Y. Tsien el Premio Nobel de Química del año 2008.

Mediante mutaciones y modificación de sus residuos se ha diseñado una gran cantidad de derivados de la GFP que mejoran sus características espectrales. Dos clases de variantes espectrales de esta proteína se emplean en FRET: CFP (*cyan fluorescent protein*) e YFP (*yellow fluorescent protein*).

Con estos sensores codificados genéticamente se ha conseguido visualizar microdominios con alta concentración de AMPc durante la estimulación β -

adrenérgica en miocitos cardíacos. Estos microdominios se localizaron en el sitio de las proteínas AKAP donde se ancla la PKA.

Los indicadores modificados genéticamente no requieren microinyección. Se pueden expresar en distintos tipos celulares mediante transfección con dos constructos de ADN que codifican para las subunidades R-CFP y C-YFP, pero esta técnica no está exenta de problemas (Rich y Karpen, 2002):

- Estos constructos están formados por dos grandes proteínas quiméricas que se deben expresar al mismo nivel para formar un tetrámero funcional. La subunidades R o C marcadas con CFP e YFP se pueden reasociar con subunidades endógenas, y por tanto no marcadas, y ésto puede dar lugar a errores en la cinética del AMPc.
- La sobreexpresión de la subunidad catalítica de la PKA puede tener consecuencias para la célula (por ejemplo, apoptosis).
- La PDE4 se activa por fosforilación dependiente de la PKA. Si ésta se activa puede dar lugar a una hidrólisis del AMPc que falsearía los resultados.
- La disociación de la PKA ocurre en múltiples pasos, es un proceso cooperativo a través de cambios conformacionales antes de que las subunidades C se liberen, lo que se traduce en una cinética del sensor más lenta que la real.

La señal de FRET que tiene lugar con sensores basados en la PKA refleja la compleja disociación de la PKA en lugar de cambios rápidos en la concentración de AMPc.

6.2 Métodos que emplean canales CNG

Son canales catiónicos no selectivos formados por 4 subunidades con una región intracelular reguladora de unión para AMPc/GMPc (Rich *et al.*, 2001). Se pueden transfectar células con ADN codificante para la subunidad α del canal CNGA₂, donde forman canales homomultiméricos integrados en la membrana plasmática. Cuando aumenta el AMPc se produce una apertura rápida del canal y

ésto se puede monitorizar por electrofisiología o por *imaging* de Ca^{2+} . Se han creado mutantes de estos canales para incrementar la selectividad y afinidad por el AMPc.

Debido a su localización, estos sensores miden AMPc exclusivamente en la membrana plasmática. En comparación con la PKA estos sensores no tienen actividad catalítica y no desarrollan desensibilización. No son dependientes del voltaje y responden rápidamente al AMPc. Sin embargo la activación de estos canales permite el flujo de Ca^{2+} , lo que puede dar lugar a interferencias en la medida.

El empleo de estos canales como sondas ha reafirmado el concepto de la compartimentación. Ha demostrado la existencia de *pools* de AMPc en la membrana plasmática en células de glioma y en células embrionarias humanas de riñón (HEK293). La activación de la síntesis de AMPc en células HEK293 por prostaglandinas induce un aumento transitorio de AMPc en la membrana plasmática, mientras que en el citosol se observa un aumento sostenido. Se ha demostrado también que los cambios de AMPc en la membrana están regulados por un *feedback* negativo vía PKA y PDE, confirmando así que la hidrólisis del AMPc por estas enzimas desarrolla gradientes “difusos” de AMPc y juega un papel fundamental en la formación de *pools* de AMPc localizados (Rochais *et al.*, 2004). El empleo de estos canales sólo informa acerca del AMPc en compartimentos submembranales, por lo tanto para registrar cambios en el citosol es necesario el empleo de otras sondas de AMPc.

Además el flujo de Ca^{2+} a través de estos canales puede conllevar una inhibición de las AC sensibles al AMPc y afectar a su producción. La visualización de compartimentos locales de AMPc mediante el sensor de PKA o de CNGC probablemente se deba al hecho de que estos sensores se localizan por sí mismos en la célula en los sitios donde hay microdominios. Sería interesante confirmar la existencia de *pools* de AMPc locales empleando un sensor que se distribuya uniformemente en la membrana pero que detecte aumentos localizados en el AMPc. Lo más probable es que tales señales pasen desapercibidas debido a la distribución uniforme del sensor.

6.3 Sensores basados en las proteínas Epac

El sensor de la Epac consiste en un dominio de unión del AMPc regulador y otro catalítico, que contribuye a la unión de la guanina a la pequeña proteína G Rap1 y así activarla. Dos laboratorios independientes crearon sensores similares que comprenden la propia proteína Epac1 o un mutante de ésta catalíticamente inactivo (y sin el dominio de unión a la membrana) fusionado entre CFP e YFP (DiPilato *et al.*, 2004; Ponsioen *et al.*, 2004). La unión del AMPc a estos sensores induce un cambio conformacional que resulta en una disminución del FRET entre los fluoróforos (figura 15). Las afinidades de estos sensores por el AMPc son menores que en el caso de los basados en la PKA, lo que permite la visualización de mayores concentraciones de AMPc (la presencia de una meseta en el registro del sensor de la PKA era indicativo de su saturación) pero probablemente también su incapacidad para detectar menores concentraciones.

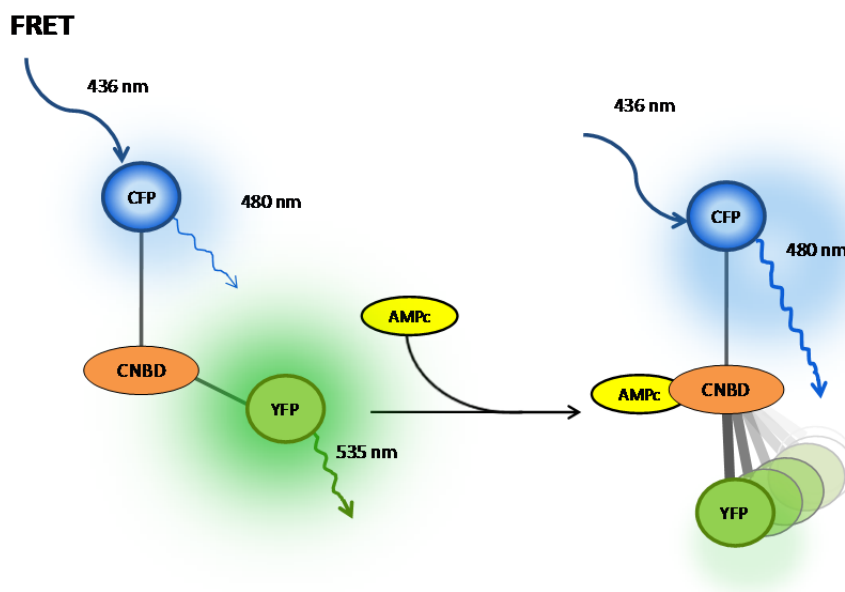


Figura 15. Representación esquemática de un sensor para el AMPc basado en la técnica de FRET. La eficiencia de la transferencia de energía entre CFP e YFP depende de la concentración de AMPc. Modificado de Nikolaev y Lohse, 2006.

En comparación con el sensor de la PKA, el de la Epac ha mostrado cinéticas más rápidas, lo que sugiere que la activación de la Epac ocurre más rápido que la disociación del complejo de la PKA.

Por estudios cristalográficos se ha visto que los cambios conformacionales inducidos por el AMPc en los CNBD de la Epac y de la PKA ocurren a nivel de un único dominio de unión (*single binding domain*) y no necesariamente requiere de otras partes de la proteína. En base a esto se crearon distintas pruebas con un único CNBD de Epac 1, Epac 2 y PKA. Estos sensores de AMPc (camps) están desprovistos de todos los dominios catalíticos y de interacción, conteniendo un solo CNBD fusionado entre YFP y CFP. Estos dominios mostraron un descenso del FRET dependiente del AMPc y afinidades entre 0,9 y 2,4 μM , permitiendo la medida de AMPc en el rango de concentraciones fisiológicas. Estos sensores se distribuyen uniformemente en el citosol. La ausencia de los dominios catalíticos y de interacción hace que sean inertes para la célula. Han demostrado cambios rápidos en el AMPc tras la estimulación de las células con agonistas de receptores acoplados a proteínas Gs. La activación de los Epac-camps *in vitro* y en células intactas es mucho más rápida que en aquellos basados en el tetrámero de la PKA, permitiendo así alcanzar mayor resolución temporal (Nikolaev y Lohse, 2005).

La sonda Epac-camps se puede aplicar satisfactoriamente para monitorizar variaciones en la síntesis y en la hidrólisis del AMPc. Esto le hace ser un buen candidato para el estudio de los mecanismos moleculares de la compartimentación del AMPc, ya que la sonda se distribuye uniformemente en el citosol.



Objetivos



En base a los antecedentes expuestos, en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado abordar los siguientes objetivos:

- Profundizar en el conocimiento del mecanismo vasodilatador de la forskolina, un activador del enzima adenilil ciclasa que incrementa la concentración intracelular de AMPc.
- Definir los mecanismos mediante los cuales tiene lugar la interconexión de las rutas de señalización del Ca^{2+} y del AMPc, así como su implicación en la contractilidad vascular.

Para ello hemos llevado a cabo los siguientes estudios:

- Determinación de diferentes canales y rutas de señalización implicados en la respuesta vasodilatadora inducida por la forskolina y el AMPc en la aorta de rata: papel del enzima PDE4, de los canales de K^+ , de diversos canales de Ca^{2+} transmembrana, de la ruta de la p38 MAPK, efecto del AMPc sobre la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares. Además, se evaluó la participación de las proteínas Epac y PKA, activadas por el AMPc, en dichos mecanismos.
- Estudio, mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, del efecto de la forskolina y del AMPc sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal y sobre la respuesta cálcica inducida por agonistas.
- Puesta a punto de la técnica de FRET para la determinación de los niveles de AMPc en tiempo real mediante el empleo de sondas intracelulares en miocitos vasculares.
- Determinación de la expresión de proteínas efectoras del AMPc en miocitos vasculares y modificación de su expresión en respuesta a determinados tratamientos.
- Estudio preliminar de los canales implicados en la interconexión de la ruta AMPc- Ca^{2+} mediante la técnica de *patch-clamp*.





Material y Métodos



1 Selección y mantenimiento de los animales

Para llevar a cabo los experimentos descritos en esta memoria, hemos utilizado ratas albinas macho (*Rattus norvegicus*) de la variedad Wistar Kyoto (WKY), suministradas por el Animalario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia. La edad de los animales osciló entre 6 meses y 1 año, y el peso entre 200 y 300 g.

Se ha elegido esta cepa por su frecuente utilización en experimentos farmacológicos cardiovasculares, lo que propicia la existencia de un gran número de datos experimentales en la bibliografía. Además, nuestro grupo de investigación posee una dilatada experiencia de trabajo con este tipo de animales.

Todos los procedimientos de manipulación y sacrificio de los animales de experimentación llevados a cabo en este trabajo han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia de acuerdo con las directrices españolas y europeas vigentes.

2 Experimentos de contractilidad en aorta aislada

La técnica de órgano aislado permite eliminar las respuestas de tipo hormonal y reflejo que aparecen *in vivo*, al tiempo que se consigue cuantificar la cantidad de fármaco que accede a la biofase. Además, se pueden conocer y modificar las condiciones de incubación del preparado tisular en los distintos protocolos experimentales. Esto da lugar a un estudio más preciso y simplificado del mecanismo de acción de los fármacos.

Las ratas WKY fueron sacrificadas mediante inhalación de CO₂ y posterior exanguinación. A continuación, se practicó una toraco-laparotomía media y, después de separar el corazón y los pulmones, se localizó la aorta descendente procediéndose a su disección desde el diafragma hasta el cayado aórtico.

La aorta fue depositada inmediatamente en una placa de Petri con solución Krebs bicarbonato normal (KBN, composición en mM: NaCl 119; KCl 4,7; CaCl₂·2H₂O

1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 25; EDTA-Na_2 0,03; ácido L-ascórbico 0,6; glucosa 11; pH 7,4) a 37 °C y burbujeada con gas carbógeno (95% O_2 /5% CO_2) para proceder a la limpieza de sangre, tejido conectivo y tejido adiposo circundante con la ayuda de pinzas y tijeras. Para la extracción del endotelio se efectuó un raspado de la luz arterial con hilo grueso de algodón. A continuación se cortó la aorta en segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de longitud.

Una vez preparados los anillos, fueron introducidos en un baño de órganos con 10 mL de solución KBN con burbujeo constante con gas carbógeno y mantenida a 37 °C mediante una cámara externa en la que se establece un circuito cerrado de agua termostatizada.

A través del lumen de cada segmento arterial se insertaron dos pinzas de acero inoxidable: una se fija al baño de órganos y la otra se conecta a un transductor. Los anillos se someten a una tensión de 2 g y a un periodo de estabilización de 1 h, con intervalos de lavado y reajuste de la tensión de reposo a 2 g cada 10 min.

En función del protocolo a seguir, en algunos experimentos se sustituyó la solución KBN por solución Krebs libre de Ca^{2+} , que posee idéntica composición que el KBN pero carece de CaCl_2 y contiene además EGTA ([ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetil éter) N,N,N',N'-tetracético] 0,5 mM), o por solución Krebs despolarizante sin Ca^{2+} ; se trata de una solución con elevada cantidad de KCl (55 mM) en la cual, para mantener la isotonicidad del medio se disminuye la concentración de NaCl en cantidad equivalente (hasta 64 mM).

Estas soluciones fueron preparadas a partir de concentrados conservados a 4 °C. La glucosa fue añadida a la solución el mismo día del experimento y el pH fue ajustado a 7,4 con HCl 1M y/o NaOH 1M y burbujeo constante con gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2).

Basándonos en trabajos previos (Furchgott y Zawadzki, 1980) la presencia o ausencia de endotelio funcional se comprobó evaluando los efectos vasorrelajantes de la acetilcolina (ACh 1 μM) sobre las contracciones tónicas inducidas por

fenilefrina (PHE 1 μ M). La ausencia de efecto vasorrelajante a la ACh demostró la total eliminación del endotelio funcional.

Para la visualización y registro de las contracciones se utilizaron dos equipos informatizados que constan de:

- Transductores *Dynamometer UF1 (Pioden Controls LTD, Canterbury, Reino Unido)*.
- Amplificadores de 16 canales (*PowerLab/16s*) y de 8 canales (*MacLab/8sp*).
- Software: *Chart v.3.6.3* y *Chart v.4.1.2 (PowerLab/MacLab, ADInstruments Pty Ltd)*.

3 Cultivos celulares

3.1 Cultivo primario de miocitos de aorta de rata

Los miocitos, o células musculares lisas de aorta de rata (RASMC) fueron cultivadas siguiendo el protocolo previamente descrito por nuestro laboratorio (Orallo, 1997).

Los miocitos fueron aislados a partir de aortas torácicas de ratas WKY macho (8-10 semanas) obtenidas por el mismo procedimiento descrito en el apartado 2. Tras la extracción, cada aorta fue depositada en una placa de Petri estéril con solución tamponada HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) suplementada con penicilina G (100 U/mL), estreptomicina sulfato (100 μ g/mL) y anfotericina B (0,25 μ g/mL), donde se procedió a la limpieza del tejido graso y conectivo circundante. Posteriormente se eliminó la capa endotelial mediante raspado con un hilo de algodón estéril que se hizo pasar a través del lumen de la arteria. Todo el trabajo de extracción de las células se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal que garantiza la esterilidad del proceso.

A continuación se realizó una digestión ligera del tejido con colagenasa B (2 mg/mL) en la solución HBSS suplementada con antibiótico-antimicótico durante 6 minutos a 37 °C con agitación continua. Seguidamente, la arteria se depositó en una placa con solución HBSS y antibiótico-antimicótico para separar mecánicamente las capas media y adventicia mediante el empleo de pinzas quirúrgicas, con la ayuda de

una lente binocular. La túnica media obtenida fue cortada con un escalpelo en pequeños fragmentos, que fueron sometidos a una segunda digestión, a 37 °C durante 60-90 min, utilizando colagenasa B (2 mg/mL) y elastasa (3-3,5 U/mL).

Tras la digestión, las células fueron dispersadas mecánicamente con una pipeta Pasteur. La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de 60 µM y diluida con medio de cultivo completo: Medio Eagle modificado de Dulbecco y medio F12 de Ham (DMEM/F12 1:1), suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor húmedo a 56 °C durante 30 min (10%), ácido L-(+)-ascórbico (50 µM), L-prolina (10 µM), penicilina G (100 U/mL), estreptomycin sulfato (100 µg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL). A continuación se centrifugó la suspensión a 160 g durante 12 min. El pellet de células obtenido fue resuspendido en medio de cultivo completo. Se tomaron alícuotas de esta suspensión celular para realizar un recuento y un estudio de viabilidad en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), mediante la técnica de exclusión con azul de tripano.

Seguidamente, las células fueron sembradas en frascos de cultivo (*flasks*) de 25 cm² de superficie a una densidad aproximada de 20.000 células/cm² y se mantuvieron en cultivo a 37°C en un ambiente saturado de humedad y un 5% de CO₂ en un incubador. El medio de cultivo se renovó de forma rutinaria cada 2-3 días.

Una vez en confluencia (cuando la capa de células ocupa el 90-95% de la superficie del *flask*), los cultivos en monocapa fueron subcultivados sucesivamente (1-10 pases) en una superficie 3 veces mayor. Para ello las células fueron tratadas, tras aspirar el medio de cultivo, con una solución de tripsina-EDTA al 5% (v/v) durante 10 min a 37 °C. Tras comprobar la proteólisis de la matriz extracelular, la suspensión celular resultante fue diluida (1:1) en medio de cultivo, centrifugada a 160 g durante 12 min, y el *pellet* obtenido resuspendido en medio de cultivo suplementado y sembrado en nuevos *flasks* de 75 cm² de superficie.

Las células RASMC procedentes de los correspondientes subcultivos fueron congeladas regularmente con el fin de poder utilizarlas con posterioridad. Para ello se sembraron en *flasks* de 75 cm² (~3x10⁶ células/mL) y una vez confluentes fueron tripsinizadas y resuspendidas en 1 mL de medio de congelación. El medio empleado para este fin fue el mismo medio completo empleado en los cultivos al que se le

añadió dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Las suspensiones celulares se conservaron en diferentes criotubos en nitrógeno líquido (-195 °C).

La caracterización celular se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo monoclonal anti α -actina de músculo liso conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC: $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) para reconocer de forma específica a las células musculares lisas y 4',6-diamidínofenilindol (DAPI: $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$), un fluorocromo selectivo de ácidos nucleicos, para facilitar la visualización de los núcleos celulares. Las preparaciones fueron visualizadas utilizando un microscopio confocal en los Servicios Generales de la USC (RIADIT, Edificio CACTUS, Santiago de Compostela).

3.2 Cultivo de células A7r5

Además de las RASMC obtenidas por cultivo primario, para la realización de este trabajo también se emplearon células A7r5, una línea de miocitos vasculares procedentes de aorta embrionaria de rata, comercializadas por *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.; Ref: CRL-1444).

El medio de cultivo, así como las condiciones de crecimiento y de congelación fueron las mismas que las empleadas para los miocitos de cultivo primario.

4 Técnicas de fluorescencia

En este trabajo se empleó la microscopía de epifluorescencia (*imaging*) para medir los cambios producidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la $[\text{AMPc}]_i$ en miocitos aislados de aorta de rata (A7r5 y RASMC).

A continuación se detallan las bases teóricas de la técnica y los protocolos empleados en el presente trabajo.

4.1 Descripción del fenómeno de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno que consta de tres etapas: excitación, pérdida de energía y emisión. Durante la excitación la molécula absorbe un fotón

procedente de una fuente externa (una lámpara fluorescente o un láser, por ejemplo) y en consecuencia pasa de un estado fundamental a un nivel energético superior o estado excitado. A continuación, la molécula pasa al modo vibracional (menor energía que el estado excitado), disipándose energía en forma de calor (etapa de relajación y pérdida de energía). Posteriormente, la molécula tiende a pasar de nuevo al estado fundamental a través de un proceso mediante el cual emite energía en forma de luz (etapa de emisión). Durante este proceso se produce una pérdida de energía, ya que la longitud de onda del fotón emitido (λ_{em}) es siempre mayor que la longitud de onda del fotón absorbido (λ_{ex}) por la molécula. A esta diferencia en las longitudes de onda se la conoce como desplazamiento de Stokes. Por tanto, la diferencia en las energías o longitudes de onda proporciona sensibilidad a las técnicas de fluorescencia, pues permitirá la detección selectiva de la longitud de onda de emisión aislada de la longitud de onda de excitación.

Los fluoróforos o sondas fluorescentes, en general, son moléculas poliaromáticas o heterocíclicas, es decir, que poseen enlaces capaces de absorber y de emitir fotones. La mayoría de las moléculas objeto de estudio en biomedicina no son fluorescentes, por ello, será necesaria la unión, covalente o no, a un fluoróforo para que adquieran la propiedad de emitir luz.

4.2 Descripción del microscopio de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es similar a un microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz de excitación (proveniente de una lámpara halógena) es refinada mediante un monocromador antes de incidir sobre la muestra (figura 16). Además, en el camino óptico de un microscopio de fluorescencia hay un espejo dicróico que refleja la luz de excitación pero deja pasar la luz emitida. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un filtro de emisión que criba la longitud de onda de emisión (λ_{em}) óptima para el fluoróforo.

El equipo utilizado en este trabajo consta de una lámpara de xenón de 75 W (XBO 75W/2), acoplada a un monocromador (P130/MLE/400 Optoscan, Cairn Research Ltd; Faversham, Reino Unido) que permite seleccionar la longitud de onda de excitación (λ_{ex}). La luz generada es transmitida por un cable de fibra óptica a un

microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert 135, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) donde es reflejada por un espejo dicróico ($\geq 400 \text{ nm}$ ó $\geq 500 \text{ nm}$) hacia las muestras (células aisladas o grupos de 2-5 células dispersas) a través de un objetivo de fluorita (Plan-Neofluar, 63X/1,25 aceite, Carl Zeiss). La luz emitida por las muestras es enviada a través del espejo dicróico (aisla longitudes de onda) hacia el módulo de detección, que consta de un filtro de emisión de $510 \pm 20 \text{ nm}$ y de una cámara CCD (Rolera XR Monofast 1394 refrigerada; QImaging®, Surrey, Canada) capaz de digitalizar la información lumínica. Las imágenes obtenidas son registradas y almacenadas para su análisis posterior mediante el programa MetaFluor 7.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, EE. UU.).

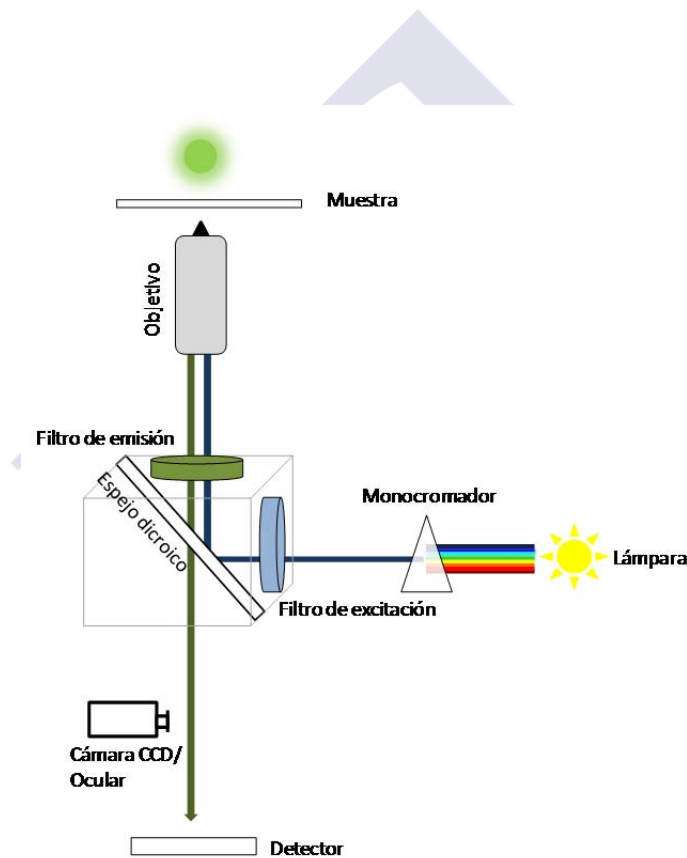


Figura 16. Esquema general de un microscopio de fluorescencia.

4.3 Medida de calcio mediante fura-2

Las medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula única se llevaron a cabo empleando la sonda fura-2. Este fluorocromo al unirse al Ca^{2+} muestra un desplazamiento en su espectro de absorción entre 300 y 400 nm cuando se monitoriza a 510 nm. De ese

modo, mediante una excitación dual ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ y 380 nm) se obtienen dos imágenes de emisión diferentes y con la relación entre ambas se puede calcular la concentración de Ca^{2+} en la región seleccionada (de ahí la denominación sonda ratiométrica).

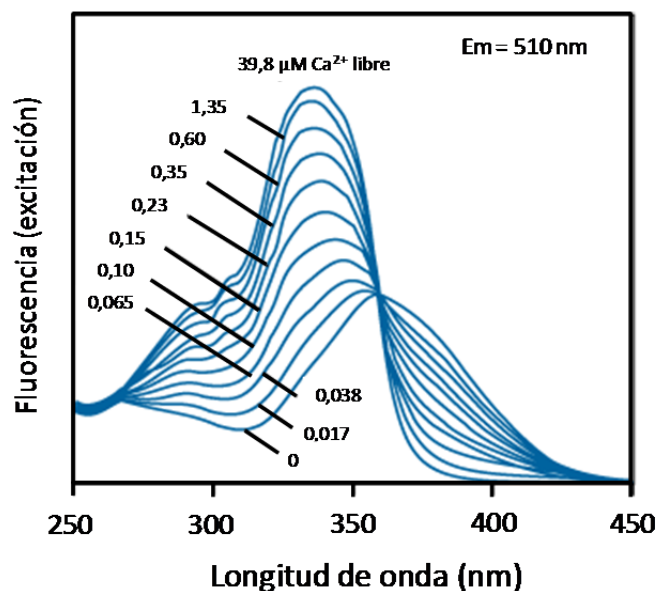


Figura 17. Espectro de excitación del fura-2 en medios con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (0 - $3,98$ μM). Fluorescent Ca^{2+} indicators excited with UV light—Section 19.2. Disponible en la Web: <<http://www.b2b.invitrogen.com>> [Consulta: 5-2-13].

Para estos experimentos las células A7r5 o RASMC fueron sembradas a baja densidad (~ 1500 células/ cm^2) en placas Petri de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio de 0,1 mm de grosor, que permite la transmisión de la luz de excitación y de emisión. Las células se mantuvieron en cultivo de 2 a 4 días antes de su utilización, y al menos 24 h antes de su utilización se sustituyó el medio de crecimiento por uno con baja concentración de FBS (1%).

Para la carga de las células con fura-2 se empleó fura-2 acetoximetiléster (fura-2 AM), que puede atravesar por difusión la membrana celular. Una vez en el interior, el fura-2 AM es transformado por acción de las esterasas intracelulares en fura-2, que no atraviesa la membrana, quedando de esta manera retenido en el citoplasma celular. La solución de carga se preparó el mismo día del experimento en solución externa normal (SN, composición en mM: NaCl 140; KCl 5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2;

MgCl₂ 2; HEPES 10; glucosa 11; pH 7,4) a partir de la correspondiente solución stock, de manera que la concentración final fuese 2,5 μM. Las células fueron incubadas con 1 mL de esta solución durante 60 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de la placa con SN para eliminar los restos de la sonda que no difundieron al interior celular.

Una vez en el microscopio las muestras fueron excitadas alternativamente a 340 ± 10 nm y 380 ± 10 nm durante un tiempo de exposición de 100 ms para cada λ . La luz fue reflejada empleando el espejo dicróico de 400 nm y la fluorescencia emitida fue filtrada con el filtro de 510 ± 20 nm. Con este protocolo se adquirieron dos o cuatro imágenes (en función de la intensidad de fluorescencia observada para cada experimento) de emisión de fluorescencia para cada λ_{ex} , con las que el programa informático realiza una media. Las imágenes así obtenidas son registradas cada 2 o 5 s y almacenadas para su posterior análisis.

En función del protocolo a seguir, en algunos experimentos se sustituyó la SN por una solución libre de Ca²⁺ (SOCa²⁺; composición en mM: NaCl 140; KCl 5; MgCl₂ 2; EGTA 10; HEPES 10; glucosa 11; pH 7,4). Los fármacos (o los vehículos para los correspondientes experimentos control) fueron añadidos en volúmenes de 1 a 10 μL a un volumen final de 2 mL de solución externa. Todos los experimentos se llevaron a cabo a t^a ambiente (~20 °C) para minimizar la compartimentación y la extrusión de la célula de la sonda.

Las soluciones SN y SOCa²⁺ fueron preparadas a partir de concentrados conservados a 4 °C. La glucosa fue añadida a la solución el mismo día del experimento y el pH fue ajustado a 7,4 con HCl 1M y/o NaOH 1M.

4.4 Estudios de FRET

4.4.1 Purificación de ADN plasmídico

Los constructos de ADN que codifican para proteínas sensibles al AMPc utilizados en este trabajo fueron diseñados por los Drs. Martin Lohse y Viacheslav O. Nikolaev, en el Instituto de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Würzburg (Alemania). Para ello se utilizó como molde ADN complementario de

Epac1 humano y Epac2 murino. Las variantes de GFP se amplificaron con *primers* estándares de pEYFP y pECFP y fueron clonadas en un vector pcDNA3 para la expresión transitoria en células de mamíferos (figura 18).

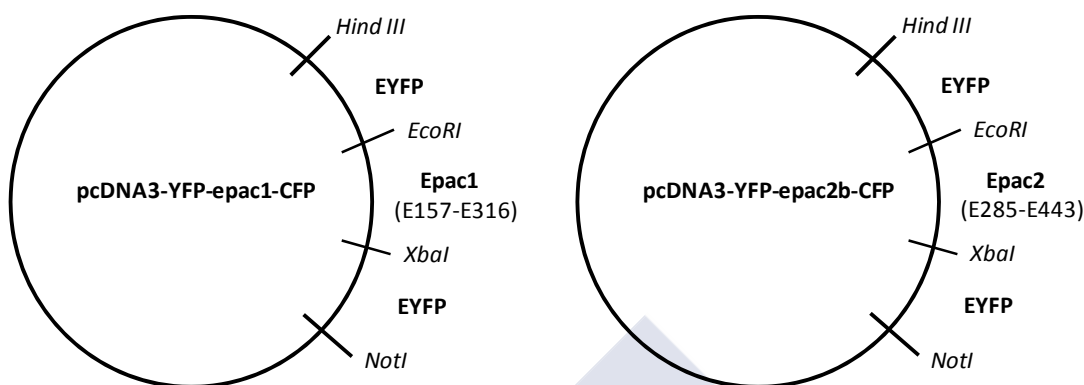


Figura 18. Mapa de restricción de los plásmidos Epac1-camps y Epac2-camps.

Los plásmidos se amplificaron mediante la transformación de bacterias competentes de *Escherichia coli* en el departamento de Microbiología e Parasitología de la USC, bajo la supervisión del profesor Manuel Veiga Aneiros.

Tras la amplificación se procedió a la extracción y purificación del ADN plasmídico empleando un sistema de columnas de intercambio iónico, el kit comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado mediante lectura de la absorbancia a 260 nm (ratio A_{260}/A_{280}).

4.4.2 Transfección de los miocitos vasculares con Epac-camps

La introducción del vector en los miocitos se realizó mediante dos técnicas, tal y como se detalla a continuación:

- Transfección por electroporación

La electroporación es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para transportar moléculas a través de las membranas celulares. En nuestro caso utilizamos la electroporación para la introducción de material genético externo en las células mediante un plásmido. Esto se realiza mediante un aumento de la

conductividad eléctrica y de la permeabilidad de la membrana plasmática causada por la aplicación de un campo eléctrico. Cuando el voltaje que atraviesa la membrana plasmática excede su rigidez dieléctrica se forman poros transitorios en las bicapas lipídicas, a través de los cuales momentáneamente pueden penetrar compuestos extracelulares. La fuerza del campo eléctrico aplicado, la duración de la exposición al mismo, el número de pulsos, la concentración de plásmido y la concentración celular en la suspensión celular son parámetros críticos que comprometen la viabilidad celular y la eficiencia de la transfección (Canatella *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2005).

Estos experimentos fueron realizados en el Instituto de Investigaciones e Análises Alimentarias de la USC, bajo la supervisión del profesor José Leiro Vidal. Mediante un electroporador (BioRad Gene Pulser II; Pulse Controller Plus; Capacitance Extender plus; BioRad Laboratories) se aplicó un campo electromagnético a la suspensión celular con el plásmido, contenida en una cubeta de plástico con electrodos en los costados.

Para estos experimentos se utilizaron células A7r5 postconfluentes. Dos días antes de la electroporación se disgregaron las células con solución de tripsina-EDTA de la misma manera descrita en el apartado 3.1, y posteriormente se realizó un recuento celular con azul de tripano. Se resuspendieron aproximadamente 1×10^6 células en 800 μL de DMEM/F12. Se eligió este volumen en base al tamaño de la hendidura de las cubetas de electroporación disponibles (0,4 cm de separación; Gene Pulser® Cuvette; Bio-Rad Laboratories). A la suspensión anterior se le añadieron 20 μL del plásmido Epac1-camps o Epac2-camps e inmediatamente se transfirió la mezcla a la cubeta de electroporación. Los parámetros empleados en un pulso fueron los siguientes: un voltaje de 450 V, máxima capacitancia y 725 Ω de resistencia.

El contenido de la cubeta fue resuspendido inmediatamente en DMEM/F12 suplementado con FBS al 10%, y fue sembrado en placas Petri de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio de 0,1 mm de grosor. Los experimentos de *imaging-FRET* se llevaron a cabo al menos 48 h post-transfección.

- Transfección por lipofección

La lipofección es una técnica empleada para la introducción de material genético en la célula mediante el empleo de liposomas, que son vesículas que pueden atravesar fácilmente la membrana celular. Las principales ventajas de esta técnica son su alta eficiencia, su capacidad para transfectar todo tipo de ácidos nucleicos en un amplio rango de tipos celulares, su facilidad de uso, su reproducibilidad y su baja toxicidad.

En la lipofección normalmente se emplea un lípido cargado positivamente para formar un agregado con la carga negativa del material genético. La lipofectamina (Lipofectamine™ 2000) es un reactivo de transfección que permite transfectar ADN plasmídico (ADNp) en cultivos celulares *in vitro* mediante lipofección. Este reactivo contiene subunidades lipídicas que pueden formar liposomas con los plásmidos en un ambiente acuoso. Los liposomas que contienen el ADN se pueden fusionar con la membrana plasmática de las células, lo que facilita el acceso del ácido nucleico al citoplasma.

En nuestros experimentos, los miocitos fueron transfectados siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para células adherentes. El día previo a la transfección se sembraron 1×10^5 células por pocillo en placa de 24 en 500 μL de medio de cultivo celular sin antibióticos.

Para cada pocillo se preparó la siguiente mezcla de transfección:

- a) 0,8 μg de ADNp diluidos en 50 μL de Opti-MEM® (ratio ADN/lipofectamina 0,8:2).
- b) 2 μL de lipofectamine™ 2000 diluidos en 50 μL de Opti-MEM®. Se incubaron durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se añadió la mezcla a la solución preparada en el apartado a y se incubó durante 20 min.

Cada pocillo fue incubado con 100 μL de la mezcla anterior entre 18 y 48 horas a 37 °C antes de comprobar la expresión génica. El medio fue renovado cada 4-6 h con medio de cultivo completo para la recuperación de las células.

4.5 Determinación de AMPc en célula viva

El FRET (transmisión de energía de resonancia, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*) es un mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos, descrita por Theodor Förster en 1914. Se basa en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano (menos de 10 nm), generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula (apartado 6 Revisión Bibliográfica).

Para estos experimentos se utilizaron células transfectadas con el plásmido Epac1-camps o Epac2-camps según corresponda, sembradas en placas Petri de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio de 0,1 mm de grosor, que permite la transmisión de la luz de excitación y de emisión. Las células A7r5 se mantuvieron en DMEM/F12 suplementado con FBS al 10% 48 h post-transfección.

La microscopía de fluorescencia en células aisladas se llevó a cabo en el mismo equipo que los experimentos de detección de Ca^{2+} con fura-2. Las muestras fueron excitadas a 436 nm mediante un filtro (436 ± 10 nm) durante 100 ms a una frecuencia de 1 Hz. La luz fue reflejada mediante un espejo dicróico (455 nm) y la emisión se registró a 535 nm ($F_{\text{YFP}}: 535 \pm 30$ nm) y a 480 ($F_{\text{CFP}}: 480 \pm 40$ nm). La fluorescencia de fondo de F_{YFP} y F_{CFP} fue sustraída.

Se tuvo especial cuidado para asegurarse de que la distribución de la sonda y los niveles de fluorescencia fuese similar en todas las células examinadas. El ratio de FRET se calculó como el cociente de YFP corregido sobre la emisión CFP ($F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}}$).

5 Cuantificación y determinación de proteínas

5.1 Cuantificación de proteína en las muestras

Para los experimentos de expresión proteica, se cultivaron las células A7r5 y RASMC hasta su confluencia, y se trataron durante 24 h con los correspondientes fármacos o el vehículo control. Transcurrido ese tiempo se procedió a la obtención de los lisados celulares en una solución Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} junto con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini Protease inhibitor tablet, Roche). Con el fin de favorecer la lisis celular y la degradación del ADN se homogeneizaron las células con la ayuda de una jeringa.

La cantidad de proteína total presente en los lisados celulares se determinó mediante el sistema Protein Assay (Bio Rad; Ref: 500-0006), basado en el método de Bradford (Bradford, 1976). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en el cambio de absorbancia que experimenta el colorante azul de Coomassie, el cual en un medio ácido cambia del color rojo al azul tras su unión a proteínas. Esta unión se puede cuantificar mediante una lectura de la absorbancia a 595 nm en un lector multifuncional de placas (Fluostar Optima™, BMG Labtech, GmbH Offenburg, Alemania). Para cuantificar la proteína se realizó una curva patrón con diferentes cantidades de seroalbúmina bovina deslipidizada (BSA) diluída en el tampón en el que se disuelve la muestra. La concentración de proteína se calculó por interpolación en la curva patrón obtenida con BSA.

5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La expresión de las proteínas objeto de estudio se determinó mediante separación electroforética en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) al 10%, y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa empleando procedimientos estandarizados de *western blot*, tal y como se detalla a continuación.

Las proteínas de las muestras fueron reducidas y desnaturalizadas por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Los lisados celulares se diluyeron en tampón de carga, cuya composición fue la siguiente: SDS 2,4%; solución de Laemmli (azul de bromofenol 0,001%; glicerol 10%; tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8) 23% y β -mercaptoetanol 0,05%.

La composición de los geles de poliacrilamida fue la siguiente: poliacrilamida (acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%) en tris-HCl 0,37 M 10%; SDS 0,1%; persulfato amónico (PSA) 0,25%; TEMED 0,06%; pH 8,8 para el gel de desarrollo. Se dejó polimerizar durante 1 h aproximadamente antes de añadir el gel concentrador (composición: poliacrilamida en tris-HCl 0,125 M 4%; SDS 0,1%; PSA 0,1% y TEMED 0,001%; pH 6,8).

Para el montaje se emplearon dos placas de vidrio con dos separadores sobre un soporte formador de geles (Multiple Gel Caster, Hoefer®, San Francisco, EE. UU.). Para la electroforesis se utilizó el sistema Mighty Small II for 8x9 cm gels (Ref: SE260-10A-75. Hoefer® San Francisco, EE. UU.) siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las electroforesis fueron realizadas a 120 V durante 1 hora y media, en tampón de electrodos (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,3).

Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas estudiadas se utilizó el reactivo Page Ruler™ Plus prestained protein ladder (referencia #SM1811, Fermentas/Thermo Fisher Scientific), que abarca un amplio rango de pesos moleculares (10-250 kDa).

5.3 Electrotransferencia y *Western blot*

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas mediante un sistema comercial denominado iBlot™ Dry Blotting System que consiste en una unidad eléctrica de transferencia (iBlot™ Gel Transfer Device. Ref: IB1001EU. Invitrogen Corporation. Carlsbad, California, USA) que permite una transferencia rápida (7 minutos) y en seco de las proteínas. Para ello dispusimos de un kit comercial desechable (iBlot™ Gel Transfer Stacks nitrocellulose, regular. Invitrogen Ref: IB3010-01), que posee una membrana de nitrocelulosa integrada, un electrodo de cobre y el ánodo y cátodo apropiados, en una matriz de gel que permite la transferencia de proteínas.

Una vez finalizada la transferencia se bloquearon los sitios activos remanentes de las membranas con tampón TBS (composición en mM: Tris-HCl 50; NaCl 150 pH 7,4) con 0,2% de tween-20 y 3% de BSA, durante 30 min a tª ambiente.

La adición del anticuerpo primario (PKA-R11α policlonal de conejo o Epac monoclonal de ratón, proporcionados por Santa Cruz Biotechnology) fue hecha en solución de bloqueo a la dilución recomendada por el proveedor del anticuerpo (1:200 y 1:100 respectivamente), y las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 min de las membranas con tampón TBS con 0,2% de tween-20.

A continuación se realizó una segunda incubación con un anticuerpo secundario correspondiente al primario (policlonal anti-conejo o monoclonal anti-rátón, diluciones 1:1000 y 1:750 respectivamente) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h en agitación en tampón TBS con 0,2% de tween-20. Este doble marcaje permite amplificar enormemente la señal. Transcurrido este tiempo se procedió al lavado de las membranas con tampón TBS conteniendo 0,2% de tween-20 y 3% de BSA (3 lavados de 5 min).

El revelado de las membranas se efectuó con una cámara CCD de captura de luminiscencia (Fluo-Chem FC2 Multimage II; Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE. UU.) y mediante el empleo de un sustrato quimioluminiscente (ECL) para la peroxidasa de rábano (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate. Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.), que permite la detección de cantidades de proteínas en el rango de picogramos. Las imágenes obtenidas se guardaron en formato TIF y la expresión de las proteínas se cuantificó por densitometría mediante un programa informático (Fluo-Chem FC2 Tool; Alpha Innotech).

6 Amplificación por retrotranscripción-PCR

6.1 Extracción del ARN

Para los experimentos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las células fueron tratadas con el fármaco correspondiente o con diluciones adecuadas del vehículo (DMSO) en el caso de los controles, durante 24 h. A continuación se aisló el ARN total de los cultivos celulares empleando un sistema de columnas de intercambio iónico (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel GmbH and Co KG, Alemania). Este proceso de aislamiento consta de varias etapas. En primer lugar, se realizó la separación de los ácidos nucleicos en fase alcohólica. Luego la retención de los ácidos nucleicos en una columna de intercambio iónico. A continuación se realizó una digestión enzimática del ADN y posterior lavado de la columna con disolventes compatibles para eliminar el ADN. Por último se eluyó el ADN en condiciones de baja fuerza iónica con agua libre de RNasas y se midió la concentración por espectrofotometría (relación 260/280). El ARN total aislado se distribuyó en alícuotas de 1,75 µg que se conservaron a -80 °C.

6.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de la retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) fue empleada en el presente trabajo para caracterizar la presencia de ARN codificante para PKA-R1I α , Epac 1, Epac 2 y β -actina en células musculares lisas (A7r5 y RASMC). Estas proteínas son parte de la maquinaria enzimática y estructural de las células vasculares, por lo que debe existir una coherencia entre los niveles de ARN codificante para dichas proteínas y sus niveles de expresión. Todos los experimentos de RT-PCR para estudiar la expresión de estas proteínas fueron realizados en el laboratorio del prof. José Leiro Vidal, en el Instituto de Investigación e Análises Alimentarias de la USC.

Mediante las herramientas informáticas *Clustal W2* y *Primers* (www.yeastgenome.org) se diseñaron cebadores (*primers*) específicos para secuencias de aproximadamente 20 nucleótidos comunes a un mismo gen de dos especies diferentes (en nuestro caso *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*).

En la tabla 3 se indican las secuencias de los cebadores empleados en la PCR, así como los tamaños de los correspondientes fragmentos amplificados y su Tm (temperatura a la cual la doble hélice del ADN se disocia en dos hebras sencillas).

Tabla 3. Secuencia de cebadores empleados en PCR. S: *primer* sentido; A: *primer* antisentido.

Gen	Secuencia del <i>primer</i>	Tm (° C)	Tamaño (pb)
PKA-R1I α	S: 5'-TTGACCAAGGAGATGATGGA -3'	60	596
	A: 5'- TCTTCATGATGTCCATGCAGG-3'		
Epac1	S: 5'- ATCGGCAGTGCTGCTCTG-3'	60	392
	A: 5'-TCTTTGAACCACACAGCAAGG-3'		
Epac2	S: 5'-TATGGTGTTATGGAAACGGG-3'	60	649
	A: 5'- ACCTTCTTCCCCCTGGTTAAA-3'		
β -actina	S: 5'- TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	58	360
	A: 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'		

La composición de la mezcla de reacción para la RT (25 μ L de volumen final a pH 8,4) fue la siguiente: ARN total 1,75 μ g; iniciadores aleatorios (hexámeros de ADN) 0,5 μ g; retrotranscriptasa recombinante M-MLV-RT 1000 U; desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) 10 mM; tampón 5X de retrotranscripción 5 μ L e inhibidores de RNasa 40 U/ μ L. La RT se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler Personal; Eppendorf, Hamburgo, Alemania) empleando procedimientos estandarizados (1h a 37 $^{\circ}$ C). La composición de la mezcla de PCR (25 μ L; pH 8,4) fue: tampón de reacción ($MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM); dNTP 0,16 mM de cada uno; 0,4 μ M de cada iniciador; 1 U de Taq ADN polimerasa (Roche[®]) 1U y 1 μ L del producto obtenido en la RT.

La PCR fue llevada a cabo en un termociclador automático con las siguientes condiciones: una fase de inicio de 5 minutos a 94 $^{\circ}$ C, después 35 ciclos de 30 s a 94 $^{\circ}$ C, 45 segundos a la t^a de alineamiento ($T_m - 5$ $^{\circ}$ C) y 90 segundos a 72 $^{\circ}$ C, a continuación una fase de extensión de 7 min a 72 $^{\circ}$ C y finalmente la temperatura fue fijada a 4 $^{\circ}$ C hasta la recogida de los productos de la PCR.

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparado en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) (composición en mM: Tris-base 45 mM; H_3BO_3 45 mM; EDTA 1 mM; pH 8) teñido con bromuro de etidio (0,05 μ L/mL). Las bandas fueron visualizadas con un sistema de adquisición de imágenes dotado con una lámpara ultravioleta (Fluo-Chem FC2 Multimage II; Alpha Innotech). La intensidad de las bandas se midió por densitometría con el programa Fluo-Chem FC2 Tool (Alpha Innotech).

7 Estudios de *patch-clamp*

La técnica de *patch-clamp* es una de las técnicas electrofisiológicas disponibles más potentes, puesto que permite aislar y medir corrientes eléctricas específicas (configuración de *voltage-clamp*) de células aisladas, así como potenciales de acción (configuración de *current clamp*). Se fundamenta en la capacidad conductora de las células cuando hay variaciones en el potencial de membrana. Este modelo experimental fue diseñado en 1978 por los investigadores

Neher y Sakmann, y modificado posteriormente por Hamill y colaboradores (Neher *et al.*, 1978; Hamill *et al.*, 1981) para estudiar canales iónicos. Por este motivo fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1991. La técnica consiste en la formación de un sello de alta resistencia (*giga seal*) entre la célula y una micropipeta que contiene una solución electrolítica. A su vez, la micropipeta está conectada a un amperímetro, lo que permite el control del voltaje o el control de la corriente en la porción de membrana sellada. Así se pueden determinar las corrientes iónicas puesto que, además del voltaje, también se conoce la resistencia que opone la pipeta al paso de la corriente.

Todos los experimentos de electrofisiología fueron realizados en el Centro de Investigação em Ciências da Saúde (Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal) bajo la supervisión de los profesores Ignacio Verde y Elisa Cairrão.

7.1 Equipo utilizado

El equipo de *voltage-clamp* consta de un amplificador modelo Axopatch 200B (Axon Instruments, EE. UU.) controlado por un ordenador. El amplificador está conectado, a su vez, a un osciloscopio. Las corrientes de membrana se registraron con la ayuda del programa Pclamp8 (Axon Instruments, EE. UU.). Las corrientes se midieron a una frecuencia de 10 kHz y filtradas a 0,1 kHz utilizando el convertidor analógico-digital Digidata 1322A (Axon Instruments, EE. UU.) (figura 19).

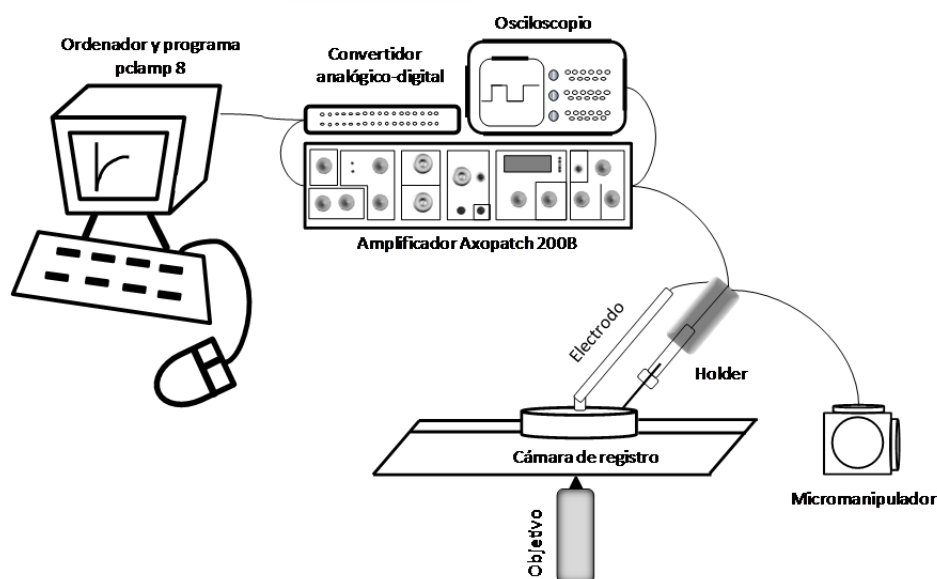


Figura 19. Esquema básico de un equipo de *patch-clamp*.

Las pipetas de patch-clamp se fabricaron a partir de capilares de vidrio borosilicatado (Harvard Apparatus, Edenbridge, Reino Unido) de 1,5 mm de diámetro externo y 1,17 mm de diámetro interno, con un estirapipetas programable (Narishige PC-10). La resistencia de la punta, una vez llena la pipeta de solución interna, fue de 2-4 M Ω .

7.2 Configuraciones de *patch-clamp*

En la presente tesis doctoral la técnica electrofisiológica utilizada fue la de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) en la configuración de célula entera (*whole-cell*) o en la configuración de parche perforado (*perforated-patch*) para medir la corriente de Ca²⁺ tipo L ($I_{Ca,L}$) y la corriente de K⁺ (I_K) en células A7r5. Ambas configuraciones coinciden en los primeros pasos de ejecución, teniendo cada una de ellas pasos diferenciales concretos (figura 20).

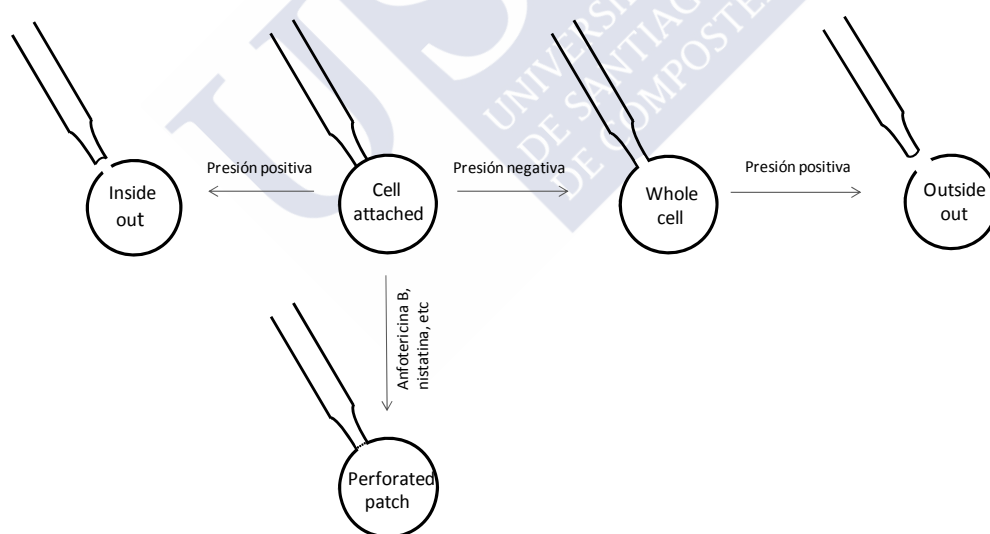


Figura 20. Configuraciones de *patch-clamp*.

7.2.1 Protocolo experimental para la obtención de la configuración de célula entera

Una vez que el cultivo ha alcanzado un 80-90% de confluencia, se procedió a la tripsinización de las células A7r5 mediante procedimientos estandarizados, y se

esperó un tiempo aproximado de una hora (período de estabilización de las células) antes de proceder al registro de las corrientes de membrana. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21-25 °C) y la temperatura no varió más de 1 °C en cada experimento.

Se depositó una alícuota de la suspensión celular con solución externa en una placa Petri de 35 mm, situada en la pletina de un microscopio invertido (Leica DMIL). Una vez que las células se adhirieron a la base de la placa, se eligió una célula con la morfología adecuada. Por otro lado, se introdujo en la placa un electrodo de plata conectado a su vez con el resto del equipo. Posteriormente, se introdujo la pipeta (rellenada con solución interna), con una ligera presión positiva, en el líquido de perfusión (solución externa) y la diferencia de potencial existente entre el exterior y el interior de la pipeta se ajustó a cero de manera manual. Con la ayuda de un micromanipulador se acercó la punta de la pipeta a la superficie de la célula.

Una vez que la pipeta está próxima a la célula se aspiró levemente para conseguir la adhesión entre la pipeta y la membrana de la célula, y de esta manera la formación de un sello de alta resistencia o *giga seal* (resistencia 10 a 100 GΩ). Así obtenemos la configuración de *on-cell patch* o *cell attached*, la cual sólo permite el estudio de las corrientes en la porción del parche de la membrana delimitada por los bordes de la pipeta.

Una vez alcanzada la configuración de *cell-attached* se aplicó presión negativa para producir la rotura del sello y así obtener la configuración de *whole-cell* o célula entera. En esta configuración el interior de la pipeta entra en contacto directo con el citoplasma, permitiendo así estudiar la corriente que pasa a través de todos los canales de la membrana celular. La $I_{Ca,L}$ basal fue medida 3-5 min después de la ruptura del sello para permitir el equilibrio entre la solución de la pipeta y el líquido intracelular, así como la estabilización de las corrientes. Las corrientes no fueron compensadas por la capacitancia y fugas. Las células se mantuvieron a un potencial de -80 mV y despolarizadas rutinariamente a 0 mV cada 8 s durante 500 ms.

7.2.2 Protocolo experimental para la obtención de la configuración de parche perforado

En este caso el sello de alta resistencia se consigue sin aplicar presión positiva a la pipeta. Una vez conseguido el sello, no se lleva a cabo la ruptura, puesto que la pipeta contiene en su interior anfotericina B (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), capaz de abrir pequeños poros en la porción de la membrana donde se formó el sello, que permitirán el acceso eléctrico. Estos poros, selectivos para cationes monovalentes, hacen más difícil la pérdida de componentes citoplasmáticos fundamentales para la activación de las corrientes.

Una vez conseguida la configuración de *cell attached* se esperó un período de tiempo de entre 10 y 35 min para conseguir la misma conexión eléctrica entre la célula y la pipeta que la obtenida en el caso de la configuración de *whole-cell*. El registro electrofisiológico se llevó a cabo 35-40 minutos después de haber conseguido el sello de alta resistencia.

7.3 Soluciones

Las soluciones utilizadas para el registro electrofisiológico de corrientes han de ser similares en su composición iónica, tanto al medio citosólico como al medio externo que rodea a la célula. Así, durante el experimento la solución interna se introduce en el interior de la micropipeta, y la solución externa baña la superficie celular.

7.3.1 Soluciones externas

La composición de la solución externa utilizada para el registro de la $I_{\text{Ca,L}}$ fue la siguiente (mM): NaCl 124; HEPES 5; tetraetilamonio (TEA) 10; glucosa 6; CaCl_2 5; KCl 4,7; pH 7,4 (ajustado con NaOH).

La composición de la solución externa utilizada para el registro de la I_{K} en la configuración de parche perforado fue la siguiente (mM): NaCl 134,3; HEPES 5; KCl 5,4; glucosa 6; CaCl_2 1; pH 7,4.

Las células se perfundieron con las diluciones apropiadas de los fármacos en solución externa, mediante un tubo capilar de 250 μM de diámetro interno, cuya apertura se situó en la proximidad de la célula a un flujo constante de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

7.3.2 Soluciones internas

La composición de la solución interna para el registro de I_{CaL} en la configuración de célula entera fue la siguiente (mM): HEPES 10; EGTA 5; CsCl 119,8; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4; TEA 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,062; NaATP 3,1; NaGTP 0,42; pH 7,3 (ajustado con CsOH).

La composición de la solución interna para el registro de la I_{K} en la configuración de parche perforado fue la siguiente (mM): HEPES 10; EGTA 0,1; CaCl_2 0,062; NaATP 3,1; NaGTP 0,42; MgCl_2 4; KCl 126,5; Glucosa 10; pH 7,3 (ajustado con CsOH). Para la configuración de parche perforado se le añadió a la solución de la pipeta anfotericina B (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

8 Enzimoimmunoensayo

La medida del contenido intracelular de AMPc se evaluó mediante un kit comercial de enzimoimmunoensayo específico para AMPc (Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay system). Consiste en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent-assay*), basado en una competición entre el AMPc no marcado y una cantidad fija de AMPc marcado con peroxidasa por un número limitado de sitios de unión a un anticuerpo específico para el AMPc (figura 21).

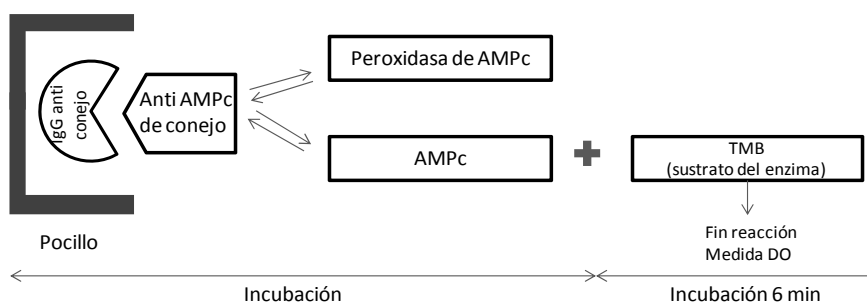


Figura 21. Principio del enzimoimmunoensayo.

Para estos experimentos se utilizaron células RASMC entre los pases 7 y 11 sembradas el día anterior al experimento a una densidad de 50.000 células/pocillo (siguiendo el procedimiento de recuento descrito en el apartado 3.1) en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, y se mantuvieron durante toda la noche en un incubador a 37 °C saturado de humedad y con un 5% de CO₂.

El día del experimento las células fueron incubadas durante 20 min en presencia de los fármacos objeto de estudio. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. A continuación se procedió a la lisis celular según las recomendaciones del fabricante del kit para células adherentes.

La placa suministrada con el kit contiene un anticuerpo específico policlonal para AMPc, inmovilizado en el fondo del pocillo, sobre el cual se añadieron soluciones estándares con concentraciones conocidas de AMPc y las muestras objeto de estudio (procedentes de las células lisadas con anterioridad). Tras este paso se incubó la placa con un antisuero (anticuerpo anti-AMPc de conejo). Transcurrido el periodo de incubación y posterior lavado para eliminar uniones inespecíficas se añadió un anticuerpo policlonal específico para AMPc conjugado con peroxidasa. A continuación, se efectuó un lavado para eliminar cualquier unión enzima-anticuerpo, se añadió una solución de sustrato del enzima a los pocillos y se incubó durante 30 minutos en oscuridad para que se desarrollase coloración proporcional a la concentración de AMPc unido en el paso inicial. Finalmente, se añadió H₂SO₄ 1M para detener la reacción de coloración y se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector multifuncional de placas (Fluostar Optima™, BMG Labtech, GmBh Offenburg, Alemania).

9 Fármacos y reactivos

Los fármacos y reactivos empleados en los experimentos fueron: acetilcolina (ACH), ácido L-(+)-ascórbico, ácido flufenámico (FFA), anfotericina B, antibiótico-antimicótico (composición por mL: 10000 U de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg de anfotericina B), apamina (APA), azul de tripano (solución al 0,4%), anticuerpo anti- α -actina de músculo liso conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), β -mercaptoetanol, caribdotoxina (CHTX), colagenasa, dimetilsulfóxido (DMSO), EGTA, elastasa pancreática porcina, fenilefrina (PHE), forskolina (FSK), glibenclamida (GLIB), KT5720, *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS), HEPES, L-prolina, milrinona, nifedipina (NIF), *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , rolipram (ROL), sal cálcica de ionomicina (ION), sal sódica de N^6 , 2'-O-dibutiril 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (db-cAMP), sal sódica de 8-(4-clorofeniltio)-3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (pCPT-cAMP), sal sódica de tetraetilamonio (TEA), sal trietilamónica de Rp-3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (Rp-cAMPs), SB 203580, seroalbúmina bovina deslipidizada, SKF-96365, tapsigargina (TP), TMB-8 (hidrocloruro de 8-(dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato), tritónX-100, tween-20, arginina-vasopresina (AVP), hidrocloruro de verapamilo (VRP), 4'-6-diamidinofenilindol (DAPI), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y 8-(4-clorofeniltio)-3',5'-monofosfato cíclico de 2'-O-metiladenosina monosódico hidratado (pCPT-2'-O-Me-cAMP), todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich.

El marcador de pesos moleculares de proteína para SDS-PAGE (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*) es de Fermentas (Ontario, Canadá).

DMEM/F-12, suero fetal bovino (FBS), tripsina-EDTA al 5%, Lipofectamine™ 2000; Opti-MEM® I Reduced Medium Serum, fura-2 AM y fluo-4 AM proceden de Invitrogen (Paisley, Reino Unido).

N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), persulfato amónico (PSA) y dodecilsulfato sódico (SDS) fueron suministrados por Merck.

La acrilamida, N,N'-bis-metilenacrilamida y el reactivo de Bradford fueron suministrados por Bio-Rad Laboratories.

La enzima retrotranscriptasa de ratón (M-MLV-RT), los iniciadores aleatorios y los inhibidores de RNasa (RNasin® Plus) utilizados en la retrotranscripción proceden de Promega (Madison, Wi, EE. UU.).

La seroalbúmina bovina fracción V (BSA), el cóctel de inhibidores de proteasas CompleteMini® protease inhibitor tablet, el marcador de peso molecular de ADN (DNA molecular weight XIV) y la enzima Taq polimerasa fueron suministrados por Roche (Manheim, Alemania).

El anticuerpo monoclonal anti-Epac y el anticuerpo policlonal anti-PKA-R11α proceden de Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, EE. UU.).

El sustrato quimioluminiscente para el revelado de las membranas de *western blot*, SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, es de Thermo Scientific (Rockford, IL, EE. UU.).

Las diluciones apropiadas de los fármacos anteriores se prepararon cada día inmediatamente antes de su uso en la solución fisiológica correspondiente a partir de las siguientes soluciones stock concentradas y almacenadas a -20 °C: apamina (500 µM), caribdotoxina (100 µM), db-cAMP (100 mM), fenilefrina (1 mM), pCPT-cAMP (10 mM), 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (10 mM), Rp-cAMPs (10 mM), SKF-96365 (10 mM), TMB-8 (10 mM), vasopresina (1 mM) y verapamilo (1 mM) en agua desionizada. Ácido flufenámico (100 mM), forskolina (10 mM), glibenclamida (10 mM), IBMX (100 mM), ionomicina (1 mM), KT5720 (1 mM), milrinona (5 mM), nifedipina (10 mM), rolipram (100 mM), SB-203580 (10 mM) y tapsigargina (1 mM) en DMSO. La concentración final de DMSO no excedió en ningún caso del 0,01% (v/v). En los experimentos de electrofisiología, las soluciones stock de forskolina (10 mM) e IBMX (100 mM) se prepararon en etanol absoluto. La concentración final de etanol no excedió del 0,01%.

Debido a la fotosensibilidad de las sondas fluorescentes (fura-2 y Epac-camps) y de algunos fármacos (KT5720, nifedipina y anfotericina-B), todos los experimentos en los que se emplearon estos compuestos fueron realizados en la oscuridad.

El resto de los compuestos químicos, incluyendo las sales utilizadas en la preparación de las diferentes soluciones fisiológicas, fueron de grado analítico.

10 Expresión y análisis estadístico de los resultados

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa Origin™ 7.0 (Microcal Software, Inc. Northampton, MA, EE. UU.).

Excepto donde se especifique de otro modo, los resultados mostrados en el texto y en las figuras se expresaron como el valor medio \pm el error estándar de la media (e.e.m.). Las diferencias significativas entre dos medias ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) fueron determinadas utilizando el test t de Student de dos colas para datos apareados o no apareados, o el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del test *post hoc* de Bonferroni's, según procediese.

En los experimentos llevados a cabo en anillos de aorta precontraídos, las respuestas de relajación se expresan como el porcentaje de la contracción máxima ($E_{\max} = 100\%$) producida por la fenilefrina. Para la forskolina se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), concentración a la cual se produce el 50% de relajación de la contracción inducida por el agente vasoconstrictor.

En los experimentos de fluorescencia en célula única, la intensidad de fluorescencia emitida por las células individuales se calculó a partir del número de píxeles incluidos en regiones delimitadas manualmente (ROI, *regions of interest*) mediante el programa Metafluor 7.1. La compensación de la fluorescencia de fondo se realizó por la substracción de la iluminación medida en un área de la imagen sin células. Los valores de fluorescencia del fura-2 se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia, y el valor basal fue normalizado a cero para cada experimento. Los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ se muestran en términos de incremento del ratio de fluorescencia ($\Delta F_{340/380 \text{ nm}}$).

Para el cálculo de los resultados en los experimentos de señalización cálcica se utilizaron únicamente los datos obtenidos a partir de células que respondían con una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al ionóforo ionomicina ($1 \mu\text{M}$) al final de los experimentos.

En los experimentos de FRET, los cambios en la $[AMPC]_i$ se estimaron como cambios en la intensidad de FRET (intensidad de la emisión de fluorescencia emitida

por YFP a 535 nm sobre la emisión de CFP a 480 nm). Los cambios en el ratio de FRET se expresaron como variaciones normalizadas en el ratio YFP/CFP.

En los experimentos de *western blot*, la cuantificación de las bandas antigénicas se realizó por densitometría con el programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., CA, EE. UU.). Los valores fueron normalizados con respecto a la banda control. El peso molecular fue calculado de acuerdo con los estándares de peso molecular que se corrieron junto con las muestras para cada membrana.

En los ensayos de PCR, se utilizó el valor de la intensidad de las bandas de β -actina ($I_{\beta\text{-actina}}$) medido por densitometría correspondientes a una misma muestra para normalizar los valores de las intensidades de las bandas, teniendo en cuenta que la expresión de β -actina no se ve modificada por los tratamientos llevados a cabo en este trabajo. El ratio $I_{\text{PKA-RII}\alpha}/I_{\beta\text{-actina}}$ es, por tanto, una magnitud normalizada y permite comparar los niveles de expresión de PKA-RII α de muestras diferentes para un mismo cultivo celular. Los resultados obtenidos mediante la RT-PCR se expresaron como la media \pm e.e.m. de al menos 3 experimentos independientes.

En los experimentos de ensayo inmunoquímico, el cálculo de la concentración de AMPc se hizo a partir de la curva patrón construida con las cantidades conocidas de estándares de AMPc (de 12,5 a 1600 fmol de AMPc por pocillo), y se expresaron como concentración de AMPc en fmol/pocillo.

En los experimentos de electrofisiología, las amplitudes de las $I_{\text{Ca,L}}$ fueron automáticamente calculadas entre el pico máximo de corriente y el plato estable al final de cada pulso cada 8 segundos. Las variaciones de la $I_{\text{Ca,L}}$ inducidas por los tratamientos se expresan como % de la $I_{\text{Ca,L}}$ basal. Las variaciones de la I_{K} se expresan como % de la I_{K} basal obtenida por despolarización en ausencia de tratamiento.



Resultados



1 Efectos de los incrementos de AMPc sobre la contractilidad vascular

1.1 Efectos de la forskolina, dibutilil AMPc y rolipram sobre la contracción con fenilefrina

Los anillos aislados de aorta de rata desprovistos de endotelio no manifestaron actividad contráctil espontánea. La adición de fenilefrina (1 μM) en un medio con 1,5 mM de Ca^{2+} produjo una contracción sostenida de dichos anillos. La tensión máxima alcanzada fue de $1,99 \pm 0,04$ g ($n = 239$). Este efecto contráctil se mantuvo sin cambios significativos de tensión en los anillos control durante al menos 90 min. En los controles, diluciones equivalentes del vehículo (DMSO) empleado en los experimentos no provocaron efectos significativos en las contracciones inducidas por la fenilefrina.

La adición acumulativa de forskolina (10 nM-10 μM) relajó las contracciones inducidas por fenilefrina (1 μM) en anillos de aorta de rata sin endotelio con una $CI_{50} = 87,9$ nM ($n = 12$) (figura 22). En base a este resultado, se eligió la concentración de 0,1 μM de forskolina para los sucesivos experimentos. Con esta concentración la relajación de los anillos fue de $44,0 \pm 2,9\%$, $n = 19$; $p < 0,01$ respecto al vehículo.

El db-cAMP (50 μM) también relajó la contracción inducida por la fenilefrina (1 μM) un $49,9 \pm 2,7\%$ ($n = 21$; $p < 0,01$ respecto al vehículo; figura 23).

La administración de rolipram (100 μM) no provocó un descenso significativo de la contracción inducida por 1 μM fenilefrina (porcentaje de relajación: $4,1 \pm 0,8\%$, $n = 22$; $p > 0,05$). En presencia de rolipram (100 μM), la relajación inducida por la forskolina (0,1 μM) o el db-cAMP (50 μM) fue potenciada de modo significativo ($58,3 \pm 4,3\%$, $n = 6$; $72,6 \pm 6,2\%$, $n = 6$, respectivamente; $p < 0,05$ y $p < 0,01$ con respecto a los resultados obtenidos en ausencia de rolipram) (figura 23).

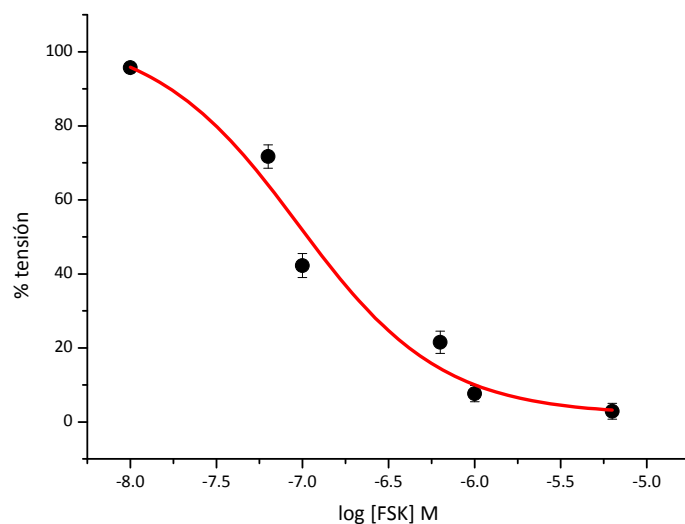


Figura 22. Curva acumulativa concentración-relajación de la forskolina en anillos de aorta de rata sin endotelio precontraídos con fenilefrina (1 μ M). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 12 experimentos.

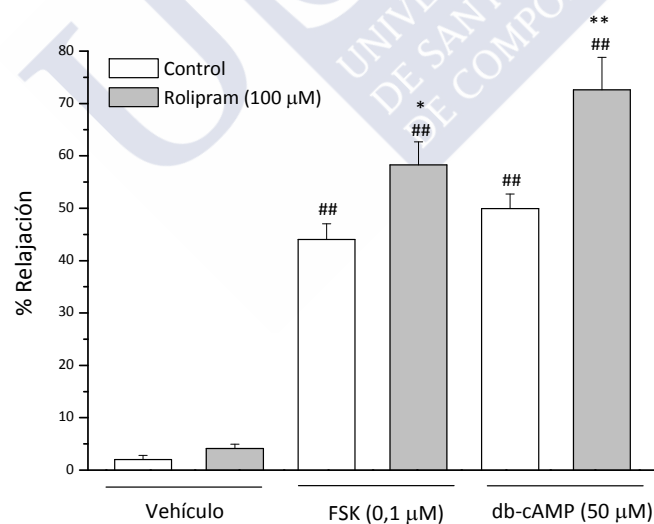


Figura 23. Efecto del rolipram sobre la relajación inducida por forskolina (FSK) y db-cAMP de las contracciones inducidas por fenilefrina (1 μ M) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 6 valores; ^{##} $p < 0,01$ respecto al vehículo control; ^{*} $p < 0,05$ y ^{**} $p < 0,01$ con respecto a los resultados en ausencia de rolipram.

En otra serie de experimentos en medio con Ca^{2+} (1,5 mM), la preincubación de los anillos durante 10 min con db-cAMP (50 μM y 100 μM) disminuyó significativamente la magnitud de la contracción de la fenilefrina (1 μM) (valores máximos de tensión (g): $1,10 \pm 0,24$ y $0,38 \pm 0,1$, $n = 5$ respectivamente; $p < 0,01$ respecto al control en ambos casos). Por otro lado, la preincubación durante 10 min con forskolina (0,1; 1 y 10 μM) disminuyó significativamente la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (valores máximos de tensión (g): $1,15 \pm 0,11$, $n = 5$; $0,74 \pm 0,12$, $n = 5$; $0,22 \pm 0,04$, $n = 10$; $p < 0,01$ respecto al control en los tres casos) (figura 24).

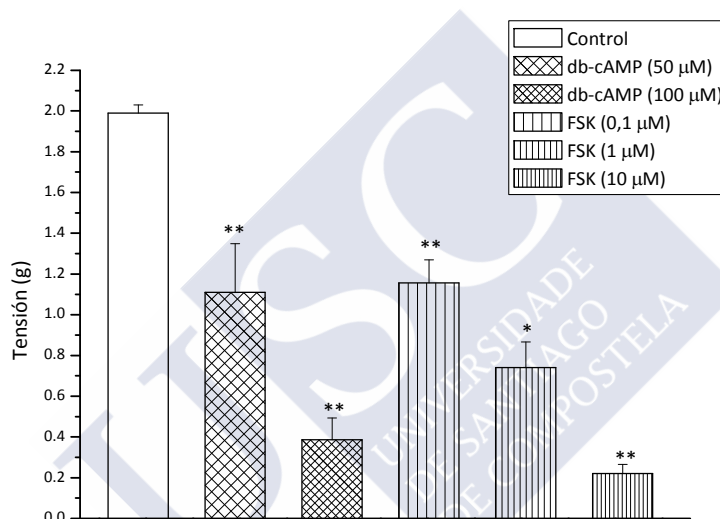


Figura 24. Efecto de la preincubación con db-cAMP y forskolina (FSK) sobre la contracción inducida con fenilefrina (1 μM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 5 valores. ** $p < 0,01$ con respecto al control.

1.2 Efecto de la inhibición de la p38 MAP cinasa sobre la vasorrelajación inducida por forskolina y dibutilil AMPc

En los anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio, la administración de SB-203580 (10 μM) no produjo ningún efecto significativo sobre la contracción sostenida inducida con fenilefrina (1 μM). En estas condiciones, la relajación inducida por la subsiguiente administración de forskolina (0,1 μM) se vio potenciada

de modo significativo (porcentaje máximo de relajación: $62,3 \pm 1,9\%$, $n = 8$; $p < 0,01$; figura 25).

El efecto relajante inducido por db-cAMP ($50 \mu\text{M}$) también fue potenciado de forma significativa en presencia de SB-203580 ($10 \mu\text{M}$) (porcentaje máximo de relajación: $83,4 \pm 7,3\%$, $n = 9$; $p < 0,01$; figura 28) (ver registro representativo en figura 26).

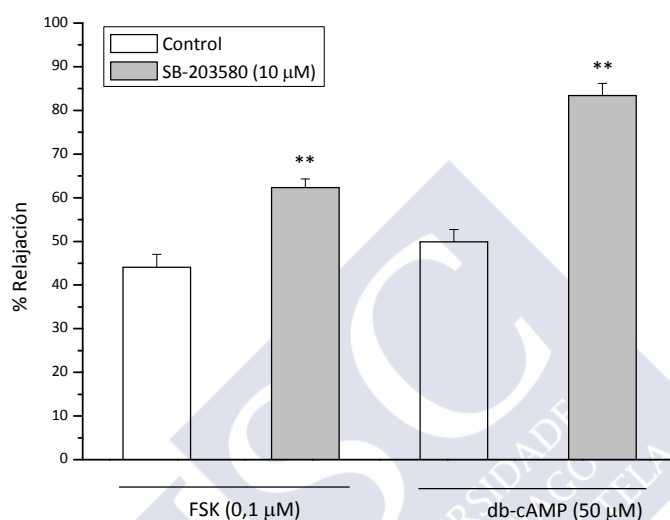


Figura 25. Efecto del SB-203580 sobre la relajación inducida por forskolina (FSK) y db-cAMP de la contracción con fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) de los anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 8 valores; ** $p < 0,01$ con respecto al control correspondiente.

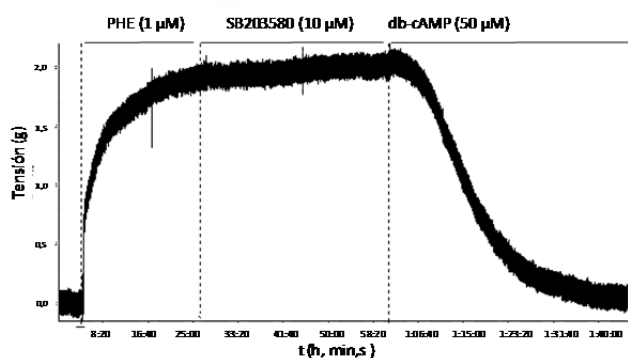


Figura 26. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (PHE) y efectos e la posterior adición de SB-203580 y db-cAMP en un anillo de aorta de rata sin endotelio.

1.3 Efecto de diversos bloqueantes de canales de K⁺ sobre la relajación inducida por forskolina o dibutilil AMPc

La administración de apamina (0,5 μ M), de una combinación de caribdotoxina (0,1 μ M) y apamina (0,5 μ M) o de glibenclamida (10 μ M) no modificó significativamente la respuesta contráctil de la fenilefrina (1 μ M) (variación de la contracción máxima: 14,04 \pm 2,2%, n = 4; 13,8 \pm 3,9%, n = 10 y 5,1 \pm 1,5%, n = 10 respectivamente; $p > 0,05$ en los tres casos).

El efecto vasorrelajante de la forskolina (0,1 μ M) no se vio modificado de forma significativa en presencia de apamina (porcentaje de relajación: 50,2 \pm 1,9%, n = 4; $p > 0,05$ respecto al control) ni de una combinación de caribdotoxina y apamina (porcentaje de relajación: 38,2 \pm 4,0%, n = 12; $p > 0,05$ respecto al control). El efecto vasorrelajante del db-cAMP (50 μ M) tampoco se vio afectado por el tratamiento con caribdotoxina (0,1 μ M) y apamina (0,5 μ M) (porcentaje de relajación: 47,8 \pm 7,1%; n = 8, $p > 0,05$ respecto al control correspondiente; figura 28).

El pretratamiento con glibenclamida (10 μ M) aumentó significativamente el efecto vasorrelajante de la forskolina (0,1 μ M) (porcentaje de relajación: 70,7 \pm 4,6%, n = 10; $p < 0,01$; figura 28 y registro representativo en figura 27) y del db-cAMPc (50 μ M) (porcentaje de relajación: 96,75 \pm 2,45%, n = 4; $p < 0,01$ respecto al control).

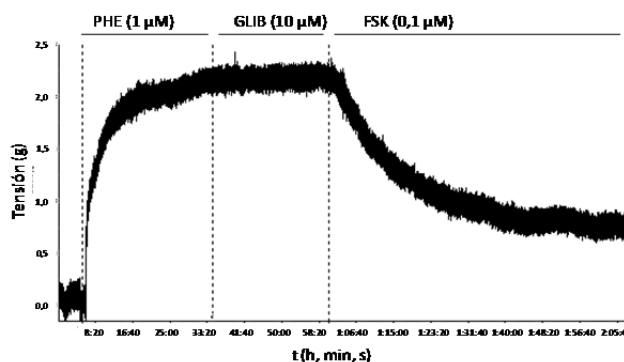


Figura 27. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (PHE) y efectos de la posterior adición de glibenclamida (GLIB) y forskolina (FSK) en un anillo de aorta de rata sin endotelio.

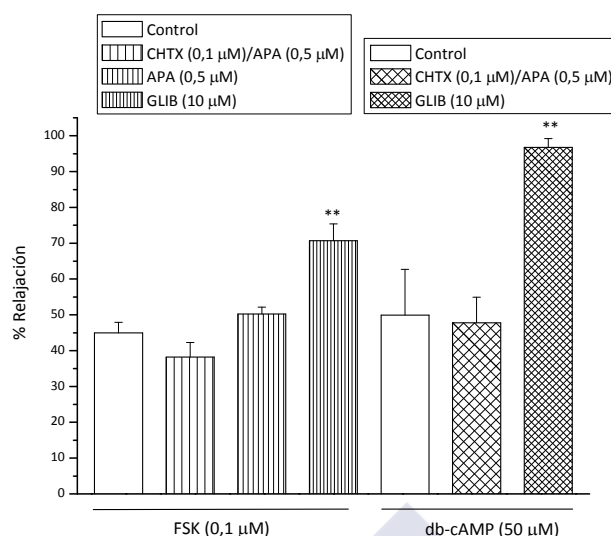


Figura 28. Efecto de caribdotoxina (CHTX), apamina (APA) y glibenclamida (GLIB) sobre la relajación inducida por forskolina (FSK) y db-cAMP en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio precontraídos con fenilefrina (1 μM). Cada barra representa la media ± e.e.m de al menos 4 valores; ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente control.

1.4 Efecto de inhibidores de canales de Ca^{2+} tipo L sobre la vasorrelajación inducida por forskolina

Los inhibidores de los canales de Ca^{2+} tipo L, nifedipina (1 μM) y verapamilo (1 μM), relajaron parcialmente la contracción de los anillos inducida por la fenilefrina (1 μM) (porcentaje de relajación: $46,2 \pm 2,6\%$, $n = 12$ para la nifedipina y $39,0 \pm 2,2\%$, $n = 12$ para el verapamilo; $p < 0,01$ respecto al vehículo en los dos casos).

Una vez estabilizada la relajación por nifedipina o verapamilo, la subsiguiente administración de forskolina (0,1 μM) relajó casi completamente la contracción remanente (porcentaje de relajación respecto a la contracción inicial con fenilefrina: $46,5 \pm 5,8\%$, $n = 6$ y $51,3 \pm 1,8\%$, $n = 6$ en presencia de nifedipina y verapamilo, respectivamente; $p > 0,05$ con respecto a los controles) (figura 29).

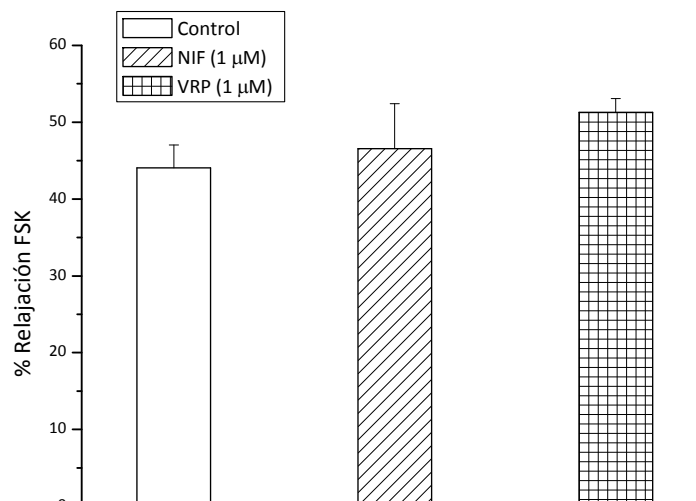


Figura 29. Efecto de nifedipina (NIF) y verapamilo (VRP) sobre la relajación inducida por forskolina (FSK 0,1 μM) de la contracción por fenilefrina (1 μM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media ± e.e.m de al menos 6 valores.

1.5 Efecto del ácido flufenámico y del SKF-96365 sobre la vasorrelajación inducida por forskolina

La administración de ácido flufenámico (100 μM) sobre la contracción estable inducida por fenilefrina (1 μM) produjo una relajación del $26,9 \pm 7,7\%$ ($n = 8$; $p < 0,01$ respecto al vehículo). Es estas condiciones, la relajación de la forskolina (0,1 μM) fue potenciada de forma significativa ($59,3 \pm 11,4\%$, $n = 4$; $p < 0,05$ con respecto a los controles en ausencia de ácido flufenámico (figura 30).

Por su parte, el SKF-96365 (30 μM) relajó significativamente la contracción estable inducida por fenilefrina (1 μM) ($87,1 \pm 8,2\%$, $n = 3$; $p < 0,01$ respecto al vehículo). La subsiguiente administración de forskolina (0,1 μM) relajó completamente la contracción residual tras la administración de SKF-96365 (datos no mostrados).

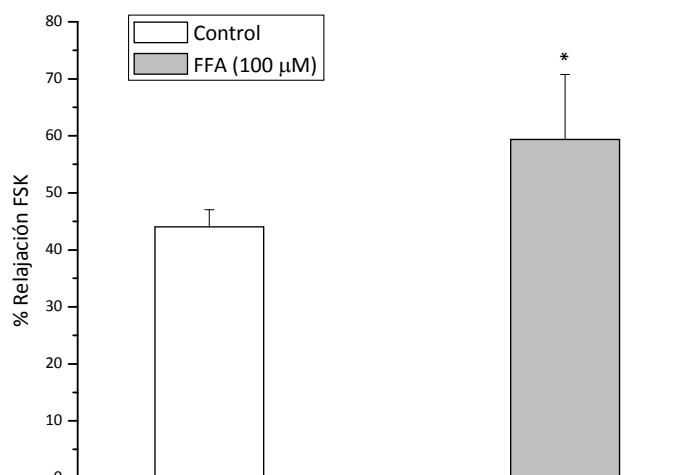


Figura 30. Efecto del ácido flufenámico (FFA) sobre la relajación inducida por forskolina (FSK 0,1 μM) de las contracciones inducidas por fenilefrina (1 μM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media ± e.e.m de, al menos, 4 valores; * $p < 0,05$ con respecto al control.

1.6 Efecto de los inhibidores de la PKA sobre la vasorrelajación inducida por forskolina

En otra serie de experimentos se evaluó la implicación de la PKA en el efecto inhibitor de la forskolina sobre la contracción inducida por fenilefrina. La administración de KT5720 (0,5 μM), inhibidor selectivo de la actividad de la PKA, no modificó significativamente la contracción de los anillos de aorta de rata con fenilefrina (1 μM) (variación de la contracción máxima: $8,0 \pm 1,6\%$, $n = 6$; $p > 0,05$). El efecto vasorrelajante de la forskolina (0,1 μM) no se vio modificado en presencia del inhibidor (porcentaje de relajación: $34,6 \pm 6,9\%$, $n = 6$; $p > 0,05$ con respecto al control correspondiente; figura 31).

La adición de KT5720 (0,5 μM) tampoco modificó significativamente la relajación observada en los anillos tratados con rolipram (100 μM) y forskolina (0,1 μM) ($49,7 \pm 11,3\%$, $n = 6$; $p > 0,05$ frente a $58,3 \pm 4,3\%$, $n = 6$ en los controles; figura 31).

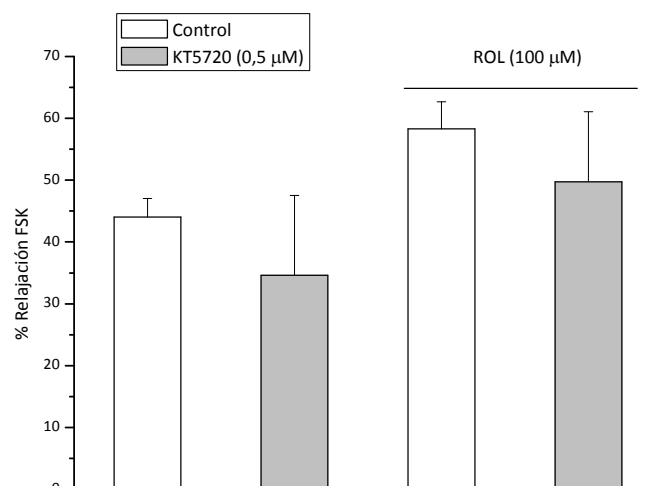


Figura 31. Efecto del KT5720 sobre la relajación inducida por forskolina (FSK 0,1 μM) de la contracción con fenilefrina (1 μM) en presencia o en ausencia de rolipram (ROL) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de, al menos, 6 valores.

Al igual que se describió en el apartado 1.1 de esta sección, la contracción originada por la fenilefrina fue significativamente menor tras la preincubación durante 10 min con forskolina (10 μM) ($0,21 \pm 0,04$ g, $n = 10$; $p < 0,01$ respecto al control sin forskolina). Este efecto de la forskolina no fue modificado de forma significativa por la presencia conjunta de Rp-cAMPs (10 μM) y KT5720 (0,5 μM), ambos inhibidores selectivos de la PKA (valor de la contracción (g): $0,10 \pm 0,01$, $n = 4$; $p > 0,05$ respecto al control en ausencia de los dos inhibidores) (figura 32).

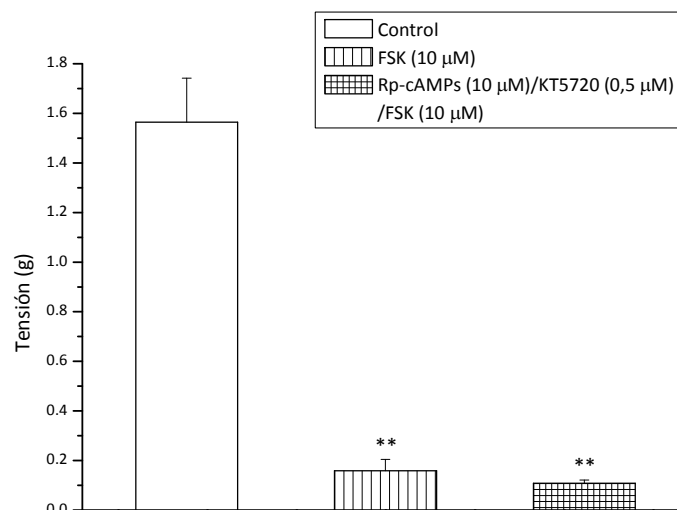


Figura 32. Efecto de la preincubación con Rp-cAMPs y KT5720 sobre el efecto inhibitor de la contracción con fenilefrina (1 μM) causado por la forskolina (FSK) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media ± e.e.m de, al menos, 4 valores; ** $p < 0,01$ con respecto al control.

1.7 Efecto de los activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la contracción con fenilefrina

El pCPT-cAMP (100 μM), activador selectivo de la PKA, produjo una relajación significativa de los anillos de aorta precontraídos con fenilefrina (1 μM) (porcentaje de relajación: $61,4 \pm 10,2\%$, $n = 6$; $p < 0,01$ respecto al vehículo).

El activador selectivo de las proteínas Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM), provocó una relajación significativa de los anillos de aorta precontraídos con fenilefrina (1 μM) (porcentaje de relajación: $14,9 \pm 1,3\%$, $n = 5$; $p < 0,01$ respecto al control).

La adición conjunta de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM) y de 8-pCPT-cAMP (100 μM) produjo una relajación significativa de los anillos del $75,8 \pm 0,3\%$, $n = 6$; $p < 0,05$ con respecto a los anillos tratados únicamente con el activador de PKA (figura 33).

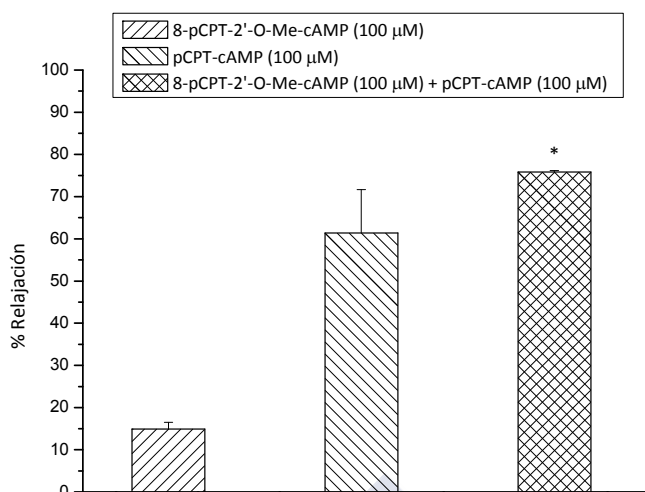


Figura 33. Efecto de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, pCPT-cAMP y una combinación de ambos sobre la contracción por fenilefrina en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 6 valores * $p < 0,05$ con respecto al tratado con 8-pCPT-cAMP.

1.8 Implicación de la liberación de Ca^{2+} intracelular en los efectos vasodilatadores del AMPc

1.8.1 Efecto de la forskolina y dibutilil AMPc sobre la contracción con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+}

Tras un período de 20 min en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la fenilefrina (1 μM) indujo una contracción transitoria de los anillos de aorta de rata (valores máximos de tensión (g): $0,57 \pm 0,03$, $n = 46$) que retornó a valores basales en ~ 6 min. La preincubación de los anillos, durante 10 min, con diferentes dosis de forskolina y con db-cAMP (100 μM) produjo una disminución significativa de la contracción de la fenilefrina en medio libre de Ca^{2+} (tabla 4; figura 34).

Tabla 4. Valores máximos de tensión (g) alcanzados por la fenilefrina en presencia de diferentes tratamientos con forskolina (FSK), IBMX y db-cAMP. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al vehículo (DMSO).

	Fenilefrina (1 μ M)
Vehículo	0,57 \pm 0,03 (n = 46)
Forskolina (0,1 μ M)	0,26 \pm 0,01** (n = 4)
Forskolina (1 μ M)	0,09 \pm 0,01** (n = 4)
Forskolina (10 μ M)	0,04 \pm 0,02** (n = 4)
Forskolina (10 μ M) + IBMX (100 μ M)	0,05 \pm 0,00** (n = 4)
Db-cAMP (100 μ M)	0,43 \pm 0,09* (n = 4)

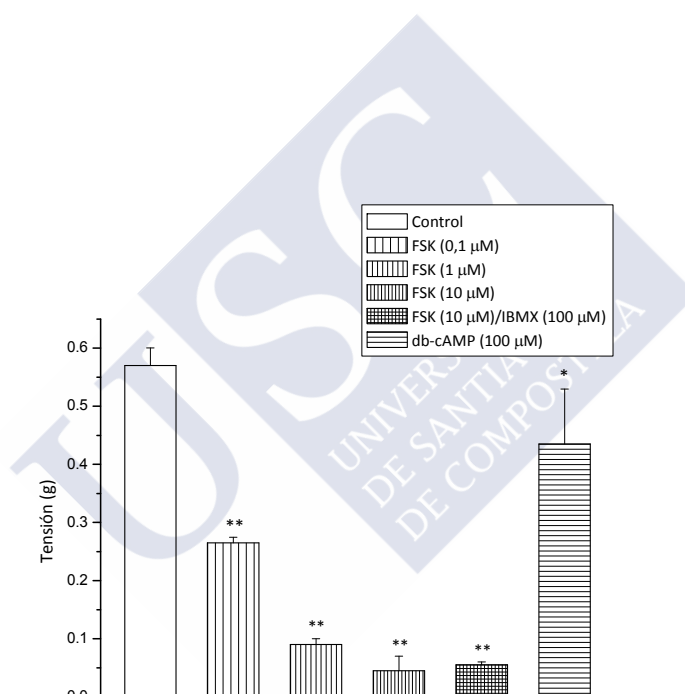


Figura 34. Efecto de la preincubación con forskolina (FSK), forskolina e IBMX y db-cAMP sobre la contracción por fenilefrina (1 μ M) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio en medio libre de Ca^{2+} . Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 4 valores. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente control.

Tras un lavado de 45 min en medio con 1,5 mM Ca^{2+} extracelular (para rellenar los reservorios intracelulares de Ca^{2+}) seguido de un nuevo período de 20 min en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la fenilefrina (1 μM) indujo una segunda contracción de los anillos (valor máximo de tensión (g): $0,40 \pm 0,02$, $n = 24$) que representa un $85,5 \pm 4,9\%$ ($n = 24$) de la primera contracción.

Esta segunda contracción, inducida por fenilefrina, fue reducida significativamente por pretatamiento durante 15 min con forskolina (0,1 μM) (% respecto a la primera contracción: $49,3\% \pm 7,6\%$, $n = 12$; $p < 0,01$ respecto al vehículo). Similares resultados se obtuvieron con db-cAMP (50 μM) ($60,8 \pm 5,4\%$, $n = 12$; $p < 0,01$ respecto al vehículo).

1.8.2 Efecto del TMB-8 sobre la acción vasodilatadora de la forskolina

En un medio extracelular con 1,5 mM Ca^{2+} , la contracción inducida por fenilefrina (1 μM) fue completamente inhibida en presencia de TMB-8 (100 μM) y parcialmente reducida ($\sim 50\%$) en presencia de TMB-8 (30 μM).

En presencia de TMB-8 (30 μM), la aplicación de forskolina (0,1 μM) relajó de forma significativa la contracción inducida por fenilefrina (1 μM) (porcentaje máximo de relajación: $74,5 \pm 10,1\%$, $n = 8$; $p < 0,01$) con una potencia superior a la observada en los controles en ausencia de TMB-8.

La preincubación con TMB-8 (30 μM) durante 10 min en medio libre de Ca^{2+} redujo un 38,3% la contracción de la fenilefrina (tensión máxima (g): $0,35 \pm 0,01$, $n = 6$; $p < 0,05$ con respecto a los controles sin TMB-8).

En presencia de TMB-8 (30 μM), la aplicación de forskolina (0,1 μM) relajó de forma significativa la contracción inducida por fenilefrina (1 μM) (porcentaje máximo de relajación: $74,5 \pm 10,1\%$, $n = 8$) con una potencia superior a la observada en los controles en ausencia de TMB-8 ($p < 0,01$).

1.8.3 Efecto de los activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la contracción con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+}

En medio libre de Ca^{2+} se preincubaron los anillos de aorta de rata, durante 10 min, con pCPT-cAMP (100 μM) y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM). La adición de

estos compuestos no modificó la tensión basal de los anillos. El tratamiento con estos compuestos disminuyó significativamente la magnitud de la contracción transitoria de la fenilefrina (1 μM) (tensión máxima pCPT-cAMP (g): $0,14 \pm 0,07$, $n = 4$; $p < 0,01$ respecto al control; 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP: $0,21 \pm 0,09$, $n = 4$; $p < 0,01$) (figura 35).

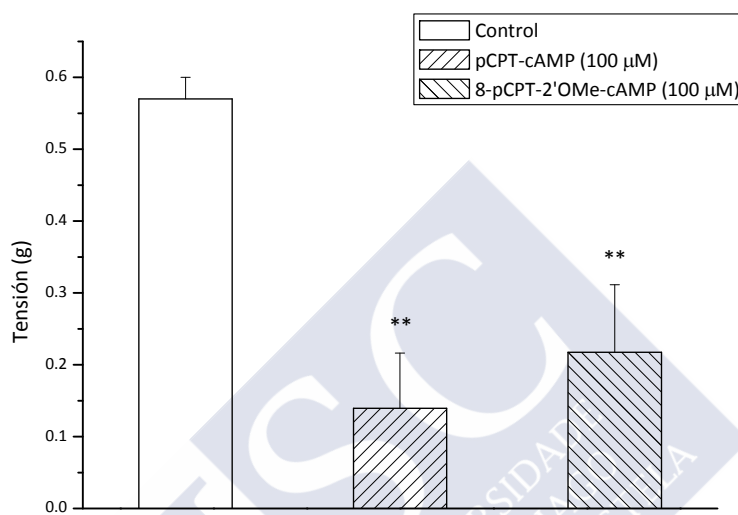


Figura 35. Efecto de la preincubación con pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la contracción por fenilefrina (1 μM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio en medio libre de Ca^{2+} . Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 4 valores. ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente control.

1.9 Implicación de la activación de canales de Ca^{2+} operados por depleción en los efectos vasodilatadores del AMPc

1.9.1 Efecto de forskolina y dibutilil AMPc sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras depleción de reservorios con fenilefrina y tapsigargina

Tal y como se describió en el apartado 1.8.1, la adición de fenilefrina (1 μM) en medio libre de Ca^{2+} indujo una contracción transitoria de los anillos. Tras 15 min de lavado con medio libre de Ca^{2+} , una segunda administración de fenilefrina (1 μM) no provocó cambios significativos en la tensión de los anillos (datos no mostrados).

Después de 15 min de lavado con medio libre de Ca^{2+} para eliminar la fenilefrina presente en los baños de órganos, la reintroducción de una solución que contiene 1,5 mM de Ca^{2+} en el medio externo provocó una respuesta contráctil lenta y sostenida (valor máximo de tensión (g): $1,28 \pm 0,19$, $n = 8$) (registro representativo en figura 36). Dicha contracción fue disminuida de forma significativa por la preincubación durante 10 min con forskolina ($0,1 \mu\text{M}$) (tensión máxima (g): $0,9 \pm 0,08$, $n = 9$; $p < 0,01$ con respecto al control), forskolina ($1 \mu\text{M}$) ($0,58 \pm 0,29$, $n = 4$; $p < 0,01$ con respecto al control), forskolina ($10 \mu\text{M}$) (tensión máxima (g): $0,27 \pm 0,04$, $n = 10$; $p < 0,01$) y forskolina ($10 \mu\text{M}$)/IBMX ($100 \mu\text{M}$) (tensión máxima (g): $0,06 \pm 0,08$, $n = 4$; $p < 0,01$) (figura 37A).

De manera similar, la preincubación con db-cAMP ($50 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$) disminuyó significativamente la respuesta contráctil por reentrada de Ca^{2+} ($0,94 \pm 0,14$ g, $n = 9$ y $0,36 \pm 0,09$ g, $n = 5$; $p < 0,01$ con respecto al control, respectivamente) (registro representativo en figura 36) (figura 37B).

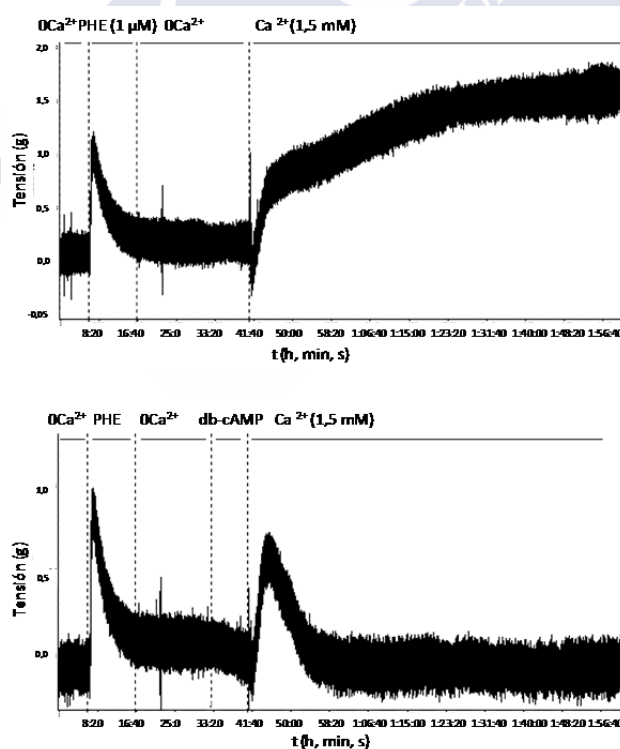


Figura 36. Registro representativo de la contracción de un anillo de aorta sin endotelio con fenilefrina (PHE) en medio libre de Ca^{2+} y posterior contracción por reintroducción de Ca^{2+} en el medio (figura superior). Disminución de la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras preincubación con db-cAMP ($100 \mu\text{M}$) (figura inferior).

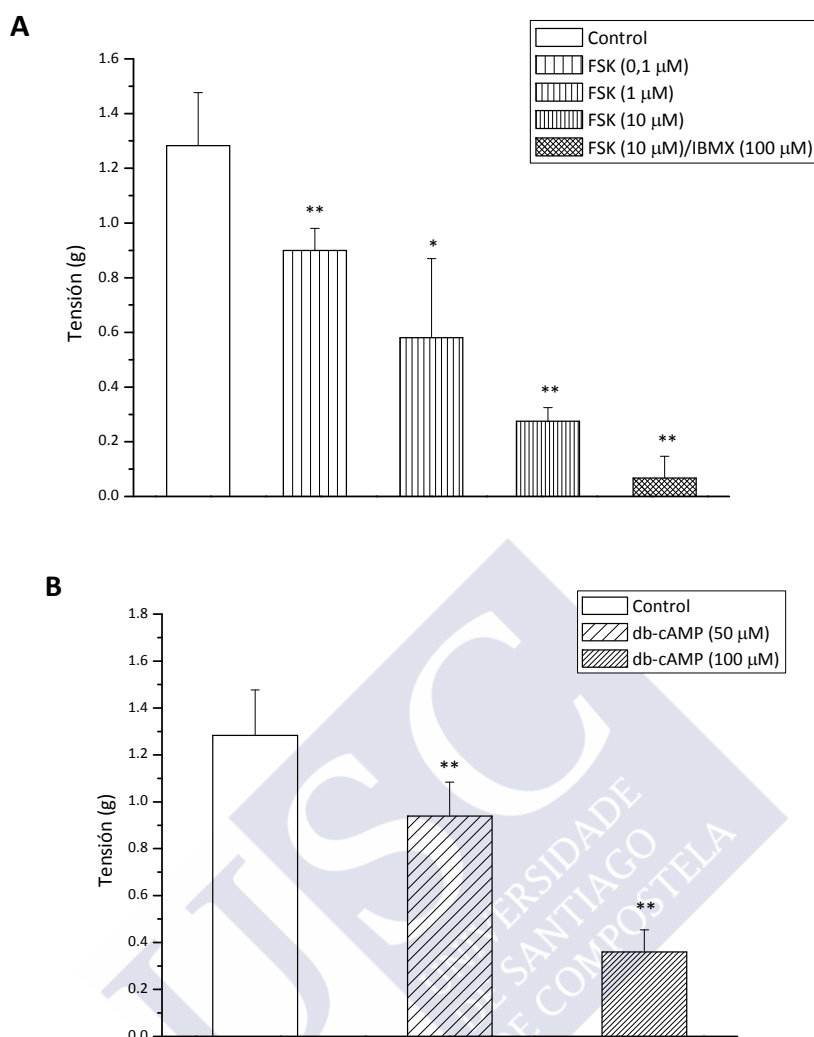


Figura 37. Efecto de la forskolina (FSK) y forskolina e IBMX (A) y del db-cAMP (B) sobre la contracción inducida por reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios con fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) en medio libre de Ca^{2+} en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 4 valores; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control.

En medio libre de Ca^{2+} la aplicación de taspigargina ($1 \mu\text{M}$) no provocó respuesta contráctil los anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Tras el tratamiento con taspigargina la posterior reintroducción de Ca^{2+} ($1,5 \text{ mM}$) en el medio indujo una respuesta contráctil sostenida (tensión máxima (g): $0,38 \pm 0,07$, $n = 7$).

Esta contracción fue inhibida de modo significativo por la aplicación de forskolina ($0,1 \mu\text{M}$) y db-cAMP ($50 \mu\text{M}$) (porcentaje máximo de inhibición: $84,6 \pm 7,0\%$; $n = 5$ y $78,4 \pm 6,5$, $n = 5$; $p < 0,01$ respecto al control, respectivamente) (tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la forskolina y el db-cAMP en la contracción inducida por reintroducción de Ca^{2+} en el medio tras la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} con tapsigargina (TP 0,5 μM) en medio libre de Ca^{2+} , en anillo de aorta de rata sin endotelio ** $p < 0,01$ respecto al control.

	Ca^{2+} tras TP (0,5 μM)
Control	0,38 \pm 0,07 g (n = 7)
Forskolina (0,1 μM)	0,06 \pm 0,005 g ** (n = 5)
Db-cAMP (50 μM)	0,08 \pm 0,003 g ** (n = 5)

1.9.2 Efecto de los inhibidores de la PKA sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras depleción con fenilefrina

La aplicación de forskolina (10 μM) en medio libre de Ca^{2+} , previamente a la reintroducción de una solución 1,5 mM de Ca^{2+} , produjo una disminución de la contracción por reentrada de Ca^{2+} de los anillos de aorta (valor de la contracción (g): 0,27 \pm 0,04, n = 10; $p < 0,01$ con respecto al control sin forskolina). Este valor no fue modificado significativamente por el pretratamiento con Rp-cAMPs (10 μM) (tensión máxima (g): 0,32 \pm 0,09, n = 4; $p > 0,05$) ni por una mezcla de Rp-cAMPs (10 μM) y KT5720 (0,5 μM) (tensión máxima (g): 0,16 \pm 0,07, n = 4) (figura 13).

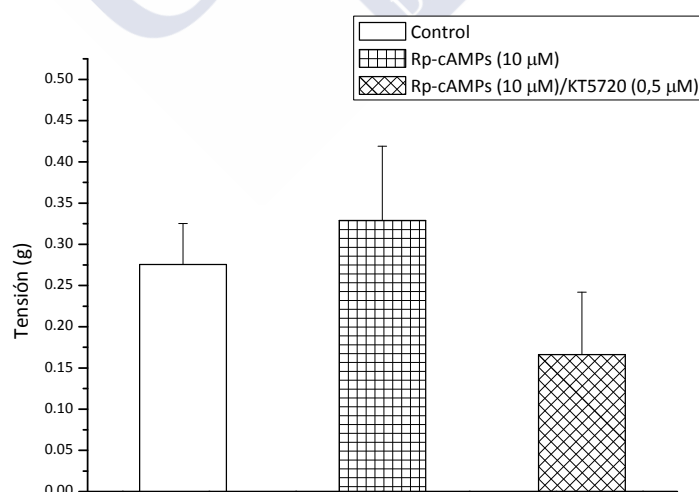


Figura 38. Efecto de Rp-cAMPs y KT5720 sobre la inhibición inducida por la forskolina (10 μM) de la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios con fenilefrina (1 μM) en medio libre de Ca^{2+} en anillos de aorta de

rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 4 valores.

1.9.3 Efecto de activadores de las proteínas Epac y PKA sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras depleción con fenilefrina

La contracción inducida por reintroducción de Ca^{2+} (1,5 mM) fue reducida de forma significativa en presencia de pCPT-cAMP (100 μM) (tensión máxima (g): $0,40 \pm 0,11$, $n = 4$; $p < 0,01$ respecto al vehículo) o de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM) (tensión máxima (g): $0,52 \pm 0,01$, $n = 4$; $p < 0,05$ respecto al vehículo) (figura 39).

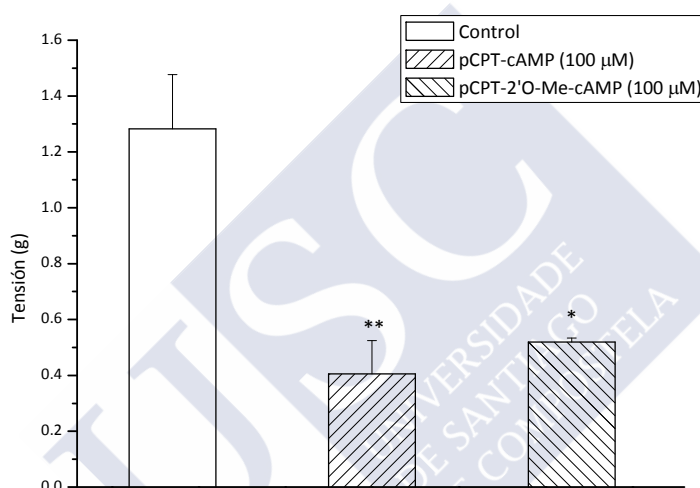


Figura 39. Efecto de pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios con fenilefrina (1 μM) en medio libre de Ca^{2+} en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 4 valores; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control.

1.10 Experimentos en medio despolarizante

1.10.1 Efecto de la forskolina y el rolipram sobre la contracción inducida con CaCl_2

En medio despolarizante sin Ca^{2+} , la adición de CaCl_2 (1,5 mM) provocó una contracción sostenida de los anillos de aorta (ver registro representativo en figura 40A). El valor máximo de tensión (g) fue: $1,77 \pm 0,10$, $n = 24$. Esta contracción fue relajada significativamente por forskolina (0,1 μM) (porcentaje de relajación: $28,1 \pm 4,8\%$, $n = 12$). El tratamiento durante 10 min con rolipram (100 μM) anterior a la

adición de la forskolina no modificó significativamente el porcentaje de relajación ($27,9 \pm 3,1\%$, $n = 12$; $p > 0,05$ respecto al control sin rolipram).

En medio despolarizante sin Ca^{2+} , la preincubación con forskolina ($0,1 \mu\text{M}$) (tensión máxima (g): $0,92 \pm 0,22$, $n = 4$; $p < 0,05$ con respecto a los controles), forskolina ($0,1 \mu\text{M}$)/IBMX ($100 \mu\text{M}$) ($0,05 \pm 0,05$, $n = 4$; $p < 0,01$ con respecto a los controles) y db-cAMP ($100 \mu\text{M}$) ($1,06 \pm 0,0$, $n = 4$, $p < 0,01$ con respecto a los controles) disminuyó significativamente la magnitud de la contracción producida tras la adición al medio de $1,5 \text{ mM CaCl}_2$ (ver registro representativo en figura 40) (figura 41).

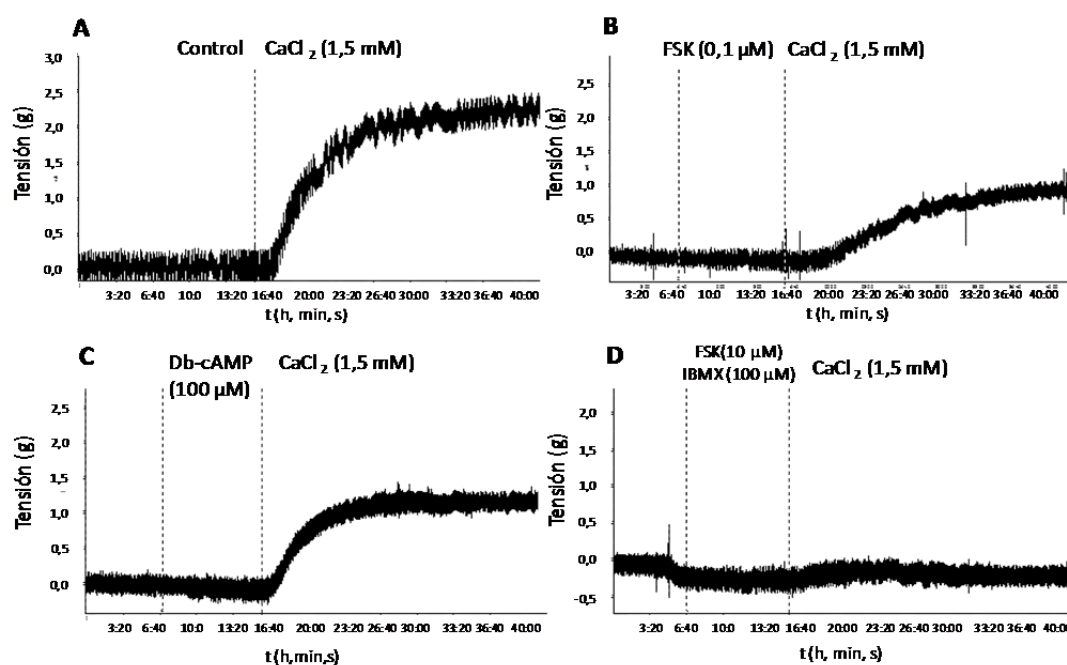


Figura 40. (A) Registro representativo de la contracción de un anillo de aorta sin endotelio en medio despolarizante sin Ca^{2+} y posterior contracción por reintroducción de Ca^{2+} en el medio (B) Disminución de la contracción por reentrada de Ca^{2+} tras preincubación con forskolina (C) db-cAMP y (D) forskolina/IBMX.

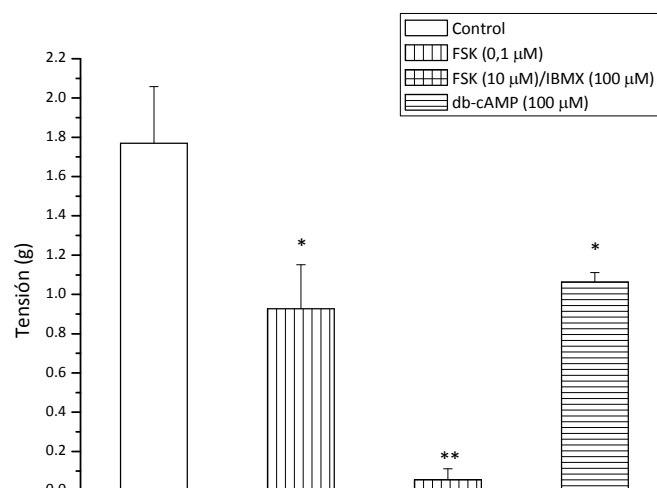


Figura 41. Efecto de la preincubación con forskolina (FSK), forskolina e IBMX y db-cAMP sobre la contracción inducida con CaCl_2 (1,5 mM) en medio despolarizante en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Cada barra representa la media \pm e.e.m de al menos 4 valores. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto a los controles.

1.10.2 Efecto de la nifedipina y el SKF96365 sobre la contracción inducida con CaCl_2

En medio despolarizante sin Ca^{2+} , la contracción inducida por la adición de CaCl_2 (1,5 mM) fue relajada significativamente por nifedipina (1 μM) (porcentaje de relajación: $98,24 \pm 1,02\%$, $n = 6$; $p < 0,01$ respecto al vehículo) y por SKF-96365 (30 μM) (porcentaje de relajación: $97,88 \pm 2,11\%$, $n = 6$; $p < 0,01$ respecto al vehículo) (no se muestra figura).

2 Efectos sobre la homeostasis cálcica

2.1 Efecto de los agentes que incrementan el AMPc y de activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal

2.1.1 Medio con Ca^{2+}

En medio 1,5 mM de Ca^{2+} , el valor medio del ratio 340/380 nm, indicativo de la $[Ca^{2+}]_i$ en células A7r5 fue de $0,47 \pm 0,01$, $n = 20$.

En este medio, la aplicación de forskolina (1, 10 μ M) y forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M) produjo un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (expresado como incremento del ratio de fluorescencia 340/380: $\Delta F_{340/380}$) de $0,09 \pm 0,01$, $n = 13$; $0,05 \pm 0,01$, $n = 13$ y $0,25 \pm 0,07$, $n = 15$ respectivamente. En los tres casos el porcentaje de respuesta celular fue del 100% (figura 1) y las diferencias fueron significativas respecto a los valores basales ($p < 0,01$). Para forskolina (1 y 10 μ M) además, se encontraron diferencias significativas respecto al valor máximo de aumento de Ca^{2+} , obtenido con forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M) ($p < 0,01$) (ver registro representativo en figura 42).

La preincubación de las células con db-cAMP (50 μ M, $n = 8$ y 100 μ M, $n = 6$) no modificó significativamente la $[Ca^{2+}]_i$ basal ($p > 0,05$). Una dosis mayor de db-cAMP (300 μ M) produjo respuesta en $\sim 44\%$ de las células ($0,046 \pm 0,010$, $n = 13$; $p < 0,05$ con respecto al valor basal y al máximo aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenido con forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M) (figura 43).

El tratamiento con pCPT-cAMP (100 μ M, $n = 11$) o con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μ M, $n = 8$) no modificó significativamente la $[Ca^{2+}]_i$ ($p > 0,05$). Sin embargo, el tratamiento conjunto con pCPT-cAMP (100 μ M) y con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μ M) incrementó de forma significativa la $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta F_{340/380} = 0,15 \pm 0,01$, $n = 8$; $p < 0,01$ con respecto a los valores basales) (figura 43).

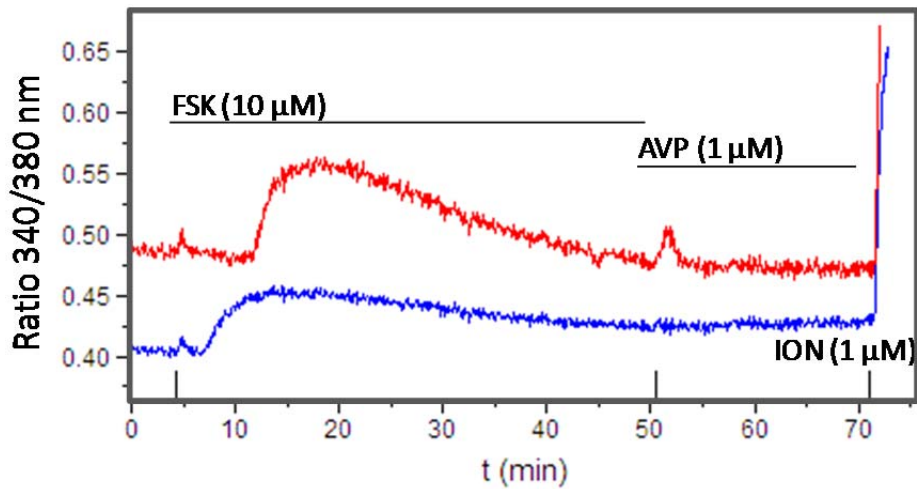


Figura 42. Registro representativo de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (expresado como $\Delta F_{340/380}$) en dos células A7r5 en medio con Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con forskolina (FSK) y posterior adición de vasopresina (AVP) e ionomicina (ION).

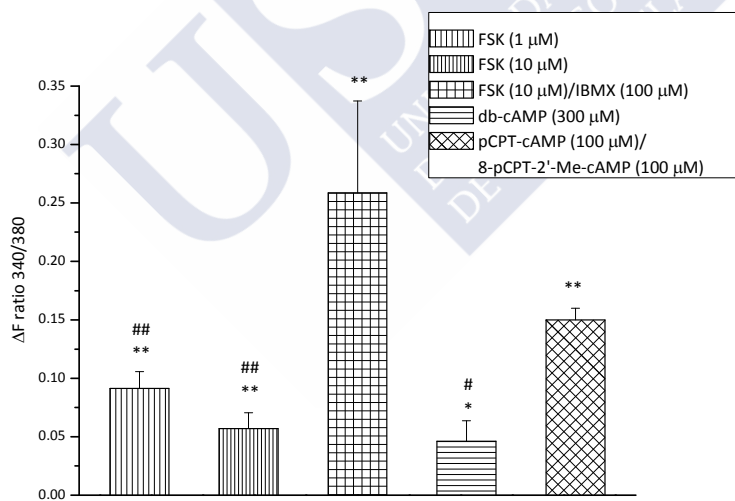


Figura 43. Efecto del tratamiento con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP y pCPT-cAMP/pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre los niveles de Ca^{2+} basales (expresado como $\Delta F_{340/380}$) en células A7r5 en medio con Ca^{2+} . Cada barra representa la media \pm e.e.m de, al menos, 6 valores; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto al máximo aumento obtenido con forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M).

2.1.2 Medio libre de Ca^{2+}

En condiciones basales, el valor medio del ratio de fluorescencia (340/380) en células A7r5 en medio libre de Ca^{2+} fue de $0,44 \pm 0,01$, $n = 20$.

La administración de forskolina (0,1; 1 y 10 μM); forskolina (10 μM /IBMX 100 μM y db-cAMP (300 μM) produjo un incremento de dicho ratio en un porcentaje variable de células A7r5. Los valores de $\Delta F_{340/380}$ corregidos por el % de células que presentan dicho aumento es: $0,27 \pm 0,02$; para forskolina (0,1 μM) ($n = 30$; 6,6% de respuesta celular); $1,28 \pm 0,21$ para forskolina (1 μM) ($n = 24$; 54,1% de respuesta); $2,56 \pm 0,71$ para forskolina (10 μM) ($n = 21$; 38,1% de respuesta); $2,54 \pm 0,69$; para forskolina (10 μM)/IBMX (100 μM) ($n = 12$; 66,6% de respuesta) y $2,57 \pm 1,97$ para db-cAMP (300 μM) ($n = 26$; 30,7% de respuesta) (figura 44). Una dosis inferior de db-AMPC (100 μM) no produjo aumentos significativos ($n = 14$).

El tratamiento con pCPT-cAMP (100 μM , $n = 20$) o con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM , $n = 12$) no modificó significativamente los niveles de Ca^{2+} basales ($p > 0,05$). Sin embargo, el tratamiento conjunto con pCPT-cAMP (100 μM) y con 8-pCPT-2'-OMe-cAMP (100 μM) incrementó de forma significativa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta F_{340/380} = 1,33 \pm 0,4$, $n = 13$; $p < 0,05$ con respecto a los valores basales) (figura 44).

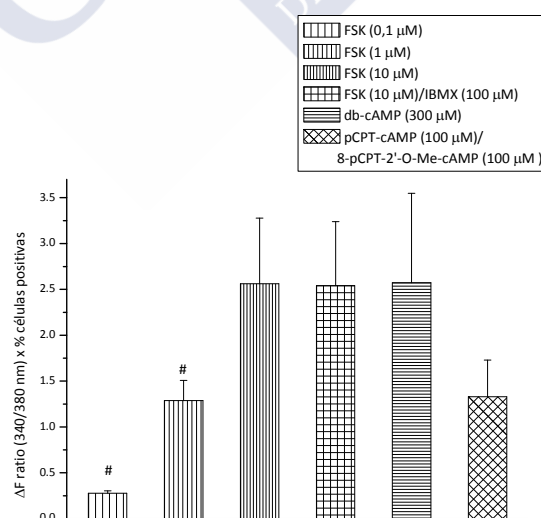


Figura 44. Efecto del tratamiento con forskolina (FSK), forskolina /IBMX y db-cAMP sobre los niveles de Ca^{2+} basales en células A7r5 en medio libre Ca^{2+} . Cada barra representa la media \pm e.e.m de entre 4 y 13 valores; # $p < 0,05$ con respecto al máximo aumento obtenido con db-cAMP.

2.2 Efecto de los agentes que incrementan el AMPc y de activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la respuesta a vasopresina

2.2.1 Medio con Ca²⁺

En medio con Ca²⁺ (2 mM), la vasopresina (1 μM) produjo un incremento transitorio del ratio 340/380 que tuvo lugar en los primeros 5 s tras la aplicación del agonista ($\Delta F_{340/380} = 0,99 \pm 0,09$, n = 26), seguido de un descenso del ratio, que se estabilizó al cabo de 3-5 min.

La preincubación de las células durante 30 min con forskolina (1 y 10 μM) o con forskolina (10 μM)/IBMX (100 μM) inhibió significativamente la respuesta cálcica de la vasopresina, tanto la fase de pico como la fase de meseta. Esta respuesta no fue modificada significativamente por forskolina (0,1 μM) (tabla 6) (figura 45A).

Este efecto inhibitor de la forskolina fue reproducido por el db-cAMP (300 μM), pCPT-cAMP (100 μM) (ver registro representativo en figura 46) y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM) (tabla 6) (figura 45B).

Tabla 6. Efecto de la forskolina (FSK), forskolina e IBMX, db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la respuesta cálcica de la vasopresina (AVP 1 μM) (expresada como $\Delta F_{340/380}$) en células A7r5 en medio con Ca²⁺. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al correspondiente control.

	Pico AVP ($\Delta F_{340/380}$)	Meseta AVP ($\Delta F_{340/380}$)	N
Control	0,99 ± 0,09	0,3 ± 0,04	26
FSK (0,1 μM)	1,27 ± 0,16	0,26 ± 0,04	16
FSK (1 μM)	0,056 ± 0,088**	0,07 ± 0,01**	13
FSK (10 μM)	0,066 ± 0,03**	0,04 ± 0,01**	9
FSK (10 μM)/IBMX (100 μM)	0,372 ± 0,11**	0,14 ± 0,04*	11
db-cAMP (300 μM)	0,47 ± 0,05**	0,15 ± 0,02**	20
pCPT-cAMP (100 μM)	0,59 ± 0,08**	0,08 ± 0,008**	11
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μM)	0,58 ± 0,11*	0,16 ± 0,05*	8

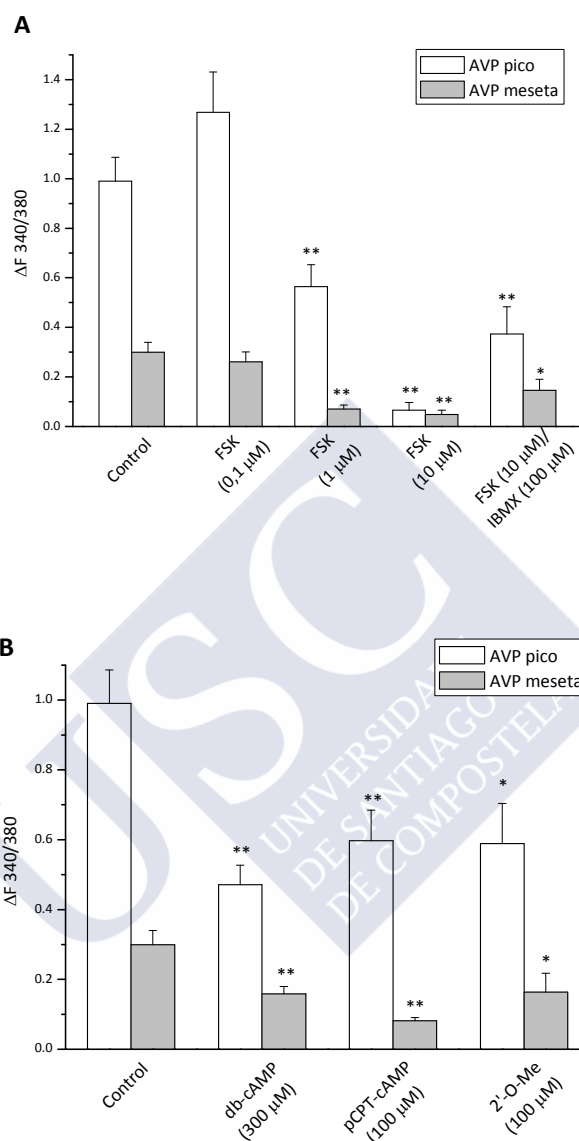


Figura 45. (A) Efecto de la preincubación con forskolina (FSK) y forskolina e IBMX sobre el incremento máximo de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) inducido por vasopresina (AVP 1 μM) en medio con Ca^{2+} en células A7r5. (B) Efecto de la preincubación con db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre el incremento máximo de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) inducido por vasopresina (AVP 1 μM) en medio con Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 8-12 células. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control correspondiente.

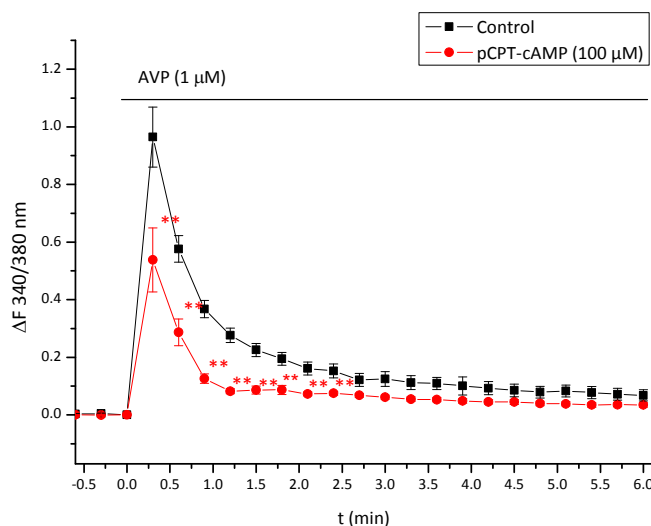


Figura 46. Efecto de la preincubación durante 30 min con pCPT-cAMP sobre la respuesta cálcica (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducida por vasopresina en medio con Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de al menos 11 células. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

2.2.2 Medio libre de Ca^{2+}

En medio libre de Ca^{2+} la vasopresina (1 μM) produjo un incremento del ratio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células A7r5 ($\Delta F_{340/380} = 0,55 \pm 0,03$, $n = 59$), que retornó a los niveles basales aproximadamente a los 3-5 min. El pico máximo se produjo en los primeros 5 s tras la adición del agonista. Esta respuesta fue significativamente menor ($p < 0,01$), tanto el pico inicial como la fase de meseta, que la obtenida en un medio con Ca^{2+} 2 mM (ver figura 47).

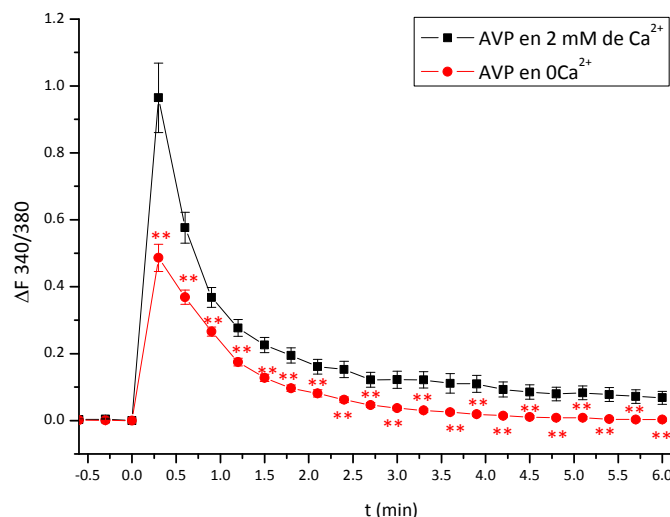


Figura 47. Registro representativo de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (expresado como $\Delta F_{340/380}$) de la respuesta a vasopresina (AVP 1 μ M) en medio 2 mM de Ca^{2+} y en medio libre de Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de, al menos, 26 células. ** $p < 0,01$ respecto a los datos obtenidos en medio 2 mM de Ca^{2+} .

La preincubación de las células durante 30 min con forskolina (0,1; 1 y 10 μ M) y forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M) inhibió significativamente la respuesta cálcica de la vasopresina ($\Delta F_{340/380} = 0,15 \pm 0,03$, $n = 19$ para forskolina (0,1 μ M); $0,05 \pm 0,02$, $n = 10$ para forskolina (1 μ M); $0,18 \pm 0,03$, $n = 8$ para forskolina (10 μ M) y $0,008 \pm 0,006$, $n = 8$ para forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M); $p < 0,01$ con respecto al control en ausencia de tratamiento).

Este efecto inhibitorio de la respuesta a vasopresina fue reproducido por db-cAMP (300 μ M), pCPT-cAMP (100 μ M) y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μ M) ($\Delta F_{340/380} = 0,19 \pm 0,05$, $n = 12$ para el db-AMPC; $0,16 \pm 0,05$, $n = 10$ para el pCPT-cAMP; $0,21 \pm 0,09$, $n = 7$ para el pCPT-2'-O-Me-cAMP; $p < 0,01$ con respecto al control en los tres casos) (figura 48).

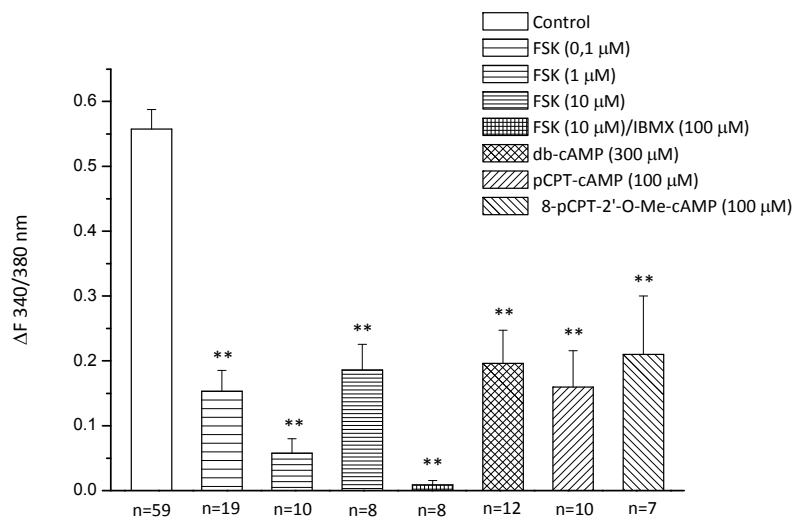


Figura 48. Efecto de la preincubación con forskolina; forskolina e IBMX, db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre el incremento máximo de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) inducido por vasopresina en medio libre de Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de, al menos, 8 células. ** $p < 0,01$ respecto al control.

2.3 Efecto de los agentes que incrementan el AMPc y de activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la reentrada de Ca^{2+} inducida por vasopresina

En células A7r5, tras inducir una depleción de reservorios intracelulares de Ca^{2+} con AVP en medio libre de Ca^{2+} , como se describe en el apartado anterior, la reintroducción de medio conteniendo 2 mM de Ca^{2+} provocó un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que se corresponde con la denominada entrada de Ca^{2+} activada por depleción de reservorios (SOCE) o entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE), que alcanza su máximo a los 3 min ($\Delta F_{340/380} = 0,31 \pm 0,04$, $n = 31$) y posteriormente desciende hasta estabilizarse a los 20 min aproximadamente.

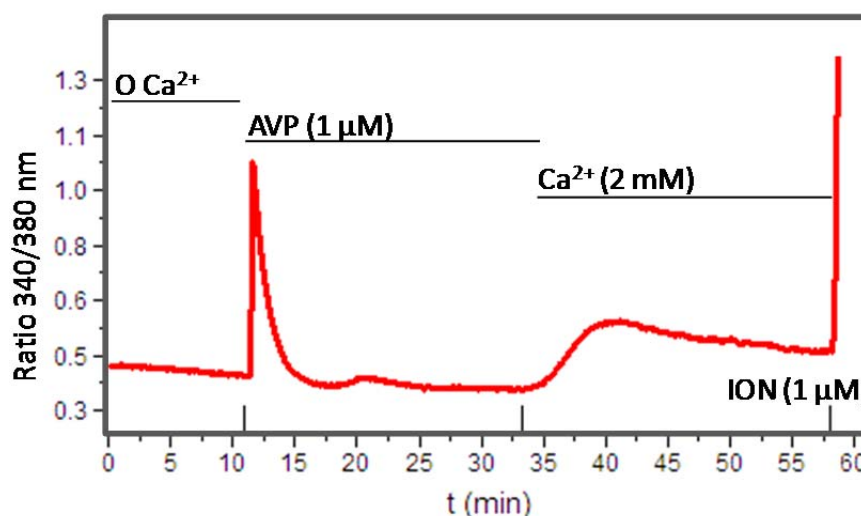


Figura 49. Registro representativo de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (expresado como $F_{340/380}$) en una célula A7r5 en medio libre de Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con vasopresina (AVP), posterior reintroducción de Ca^{2+} en el medio y adición de ionomicina (ION) al final del experimento.

En estas condiciones, la preincubación con forskolina ($1 \mu M$) durante 10 min no modificó significativamente la máxima reentrada de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380} = 0,34 \pm 0,13$, $n = 9$; $p > 0,05$ con respecto al control). El pretratamiento con forskolina ($10 \mu M$)/IBMX ($100 \mu M$) disminuyó significativamente la máxima reentrada de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380} = 0,09 \pm 0,01$, $n = 6$; $p < 0,01$ respecto al control; figura 49). El pretratamiento con db-cAMP ($100 \mu M$) no modificó significativamente la magnitud de dicha reentrada ($\Delta F_{340/380} = 0,35 \pm 0,02$, $n = 7$; $p > 0,01$ respecto al control sin tratamiento; figura 51).

El tratamiento con pCPT-cAMP ($100 \mu M$) y con 8-pCPT- 2'-O-Me-cAMP ($100 \mu M$) no modificó significativamente la reentrada de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380} = 0,33 \pm 0,02$, $n = 12$; $p > 0,05$ y $0,23 \pm 0,03$, $n = 9$; $p > 0,05$ respecto al control, respectivamente).

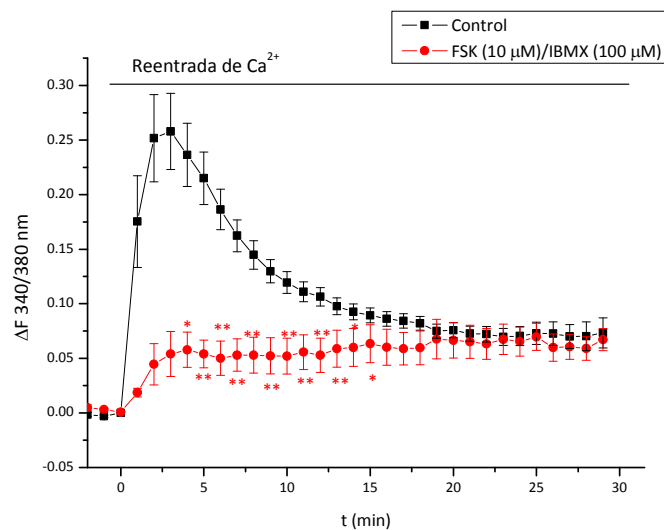


Figura 50. Efecto de la preincubación durante 10 min con forskolina (FSK) e IBMX sobre la respuesta cálcica (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducida por depleción de reservorios con vasopresina ($1 \mu\text{M}$) y posterior reentrada de Ca^{2+} en células A7r5. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 células. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

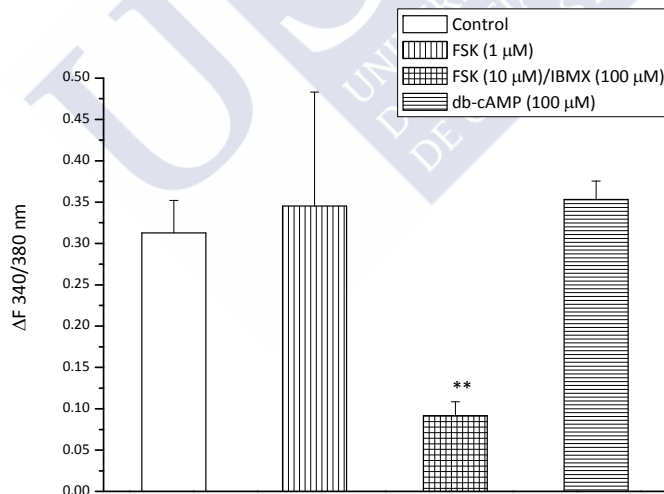


Figura 51. Efecto de la preincubación durante 10 min con forskolina (FSK); forskolina/IBMX y db-cAMP sobre el máximo incremento de $[\text{Ca}^{2+}]$ (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducido por depleción de reservorios con vasopresina ($1 \mu\text{M}$) y posterior reentrada de Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de, al menos, 6 células. ** $p < 0,01$ respecto al control.

2.4 Efecto de los agentes que incrementan el AMPc y de activadores de las proteínas PKA y Epac sobre la respuesta de la tapsigargina

En medio libre de Ca^{2+} , la aplicación de tapsigargina ($0,5 \mu\text{M}$) produjo un incremento del ratio de Ca^{2+} ($\Delta F_{340/380}$) en células A7r5, que regresó a línea basal tras aproximadamente 20-25 min. El valor máximo se alcanzó, aproximadamente, a los 7 min desde el comienzo de la acción ($\Delta F_{340/380} = 0,10 \pm 0,02$, $n = 34$).

La preincubación de las células durante 30 min con forskolina ($0,1$, 1 y $10 \mu\text{M}$) y forskolina ($10 \mu\text{M}$)/IBMX ($100 \mu\text{M}$) inhibió significativamente la respuesta cálcica de la tapsigargina ($\Delta F_{340/380} = 0,03 \pm 0,01$, $n = 10$ para forskolina ($0,1 \mu\text{M}$); $p < 0,05$ frente al control; $0,024 \pm 0,006$, $n = 14$ para forskolina ($1 \mu\text{M}$); $0,008 \pm 0,005$, $n = 8$ para forskolina ($10 \mu\text{M}$) y $0,014 \pm 0,004$, $n = 8$ para forskolina ($10 \mu\text{M}$)/IBMX ($100 \mu\text{M}$); $p < 0,01$ con respecto al control en ausencia de tratamiento) (figura 52).

Este efecto fue reproducido por el db-cAMP ($300 \mu\text{M}$) ($\Delta F_{340/380} = 0,02 \pm 0,009$, $n = 12$), pCPT-cAMP ($100 \mu\text{M}$) ($\Delta F_{340/380} = 0,005 \pm 0,004$, $n = 10$) y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP ($100 \mu\text{M}$) ($\Delta F_{340/380} = 0,037 \pm 0,008$, $n = 12$); $p < 0,01$ con respecto al control en los tres casos (figura 52).

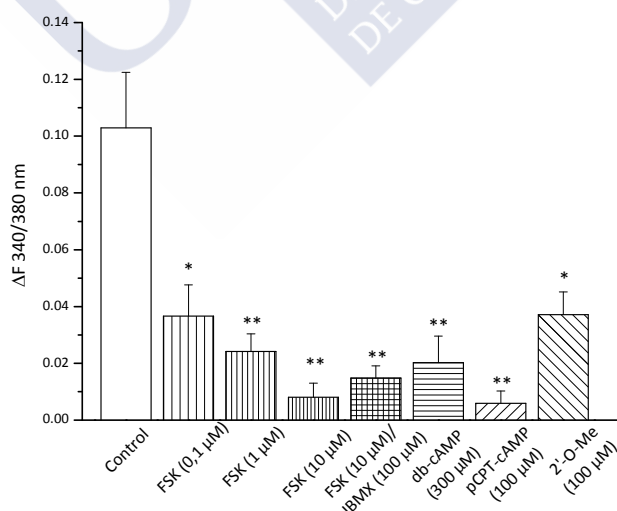


Figura 52. Efecto de la preincubación con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP, pCPT-cAMP y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta F_{340/380}$) inducido por tapsigargina (TP) en medio libre de Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de, al menos, 8 células. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

El cambio de medio 50Ca^{2+} a SN después de la aplicación de tapsigargina ($0,5\ \mu\text{M}$) indujo entrada capacitativa de Ca^{2+} en un 91,3% de las células, con un valor máximo de $\Delta F_{340/380} = 0,27 \pm 0,06$, $n = 23$ a los 3 min y estabilización al cabo de 25 min.

En estas condiciones, la preincubación con forskolina ($10\ \mu\text{M}$)/IBMX ($100\ \mu\text{M}$) durante 10 min, anterior a la reintroducción de Ca^{2+} en el medio disminuyó significativamente el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por depleción de reservorios con tapsigargina ($\Delta F_{340/380} = 0,034 \pm 0,008$, $n = 4$; $p < 0,05$ respecto al control sin tratamiento) (figura 53).

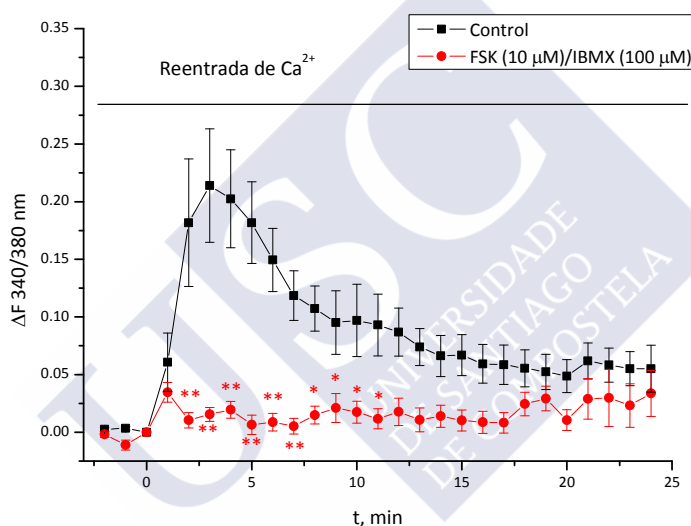


Figura 53. Efecto de 10 min de con forskolina (FSK) /IBMX sobre la respuesta cálcica (expresada como $\Delta F_{340/380}$) inducida por depleción de reservorios con tapsigargina ($0,5\ \mu\text{M}$) y posterior reentrada de Ca^{2+} en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 4 células. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

El tratamiento con db-cAMP ($100\ \mu\text{M}$) no modificó significativamente el aumento máximo de Ca^{2+} inducido por CCE ($\Delta F_{340/380} = 0,15 \pm 0,08$, $n = 4$) pero sí disminuyó de forma significativa el % de células que respondieron (66% frente a $\sim 90\%$ en los controles).

3 Efecto sobre la producción de AMPc en tiempo real

Las imágenes de las células A7r5 y RASMC, transfectadas con la sonda epac1-camps y epac2-camps, obtenidas con el microscopio de fluorescencia muestran una distribución citoplasmática de la sonda (figura 56).

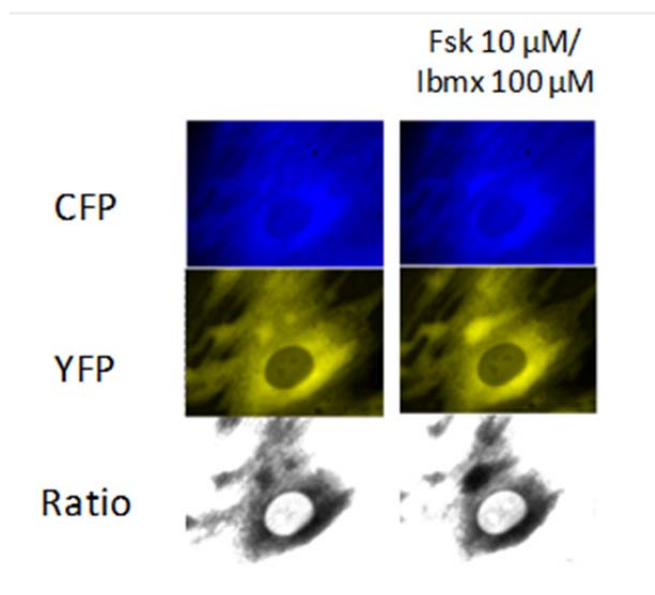


Figura 54. Imágenes digitalizadas de FRET de los efectos de una concentración maximal estimulante con forskolina (10 μM)/IBMX (100 μM) en células RASMC 48 h post-transfección con la sonda Epac1-camps.

En las células A7r5 transfectadas, el tratamiento con forskolina (10 μM)/IBMX (100 μM) produjo un aumento sostenido de la $[AMPc]_i$ (expresado como descenso del ratio $YFP/CFP = -0,25 \pm 0,02$, $n = 4$), que alcanza su máximo aproximadamente a los 10 min y se mantiene estable durante al menos 30 minutos (figura 56). En las células tratadas con forskolina (1 μM) y forskolina (10 μM) no se han producido variaciones significativas de la $[AMPc]_i$ ($0,04 \pm 0,005$, $n = 2$ y $0,05 \pm 0,007$, $n = 3$; $p > 0,05$ respectivamente).

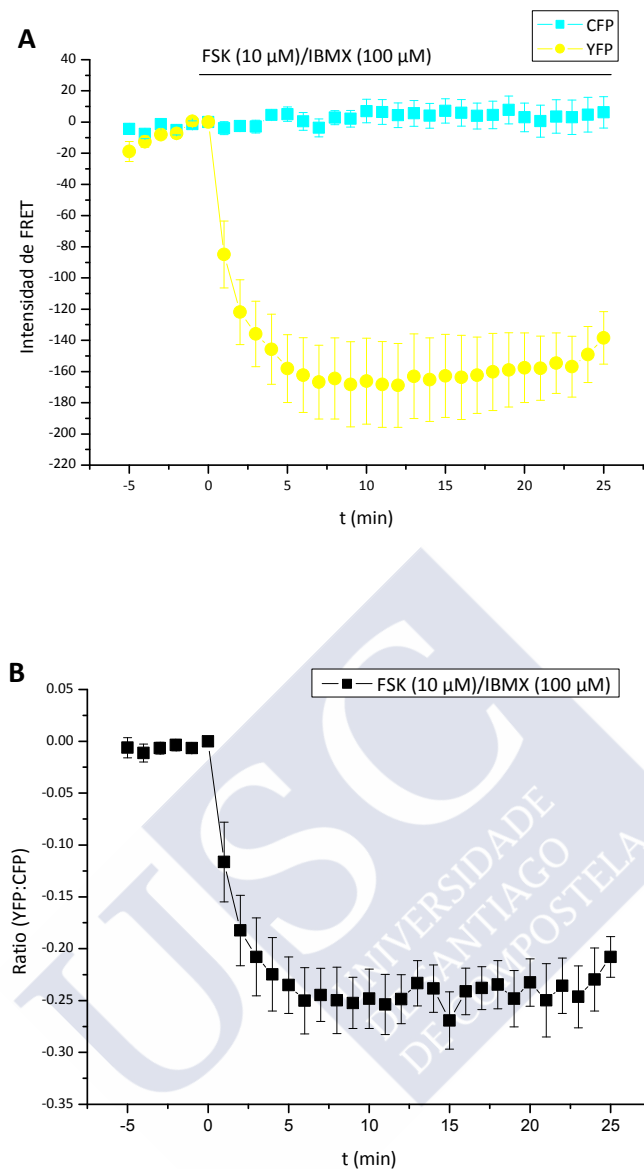


Figura 55. Registro representativo de los cambios en la intensidad (A) y en el ratio de FRET (B) medidos con la sonda Epac1-camps en respuesta a una estimulación con forskolina (FSK)/IBMX en células A7r5.

4 Efectos sobre la expresión de proteínas

4.1 Expresión de proteínas PKA y Epac en miocitos vasculares

Mediante estudios de amplificación por rt-PCR se ha estudiado la presencia de proteínas diana del AMPc en miocitos vasculares (células A7r5 y RASMC). Con el empleo de cebadores específicos se han amplificado secuencias específicas para los genes PKA RII α , Epac-1, Epac-2 y β -actina (figura 57).

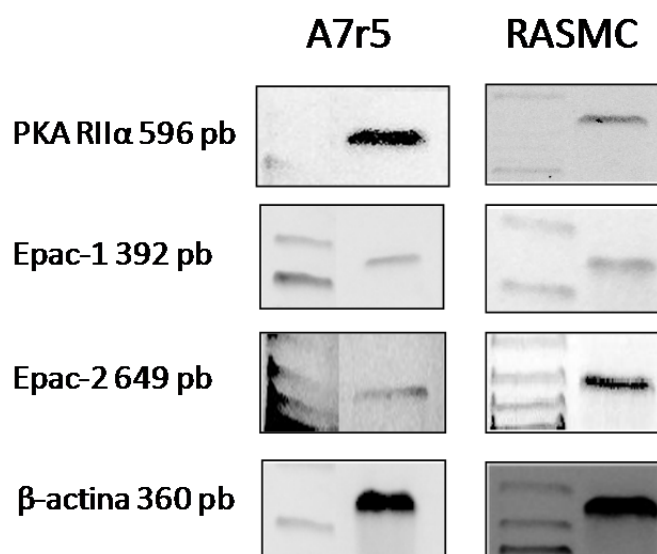


Figura 56. Geles de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de un fragmento de los genes PKA RII α , Epac 1, Epac 2 y β -actina de células A7r5 y RASMC.

4.2 Efecto del tratamiento de 24 h con fármacos que aumentan el AMPc sobre la expresión de las proteínas PKA y Epac

En esta serie de experimentos se evaluó el efecto del tratamiento durante 24 h con forskolina (1 μ M), forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M), forskolina (10 μ M)/rolipram (100 μ M) y db-cAMP (100 μ M) en los niveles de expresión de la subunidad reguladora de la PKA (RII α) en lisados celulares de A7r5 mediante técnicas estandarizadas de *western blot* (ver *blot* representativo en figura 59).

La intensidad de las bandas de las proteínas marcadas con el correspondiente anticuerpo se cuantificó considerando el nivel de PKA basal como el valor de

referencia 1. Así, los datos obtenidos para los diferentes tratamientos fueron: control (1, n = 3); forskolina (1 μ M) ($0,79 \pm 0,11$, n = 3); forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M) ($0,66 \pm 0,01$, n = 3; $p < 0,01$ respecto al control); forskolina (10 μ M)/rolipram (100 μ M) ($0,74 \pm 0,1$, n = 3; $p < 0,05$) y db-cAMP (100 μ M) ($0,68 \pm 0,01$, n = 3; $p < 0,01$) (figura 60).

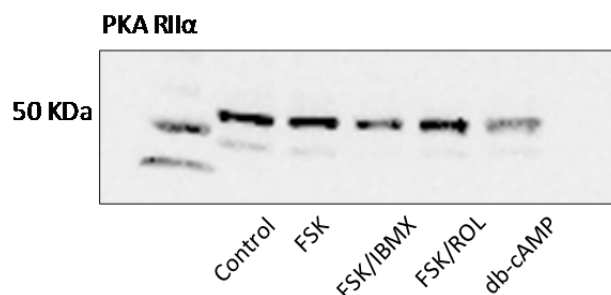


Figura 57. Western blot representativo de cantidades iguales de lisados de células A7r5 tratadas con forskolina (FSK 1 μ M), forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M), forskolina (10 μ M)/rolipram (ROL 100 μ M) y db-cAMP (100 μ M), durante 24 h, marcados con anticuerpo anti-PKA. La primera banda representa la proteína de 50 kDa del marcador de peso molecular.

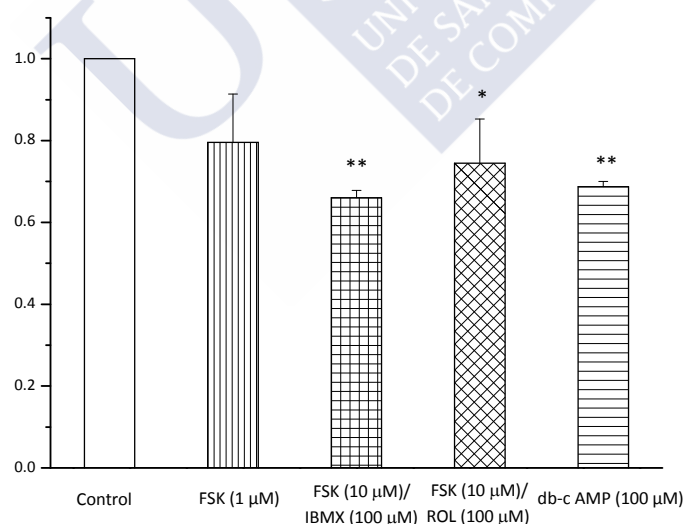


Figura 58. Efecto de 24 h de tratamiento con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, forskolina/rolipram (ROL) y db-cAMP (valores normalizados respecto a la intensidad de la banda control) sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la subunidad RII α de la PKA en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m (indicado por líneas verticales) de 3 experimentos; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control en ausencia de tratamiento.

Posteriormente, se procedió a la determinación de ARN codificante para la subunidad RII α de la PKA en células A7r5. Para ello se aisló el ARN total de las muestras mediante un sistema de columnas de intercambio iónico. Tras la retrotranscripción se procedió a la amplificación de un fragmento del gen de PKA-RII α con el fin de cuantificar los niveles de ARNm codificante para PKA RII α . Para ello se diseñaron *primers* específicos para una secuencia común al ADNc de las especies (*R. norvegicus* y *H. sapiens*). Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa mediante electroforesis según lo descrito en el apartado 6 de Material y Métodos (figura 61). Las intensidades de las bandas obtenidas mediante RT-PCR están normalizadas considerando el nivel de ARN de PKA RII α basal como el valor de referencia 1 (figura 62).

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión proteica (*western blot*) están en concordancia con los resultados obtenidos mediante RT-PCR. Ambos, en conjunto, indican que las células A7r5 expresan constitutivamente la proteína PKA RII α y que además, el tratamiento durante 24 h con forskolina (1 μ M), forskolina (10 μ M)/IBMX (100 μ M), db-cAMP (100 μ M), 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μ M) y pCPT-cAMP (100 μ M) disminuye los niveles de expresión de dicha proteína.

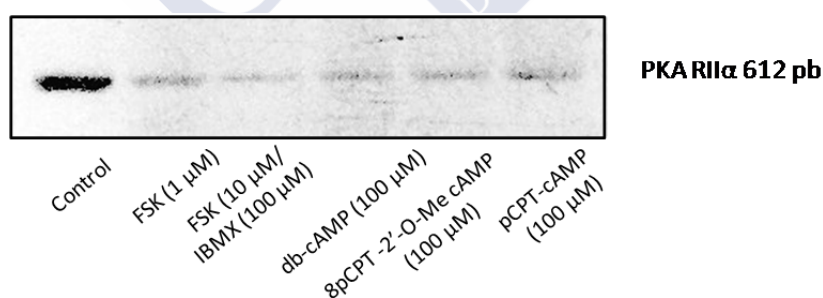


Figura 59. Gel de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de un fragmento de 612 pb del gen PKA RII α de células A7r5 tratadas con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP y pCPT-cAMP durante 24 h.

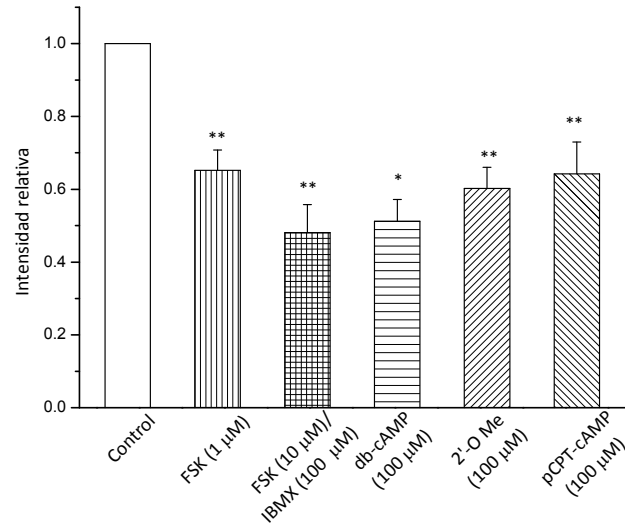


Figura 60. Niveles relativos de expresión de PKA RII α en células A7r5 tras 24 h de tratamiento con forskolina (FSK), forskolina/IBMX, db-cAMP, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP y pCPT-cAMP (valores normalizados respecto a la intensidad de la banda control). Cada barra representa la media \pm e.e.m (indicado por líneas verticales) de 3 experimentos; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control en ausencia de tratamiento.

5 Estudios de *patch-clamp*

Se empleó la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera para analizar la corriente de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) y los canales de K^+ (I_{K}) y sus variaciones en respuesta a diferentes tratamientos en células A7r5.

5.1 Efecto de la forskolina y de los activadores de la PKA y Epac sobre las corrientes de Ca^{2+} tipo L en células A7r5

Diferentes concentraciones de forskolina (1-10 μM) activaron la $I_{\text{Ca,L}}$ basal (expresado como % de activación) ($16,8 \pm 6,0\%$, $n = 10$; $9,8 \pm 6,2\%$, $n = 15$; $6,8 \pm 3,1\%$, $n = 16$ respectivamente) (figura 63).

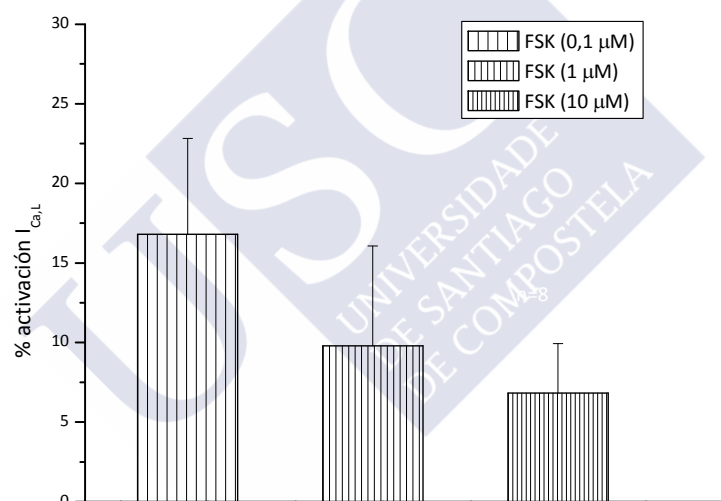


Figura 61. Efecto de la forskolina (FSK) en la $I_{\text{Ca,L}}$ basal en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de, al menos, 9 experimentos expresados como % de inhibición de la $I_{\text{Ca,L}}$.

Concentraciones crecientes de pCPT-cAMP (0,1; 1 y 10 μM) inhibieron esta corriente de forma significativa (expresado como % de inhibición) ($9,17 \pm 2,08\%$, $n = 4$; $12,62 \pm 2,03\%$, $n = 4$ y $15,02 \pm 3,62\%$, $n = 4$ respectivamente) (figura 64), mientras que la aplicación de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (0,1; 1 y 10 μM) no modificó significativamente la corriente (datos no mostrados).

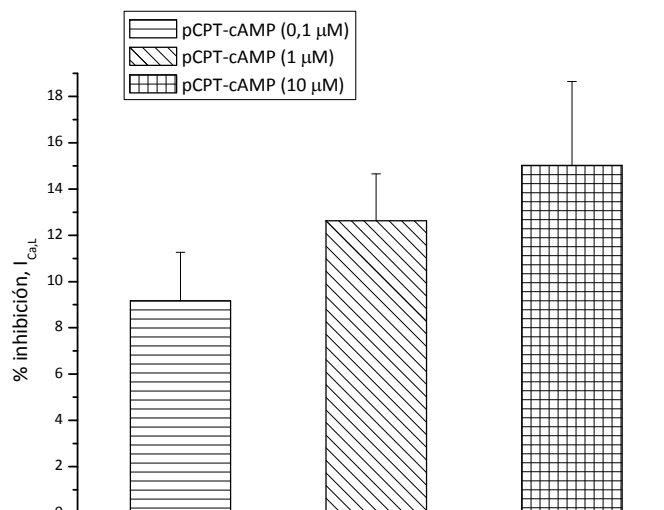


Figura 62. Efecto de pCPT-cAMP en la $I_{Ca,L}$ basal en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 4 experimentos, expresados como % de inhibición de la $I_{Ca,L}$.

5.2 Efecto sobre las corrientes de K^+ en células A7r5

El tratamiento de las células con diferentes concentraciones de forskolina (0,1; 1 y 10 μ M) activó la I_K basal en células A7r5 (% de activación: $18,9 \pm 13,2\%$, $n = 12$; $40,0 \pm 13,3\%$, $n = 9$ y $39,5 \pm 12,1\%$, $n = 6$ respectivamente) (figura 65).

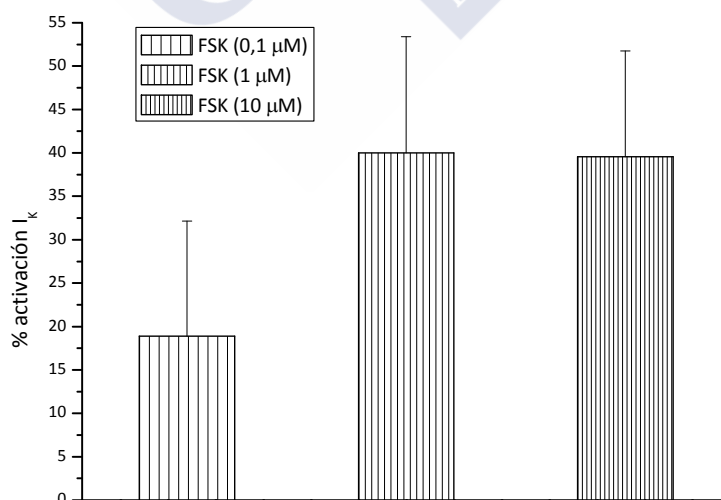


Figura 63. Efecto de la forskolina (FSK) en la I_K basal en células A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de, al menos, 6 experimentos, expresados como % de inhibición de la $I_{Ca,L}$.

6 Efectos sobre la producción de AMPc en cultivos celulares

En esta serie de experimentos se evaluó la $[AMPc]_i$ por enzimoimmunoensayo en RASMC. La $[AMPc]_i$ basal fue de $27,2 \pm 9,6$ fmol/pocillo ($n = 8$). Este valor no se vio afectado por el tratamiento con forskolina ($0,1 \mu M$) ($39,0 \pm 7,5$ fmol/pocillo, $n = 8$; $p > 0,05$) aunque fue significativamente aumentado tras el tratamiento con forskolina ($10 \mu M$) ($94,2 \pm 24,6$ fmol/pocillo, $n = 8$, $p < 0,05$).

EL rolipram ($100 \mu M$, $1 mM$) no modificó la $[AMPc]_i$ basal, pero potenció significativamente el incremento inducido por la forskolina cuando fueron administrados conjuntamente ($[AMPc]_i$ en fmol/pocillo: $96,8 \pm 17,3$ para forskolina ($0,1 \mu M$) y $186,4 \pm 73,8$ para forskolina ($10 \mu M$) en presencia de rolipram ($100 \mu M$); $668,2 \pm 107,3$ para forskolina ($0,1 \mu M$) y $926,8 \pm 91,0$ para forskolina ($10 \mu M$) en presencia de rolipram ($1 mM$), $n = 8$ en todos los casos; $p < 0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ausencia de rolipram (figura 66).

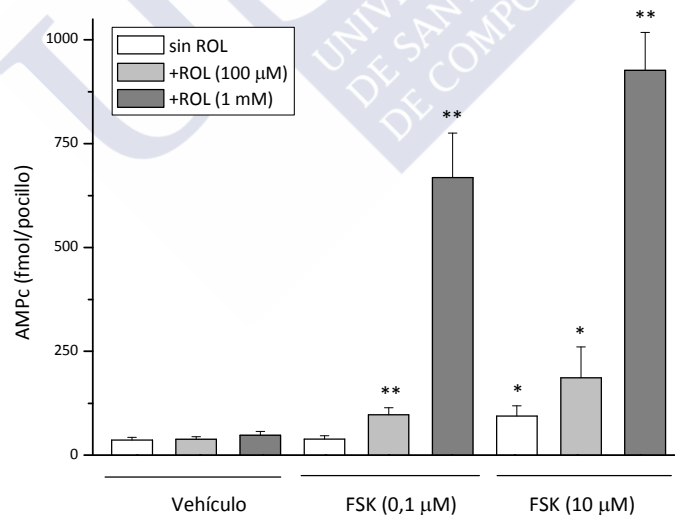


Figura 64. Medida de la $[AMPc]_i$ en RASMC por enzimoimmunoensayo. El aumento de la $[AMPc]_i$ inducido por la forskolina es potenciado en presencia del inhibidor de la PDE4 rolipram. Cada barra representa la media \pm e.e.m. (indicado por líneas verticales) de 8 experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al resultado en ausencia de rolipram.

Una preincubación de 10 min con fenilefrina (1 μ M) no modificó significativamente la $[AMPC]_i$ basal en RASMC. La subsiguiente adición de rolipram (100 μ M, 1 mM) aumentó significativamente la $[AMPC]_i$ ($[AMPC]_i$ en fmol/pocillo: $71,3 \pm 15,8$ y $128,9 \pm 44,2$ respectivamente, $n = 8$; $p < 0,05$ en ambos casos). Tras 10 min en presencia de fenilefrina (1 μ M), la adición de forskolina (0,1 μ M, 1 μ M) aumentó significativamente la $[AMPC]_i$ ($[AMPC]_i$ en fmol/pocillo: $120,2 \pm 81,0$, $n = 8$ y $491,4 \pm 96,5$, $n = 7$ respectivamente; $p < 0,01$ respecto al valor basal en ausencia de fenilefrina en ambos casos) (figura 67). Además, una preincubación de 10 min con fenilefrina (1 μ M) potenció significativamente los incrementos de la $[AMPC]_i$ inducidos por la combinación de rolipram (100 μ M) y forskolina (0,1 μ M) cuando fueron administrados conjuntamente ($228,1 \pm 65,0$ fmol/pocillo, $n = 8$; $p < 0,01$).

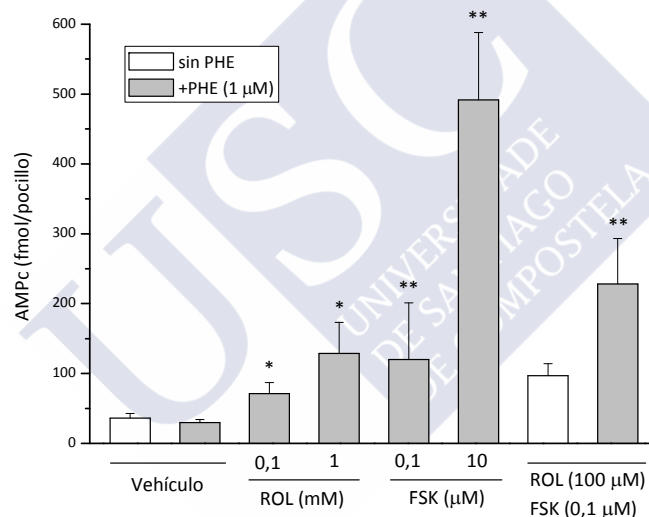


Figura 65. Medida de la $[AMPC]_i$ en RASMC por enzimoimmunoensayo. En presencia de fenilefrina (PHE, 1 μ M), el rolipram (ROL) induce un incremento significativo de la $[AMPC]_i$, y el incremento de la $[AMPC]_i$ inducido por forskolina (FSK) o por rolipram + forskolina está aumentado significativamente. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 8 experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al resultado en ausencia de fenilefrina.

Una preincubación de 10 min con SB-203580 (10 μ M) no modificó significativamente los niveles de AMPC basales o aumentados por la forskolina ($[AMPC]_i$ en fmol/pocillo tras tratamiento con SB-203580: $18,9 \pm 10,7$ en células tratadas con el vehículo; $36,3 \pm 13,7$ en células tratadas con forskolina (0,1 μ M) y

88,0 ± 19,6 en células tratadas con forskolina (10 μM), n = 6; $p > 0,05$ respecto al control en ausencia de SB-203580 en los tres casos) (figura 68).

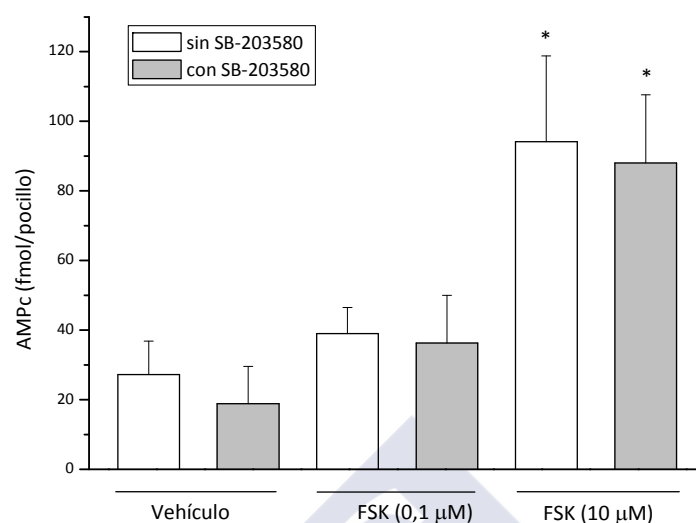


Figura 66. Medida de la $[AMPC]_i$ en RASMC por enzimoimmunoensayo. El pretratamiento de las células con SB-203580 (10 μM) no modificó significativamente la $[AMPC]_i$ basal o en presencia de forskolina (FSK). Cada barra representa la media ± e.e.m. de 8 experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al resultado en ausencia de fenilefrina.





Discusión



El incremento de los niveles intracelulares de AMPc ($[AMPc]_i$) desempeña un papel destacado en la mediación de la relajación del músculo liso vascular en respuesta a diversos agentes vasodilatadores. Sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales este segundo mensajero inhibe la contracción muscular. A pesar de que durante muchos años se creía que la vasorrelajación inducida por AMPc era independiente de la presencia de un endotelio funcional, hoy en día se acepta de modo general que el endotelio también participa en dicho efecto (Ferro *et al.*, 2004; Queen *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2003; Zieba *et al.*, 2011). En el presente trabajo hemos intentado profundizar en el conocimiento de su efecto vasodilatador directo, independiente de endotelio, para cuya explicación se han propuesto diversas hipótesis (Akata, 2007; Bruce *et al.*, 2003; Morgado *et al.*, 2012; ver Revisión Bibliográfica):

- Una activación de ciertos tipos de canales de K^+ , entre ellos los BK_{Ca} (Hiramatsu *et al.*, 1994; Savaria *et al.*, 1992; White *et al.*, 2000) o los K_{ATP} (Schubert *et al.*, 1997; Waldron y Cole, 1999).
- Una disminución de la $[Ca^{2+}]_c$, bien por inhibición de su liberación desde depósitos intracelulares (Chen y Rembold, 1996; Yang *et al.*, 1999) o de su entrada a través canales transmembrana (Ishikawa *et al.*, 1993; Orlov, *et al.*, 1996), bien por incremento de su secuestro hacia dichos reservorios (Itoh *et al.*, 1982; Lincoln y Cornwell, 1991) o su extrusión hacia el espacio extracelular (Karashima *et al.*, 2007).
- Una disminución de la sensibilidad de los filamentos contráctiles a la $[Ca^{2+}]_c$ (Nishimura y van Breemen, 1989; Ushio-Fukai *et al.*, 1993), aunque se ha sugerido que solamente una pequeña fracción de la relajación con nucleótidos cíclicos o forskolina en la aorta de rata es debida a una acción de dichos agentes a nivel de la maquinaria contráctil de las células (McMahon y Paul, 1986).

La relevancia fisiológica de uno u otro mecanismo parece variar en función del modelo vascular estudiado (Bugrim, 1999; Taguchi *et al.*, 1997) e incluso, para una misma preparación vascular, del estímulo desencadenante de la vasoconstricción previa (Santos-Silva *et al.*, 2008).

1 Efectos de agentes que incrementan la $[AMPC]_i$ sobre la contracción del músculo vascular en medio con Ca^{2+} externo.

En presencia de Ca^{2+} extracelular (1,5 mM), la forskolina relajó los anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio precontraídos con fenilefrina con una potencia de orden nM ($IC_{50} = 87,9$ nM), mayor que la descrita previamente por Delpy *et al.* (1996) o Kamata *et al.* (1989) y con una potencia similar a la descrita en anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina (Delpy *et al.*, 1996), noradrenalina (Sukhanova *et al.*, 2006) o con una elevada concentración de K^+ (Elgoyhen *et al.*, 1992; Silver *et al.*, 1985). Esta potencia vasorrelajante fue confirmada por nuestra serie de experimentos en los que la contracción de los anillos de aorta inducida por la fenilefrina fue reducida aproximadamente a la mitad tras 10 min de preincubación de las preparaciones con forskolina (100 nM).

Aunque de modo general es aceptado que este efecto es mediado por la capacidad de la forskolina para incrementar $[AMPC]_i$ (Insel y Ostrom, 2003; Rembold y Chen, 1998), se ha sugerido que las acciones vasodilatadoras directas de este agente podrían ser debidas a la inhibición de ciertas proteínas transportadoras o de canales iónicos en la membrana plasmática por un mecanismo independiente de la producción de AMPC (Laurenza *et al.*, 1989). De acuerdo con esta última hipótesis, la forskolina (100 nM), que relajó los anillos de aorta precontraídos con fenilefrina en un 44%, no produjo por sí sola incrementos significativos de la $[AMPC]_i$ en las células RASMC en los experimentos de enzimoimmunoensayo. Sin embargo, aunque no se puede descartar la participación de otros mecanismos adicionales, la vasorrelajación observada en el presente trabajo sí parece mediada principalmente por un incremento en los niveles de $[AMPC]_i$ puesto que:

i) Hemos demostrado, por vez primera, que bajas concentraciones de forskolina (100 nM) incrementan de forma significativa los niveles basales de AMPC únicamente en presencia (pero no en ausencia) de fenilefrina, la cual no modifica la $[AMPC]_i$ por sí misma, o de rolipram. En concordancia, Galindo *et al.* (2001) demostraron que en anillos de aorta torácica de rata incubados con fenilefrina, la forskolina (300 nM) provocaba un incremento significativo de la $[AMPC]_i$. Sin

embargo, no nos consta la existencia de resultados que indiquen los efectos de dosis de forskolina inferiores a 1 μM en preparaciones de células vasculares aisladas. De hecho, en los experimentos de enzimoimmunoensayo, la forskolina suele ser empleada a concentraciones $>1 \mu\text{M}$ como fármaco de referencia para comprobar la efectividad de los ensayos (ver, por ejemplo, Lincoln *et al.*, 1990 o Lim *et al.* 2008, que emplean 10 μM forskolina en RASMC y A7r5, respectivamente).

ii) Los efectos vasorrelajantes de la forskolina descritos aquí pueden ser reproducidos por la administración de db-AMPC, un análogo no hidrolizable del AMPC. Al igual que sucedía con la forskolina, el efecto del db-cAMP sobre preparaciones precontraídas fue reproducido con similar potencia cuando las preparaciones fueron preincubadas con este agente previamente a la inducción de la contracción. Además, tanto los efectos de la forskolina como los del db-AMPC fueron afectados de modo similar por el rolipram, el SB-203580, la nifedipina, el verapamilo o los bloqueantes de canales de K^+ .

iii) El rolipram, un inhibidor selectivo de la PDE4 que degrada AMPC de modo selectivo (Schwabe *et al.*, 1976), no modificó las contracciones por fenilefrina, pero potenció de forma significativa las relajaciones inducidas por la forskolina y el db-AMPC. Se había descrito previamente que la actividad de la PDE4 no es relevante para la regulación de la contractilidad del músculo liso de la aorta de rata, ya que el rolipram no relaja las contracciones inducidas por noradrenalina o por elevada concentración de K^+ en anillos de aorta desprovistos de endotelio (Noguera *et al.*, 2001). En conjunto, nuestros resultados sugieren que el papel de la PDE4 en la regulación de la contractilidad del músculo liso de aorta de rata no es relevante para la $[\text{AMPC}]_i$ basal. Sin embargo, cuando la $[\text{AMPC}]_i$ se incrementa, la actividad de la PDE4 podría aumentar, actuando así como un mecanismo compensatorio para acelerar la degradación del AMPC y contrarrestando de ese modo su actividad vasodilatadora. Este incremento en la actividad de la PDE4 parece ser independiente de los incrementos en la expresión de la PDE4 detectada en células vasculares musculares lisas y endoteliales tras un aumento sostenido de la $[\text{AMPC}]_i$ (Campos-Toimil *et al.*, 2008; Maurice, 1998) y podría estar relacionado con una

fosforilación dependiente de la PKA que puede incrementar la actividad de la PDE4 (Liu y Maurice, 1999; Sette *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos en los experimentos de enzimoimmunoensayo confirman que el rolipram no induce por sí mismo un incremento de la $[AMPc]_i$ basal, lo que es indicativo de que las RASMC no poseen una actividad AC basal muy importante. A pesar de ello, el rolipram potenció de forma significativa los incrementos de la $[AMPc]_i$ inducidos por la forskolina. En concordancia con los resultados obtenidos en órgano aislado, esta potenciación fue más elevada en las RASMC pretratadas con fenilefrina, aunque como ya hemos comentado, tampoco este agonista incrementó los niveles basales de AMPc por sí mismo.

Curiosamente, el rolipram también indujo un incremento de la $[AMPc]_i$ en presencia de fenilefrina. A partir de estos resultados no podemos deducir el mecanismo por el cual la fenilefrina potencia los incrementos de AMPc inducidos tanto por el rolipram como por la forskolina, aunque estudios previos habían sugerido que la activación de adrenoceptores α_1 podría potenciar los incrementos de la $[AMPc]_i$ inducidos por diversos estímulos (Etgen y Petitti, 1987; LeSage *et al.*, 2004). Un efecto de este tipo podría ser mediado por la activación de la PKC (Ho *et al.*, 1988).

Estudios previos habían sugerido que la inhibición de la PDE4 puede inducir la relajación de diversas preparaciones vasculares de modo independiente del endotelio. Por ejemplo, los inhibidores selectivos de la PDE4, denbufilina y rolipram, relajan la arteria basilar canina precontraída con U-46619, un análogo del tromboxano (Willette *et al.*, 1999). Además, el rolipram relaja de modo significativo las arterias umbilicales humanas precontraídas con histamina y potencia la relajación inducida por la forskolina en la misma preparación (Santos-Silva *et al.*, 2008). Un efecto similar ha sido descrito para el Ro 20-1724, un inhibidor selectivo de la PDE4, que da lugar a una potenciación de la relajación inducida por la forskolina en diversas preparaciones de músculo liso no vascular (Muller y Baer, 1983).

En cualquier caso, el presente estudio es el primero en demostrar que una inhibición de la PDE4 potencia el efecto vasodilatador directo de los agentes que

elevan la $[AMPC]_i$ en el músculo liso vascular de la aorta de rata. Esto contrasta con las conclusiones obtenidas por Noguera *et al.* (2001) quienes descartaron una participación de la PDE4 en la relajación de la aorta.

1.1 Papel de la p38 MAPK

Se ha demostrado que la ruta de la p38 MAPK está implicada en la contracción del músculo liso vascular (Bao *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2008). En la aorta de rata, el SB-203580, un inhibidor selectivo de la p38 MAPK, reduce el efecto contráctil de la endotelina 1 (Park *et al.*, 2003) y de la angiotensina II (Meloche *et al.*, 2000) en preparaciones desprovistas de endotelio. Además, tanto la forskolina como el db-cAMP reducen la fosforilación de la p38 MAPK inducida por la trombina en el modelo celular A10, procedente de músculo liso de aorta torácica de rata (Nakajima *et al.*, 2005).

Nuestros resultados sugieren que la p38 MAPK no está implicada en la contracción inducida por la fenilefrina en los anillos de aorta de rata, puesto que su inhibición con SB-203580 no modificó dicha contracción. Sin embargo, los efectos vasodilatadores inducidos por los agentes que elevan los niveles de AMPc en los anillos de aorta precontraídos con fenilefrina fueron potenciados en presencia de dicho inhibidor de la p38 MAPK.

Esta es, a nuestro entender, la primera vez que se describen los efectos de la inhibición de la p38 MAPK sobre los efectos vasodilatadores del AMPc. En base a nuestros resultados, creemos que la activación de la p38 MAPK podría contrarrestar, al menos en parte, la relajación mediada por el AMPc a través de un mecanismo que no está relacionado con la contracción inducida por el propio agonista, pero que podría interferir de algún modo en la señalización posterior al incremento de AMPc, ya que el SB-203580 no modificó la $[AMPC]_c$ basal o su incremento tras la aplicación de forskolina. De todos modos, se necesitarán más experimentos para confirmar o rechazar esta posibilidad.

1.2 Papel de los canales de K⁺

Para estudiar la posible activación de canales de K⁺ por la forskolina en nuestro modelo experimental, llevamos a cabo diversos experimentos con bloqueantes selectivos de dichos canales.

La aplicación de caribdotoxina (bloqueante de canales de K⁺ tipo BK_{Ca} e IK), de apamina (bloqueante de canales de tipo SK), de la combinación de ambas o de glibenclamida (un bloqueante selectivo de los K_{ATP}) no modificó de forma significativa la contracción inducida por fenilefrina. Este hecho sugiere que, en nuestras preparaciones, no existen canales sensibles a estos fármacos que estén activados durante dicha contracción. Sin embargo conviene destacar que, aunque no significativo, el incremento de la contracción provocado por la glibenclamida alcanzó un porcentaje considerable (14%).

La relajación inducida por la forskolina o el db-cAMP no se vio afectada de modo significativo en presencia de la caribdotoxina o la apamina, sugiriendo que el efecto vasodilatador del AMPc no es mediado por la activación de canales BK_{Ca}, IK o SK. Estos resultados difieren de los obtenidos en diferentes preparaciones por otros investigadores: Ross y Yallampalli (2006), utilizando arteria mesentérica de rata, describieron un efecto vasodilatador independiente de endotelio para la adrenomedulina, mediado por la activación de los canales BK_{Ca} a través de un mecanismo dependiente de la activación de la PKA. Además, Haynes *et al.*, (1992) han demostrado que la forskolina puede relajar el músculo liso también por activación de los canales BK_{Ca} (aunque consideran que este efecto no estaba mediado por el AMPc).

Por otro lado, en presencia de glibenclamida, la relajación inducida por ambos agentes que incrementan el AMPc fue significativamente mayor que la observada en los controles. En contraste con nuestros resultados, estudios previos de otros autores sugieren que el efecto vasodilatador de la forskolina no es afectado por la glibenclamida en la aorta de rata desprovista de endotelio (Wilson y Clapp, 2002).

Una posible explicación para nuestros resultados podría ser que, durante la contracción con el agonista, existe un número limitado de canales de K_{ATP} en estado

cerrado susceptibles de ser activados por el incremento de AMPc, pero en presencia de la glibenclamida este número de canales estaría incrementado. De hecho, el efecto de los bloqueantes de canales K_{ATP} depende del estado de apertura en que se encuentre el canal, y que puede ser modificado por un agonista (Shi *et al.*, 2008). Así, el bloqueo producido por la glibenclamida, que es reversible sobre ciertos subtipos de canales K_{ATP} (Gribble *et al.*, 1998), podría ser contrarrestado por el AMPc. Apoya esta hipótesis el hecho de que en nuestros experimentos la glibenclamida tiende a potenciar la contracción por el agonista.

Un efecto activador del AMPc sobre los canales de K^+ en los miocitos de aorta de rata está apoyado por nuestros experimentos de electrofisiología, que confirman que la forskolina incrementa las corrientes a través de canales de K^+ en células A7r5. Dicho efecto podría estar mediado por la activación de proteínas Epac, que en neuronas de cerebelo de ratón moviliza Ca^{2+} intracelular provocando la activación de canales BKCa (Ster *et al.*, 2007).

1.3 Papel de diversos tipos de canales transmembrana permeables al Ca^{2+}

La contracción inducida por la fenilefrina en el músculo liso vascular es debida a la activación de receptores GPCR α_1 adrenérgicos y al subsiguiente incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ debido a la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares por la acción del IP_3 y a la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de diversos tipos de canales permeables a este ion, como son los canales de Ca^{2+} acoplados a un receptor, los canales catiónicos no selectivos activados por un agonista, los canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas y los canales de Ca^{2+} operados por depleción de reservorios responsables de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Docherty, 2010; Sanders, 2001). La participación de este último tipo de canales en la relajación inducida por el AMPc la discutiremos en el siguiente apartado.

En el presente trabajo, la inhibición total de los canales sensibles a nifedipina o verapamilo redujo en ~40% las contracciones inducidas por la fenilefrina, demostrando que los canales VOCC de tipo L participan en la contracción inducida por este agonista en la aorta de rata, tal y como se describió previamente para las

contracciones inducidas por noradrenalina (Hagiwara *et al.*, 1993), y en concordancia con nuestros resultados que muestran que la fase de meseta de la respuesta cálcica inducida por la angiotensina II es parcialmente inhibida por la nifedipina en miocitos de rata aislados (Campos-Toimil *et al.*, 2007). Es interesante resaltar que, una vez que la relajación inducida por ambos inhibidores de los VOCC se ha estabilizado, la contracción restante fue inhibida de modo casi completo por la forskolina. Si se considera como el 100% al total de la contracción inducida por fenilefrina, la relajación que provoca la forskolina fue similar a la que se puede medir en ausencia de los inhibidores de VOCC (~50% de la contracción total inducida por la fenilefrina).

Los resultados con nifedipina y verapamilo sugieren que el efecto vasorrelajante provocado por la forskolina (100 nM) no es mediado por una reducción en la entrada de Ca^{2+} externo a través de canales VOCC tipo L. El hecho de que la contracción inducida por despolarización con una elevada concentración de K^+ , que fue completamente inhibida por la nifedipina, sea relajada de forma significativa por la forskolina y el db-cAMP podría explicarse en base a que el efecto del AMPc podría tener lugar en un paso posterior, o una ruta diferente, a la de la modificación de la entrada de Ca^{2+} , por alguno de los mecanismos ya comentados (ver Revisión Bibliográfica).

Por otro lado, en nuestros experimentos de *patch clamp*, la forskolina activó VOCC de tipo L en las células A7r5, aunque con más potencia en las dosis inferiores. En la literatura existe gran controversia en lo referente a la acción del AMPc en los canales de Ca^{2+} de tipo L y a los mediadores que participan en dicha acción en el músculo vascular, y muchos resultados contradictorios han sido publicados (Keef *et al.*, 2001), por lo que debemos tener precaución a la hora de interpretar nuestros datos. Por ejemplo, otros autores también han encontrado efectos activadores del AMPc sobre canales VOCC de tipo L en células A7r5 (Marks *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 2000) o en células musculares lisas de aorta porcina (Fukumitsu *et al.*, 1990). A este efecto podría deberse, en parte, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal inducido por el AMPc en los miocitos vasculares observado en el presente trabajo y que se discute en el apartado 3.

Pero contrariamente a nuestros resultados, investigadores de la Universidad de Cincinnati liderados por el Dr. Sperelakis han mostrado, mediante experimentos de *patch clamp* en células A7r5, que el AMPc ejerce un efecto inhibitor directo sobre los canales VOCC de tipo L (Satoh y Sperelakis; 1995; Lorenz *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997) y sus resultados han sido corroborados por Orlov *et al.* (1996) midiendo la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en RASMC. También se ha sugerido que el AMPc no modifica directamente la actividad de este tipo de canales de Ca^{2+} mediante experimentos llevados a cabo en tiras de aorta de rata desprovistas de endotelio, midiendo los efectos de la forskolina o el db-cAMP en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Ahn *et al.*, 1992) o en preparaciones de músculo liso no vascular (Welling *et al.*, 1997; Ohya *et al.*, 1987). Finalmente, Ishikawa *et al.* (1993) han sugerido que la activación de la PKA por concentraciones bajas de AMPc induce incrementos modestos de la actividad de los canales de tipo L, mientras que el GMPc y las elevadas concentraciones de AMPc dan como resultado una inhibición de la actividad de estos canales por activación de la PKG.

En otra serie de experimentos, el ácido flufenámico ha sido empleado para evaluar la implicación de canales tipo TRP en la respuesta cálcica a la fenilefrina y en el posterior efecto relajante de la forskolina. Se ha descrito previamente que el ácido flufenámico es un posible inhibidor del flujo de Ca^{2+} a través de los subtipos de canales TRPC3 y TRPC7, aunque también se ha descubierto un papel activador del subtipo TRPC6 (Hill *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2002). Además, en el músculo liso vascular, el ácido flufenámico puede producir un bloqueo de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} y estimuladora de canales de K^+ de tipo BK o SK (Greenwood y Leblanc, 2007).

En nuestros experimentos, el ácido flufenámico inhibió en parte la contracción inducida con fenilefrina (~25%). En estas condiciones, la forskolina (100 nM) relajó la contracción residual con una mayor potencia que en los anillos control. Este hecho podría ser debido a la mencionada falta de especificidad del propio ácido flufenámico. Por ello, en presencia de este agente, estarían activados algunos canales o mecanismos involucrados en la contracción que no habían sido activados por la fenilefrina y que son sensibles a los incrementos de AMPc o a una

acción directa de la forskolina. Así, serán necesarios nuevos estudios para poder esclarecer cuál es la influencia real del AMPc sobre los canales de tipo TRP.

Con la idea de bloquear otros tipos de canales de entrada de Ca^{2+} implicados en la contracción con fenilefrina, hemos utilizado SKF96365 (30 μM). A esta concentración, este fármaco parece ser un inhibidor efectivo de la entrada de Ca^{2+} a través de canales ROCC y VOCC (Merritt *et al.*, 1990), NSCC (Furutani *et al.*, 2002; Minowa *et al.*, 1997), y SOCC (Flemming *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1999b).

En nuestros experimentos, el SKF96365 inhibió por completo la contracción inducida por despolarización con K^+ , lo que indica un marcado efecto bloqueante de los canales VOCC por parte de este agente. Además, relajó aproximadamente un 90% la contracción inducida por fenilefrina, un porcentaje significativamente superior al provocado por la nifedipina o el verapamilo, lo que indica que en nuestra preparación, el SKF96365 posee además actividad sobre otros tipos de canales de Ca^{2+} , poniendo de manifiesto la poca selectividad de este agente.

La administración de forskolina (100 nM) sobre los anillos precontraídos con fenilefrina y parcialmente relajados con SKF96365 inhibió completamente la contracción restante. Estos resultados no permiten concluir si el efecto de la forskolina es modificado tras la inhibición de canales inducida por el SKF96365. Es decir, no podemos precisar si la inhibición de esos canales provoca una disminución del efecto relajante de la forskolina pero, en todo caso, podemos deducir que, a pesar de la inhibición de varios tipos de canales de Ca^{2+} todavía se manifiesta una actividad relajante inducida por este agente. Este hecho concuerda con la hipótesis señalada anteriormente de que el mecanismo de relajación de la forskolina a dosis bajas (100 nM) es mediado, al menos en parte, por un mecanismo diferente a la disminución de la entrada de Ca^{2+} extracelular. Similares conclusiones fueron obtenidas por Ahn *et al.* (1992) utilizando también anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio para sus experimentos de contractilidad, aunque empleando concentraciones de forskolina del orden μM .

A pesar de las dudas sobre el tipo de canales de Ca^{2+} que pueden estar implicados en la vasodilatación inducida por el AMPc, nuestros experimentos de microscopía de epifluorescencia (*imaging*) en células musculares lisas de aorta de

rata embrionarias (A7r5), que permiten monitorizar en tiempo real las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ mediante el empleo de la sonda fluorescente fura-2, confirman que los incrementos de este nucleótido cíclico reducen la entrada de Ca^{2+} externo tras la estimulación de las células con un agonista.

La respuesta cálcica provocada por la arginina-vasopresina (AVP) en las células A7r5 es mediada por la activación de receptores específicos del tipo V_1 (Thibonnier *et al.*, 1991). Consta de dos fases bien diferenciadas: en primer lugar, un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_c$, en forma de pico, debido principalmente a la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares; en segundo lugar, la $[Ca^{2+}]_c$ desciende hasta estabilizarse en una meseta sostenida, debida fundamentalmente a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de diferentes tipos de canales permeables al Ca^{2+} (Thibonnier *et al.*, 1991; Byron y Taylor, 1995; Jung *et al.*, 2002). En nuestros experimentos, la aplicación de agentes que incrementan el AMPc redujo de forma significativa ambas fases de la respuesta cálcica inducida por AVP en miocitos de aorta de rata, con la excepción de la forskolina aplicada a bajas concentraciones (100 nM) en preparaciones con medio con Ca^{2+} externo.

Por lo tanto, los agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ (excepto la forskolina a concentraciones del orden nM) reducen la contracción de la aorta de rata inhibiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular (un efecto en el que podría estar implicada la entrada capacitativa de Ca^{2+} (como discutiremos en el apartado siguiente) y la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares (como discutiremos en el apartado 2). La falta de efecto de las concentraciones del orden nM de forskolina sugiere, de nuevo, que sus efectos a dichas concentraciones estarían mediados por una acción no relacionada con la entrada de Ca^{2+} transmembrana (su efecto vasorrelajante en la aorta no era modificado por los distintos bloqueantes de canales de Ca^{2+}), aunque sí con la reducción de la liberación de Ca^{2+} intracelular.

1.4 Papel de la entrada capacitativa de Ca²⁺

Se ha descrito que la depleción de reservorios intracelulares de Ca²⁺, tanto por la acción de agonistas a nivel de la membrana plasmática como por agentes intracelulares, incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca²⁺ en las células no excitables, lo que, en consecuencia, permite el relleno de los reservorios deplecionados a través de SOCC, siguiendo el denominado “modelo capacitativo” o SOCE (Álvarez-Castro *et al.*, 2004; Putney, 2009) un proceso que se asocia con una contracción funcional en la aorta de rata (Noguera *et al.*, 1998). En los últimos años, los canales de tipo TRP y las proteínas STIM y Orai han sido postulados como candidatos moleculares para SOCC (ver Revisión Bibliográfica).

En nuestros experimentos de contractilidad, la reintroducción de Ca²⁺ externo tras la depleción de reservorios intracelulares de Ca²⁺ con fenilefrina o tapsigargina, un inhibidor de la SERCA, indujo una contracción sostenida que fue relajada parcialmente por la forskolina, un efecto potenciado por la inhibición de las PDE con IBMX, o el db-cAMP. La contracción remanente en este caso está mediada por la entrada de Ca²⁺ a través de canales sensibles a la nifedipina (datos no mostrados), lo que coincide con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en los cuales la entrada capacitativa de Ca²⁺ podía ser inhibida parcialmente por la nifedipina tanto en A7r5 (Campos-Toimil *et al.*, 2005) como en células RASMC (Álvarez-Castro *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la relajación del músculo liso de aorta de rata inducida por la forskolina y el db-cAMP podría estar mediada, en parte, por la inhibición de la entrada de Ca²⁺ a través de SOCC. De modo similar, en células musculares lisas de estómago de conejo, la entrada capacitativa de Ca²⁺ observada tras el tratamiento con tapsigargina fue inhibida por forskolina y nifedipina (Murthy y Makhlof, 1998). La diferencia de potencia entre la forskolina y el db-cAMP a la hora de relajar las contracciones debidas a la entrada capacitativa de Ca²⁺ inducida por fenilefrina o tapsigargina observada aquí se debe, probablemente, a la activación de diferentes canales tras la depleción de reservorios mediante antagonistas de α -adrenoreceptores o inhibidores de la SERCA en la aorta de rata (Noguera *et al.*, 1997).

Para confirmar una posible inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{2+} por parte de la forskolina y el db-cAMP, llevamos a cabo experimentos de *imaging* con miocitos A7r5. La aplicación de AVP en medio libre de Ca^{2+} indujo un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ atribuible a la depleción de reservorios intracelulares del ion (en el apartado 2 discutiremos el efecto de los agentes que elevan el AMPc sobre dicha respuesta). En estas condiciones, la reintroducción de Ca^{2+} en el medio provocó un nuevo incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ atribuible a la entrada capacitativa de Ca^{2+} , en concordancia con la contracción observada por la reintroducción de Ca^{2+} tras la aplicación de fenilefrina en medio libre de Ca^{2+} en las preparaciones de órgano aislado. La forskolina únicamente inhibió este efecto cuando fue empleada a altas concentraciones (10 μM) y en presencia de IBMX para inhibir las PDE. Dosis inferiores de forskolina y el db-cAMP no provocaron efectos significativos. Así pues, existe una aparente contradicción entre los resultados obtenidos en los experimentos de contractilidad y de *imaging*. Los primeros indican que el incremento de la $[\text{AMPc}]_i$ inhibe la contracción por entrada capacitativa de Ca^{2+} , mientras que los datos de *imaging* no muestran inhibición de dicha entrada capacitativa. Esta discrepancia podría deberse a las diferencias entre el modelo celular empleado, A7r5, y las células musculares lisas presentes en la aorta de rata, RASMC. De hecho, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida tras depleción de reservorios con AVP es inhibida de forma dosis dependiente por la forskolina en RASMC (Cuññas *et al.*, 2010).

Por otro lado, la forskolina (a concentraciones elevadas) y el db-cAMP sí inhiben la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida por la depleción de reservorios con taspigargina (reduciendo el número de células que presentan respuesta) en las células A7r5, en paralelismo con los resultados observados en órgano aislado.

2 Efectos de los agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ sobre la contracción provocada por la liberación de Ca^{2+} intracelular

Para investigar la posible implicación de la liberación de Ca^{2+} intracelular en la actividad vasorrelajante del AMPc, estudiamos en primer lugar, los efectos de la forskolina y del db-cAMP sobre las contracciones inducidas con fenilefrina en medio libre de Ca^{2+} . Esta contracción es mediada por la liberación de Ca^{2+} a partir de sus reservorios intracelulares, principalmente desde el RE (ver Revisión Bibliográfica).

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, dosis nanomolares de forskolina y el db-cAMP inhibieron la contracción inducida por fenilefrina, mediada por la liberación de Ca^{2+} intracelular (Janssens y Verhaeghe, 1984; Jiang *et al.*, 2005). Esto sugiere que los incrementos en la $[AMPc]_i$ reducen la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares en los miocitos de aorta de rata.

Para confirmar esta hipótesis llevamos a cabo los experimentos de *imaging* en células A7r5. Como hemos comentado anteriormente, la respuesta cálcica inducida por AVP en estas células consta de una fase de pico debida principalmente a la liberación de Ca^{2+} intracelular seguida de una fase de meseta debida a la entrada de Ca^{2+} a través de canales transmembrana. En las células musculares lisas la principal fuente de liberación de Ca^{2+} intracelular es el RE y existen dos tipos de mecanismos implicados en este proceso: la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), que puede ser activada de manera selectiva por la cafeína y por la rianodina, y la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 , activada por agonistas de receptores acoplados a PLC y la subsiguiente generación de IP_3 , que libera Ca^{2+} del RE al unirse a receptores específicos (ver Revisión Bibliográfica).

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, la rianodina no indujo una respuesta cálcica significativa en las células A7r5 (Campos-Toimil *et al.*, 2007), en concordancia con los resultados expuestos con anterioridad por otros autores empleando, además, cafeína como agonista (Byron y Taylor, 1993; Missiaen *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que las células A7r5, utilizadas en este estudio, no poseen reservorios implicados en la CICR sensibles a la rianodina. Por el contrario,

Berman *et al.* (1994) habían descrito que la rianodina induce en células A7r5 incrementos lentos de $[Ca^{2+}]_c$ que tardan aproximadamente 30 min en estabilizarse.

De acuerdo con el modelo descrito, la aplicación de AVP (1 μ M), en ausencia de Ca^{2+} extracelular, provocó un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ transitorio que regresó a la línea base en ~ 3 min sin presentar, por tanto, la fase de meseta. Este resultado confirma que el pico de la respuesta cálcica inducida por agonistas es debido, fundamentalmente, a la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares por estimulación de IP_3R en las células A7r5. Sin embargo, el pico inicial de la respuesta en medio libre de Ca^{2+} fue significativamente menor que el obtenido en presencia de Ca^{2+} extracelular, lo que sugiere la existencia de una contribución de la entrada de Ca^{2+} extracelular en la fase inicial transitoria de la respuesta cálcica a este agonista. Estos resultados concuerdan con los publicados anteriormente por otros autores para esta misma línea celular (Hughes y Schachter, 1994; Campos Toimil *et al.*, 2007).

La preincubación con forskolina inhibió, de forma dosis dependiente, la respuesta cálcica inducida por AVP en ausencia de Ca^{2+} extracelular, un efecto que es potenciado por la inhibición de las PDE y reproducido por el db-cAMP. De acuerdo con estos resultados, Ahn *et al.* (1992) demostraron que tanto la forskolina como el db-cAMP reducen la producción de IP_3 en el músculo liso de aorta de rata. Además, Yang *et al.* (1999) describieron que los incrementos de la $[AMPc]_i$ pueden reducir la movilización de Ca^{2+} inducida por agonistas desde reservorios de Ca^{2+} sensibles al IP_3 en células musculares lisas de aorta caninas y atribuyeron este efecto a una activación de la PKA, que disminuiría la generación de IP_3 .

Por otro lado, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la respuesta cálcica inducida por la tapsigargina fue inhibida en presencia de forskolina, un efecto también potenciado por la inhibición de PDE y reproducido por el db-cAMP. Una acción similar había sido descrita previamente en linfocitos humanos tras la administración de forskolina, db-cAMP, rolipram o milrinona (de la Rosa *et al.*, 2001). Generalmente se acepta que el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por la tapsigargina es debido a su efecto inhibitorio de la SERCA, que provoca una depleción gradual de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} . Así pues, nuestros resultados sugieren que el

incremento de la $[AMPC]_i$ reduce la capacidad de la tapsigargina para deplecionar Ca^{2+} de sus reservorios internos. Dicho efecto es probablemente debido a la depleción de reservorios sensibles a tapsigargina inducida por el propio AMPc descrita por vez primera en el presente trabajo (ver apartado siguiente).

Con la idea de seguir estudiando el efecto inhibitor de los incrementos de la $[AMPC]_i$ sobre el vaciado de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , llevamos a cabo una serie de experimentos de contractilidad utilizando el TMB-8. Se ha descrito previamente que este agente es un inhibidor de la liberación de Ca^{2+} intracelular, y reduce la disponibilidad de Ca^{2+} en el músculo liso y esquelético debido a que estabiliza la unión del Ca^{2+} a sus reservorios intracelulares (Chiou y Malagodi, 1975). Se ha demostrado que este agente bloquea de forma transitoria los incrementos de $[Ca^{2+}]_c$ inducidos por tapsigargina en neuronas (Douthel y Paschen, 1999) o en células A7r5 (Campos Toimil *et al.*, 2005) y la respuesta contráctil a este agente en la aorta de rata (Tepel *et al.*, 1994).

En el presente estudio, en medio con Ca^{2+} extracelular y en presencia de TMB-8 (100 μ M), la aplicación de fenilefrina no provocó contracción de los anillos, lo que sugiere que esta concentración no es efectiva para bloquear selectivamente la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares.

Sin embargo, una concentración menor de TMB-8 (30 μ M) presentó las siguientes acciones:

- Redujo la contracción inducida por fenilefrina en medio con 1,5 mM de Ca^{2+} en un 50%.
- Redujo la contracción por fenilefrina en un 37% en medio libre de Ca^{2+} .
- En presencia de TMB-8 y en medio con Ca^{2+} externo, la forskolina relajó la contracción por fenilefrina con más potencia que en los controles.

Estos resultados sugieren que el TMB-8 (30 μ M) inhibe únicamente parte de la liberación de Ca^{2+} intracelular y, en consecuencia, reduce también en parte la subsiguiente entrada capacitativa de Ca^{2+} , aunque no se puede descartar por completo un efecto sobre otro tipo de canales transmembrana diferentes de los SOCC. Sin embargo, en vista de lo expresado anteriormente, cabría esperar una

disminución del efecto relajante de la forskolina ya que, en estas condiciones, la contracción es menos dependiente de la liberación de Ca^{2+} intracelular y de la entrada capacitativa de este ión. Para aclarar esta aparente contradicción será necesaria la planificación de nuevos experimentos, bien empleando de nuevo TMB-8 en protocolos y concentraciones diferentes, o bien utilizando otros agentes que permitan discernir con mayor efectividad entre la contracción derivada de la liberación de Ca^{2+} intracelular y la provocada por la entrada de Ca^{2+} a través de canales transmembrana.

En todo caso, nuestros resultados en conjunto sugieren que un incremento de la $[\text{AMPC}]_i$ reduce la cantidad de Ca^{2+} liberado por los agonistas a partir de reservorios intracelulares sensibles a IP_3 y a tapsigargina, lo que contribuye a una menor respuesta contráctil del músculo liso vascular en respuesta a dichos agonistas.

3 Efectos de los agentes que incrementan el AMPc sobre $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal

Una de las hipótesis que nos habíamos planteado para explicar la reducción de la liberación de Ca^{2+} intracelular tras un incremento de la $[\text{AMPC}]_i$ consistía en la posibilidad de que el AMPc redujese de algún modo la cantidad de Ca^{2+} disponible en los reservorios intracelulares del ion, un efecto que no había sido descrito hasta la fecha por ningún otro autor.

La confirmación de esta hipótesis vino dada por nuestros experimentos de *imaging* con células A7r5. En ellos, tanto la forskolina como el análogo del AMPc, el db-cAMP, produjeron *per se* un incremento lento y gradual de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal, que es potenciado por la inhibición de las PDE con IBMX. Este efecto tiene lugar tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo que sugiere que es debido, al menos en parte, a una liberación de Ca^{2+} a partir de sus reservorios intracelulares. Con anterioridad habíamos descrito un efecto similar en células RASMC, aunque con ciertas diferencias en la concentración de los agentes empleados para incrementar el AMPc, y que era potenciado por la inhibición de PDE con IBMX, rolipram o milrinona, esta última inhibidora selectiva de la PDE3 (Cuññas *et al.*,

2010). Nuestros resultados indican que el incremento de la $[AMPC]_i$ puede provocar una lenta depleción de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares, que no induce de por sí una entrada capacitativa de Ca^{2+} del exterior celular, o al menos esta no fue detectada con las técnicas empleadas en el presente trabajo. Esta depleción tiene lugar a partir de reservorios sensibles a la tapsigargina, puesto que la aplicación previa de este agente inhibió los incrementos de Ca^{2+} inducidos por la forskolina y el db-cAMP (Cuíñas *et al.*, 2010). Recordemos que, a la inversa, la respuesta cálcica a la tapsigargina también era inhibida por la aplicación previa de forskolina o db-cAMP. Esto indica que tanto el AMPc como la tapsigargina deplecionan los mismos reservorios intracelulares de Ca^{2+} .

A priori, el hecho de que un aumento de la $[AMPC]_i$, que provoca actividad vasorrelajante, pueda producir un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal en los miocitos vasculares podría resultar inesperado y contradictorio. Sin embargo, otros autores también habían descrito que los diversos agentes que aumentan la $[AMPC]_i$ pueden incrementar la $[Ca^{2+}]_c$. Ya en 1984, se describió que la forskolina podía causar la relajación del músculo liso de la vena porta de hurón, pero la $[Ca^{2+}]_i$, medida en la misma preparación mediante aequorina, permanecía sin cambios o incluso era incrementada (Morgan y Morgan, 1984). Empleando aequorina en tiras de músculo liso de tráquea bovina, Takuwa *et al.* (1988) describieron que la isoprenalina producía un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que era reproducido por la forskolina utilizada en concentraciones que provocaban un marcado efecto vasorrelajante. Posteriormente, empleando la sonda fura-2 en RASMC, Lincoln *et al.* (1990) demostraron que tanto la forskolina como la isoprenalina incrementaban de forma transitoria la $[Ca^{2+}]_i$ y que la forskolina reducía la señal cálcica inducida por una posterior aplicación de AVP.

Sin embargo, estos efectos, a diferencia de lo descrito en nuestro estudio, tenían lugar únicamente en presencia de Ca^{2+} extracelular. No tenemos conocimiento, hasta la fecha, de que se haya descrito que el aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por el AMPc pueda deberse en gran medida a una depleción del ion desde sus reservorios intracelulares, como sugieren nuestros resultados empleando células A7r5, aunque también hemos encontrado resultados similares en las RASMC

(Cuíñas *et al.*, 2010). Nuestro grupo de investigación había descrito un efecto similar para el resveratrol, un estilbeno de origen natural con actividad vasodilatadora que provoca una liberación de Ca^{2+} intracelular en células A7r5 (Campos-Toimil *et al.*, 2005) y para el cual había sido descrita cierta capacidad para incrementar la $[\text{AMPc}]_i$ en algunos modelos celulares (Blumenstein *et al.*, 2005; El-Mowafy y Alkhalaf, 2003; Kimura *et al.*, 1995).

En el presente trabajo, este incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducido por AMPc no parece estar asociado a un aumento del tono basal de los anillos de aorta de rata. Del mismo modo, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducido por la tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} en los miocitos no se corresponde con una contracción de los anillos de aorta tras la administración de este agente. Esta situación de desacoplamiento entre la liberación de Ca^{2+} a partir de los reservorios intracelulares y la contracción muscular coincide con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio: en ausencia de Ca^{2+} extracelular, el aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducido por la tapsigargina en RASMC no se corresponde con una contracción en anillos de aorta de rata (Álvarez-Castro *et al.*, 2004) y con los publicados por otros autores (Zhang *et al.*, 1999). De modo similar, el ácido ciclopiazónico, también inhibidor de la SERCA, provoca una contracción insignificante de la aorta de rata a pesar de provocar un marcado incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en los miocitos de dicha preparación (Tosun *et al.*, 1998).

Según lo descrito por otros autores (Morgan y Morgan, 1984; Takuwa *et al.*, 1988; Lincoln *et al.*, 1990), el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ debido al AMPc descrito aquí también podría estar relacionado en parte con un incremento de la entrada de Ca^{2+} extracelular. Como hemos discutido anteriormente, en nuestros experimentos de electrofisiología, la forskolina activó la entrada de Ca^{2+} extracelular en las células A7r5 a través de canales VOCC de tipo L, un efecto similar al descrito previamente realizando medidas de electrofisiología en canales VOCC de tipo L aislados en células A7r5 (Marks *et al.*, 1990). Kimura *et al.* (2000) demostraron que el db-AMPc puede incrementar la I_{Ca} en células A7r5 por fosforilación de la subunidad β del canal, un efecto por la activación de la PKA. Además, Fukumitsu *et al.* (1990) publicaron que la estimulación de β -adrenoceptores aumenta la amplitud de las

corrientes transmembrana de entrada de Ca^{2+} , probablemente a través de canales de Ca^{2+} tipo L en arteria coronaria de cerdo.

Recapitulando, nuestros resultados indican que un incremento de la $[\text{AMPc}]_i$ induce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ debido principalmente a la depleción de reservorios intracelulares de Ca^{2+} sensibles a tapsigargina y que este efecto podría estar acompañado de un incremento de las corrientes de Ca^{2+} a través de canales VOCC de tipo L.

4 Papel de las proteínas activadas por AMPc, PKA y Epac, en los efectos del AMPc sobre el músculo liso vascular

En la actualidad es conocido que diversos efectos inducidos por los agentes que incrementan el AMPc, y que se creía que estaban mediados por la activación de la PKA, son atribuibles a la activación de las proteínas Epac en diferentes modelos celulares (Gloerich y Bos, 2010; Roscioni *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2013; ver Revisión Bibliográfica). De hecho, el reciente desarrollo de los activadores específicos de la Epac ha servido para poner de manifiesto la importancia de estas proteínas. Estos compuestos se basan en pequeñas, pero significativas diferencias estructurales entre los sitios de unión del AMPc (*cAMP binding pockets*) encontrados en la PKA y en los CNG y los encontrados en las Epac (Enserik *et al.*, 2002, Christensen, 2003; Purves, 2009).

En el sistema cardiovascular, los estudios realizados indican que la Epac podría desempeñar un papel destacado en la regulación del tono vascular (Schmidt *et al.*, 2007, 2013). A pesar de ello, los papeles relativos de la PKA y de la Epac apenas han sido estudiados en el músculo liso vascular (Métrich *et al.*, 2010). Por ello, en esta fase de nuestra investigación hemos querido estudiar la participación de las proteínas PKA y Epac en las relajaciones en la aorta aislada de rata, así como en la inhibición de la liberación de Ca^{2+} intracelular y de la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducidas por agentes que incrementan de la $[\text{AMPc}]_i$.

Como paso previo, hemos llevado a cabo experimentos de *western blot* y RT-PCR que demostraron la expresión de PKA, Epac1 y Epac2, tanto en células RASMC como en A7r5. La presencia del enzima PKA está fuertemente documentada en

miocitos vasculares, así ha sido puesto de manifiesto mediante ensayos de *western blot* en aorta de rata (Sampson *et al.*, 2004) o en aorta de embrión de rata (Yokoyama *et al.*, 2008), así como en estudios de actividad de PKA y mediante el uso de activadores/inhibidores específicos en células de rata (Lincoln y Cornwell, 1990), en aorta bovina (Sellak *et al.*, 2002) o en aorta humana (Fetalvero *et al.*, 2005).

Por otro lado, la presencia de Epac1, pero no de Epac2 había sido demostrada en homogenados de aorta de rata Wistar en un trabajo realizado por Purves *et al.* (2009). En miocitos de aorta de rata Sprague-Dawley se ha podido constatar mediante estudios de expresión la presencia de ambas isoformas de Epac (Hewer *et al.*, 2011).

Este trabajo es, a nuestro entender, el primero que demuestra la expresión de la PKA y de las isoformas Epac1 y Epac2 en células A7r5. Adicionalmente, y como paso previo de una investigación futura, también hemos realizado una serie de experimentos para estudiar que componentes de la ruta AMPc-PKA-Epac se ven modificados tras 24 h de tratamiento con fármacos que activan/bloquean pasos diferenciales implicados en esta ruta de señalización. Así, hemos observado que tras tratamiento de 24 h con forskolina y db-cAMP disminuye significativamente la expresión de la subunidad reguladora de la PKA, lo que sugiere que la elevación sostenida de la $[AMPc]_i$ conduce a una disminución de la expresión de la PKA en los miocitos vasculares para, de esta manera, disminuir su sensibilidad al nucleótido. En este sentido, en las células musculares lisas vasculares, el tratamiento durante largos períodos con forskolina o 8-Br-cAMP, un análogo del cAMP, induce un aumento de la actividad de las PDE de AMPc (Rose *et al.*, 1997; Maurice, 1998), que podría estar relacionado con una fosforilación de la PDE4 por parte de la PKA (Sette *et al.*, 1994; Liu y Maurice, 1999) o con un incremento de la expresión de la PDE4D (Liu *et al.*, 2000).

4.1 Papel de la PKA y de la Epac en el efecto vasodilatador del AMPc

En nuestro estudio, los inhibidores selectivos de PKA, Rp-cAMPs y KT5720, no afectaron de modo significativo a la relajación inducida por la forskolina de las contracciones inducidas por fenilefrina en los anillos sin endotelio de aorta de rata,

en concordancia con resultados obtenidos en un estudio previo (García-Morales *et al.*, en revisión). Este hecho parece indicar que el efecto vasodilatador directo de la forskolina es independiente de la activación de la ruta cAMP/PKA.

Es interesante, sin embargo, destacar que en nuestras condiciones experimentales el activador selectivo de la PKA, pCPT-cAMP, relajó de forma significativa los anillos de aorta. Por otro lado, Ferro *et al.* (2004) ha descrito que la PKA participa de modo predominante en la relajación independiente de endotelio tras la estimulación de adrenoceptores β_2 con salbutamol. Esta aparente contradicción con nuestros resultados con los inhibidores de PKA podría ser explicada en base a la existencia de una o más rutas alternativas dependientes del cAMP que podrían relajar el músculo liso precontraído con más efectividad cuando la PKA está inhibida, compensando así el efecto de dicha inhibición.

Aunque ya había sido sugerida la existencia de diversos mecanismos que podrían mediar un efecto vasodilatador por parte del AMPc independiente de la activación de la PKA (Akata, 2007; Bruce *et al.*, 2003; Morgado *et al.*, 2012; ver Revisión Bibliográfica), los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que el efecto vasorrelajante independiente de endotelio del AMPc podría ser mediado, al menos en parte, por la activación de las proteínas Epac: la administración de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, un activador selectivo de la Epac, relajó de forma significativa las preparaciones de aorta aislada. Además, de nuestros resultados se desprende que los efectos vasorrelajantes de los activadores de la Epac y de la PKA son aditivos. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio ya habían sugerido que la Epac puede relajar en parte la aorta de rata, pero en este caso por un mecanismo dependiente de endotelio (García-Morales *et al.*, en revisión).

Los resultados aquí descritos coinciden, en parte, con los publicados anteriormente por Sukhanova *et al.* (2006), que atribuyen un papel destacado a la activación de una o varias proteínas Epac en la relajación de la aorta de rata. Sin embargo, estos autores no especifican si dicho efecto es dependiente de endotelio o debido a un efecto directo de la Epac en las células musculares lisas arteriales. Además, en anillos de aorta de rata sin endotelio, la activación de la Epac con 8-

pCPT-2'-O-Me-cAMP reduce la contracción inducida por U46619 (análogo deTX-A₂) o endotelina-1, aunque no la provocada por noradrenalina o KCl (Grandoch *et al.*, 2006). En los últimos años, otros autores han descrito la capacidad de los activadores de la Epac para relajar de modo directo otras preparaciones de músculo liso, tanto vascular como no vascular (Murray *et al.*, 2009; Zieba *et al.*, 2011; Roscioni *et al.*, 2011).

Recientemente han sido comercializados diversos inhibidores específicos de la Epac-1 y la Epac-2 (ESI-09, HJC0197) o únicamente de la Epac-2 (ESI-05) que parecen tener acción selectiva sobre la actividad de estas proteínas y que en el futuro podrán servir para realizar nuevos experimentos que completen los resultados aquí presentados.

Según habíamos expuesto, el efecto vasorelajante de los agentes que incrementan el AMPc podría estar mediado, en parte, por la depleción de Ca²⁺ a partir de reservorios intracelulares, que implica una menor cantidad de este ion disponible para la respuesta a los agonistas. El hecho de que los activadores de Epac y PKA inhibiesen de forma significativa la contracción por fenilefrina en ausencia de Ca²⁺ extracelular, sugiere la participación de ambas proteínas en dicha depleción de Ca²⁺ interno. Por otro lado, como hemos discutido anteriormente, el incremento de la [AMPc]_i también podría inhibir directamente la entrada capacitativa de Ca²⁺, que participa en el mantenimiento de la contracción del músculo liso. Los efectos de los activadores de Epac y de PKA, capaces de reducir la contracción inducida por la reentrada de Ca²⁺ tras la depleción con fenilefrina, apoyan una participación de estas proteínas en dicho efecto. Sin embargo, en contra de la participación de la PKA en la disminución de la contracción por reentrada de Ca²⁺, la inhibición de esta cinasa con Rp-cAMPs y/o KT5720 no afectó de forma significativa a los efectos de la forskolina sobre dicha contracción.

4.2 Papel de la PKA y de la Epac en la regulación de la homeostasis cálcica por el AMPc en los miocitos vasculares

En vista de dichos resultados, y para profundizar en el estudio de la posible participación de la PKA o de la Epac en depleción de Ca^{2+} intracelular o en la reducción de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , realizamos una serie de experimentos de *imaging* en miocitos aislados de aorta de rata de tipo A7r5.

Por primera vez hemos demostrado que la activación conjunta de la Epac y de la PKA puede incrementar de forma significativa la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en los miocitos vasculares, mientras que su administración por separado provocó ninguna acción significativa. Dicho efecto es debido, en parte, a la depleción de reservorios intracelulares de Ca^{2+} sensibles a la tapsigargina, puesto que también fue observado en ausencia de Ca^{2+} extracelular, reduciendo la señal cálcica inducida por una posterior aplicación de dicho inhibidor de la SERCA.

Una posible interpretación de estos resultados es que ambas proteínas participan de forma sinérgica en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal inducido por el AMPc, y que la sensibilidad de nuestra técnica no permite detectar el incremento menor inducido por su activación por separado. De hecho, un incremento de la $[\text{AMPc}]_i$, a través de la activación de la PKA, puede aumentar la liberación de Ca^{2+} del RE a través de canales de IP_3 en la glándula salivaria de mosca (Schmidt *et al.* 2008). Además, la incubación previa de los miocitos de aorta con Rp-cAMPs redujo de modo significativo la respuesta cálcica inducida por incremento del AMPc, confirmando la participación de la PKA en dicha respuesta. En lo referente a la Epac, Purves *et al.* (2008) habían sugerido que la activación selectiva de la Epac con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP induce un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal en RASMC. En concordancia con una participación de la Epac en la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, el mismo grupo de investigación sugirió más tarde que, en miocitos de aorta de rata, la Epac inhiben las corrientes a través de canales K^+_{ATP} por un mecanismo dependiente de la liberación de Ca^{2+} de sus reservorios intracelulares y de la activación de la calcineurina (Purves *et al.* ,2009). En el mismo sentido, Morel *et al.* (2005) describieron que el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP puede provocar un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en miocitos ventriculares de ratón neonato

para producir hipertrofia cardíaca. En neuronas de cerebelo de ratón, la administración del mismo activador de la Epac indujo un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal debido a la movilización de Ca^{2+} intracelular (Ster *et al.*, 2007), provocando en este caso la activación de canales BK_{Ca} . De nuevo, la falta de un inhibidor selectivo de la Epac nos impidió en su momento profundizar en esta parte de nuestro estudio.

En relación con la movilización directa de Ca^{2+} por el AMPc, cabe destacar que la corriente de Ca^{2+} a través de VOCC tipo L activada por la forskolina medida en nuestros experimentos de *patch-clamp* no es debida una activación de la Epac, puesto que el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP no modificó de modo significativo dicha corriente y es inhibida por la activación de la PKA, ya que fue inhibida por el pCPT-cAMP.

Por otro lado, la preincubación de los miocitos de aorta con los activadores de PKA y Epac inhibió la respuesta cálcica inducida por AVP, tanto en medio con Ca^{2+} externo como en medio libre de Ca^{2+} , y por tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} , reproduciendo así los efectos de la forskolina y del db-cAMP. Estos resultados son indicativos de una depleción de los reservorios de Ca^{2+} sensibles a tapsigargina por la PKA y la Epac. De ese modo, estas proteínas pueden contribuir al efecto inhibitor del AMPc sobre la respuesta cálcica a los agonistas, al reducir la cantidad de Ca^{2+} intracelular disponible para ser liberado.

La disminución de la respuesta cálcica a la AVP también podría ser debida, en parte, a un efecto de desensibilización de los IP_3R , al menos en lo referente a la PKA. Se ha descrito que el AMPc, a través de la PKA, inhibe la liberación de Ca^{2+} inducida por el IP_3 en megacariocitos de rata (Tertyshnikova y Fein, 1998) y que la activación de la PKA inhibe la liberación de Ca^{2+} intracelular en células acinares pancreáticas de ratón (Giovannucci *et al.*, 2000) o en cerebelo de rata (Supattapone *et al.*, 1998). En dichos efectos podría estar implicada la fosforilación del IP_3R por la PKA. No obstante, en este aspecto existe una gran controversia ya que también se ha descrito dicha fosforilación podría potenciar la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por agonistas en diversas preparaciones, como hepatocitos de rata (Joseph y Ryan, 1993) o células acinares de parótida de ratón (Bruce *et al.*, 2002).

En cuanto a la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida por la depleción de reservorios con AVP, ésta no es afectada de forma significativa por el pCPT-cAMP o el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. Estos resultados están en aparente contradicción con los obtenidos en los experimentos de contractilidad, en los cuales ambos fármacos reducían la contracción inducida por la reentrada de Ca^{2+} tras la depleción de Ca^{2+} intracelular con fenilefrina. El diferente comportamiento de los miocitos embrionarios (A7r5) y los que conforman la aorta de rata adulta (RASMC) podría estar detrás de dicha discrepancia, según lo discutido en el apartado 1.4 de esta discusión, aunque se necesitarán nuevos experimentos para comprobar esta posibilidad.

Este es, a nuestro entender, el primer trabajo que estudia una posible acción de la Epac sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Por otro lado, los resultados descritos en la literatura sobre los efectos de la PKA sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+} son también muy contradictorios, dependiendo de la preparación y del agente empleado para la depleción. Así, en linfocitos humanos la entrada capacitativa provocada por la taspigargina puede ser incrementada o disminuida por diferentes concentraciones de H-89, un inhibidor de PKA (de la Rosa *et al.*, 2001). En células musculares lisas de arteria pulmonar humana, el AMPc podría reducir la entrada capacitativa de Ca^{2+} por un efecto independiente de la PKA para tiempos de incubación cortos con forskolina e IBMX y se volvería dependiente de PKA a medida que el tiempo de incubación se incrementa (Zhang *et al.*, 2007). En células musculares lisas de arterias renales de cerdo, la reentrada de Ca^{2+} medida tras la depleción de reservorios de Ca^{2+} con taspigargina es inhibida parcialmente por el H-89, un inhibidor de la PKA, lo cual sugiere que, al menos en dicha preparación, la activación de la PKA potencia la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

Finalmente, creemos conveniente recordar que algunos de los efectos provocados por los incrementos de la $[\text{AMPc}]_i$ en la homeostasis cálcica podrían ser debidos a la activación cruzada de la PKG por el AMPc (ver Revisión Bibliográfica), aunque el estudio de dichos efectos sobrepasa la finalidad de este trabajo.

5 Aumento de AMPc en tiempo real

Mediante los experimentos de FRET, empleando por primera vez las sondas intracelulares Epac-camps en miocitos vasculares de tipo RAMSC o A7r5, hemos comprobado que la administración de forskolina incrementa de forma significativa la $[AMPc]_i$ en dichos modelos celulares. Sin embargo, fue necesario emplear concentraciones de forskolina del orden μM en presencia de un inhibidor de PDE (IBMX) para detectar un incremento significativo de la $[AMPc]_i$. Esta ausencia de efectos de la forskolina se podría deber a alguna de las siguientes posibilidades:

1. Los experimentos de FRET empleando las sondas Epac-camps no son lo suficientemente sensibles para detectar pequeños incrementos de la $[AMPc]_i$ provocados por concentraciones bajas de forskolina.
2. Los incrementos de AMPc inducidos por la forskolina a bajas concentraciones se producen de modo localizado en determinados compartimentos celulares próximos a los centros efectores.

La primera hipótesis coincide con lo descrito previamente en la bibliografía. En teoría, las sondas empleadas pueden detectar variaciones en niveles fisiológicos de AMPc, pero en la práctica en la mayoría de los trabajos publicados emplean concentraciones saturantes de AMPc (Ponsioen *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2011; Terrin *et al.*, 2012): emplean forskolina (25 μM) para detectar descensos de FRET. Solamente en un trabajo publicado por Sassi *et al.* (2008) comienzan a detectar descenso de FRET con forskolina (5 μM) en miocitos de arteria coronaria. De hecho, en la actualidad se están desarrollando nuevos fluorocromos más sensibles, con mayor resolución y especificidad, así como con menor tendencia a experimentar el fenómeno de fotoblanqueo (*photobleaching*) (Hong *et al.*, 2011; Klarenbeek *et al.*, 2011; Zadran *et al.*, 2012).

Esta insuficiente sensibilidad por parte de las sondas Epac-camps para detectar pequeños incrementos de AMPc, unido a su baja efectividad en la transfección, podría suponer un hándicap importante para su utilización en determinados tipos de experimentos con miocitos vasculares (Nikolaev y Lohse, 2006; Tokay *et al.*, 2012).

En cuanto a la compartimentación de los incrementos del nucleótido, esta podría ser también un motivo de los diferentes resultados obtenidos en los experimentos de FRET y de enzimoimmunoensayo. Esta compartimentación, llevada a cabo principalmente por la AC y las PDE, ya ha sido descrita previamente (Baillie, 2009; Cooper, 2005; Vandecasteele *et al.*, 2006; ver Revisión Bibliográfica), y consiste en la diferente localización, propiedades y selectividad de los enzimas implicados en la ruta de los nucleótidos cíclicos. En miocitos ventriculares de rata neonata, se han encontrado aumentos de AMPc localizados que fueron disipados por la adición de un inhibidor de PDE como el IBMX (Stangherlin y Zaccolo, 2011).

Dosis bajas de forskolina aumentan el AMPc en compartimentos celulares. Dado que la sonda empleada presenta distribución citoplasmática, una posibilidad sería que dicha sonda no alcance los microdominios donde el AMPc es sintetizado. Además estos microdominios están rodeados de cadenas de PDE que frenan la difusión del AMPc. Concluimos que la técnica de FRET no sería la adecuada para medir cambios en la [AMPc] tan localizados (esta posibilidad la han contemplado Rich *et al.*, 2000). Así, serían necesarias concentraciones de AMPc suficientemente altas (de manera que invada toda la célula) para poder ser detectadas por el método de FRET.



Conclusiones



1. La forskolina relaja la aorta de rata independientemente de la presencia de endotelio. A la concentración que causa un 50% de relajación (100 nM) la forskolina incrementa significativamente la $[AMPc]_i$ en miocitos vasculares solamente en presencia de fenilefrina o de rolipram. El efecto vasodilatador directo de la forskolina y del subsiguiente incremento de la $[AMPc]_i$ es mediado por las proteínas PKA y Epac. El efecto de la activación de ambas proteínas es aditivo.
2. El papel de la PDE4 en la regulación de la contractilidad del músculo liso de aorta de rata no es relevante cuando la $[AMPc]$ se mantiene en niveles basales. Sin embargo, cuando la $[AMPc]_i$ se incrementa, la actividad de la PDE4 aumenta, actuando así como un mecanismo compensatorio para acelerar la degradación del AMPc y contrarrestando de ese modo su actividad vasodilatadora.
3. La ruta de la p38 MAPK no está implicada en la contracción inducida por la fenilefrina en los anillos de aorta de rata sin endotelio. En cambio, su activación contrarresta, en parte, la relajación mediada por la forskolina y el AMPc.
4. El efecto vasodilatador directo de la forskolina y del AMPc en la aorta de rata no es mediado por la activación de canales BK_{Ca} , IK, SK y K_{ATP} . Se ha podido confirmar por electrofisiología un efecto activador de la forskolina y del AMPc sobre los canales de K^+ (K_v y BK_{Ca}) en las células A7r5.
5. El efecto vasorrelajante de la forskolina a concentraciones bajas (100 nM) no tiene lugar por bloqueo de canales TRP, aunque se pone en duda la selectividad del ácido flufenámico para el estudio de estos canales en contractilidad.
6. El efecto vasorrelajante de la forskolina (100 nM) no es mediado por una reducción en la entrada de Ca^{2+} externo a través de canales VOCC tipo L. A estas concentraciones, la forskolina induce incrementos modestos de la corriente a través de canales VOCC tipo L, mientras que concentraciones más elevadas dan como resultado una inhibición de la actividad de estos canales. En la activación de estos canales participa la proteína PKA.
7. Los agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ reducen la contracción de la aorta de rata sin endotelio producida por la reintroducción de Ca^{2+} extracelular tras la

- depleción de reservorios intracelulares de Ca^{2+} . En este efecto participan las proteínas PKA y Epac y es mediado, al menos en parte, por un mecanismo diferente a la disminución de la entrada capacitativa de Ca^{2+} extracelular.
8. El efecto vasorrelajante de la forskolina (100 nM) y del subsiguiente incremento de la $[\text{AMPC}]_i$ es mediado en parte por una depleción de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares sensibles al IP_3 y a la tapsigargina. Esta depleción da lugar a un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que no se corresponde con una contracción de los anillos de aorta. En este efecto participan las proteínas PKA y Epac.
 9. La PKA y las isoformas 1 y 2 de las proteínas Epac se expresan de manera constitutiva en las células A7r5. La elevación sostenida (24 h) de la $[\text{AMPC}]_i$ reduce la expresión de la proteína PKA en dichas células.
 10. La técnica de medición de la $[\text{AMPC}]_i$ en miocitos vasculares mediante la técnica de FRET, empleando las sondas Epac-camps, detecta únicamente incrementos inducidos por concentraciones de forskolina del orden μM en presencia de un inhibidor de PDE. Este hecho, unido a la baja eficiencia de la transfección de este modelo celular, nos permite concluir que esta técnica, en las condiciones aquí expuestas, no es suficientemente sensible para detectar variaciones fisiológicas en la $[\text{AMPC}]_i$.



Bibliografía



- Adams, S. R., A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor y R. Y. Tsien. 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349 (6311) (Feb 21): 694-7.
- Ada-Nguema, A. S., H. Xenias, J. M. Hofman, C. H. Wiggins, M. P. Sheetz y P. J. Keely. 2006. The small GTPase R-ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLCepsilon. *Journal of Cell Science* 119 (Pt 7) (Apr 1): 1307-19.
- Ahn, H. Y., S. E. Kang, K. C. Chang y H. Karaki. 1992. Dibutyl cyclic AMP and forskolin inhibit phosphatidylinositol hydrolysis, Ca²⁺ influx and contraction in vascular smooth muscle. *Japanese Journal of Pharmacology* 59 (2) (Jun): 263-5.
- Akata, T. 2007. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: Basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *Journal of Anesthesia* 21 (2): 220-31.
- Akata, T. 2007. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: Regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. *Journal of Anesthesia* 21 (2): 232-42.
- Alvarez-Castro, E., M. Campos-Toimil y F. Orallo. 2004. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369 (5) (May): 496-506.
- Azam, M. A., K. Yoshioka, S. Ohkura, N. Takuwa, N. Sugimoto, K. Sato y Y. Takuwa. 2007. Ca²⁺-independent, inhibitory effects of cyclic adenosine 5'-monophosphate on Ca²⁺ regulation of phosphoinositide 3-kinase C2alpha, rho, and myosin phosphatase in vascular smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320 (2) (Feb): 907-16.
- Baillie, G. S. 2009. Compartmentalized signalling: Spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *The FEBS Journal* 276 (7) (Apr): 1790-9.
- Bao, W., D. J. Behm, S. S. Nerurkar, Z. Ao, R. Bentley, R. C. Mirabile, D. G. Johns *et al.* 2007. Effects of p38 MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 49 (6) (Jun): 362-8.
- Begum, N., S. Hockman y V. C. Manganiello. 2011. Phosphodiesterase 3A (PDE3A) deletion suppresses proliferation of cultured murine vascular smooth muscle cells (VSMCs) via inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling and alterations in critical cell cycle regulatory proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (29) (Jul 22): 26238-49.
- Bender, A. T. y J. A. Beavo. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews* 58 (3) (Sep): 488-520.
- Berk, B. C. y M. A. Corson. 1997. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: Role of tyrosine kinases. *Circulation Research* 80 (5) (May): 607-16.

- Berman, D. M., T. Sugiyama y W. F. Goldman. 1994. Ca²⁺ stores in smooth muscle cells: Ca²⁺ buffering and coupling to AVP-evoked inositol phosphate synthesis. *The American Journal of Physiology* 266 (1 Pt 1) (Jan): C276-83.
- Berna-Erro, A., P. C. Redondo y J. A. Rosado. 2012. Store-operated Ca(2+) entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 349-82.
- Berridge, M. J. 2008. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *The Journal of Physiology* 586 (Pt 21) (Nov 1): 5047-61.
- Berridge, M. J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of Experimental Biology* 200 (Pt 2) (Jan): 315-9.
- Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 (6410) (Jan 28): 315-25.
- Biel, M. y S. Michalakis. 2009. Cyclic nucleotide-gated channels. *Handbook of Experimental Pharmacology* (191) (191): 111-36.
- Blumenstein, I., B. Keseru, F. Wolter, and J. Stein. 2005. The chemopreventive agent resveratrol stimulates cyclic AMP-dependent chloride secretion in vitro. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (15) (Aug 1): 5651-6.
- Bolton, T. B. 1979. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiological Reviews* 59 (3) (Jul): 606-718.
- Borland, G., R. J. Bird, T. M. Palmer y S. J. Yarwood. 2009. Activation of protein kinase C alpha by EPAC1 is required for the ERK- and CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent induction of the SOCS-3 gene by cyclic AMP in COS1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (26) (Jun 26): 17391-403.
- Bozler, E. 1948. The myenteric reflex. *Federation Proceedings* 7 (1 Pt 1) (Mar): 12.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (May 7): 248-54.
- Braun, A. P. y H. Schulman. 1995. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: From form to function. *Annual Review of Physiology* 57: 417-45.
- Brayden, J. E. 2002. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 29 (4) (Apr): 312-6.
- Brelidze, T. I., A. E. Carlson y W. N. Zagotta. 2009. Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (41) (Oct 9): 27989-97.
- Bruce, J. I., T. J. Shuttleworth, D. R. Giovannucci y D. I. Yule. 2002. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the

- synergistic effects of cAMP on Ca²⁺ signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2) (Jan 11): 1340-8.
- Bruce, J. I., S. V. Straub y D. I. Yule. 2003. Crosstalk between cAMP and Ca²⁺ signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium* 34 (6) (Dec): 431-44.
- Bugrim, A. E. 1999. Regulation of Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase. A mechanism for agonist-specific calcium signaling? *Cell Calcium* 25 (3) (Mar): 219-26.
- Bunney, T. D. y M. Katan. 2006. Phospholipase C epsilon: Linking second messengers and small GTPases. *Trends in Cell Biology* 16 (12) (Dec): 640-8.
- Buxton, I. L. y L. L. Brunton. 1983. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 258 (17) (Sep 10): 10233-9.
- Byron, K. y C. W. Taylor. 1995. Vasopressin stimulation of Ca²⁺ mobilization, two bivalent cation entry pathways and Ca²⁺ efflux in A7r5 rat smooth muscle cells. *The Journal of Physiology* 485 (Pt 2) (Jun 1): 455-68.
- Byron, K. L. y C. W. Taylor. 1993. Spontaneous Ca²⁺ spiking in a vascular smooth muscle cell line is independent of the release of intracellular Ca²⁺ stores. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (10) (Apr 5): 6945-52.
- Campbell, J. H. y G. R. Campbell. 1993. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clinical Science (London, England: 1979)* 85 (5) (Nov): 501-13.
- Campos-Toimil, M., J. Elies, E. Alvarez, I. Verde y F. Orallo. 2007. Effects of trans- and cis-resveratrol on Ca²⁺ handling in A7r5 vascular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 577 (1-3) (Dec 22): 91-9.
- Campos-Toimil, M., J. Elies y F. Orallo. 2005. Trans- and cis-resveratrol increase cytoplasmic calcium levels in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (5) (May): 396-404.
- Campos-Toimil, M., T. Keravis, F. Orallo, K. Takeda y C. Lugnier. 2008. Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca²⁺ responses in endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 154 (1) (May): 82-92.
- Canatella, P. J., J. F. Karr, J. A. Petros y M. R. Prausnitz. 2001. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. *Biophysical Journal* 80 (2) (Feb): 755-64.
- Chen, W. J., Y. H. Chen, K. H. Lin, C. H. Ting y Y. H. Yeh. 2011. Cilostazol promotes vascular smooth muscles cell differentiation through the cAMP response element-binding protein-dependent pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (9) (Sep): 2106-13.

- Chen, X. L. y C. M. Rembold. 1996. Nitroglycerin relaxes rat tail artery primarily by lowering Ca^{2+} sensitivity and partially by repolarization. *The American Journal of Physiology* 271 (3 Pt 2) (Sep): H962-8.
- Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova y F. Mei. 2008. Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 40 (7) (Jul): 651-62.
- Chiou, C. Y. y M. H. Malagodi. 1975. Studies on the mechanism of action of a new Ca^{2+} antagonist, 8-(N,N-diethylamino)octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *British Journal of Pharmacology* 53 (2) (Feb): 279-85.
- Christensen, A. E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K. K. Dao, A. Martinez *et al.* 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (37) (Sep 12): 35394-402.
- Cooper, D. M. 2005. Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 6) (Dec): 1319-22.
- Craven, K. B. y W. N. Zagotta. 2006. CNG and HCN channels: Two peas, one pod. *Annual Review of Physiology* 68: 375-401.
- Cribbs, L. L. 2006. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. *Cell Calcium* 40 (2) (Aug): 221-30.
- Crossthwaite, A. J., T. Seebacher, N. Masada, A. Ciruela, K. Dufraux, J. E. Schultz y D. M. Cooper. 2005. The cytosolic domains of Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8) (Feb 25): 6380-91.
- Cuíñas, A., F. Orallo y M. Campos-Toimil M. 2010. cAMP depletes Ca^{2+} from thapsigargin-sensitive and -insensitive intracellular stores in vascular myocytes. Role of PKA and EPAC proteins [abstract]. *European Journal of Clinical Pharmacology* 66 (1). P-16.
- Cuíñas A., J. Elíes y M. Campos-Toimil. 2010. Epac proteins as a determinant for forskolin-induced vasorelaxant effect and cAMP inhibition of store-operated Ca^{2+} entry in vascular myocytes [abstract]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 107 (1). P-2967.
- de la Rosa, L. A., N. Vilariño, M. R. Vieytes y L. M. Botana. 2001. Modulation of thapsigargin-induced calcium mobilisation by cyclic AMP-elevating agents in human lymphocytes is insensitive to the action of the protein kinase A inhibitor H-89. *Cellular Signalling* 13 (6) (Jun): 441-9.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer y J. L. Bos. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396 (6710) (Dec 3): 474-7.
- Delpy, E., H. Coste y A. C. Gouville. 1996. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: Role of phosphodiesterase 3. *British Journal of Pharmacology* 119 (3) (Oct): 471-8.

- Dessauer, C. W. 2009. Adenylyl cyclase-A-kinase anchoring protein complexes: The next dimension in cAMP signaling. *Molecular Pharmacology* 76 (5) (Nov): 935-41.
- Dessauer, C. W., T. T. Scully y A. G. Gilman. 1997. Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (35) (Aug 29): 22272-7.
- Ding, L., A. Chapman, R. Boyd y H. D. Wang. 2007. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292 (6) (Jun): H2997-3005.
- DiPilato, L. M., X. Cheng y J. Zhang. 2004. Fluorescent indicators of cAMP and epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47) (Nov 23): 16513-8.
- DiPilato, L. M. y J. Zhang. 2010. Fluorescent protein-based biosensors: Resolving spatiotemporal dynamics of signaling. *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (1) (Feb): 37-42.
- Do, K. H., M. S. Kim, J. H. Kim, B. Y. Rhim, W. S. Lee, C. D. Kim y S. S. Bae. 2009. Angiotensin II-induced aortic ring constriction is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/L-type calcium channel signaling pathway. *Experimental & Molecular Medicine* 41 (8) (Aug 31): 569-76.
- Docherty, J. R. 2010. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (3) (Feb): 405-17.
- Dodge-Kafka, K. L. y M. S. Kapiloff. 2006. The mAKAP signaling complex: Integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *European Journal of Cell Biology* 85 (7) (Jul): 593-602.
- Dodge-Kafka, K. L., J. Soughayer, G. C. Pare, J. J. Carlisle Michel, L. K. Langeberg, M. S. Kapiloff y J. D. Scott. 2005. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 437 (7058) (Sep 22): 574-8.
- Dong, H., G. J. Waldron, W. C. Cole y C. R. Triggle. 1998. Roles of calcium-activated and voltage-gated delayed rectifier potassium channels in endothelium-dependent vasorelaxation of the rabbit middle cerebral artery. *British Journal of Pharmacology* 123 (5) (Mar): 821-32.
- Doutheil, J. y W. Paschen. 1999. Effect of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-diethylamino-octyl ester (TMB-8) on neuronal calcium homeostasis, protein synthesis, and energy metabolism. *Pharmacology & Toxicology* 85 (2) (Aug): 85-91.
- Echevarria, W., M. F. Leite, M. T. Guerra, W. R. Zipfel y M. H. Nathanson. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology* 5 (5) (May): 440-6.

- Elgoyhen, B., P. S. Lorenzo, M. T. Tellez-Inon y E. Adler-Graschinsky. 1992. Relaxant effects of beta-carbolines on rat aortic rings. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 261 (2) (May): 534-9.
- El-Mowafy, A. M. y M. Alkhalaf. 2003. Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: A novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism. *Carcinogenesis* 24 (5) (May): 869-73.
- Enserink, J. M., A. E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H. G. Genieser, S. O. Doskeland, J. L. Blank y J. L. Bos. 2002. A novel epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biology* 4 (11) (Nov): 901-6.
- Etgen, A. M. y N. Petitti. 1987. Mediation of norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation by adrenergic receptors in hypothalamic and preoptic area slices: Effects of estradiol. *Journal of Neurochemistry* 49 (6) (Dec): 1732-9.
- Ferro, A., M. Coash, T. Yamamoto, J. Rob, Y. Ji y L. Queen. 2004. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and akt. *British Journal of Pharmacology* 143 (3) (Oct): 397-403.
- Fetalvero, K. M., M. Shyu, A. P. Nomikos, Y. F. Chiu, R. J. Wagner, R. J. Powell, J. Hwa y K. A. Martin. 2006. The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 290 (4) (Apr): H1337-46.
- Firth, A. L., C. V. Remillard y J. X. Yuan. 2007. TRP channels in hypertension. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1772 (8) (Aug): 895-906.
- Fisher, S. A. 2010. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological Genomics* 42A (3) (Nov 15): 169-87.
- Flemming, R., S. Z. Xu y D. J. Beech. 2003. Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 139 (5) (Jul): 955-65.
- Floyd, R. y S. Wray. 2007. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* 42 (4-5) (Oct-Nov): 467-76.
- Francis, S. H., M. A. Blount y J. D. Corbin. 2011. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological Reviews* 91 (2) (Apr): 651-90.
- Freeman, E. J., G. M. Chisolm y E. A. Tallant. 1995. Role of calcium and protein kinase C in the activation of phospholipase D by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 319 (1) (May 10): 84-92.
- Fukumitsu, T., H. Hayashi, H. Tokuno y T. Tomita. 1990. Increase in calcium channel current by beta-adrenoceptor agonists in single smooth muscle cells isolated from porcine coronary artery. *British Journal of Pharmacology* 100 (3) (Jul): 593-9.

- Furchgott, R. F. y J. V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789) (Nov 27): 373-6.
- Furutani, H., X. F. Zhang, Y. Iwamuro, K. Lee, Y. Okamoto, O. Takikawa, M. Fukao, T. Masaki y S. Miwa. 2002. Ca²⁺ entry channels involved in contractions of rat aorta induced by endothelin-1, noradrenaline, and vasopressin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 40 (2) (Aug): 265-76.
- Galindo, A., M. L. Vargas, J. Garcia Estan, T. Fuentes y J. Hernandez. 2001. Synergistic interaction of diazepam with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-elevating agents on rat aortic rings. *European Journal of Pharmacology* 428 (2) (Oct 5): 269-75.
- Galione, A. y K. T. Chuang. 2012. Pyridine nucleotide metabolites and calcium release from intracellular stores. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 305-23.
- García-Morales, V., A. Cuiñas, J. Elías y M. Campos-Toimil. PKA and Epac activation mediates cAMP-induced vasorelaxation by increasing endothelial NO production. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. En revision.
- Genazzani, A. A. y A. Galione. 1996. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-insensitive pool. *The Biochemical Journal* 315 (Pt 3) (Pt 3) (May 1): 721-5.
- Gerits, N., S. Kostenko, A. Shiryaev, M. Johannessen y U. Moens. 2008. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cellular Signalling* 20 (9) (Sep): 1592-607.
- Gibson, A., I. McFadzean, P. Wallace y C. P. Wayman. 1998. Capacitative Ca²⁺ entry and the regulation of smooth muscle tone. *Trends in Pharmacological Sciences* 19 (7) (Jul): 266-9.
- Gilibert, J. A. y A. B. Parekh. 2000. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *The EMBO Journal* 19 (23) (Dec 1): 6401-7.
- Giovannucci, D. R., G. E. Groblewski, J. Sneyd y D. I. Yule. 2000. Targeted phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized Ca²⁺ release and shapes oscillatory Ca²⁺ signals. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (43) (Oct 27): 33704-11.
- Gloerich, M. y J. L. Bos. 2010. Epac: Defining a new mechanism for cAMP action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 355-75.
- Goillard, J. M., P. V. Vincent y R. Fischmeister. 2001. Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca²⁺ current in single frog ventricular myocytes. *The Journal of Physiology* 530 (Pt 1) (Jan 1): 79-91.
- Gómez Jimenez, J. y A. Salgado Remigio. 1993. Óxido nítrico y sepsis. *Medicina Clinica (Ed. Impresa)* 101 (19): 741-2.

- Grandoch M., C. Sand, C. Bögermann, Y. Mahlke, P. A Oude Weernik, K. H. Jakobs, M. C. Michel y M. Schmidt M. 2006. Epac-mediated inhibition of vasoconstriction [abstract] *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 372: R92.
- Gratton, J. P., P. Bernatchez y W. C. Sessa. 2004. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circulation Research* 94 (11) (Jun 11): 1408-17.
- Greenwood, I. A. y N. Leblanc. 2007. Overlapping pharmacology of Ca²⁺-activated Cl⁻ and K⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (1) (Jan): 1-5.
- Gribble, F. M., S. J. Tucker, S. Seino y F. M. Ashcroft. 1998. Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels. *Diabetes* 47 (9) (Sep): 1412-8.
- Gros, R., Q. Ding, J. Chorazyczewski, J. G. Pickering, L. E. Limbird y R. D. Feldman. 2006. Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization. *Circulation Research* 99 (8) (Oct 13): 845-52.
- Gueguen, M., Z. Keuylian, V. Mateo, N. Mougnot, A. M. Lompre, J. B. Michel, O. Meilhac, L. Lipskaia y I. Limon. 2010. Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling. *The Journal of Pathology* 221 (3) (Jul): 331-42.
- Guse, A. H. 2002. Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): Novel regulators of Ca²⁺-signaling and cell function. *Current Molecular Medicine* 2 (3) (May): 273-82.
- Guyton, A. C. 2007. *Tratado de fisiología médica*. 11^a edición. Vol. XXXV. Elsevier.
- Hagiwara, S., M. Mitsui y H. Karaki. 1993. Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca²⁺ and contraction in vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology* 234 (1) (Mar 30): 1-7.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann y F. J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 391 (2) (Aug): 85-100.
- Hayashi, K., M. Takahashi, W. Nishida, K. Yoshida, Y. Ohkawa, A. Kitabatake, J. Aoki, H. Arai y K. Sobue. 2001. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circulation Research* 89 (3) (Aug 3): 251-8.
- Haynes, J., Jr, J. Robinson, L. Saunders, A. E. Taylor y S. J. Strada. 1992. Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilation. *The American Journal of Physiology* 262 (2 Pt 2) (Feb): H511-6.
- Hewer, R. C., G. B. Sala-Newby, Y. J. Wu, A. C. Newby y M. Bond. 2011. PKA and epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (1) (Jan): 87-98.

- Hibino, H., A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay y Y. Kurachi. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: Their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews* 90 (1) (Jan): 291-366.
- Hill, A. J., J. M. Hinton, H. Cheng, Z. Gao, D. O. Bates, J. C. Hancox, P. D. Langton y A. F. James. 2006. A TRPC-like non-selective cation current activated by alpha 1-adrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Cell Calcium* 40 (1) (Jul): 29-40.
- Hiramatsu, T., H. Kume, M. I. Kotlikoff y K. Takagi. 1994. Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 21 (5) (May): 367-75.
- Ho, A. K., T. P. Thomas, C. L. Chik, W. B. Anderson y D. C. Klein. 1988. Protein kinase C: Subcellular redistribution by increased Ca²⁺ influx. Evidence that Ca²⁺-dependent subcellular redistribution of protein kinase C is involved in potentiation of beta-adrenergic stimulation of pineal cAMP and cGMP by K⁺ and A23187. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (19) (Jul 5): 9292-7.
- Hochbaum, D., K. Hong, G. Barila, F. Ribeiro-Neto y D. L. Altschuler. 2008. Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (8) (Feb 22): 4464-8.
- Hofer, A. M. y K. Lefkimiatis. 2007. Extracellular calcium and cAMP: Second messengers as "third messengers"? *Physiology (Bethesda, Md.)* 22 (Oct): 320-7.
- Holz, G. G., G. Kang, M. Harbeck, M. W. Roe y O. G. Chepurny. 2006. Cell physiology of cAMP sensor epac. *The Journal of Physiology* 577 (Pt 1) (Nov 15): 5-15.
- Hong, K. P., N. C. Spitzer y X. Nicol. 2011. Improved molecular toolkit for cAMP studies in live cells. *BMC Research Notes* 4 (Jul 20): 241,0500-4-241.
- Houslay, M. D., G. S. Baillie y D. H. Maurice. 2007. cAMP-specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: A molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circulation Research* 100 (7) (Apr 13): 950-66.
- Hughes, A. D., y M. Schachter. 1995. AIF4- inhibits influx of Ca²⁺ into vascular smooth muscle cells. *Biochemical Society Transactions* 23 (2) (May): 171S.
- Iino, M. 2010. Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 86 (3): 244-56.
- Indolfi, C., E. Di Lorenzo, A. Rapacciuolo, A. M. Stingone, E. Stabile, A. Leccia, D. Torella *et al.* 2000. 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *Journal of the American College of Cardiology* 36 (1) (Jul): 288-93.
- Insel, P. A. y R. S. Ostrom. 2003. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology* 23 (3) (Jun): 305-14.

- Irvine, R. F. 1990. 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Letters* 263 (1) (Apr 9): 5-9.
- Ishikawa, T., J. R. Hume y K. D. Keef. 1993. Regulation of Ca²⁺ channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 73 (6) (Dec): 1128-37.
- Ishikura, K., H. Fujita, M. Hida y M. Awazu. 2005. Trapidil inhibits platelet-derived growth factor-induced migration via protein kinase A and RhoA/Rho-associated kinase in rat vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* 515 (1-3) (May 16): 28-33.
- Itoh, T., H. Izumi, and H. Kuriyama. 1982. Mechanisms of relaxation induced by activation of beta-adrenoceptors in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *The Journal of Physiology* 326 (May): 475-93.
- Iversen, N., B. Birkenes, K. Torsdalen y S. Djurovic. 2005. Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells. *Genetic Vaccines and Therapy* 3 (1) (Apr 18): 2.
- Janssens, W. y R. Verhaeghe. 1984. Sources of calcium used during alpha 1- and alpha 2-adrenergic contractions in canine saphenous veins. *The Journal of Physiology* 347 (Feb): 525-32.
- Jiang, D., B. Xiao, X. Li y S. R. Chen. 2003. Smooth muscle tissues express a major dominant negative splice variant of the type 3 Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *The Journal of Biological Chemistry* 278 (7) (Feb 14): 4763-9.
- Jiang, H., Q. Xia, X. Wang, J. Song, and I. C. Bruce. 2005. Luteolin induces vasorelaxion in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Die Pharmazie* 60 (6) (Jun): 444-7.
- Johannessen, M., and U. Moens. 2007. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12 (Jan 1): 1814-32.
- Joseph, S. K. y S. V. Ryan. 1993. Phosphorylation of the inositol trisphosphate receptor in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (31) (Nov 5): 23059-65.
- Jung, F., J. Haendeler, C. Goebel, A. M. Zeiher y S. Dimmeler. 2000. Growth factor-induced phosphoinositide 3-OH kinase/Akt phosphorylation in smooth muscle cells: Induction of cell proliferation and inhibition of cell death. *Cardiovascular Research* 48 (1) (Oct): 148-57.
- Jung, S., R. Strotmann, G. Schultz y T. D. Plant. 2002. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282 (2) (Feb): C347-59.
- Kamata, K., N. Miyata y Y. Kasuya. 1989. Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 249 (3) (Jun): 890-4.

- Kaupp, U. B. y R. Seifert. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological Reviews* 82 (3) (Jul): 769-824.
- Kawano, Y., T. Yoshimura y K. Kaibuchi. 2002. Smooth muscle contraction by small GTPase rho. *Nagoya Journal of Medical Science* 65 (1-2) (May): 1-8.
- Keef, K. D., J. R. Hume y J. Zhong. 2001. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 281 (6) (Dec): C1743-56.
- Keravis, T. y C. Lugnier. 2012. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: Benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *British Journal of Pharmacology* 165 (5) (Mar): 1288-305.
- Khalil, R. A. 2010. Regulation of vascular smooth muscle function. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
- Kim, C., C. Y. Cheng, S. A. Saldanha y S. S. Taylor. 2007. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* 130 (6) (Sep 21): 1032-43.
- Kim, H. H. y J. K. Liao. 2008. Translational therapeutics of dipyridamole. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (3) (Mar): s39-42.
- Kim, H. R., S. Appel, S. Vetterkind, S. S. Gangopadhyay y K. G. Morgan. 2008. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (6A) (Dec): 2165-80.
- Kimura, M., T. Osanai, K. Okumura, S. Suga, T. Kanno, N. Kamimura, N. Horiba y M. Wakui. 2000. Involvement of phosphorylation of beta-subunit in cAMP-dependent activation of L-type Ca²⁺ channel in aortic smooth muscle-derived A7r5 cells. *Cellular Signalling* 12 (1) (Jan): 63-70.
- Kimura, Y., H. Okuda y M. Kubo. 1995. Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 45 (2) (Feb): 131-9.
- Kitazawa, T. 2010. G protein-mediated Ca(2+)-sensitization of CPI-17 phosphorylation in arterial smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401 (1) (Oct 8): 75-8.
- Kitazawa, T., B. D. Gaylinn, G. H. Denney y A. P. Somlyo. 1991. G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (3) (Jan 25): 1708-15.
- Klarenbeek, J. B., J. Goedhart, M. A. Hink, T. W. Gadella y K. Jalink. 2011. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PloS One* 6 (4) (Apr 29): e19170.

- Ko, E. A., J. Han, I. D. Jung y W. S. Park. 2008. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 44 (2) (Apr): 65-81.
- Kobayashi, H., T. Miwa, T. Nagao y S. Adachi-Akahane. 2003. Negative modulation of L-type Ca²⁺ channels via beta-adrenoceptor stimulation in guinea-pig detrusor smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* 470 (1-2) (May 30): 9-15.
- Komas, N., C. Lugnier y J. C. Stoclet. 1991. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 104 (2) (Oct): 495-503.
- Koopman, W. J., R. R. Bosch, S. E. van Emst-de Vries, M. Spaargaren, J. J. De Pont y P. H. Willems. 2003. R-ras alters Ca²⁺ homeostasis by increasing the Ca²⁺ leak across the endoplasmic reticular membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16) (Apr 18): 13672-9.
- Kwan, H. Y., Y. Huang, X. Q. Yao y F. P. Leung. 2009. Role of cyclic nucleotides in the control of cytosolic Ca²⁺ levels in vascular endothelial cells. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 36 (9) (Sep): 857-66.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259) (Aug 15): 680-5.
- Large, W. A. 2002. Receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: A physiologic perspective. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 13 (5) (May): 493-501.
- Laurenza, A., E. M. Sutkowski y K. B. Seamon. 1989. Forskolin: A specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends in Pharmacological Sciences* 10 (11) (Nov): 442-7.
- Ledbetter, M. W., J. K. Preiner, C. F. Louis y J. R. Mickelson. 1994. Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (50) (Dec 16): 31544-51.
- Ledoux, J., M. E. Werner, J. E. Brayden y M. T. Nelson. 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda, Md.)* 21 (Feb): 69-78.
- LeSage, G. D., D. Alvaro, S. Glaser, H. Francis, L. Marucci, T. Roskams, J. L. Phinizy *et al.* 2004. Alpha-1 adrenergic receptor agonists modulate ductal secretion of BDL rats via Ca²⁺- and PKC-dependent stimulation of cAMP. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40 (5) (Nov): 1116-27.
- Leung, Y. K., J. Du, Y. Huang y X. Yao. 2010. Cyclic nucleotide-gated channels contribute to thromboxane A₂-induced contraction of rat small mesenteric arteries. *PLoS One* 5 (6) (Jun 14): e11098.

- Lim, J. J., Y. H. Liu, E. S. Khin y J. S. Bian. 2008. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 295 (5) (Nov): C1261-70.
- Lincoln, T. M. y T. L. Cornwell. 1991. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 28 (1-3): 129-37.
- Lincoln, T. M., T. L. Cornwell y A. E. Taylor. 1990. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology* 258 (3 Pt 1) (Mar): C399-407.
- Lincoln, T. M., N. Dey y H. Sellak. 2001. Invited review: CGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: From the regulation of tone to gene expression. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 91 (3) (Sep): 1421-30.
- Liu, H. y D. H. Maurice. 1999. Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (15) (Apr 9): 10557-65.
- Liu, H., D. Palmer, S. L. Jimmo, D. G. Tilley, H. A. Dunkerley, S. C. Pang y D. H. Maurice. 2000. Expression of phosphodiesterase 4D (PDE4D) is regulated by both the cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and expression in cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (34) (Aug 25): 26615-24.
- Liu, H., Z. Xiong y N. Sperelakis. 1997. Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (5) (May): 1411-21.
- Lockwich, T. P., X. Liu, B. B. Singh, J. Jadlowiec, S. Weiland y I. S. Ambudkar. 2000. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (16) (Apr 21): 11934-42.
- Lompre, A. M. 1998. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases in the cardiovascular system during growth and proliferation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 8 (2) (Feb): 75-82.
- Lorenz, J. N., D. R. Bielefeld y N. Sperelakis. 1994. Regulation of calcium channel current in A7r5 vascular smooth muscle cells by cyclic nucleotides. *The American Journal of Physiology* 266 (6 Pt 1) (Jun): C1656-63.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K. P. Chepenik y S. A. Waldman. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews* 52 (3) (Sep): 375-414.
- Ludwig, J., R. Weseloh, C. Karschin, Q. Liu, R. Netzer, B. Engeland, C. Stansfeld y O. Pongs. 2000. Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-

- go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Molecular and Cellular Neurosciences* 16 (1) (Jul): 59-70.
- Malviya, A. N. y P. J. Rogue. 1998. "Tell me where is calcium bred": Clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 92 (1) (Jan 9): 17-23.
- Marchand, A., A. Abi-Gerges, Y. Saliba, E. Merlet y A. M. Lompre. 2012. Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: From physiology to pathology. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 795-810.
- Marin, J., A. Encabo, A. Briones, E. C. Garcia-Cohen y M. J. Alonso. 1999. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. *Life Sciences* 64 (5): 279-303.
- Marks, T. N., G. R. Dubyak y S. W. Jones. 1990. Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 417 (4) (Dec): 433-9.
- Matsuki-Fukushima, M., T. Tomita, G. S. Bird y J. W. Putney Jr. 2009. Store operated calcium entry in NIH-3T3 cells. *The Journal of Medical Investigation: JMI* 56 Suppl: 381-2.
- Matsumoto, T., T. Kobayashi y K. Kamata. 2003. Phosphodiesterases in the vascular system. *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 39 (4) (Aug): 67-86.
- Maurice, D. H. 2005. Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 10 (May 1): 1221-8.
- Maurice, D. H. 1998. Cyclic nucleotide-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. Selective effect of cyclic AMP. *Cell Biochemistry and Biophysics* 29 (1-2): 35-47.
- Maurice, D. H., D. Palmer, D. G. Tilley, H. A. Dunkerley, S. J. Netherton, D. R. Raymond, H. S. Elbatarny y S. L. Jimmo. 2003. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Molecular Pharmacology* 64 (3) (Sep): 533-46.
- McMahon, E. G. y R. J. Paul. 1986. Effects of forskolin and cyclic nucleotides on isometric force in rat aorta. *The American Journal of Physiology* 250 (3 Pt 1) (Mar): C468-73.
- Meloche, S., J. Landry, J. Huot, F. Houle, F. Marceau y E. Giasson. 2000. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 279 (2) (Aug): H741-51.
- Menniti, F. S., W. S. Faraci y C. J. Schmidt. 2006. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (8) (Aug): 660-70.
- Merritt, J. E., W. P. Armstrong, C. D. Benham, T. J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B. K. Leigh, S. A. McCarthy, K. E. Moores y T. J. Rink. 1990. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *The Biochemical Journal* 271 (2) (Oct 15): 515-22.

- Metrich, M., M. Berthouze, E. Morel, B. Crozatier, A. M. Gomez y F. Lezoualc'h. 2010. Role of the cAMP-binding protein epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 459 (4) (Mar): 535-46.
- Metrich, M., E. Morel, M. Berthouze, L. Pereira, P. Charron, A. M. Gomez y F. Lezoualc'h. 2009. Functional characterization of the cAMP-binding proteins epac in cardiac myocytes. *Pharmacological Reports: PR* 61 (1) (Jan-Feb): 146-53.
- Minowa, T., S. Miwa, S. Kobayashi, T. Enoki, X. F. Zhang, T. Komuro, Y. Iwamuro, and T. Masaki. 1997. Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated Ca(2+)-permeable nonselective cation channel in rat aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 120 (8) (Apr): 1536-44.
- Minta, A. y R. Y. Tsien. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *The Journal of Biological Chemistry* 264 (32) (Nov 15): 19449-57.
- Missiaen, L., J. B. Parys, H. De Smedt, B. Himpens y R. Casteels. 1994. Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP. *The Biochemical Journal* 300 (Pt 1) (May 15): 81-4.
- Morel, E., A. Marcantoni, M. Gastineau, R. Birkedal, F. Rochais, A. Garnier, A. M. Lompre, G. Vandecasteele y F. Lezoualc'h. 2005. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research* 97 (12) (Dec 9): 1296-304.
- Morgado, M., E. Cairrao, A. J. Santos-Silva e I. Verde. 2012. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (2) (Jan): 247-66.
- Morgan, J. P. y K. G. Morgan. 1984. Alteration of cytoplasmic ionized calcium levels in smooth muscle by vasodilators in the ferret. *The Journal of Physiology* 357 (Dec): 539-51.
- Muller, M. J. y H. P. Baer. 1983. Relaxant effects of forskolin in smooth muscle. Role of cyclic AMP. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 322 (1) (Feb): 78-82.
- Murphy, M. E. y J. E. Brayden. 1995. Apamin-sensitive K⁺ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *The Journal of Physiology* 489 (Pt 3) (Pt 3) (Dec 15): 723-34.
- Murray, A. J., S. J. Tucker y D. A. Shewan. 2009. cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by epac and protein kinase A. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (49) (Dec 9): 15434-44.
- Murthy, K. S. y G. M. Makhlof. 1998. Regulation of adenylyl cyclase type V/VI in smooth muscle: Interplay of inhibitory G protein and Ca²⁺ influx. *Molecular Pharmacology* 54 (1) (Jul): 122-8.
- Nakajima, K., K. Hirade, A. Ishisaki, H. Matsuno, H. Suga, Y. Kanno, E. Shu, Y. Kitajima, Y. Katagiri y O. Kozawa. 2005. Akt regulates thrombin-induced HSP27 phosphorylation in aortic smooth muscle cells: Function at a point downstream from p38 MAP kinase. *Life Sciences* 77 (1) (May 20): 96-107.

- Neher, E., B. Sakmann, and J. H. Steinbach. 1978. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 375 (2) (Jul 18): 219-28.
- Nelson, C. P., R. D. Rainbow, J. L. Brignell, M. D. Perry, J. M. Willets, N. W. Davies, N. B. Standen y R. A. Challiss. 2011. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K(+) channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research* 91 (4) (Sep 1): 694-702.
- Netherton, S. J. y D. H. Maurice. 2005. Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: Implications in angiogenesis. *Molecular Pharmacology* 67 (1) (Jan): 263-72.
- Nikolaev, V. O. y M. J. Lohse. 2006. Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda, Md.)* 21 (Apr): 86-92.
- Nishimura, J. 2006. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. *Journal of Pharmacological Sciences* 102 (1) (Sep): 27-31.
- Nishimura, J. y C. van Breemen. 1989. Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 163 (2) (Sep 15): 929-35.
- Noguera, M. A., M. D. Ivorra, S. Chulia y P. D'Ocon. 1997. Capacitative Ca²⁺ entry associated with alpha1-adrenoceptors in rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 356 (1) (Jul): 83-9.
- Noguera, M. A., M. D. Ivorra, C. Lugnier y P. D'Ocon. 2001. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in contractile responses of denuded rat aorta related to various Ca²⁺ sources. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363 (6) (Jun): 612-9.
- Noguera, M. A., Y. Madrero, M. D. Ivorra y P. D'Ocon. 1998. Characterization of two different Ca²⁺ entry pathways dependent on depletion of internal Ca²⁺ pools in rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 357 (2) (Feb): 92-9.
- Oestreich, E. A., S. Malik, S. A. Goonasekera, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen y A. V. Smrcka. 2009. Epac and phospholipase cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (3) (Jan 16): 1514-22.
- Ohya, Y., K. Kitamura y H. Kuriyama. 1987. Cellular calcium regulates outward currents in rabbit intestinal smooth muscle cell. *The American Journal of Physiology* 252 (4 Pt 1) (Apr): C401-10.
- Orallo, F. 1997. Study of the in vivo and in vitro cardiovascular effects of a hydralazine-like vasodilator agent (HPS-10) in normotensive rats. *British Journal of Pharmacology* 121 (8) (Aug): 1627-36.

- Orallo F. 1996. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacology & Therapeutics* 69 (3): 153-71.
- Orlov, S. N., J. Tremblay y P. Hamet. 1996. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 27 (3 Pt 2) (Mar): 774-80.
- Ostrom, R. S., X. Liu, B. P. Head, C. Gregorian, T. M. Seasholtz y P. A. Insel. 2002. Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: Expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Molecular Pharmacology* 62 (5) (Nov): 983-92.
- Parekh, A. B. 2008. Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* 44 (1) (Jul): 6-13.
- Park, S., B. Kim, J. Kim, K. J. Won, S. Lee, S. Kwon y S. Cho. 2003. Tamoxifen induces vasorelaxation via inhibition of mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 65 (11) (Nov): 1155-60.
- Parkash, J. y K. Asotra. 2012. Calcium oscillations and waves in cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 521-9.
- Parys, J. B. y H. De Smedt. 2012. Inositol 1,4,5-trisphosphate and its receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 255-79.
- Patel, H. H., F. Murray y P. A. Insel. 2008. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48: 359-91.
- Perez-Reyes, E. 2004. Paradoxical role of T-type calcium channels in coronary smooth muscle. *Molecular Interventions* 4 (1) (Feb): 16-8.
- Pfizer, G. 2001. Invited review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 91 (1) (Jul): 497-503.
- "Physiology or Medicine 1971 - Press Release". Nobelprize.org. 11 Apr 2013 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1971/press.html
- Pidoux, G. y K. Tasken. 2010. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Molecular Endocrinology* 44 (5) (May): 271-84.
- Ponsioen, B., J. Zhao, J. Riedl, F. Zwartkuis, G. van der Krogt, M. Zaccolo, W. H. Moolenaar, J. L. Bos y K. Jalink. 2004. Detecting cAMP-induced epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Reports* 5 (12) (Dec): 1176-80.
- Potier, M., J. C. Gonzalez, R. K. Motiani, I. F. Abdullaev, J. M. Bisailon, H. A. Singer y M. Trebak. 2009. Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: Role in proliferation and migration.

FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23 (8) (Aug): 2425-37.

Potier, M. y M. Trebak. 2008. New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 457 (2) (Nov): 405-15.

Purves, G. I., T. Kamishima, L. M. Davies, J. M. Quayle y C. Dart. 2009. Exchange protein activated by cAMP (epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of Physiology* 587 (Pt 14) (Jul 15): 3639-50.

Purves, G. I., T. Kamishima, L. M. Davies, J. M. Quayle y C. Dart. 2008. cAMP-initiated but PKA-independent regulation of vascular ATP-sensitive K⁺ channels: The role of exchange proteins directly activated by cAMP [abstract]. *Proc Physiol Soc* 11, C42.

Putney, J. W. 2009. Capacitative calcium entry: From concept to molecules. *Immunological Reviews* 231 (1) (Sep): 10-22.

Putney, J. W., Jr. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11 (10) (Nov-Dec): 611-24.

Queen, L. R., Y. Ji, B. Xu, L. Young, K. Yao, A. W. Wyatt, D. J. Rowlands, R. C. Siow, G. E. Mann y A. Ferro. 2006. Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Physiology* 576 (Pt 2) (Oct 15): 585-94.

Rall, T. W. y E. W. Sutherland. 1958. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *The Journal of Biological Chemistry* 232 (2) (Jun): 1065-76.

Randriamampita, C. y R. Y. Tsien. 1993. Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 364 (6440) (Aug 26): 809-14.

Raymond, G. L. y I. R. Wendt. 1996. Force and intracellular Ca²⁺ during cyclic nucleotide-mediated relaxation of rat anococcygeus muscle and the effects of cyclopiazonic acid. *British Journal of Pharmacology* 119 (5) (Nov): 1029-37.

Rembold, C. M. 1992. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* 20 (2) (Aug): 129-37.

Rembold, C. M. y X. L. Chen. 1998. Mechanisms responsible for forskolin-induced relaxation of rat tail artery. *Hypertension* 31 (3) (Mar): 872-7.

Rich, T. C., K. A. Fagan, H. Nakata, J. Schaack, D. M. Cooper y J. W. Karpen. 2000. Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *The Journal of General Physiology* 116 (2) (Aug): 147-61.

Rich, T. C. y J. W. Karpen. 2002. Review article: Cyclic AMP sensors in living cells: What signals can they actually measure? *Annals of Biomedical Engineering* 30 (8) (Sep): 1088-99.

- Rich, T. C., T. E. Tse, J. G. Rohan, J. Schaack y J. W. Karpen. 2001. In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *The Journal of General Physiology* 118 (1) (Jul): 63-78.
- Richard, S. 2005. Vascular effects of calcium channel antagonists: New evidence. *Drugs* 65 Suppl 2: 1-10.
- Robert, R., V. Thoreau, C. Norez, A. Cantereau, A. Kitzi, Y. Mettey, C. Rogier y F. Becq. 2004. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by beta-adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (20) (May 14): 21160-8.
- Rochais, F., G. Vandecasteele, F. Lefebvre, C. Lugnier, H. Lum, J. L. Mazet, D. M. Cooper y R. Fischmeister. 2004. Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: An in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (50) (Dec 10): 52095-105.
- Rodman, D. M., J. Harral, S. Wu, J. West, M. Hoedt-Miller, K. A. Reese y K. Fagan. 2005. The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest* 128 (6 Suppl) (Dec): 581S-2S.
- Rodrigo, J., D. Alonso, A. Fernandez, J. Serrano y J. Lopez. 2000. Nitric oxide: Synthesis, neuroprotection and neurotoxicity. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra* 23 (2) (May-Aug): 195-235.
- Roscioni, S. S., B. G. Dekkers, A. G. Prins, M. H. Menzen, H. Meurs, M. Schmidt y H. Maarsingh. 2011. cAMP inhibits modulation of airway smooth muscle phenotype via the exchange protein activated by cAMP (epac) and protein kinase A. *British Journal of Pharmacology* 162 (1) (Jan): 193-209.
- Roscioni, S. S., C. R. Elzinga y M. Schmidt. 2008. Epac: Effectors and biological functions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (4-6) (Jun): 345-57.
- Roscioni, S. S., L. E. Kistemaker, M. H. Menzen, C. R. Elzinga, R. Gosens, A. J. Halayko, H. Meurs y M. Schmidt. 2009. PKA and epac cooperate to augment bradykinin-induced interleukin-8 release from human airway smooth muscle cells. *Respiratory Research* 10 (Sep 29): 88,9921-10-88.
- Rose, R. J., H. Liu, D. Palmer y D. H. Maurice. 1997. Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *British Journal of Pharmacology* 122 (2) (Sep): 233-40.
- Ross, M. H., G. I. Gordon I. Kaye y W. Pawlina. 2005. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. 4ª edición. Vol. XVIII. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Ross, G. R. y C. Yallampalli. 2006. Endothelium-independent relaxation by adrenomedullin in pregnant rat mesenteric artery: Role of cAMP-dependent protein kinase A and

- calcium-activated potassium channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317 (3) (Jun): 1269-75.
- Rzucidlo, E. M., K. A. Martin y R. J. Powell. 2007. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of Vascular Surgery* 45 Suppl A (Jun): A25-32.
- Salamanca, D. A. y R. A. Khalil. 2005. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochemical Pharmacology* 70 (11) (Nov 25): 1537-47.
- Salido, G. M., I. Jardi y J. A. Rosado. 2011. The TRPC ion channels: Association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 704: 413-33.
- Sampson, L. J., Y. Hayabuchi, N. B. Standen y C. Dart. 2004. Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels. *Circulation Research* 95 (10) (Nov 12): 1012-8.
- Sanders, K. M. 2001. Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 91 (3) (Sep): 1438-49.
- Santos-Silva, A. J., E. Cairrão, M. Morgado, E. Álvarez e I. Verde. 2008. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *European Journal of Pharmacology* 582 (1-3) (Mar 17): 102-9.
- Sassi, Y., L. Lipskaia, G. Vandecasteele, V. O. Nikolaev, S. N. Hatem, F. Cohen Aubart, F. G. Russel, *et al.* 2008. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (8) (Aug): 2747-57.
- Satoh, H. y N. Sperelakis. 1995. Modulation of L-type Ca²⁺ current by isoprenaline, carbachol and phorbol ester in cultured rat aortic vascular smooth muscle (A7r5) cells. *General Pharmacology* 26 (2) (Mar): 369-79.
- Savaria, D., C. Lanoue, A. Cadieux y E. Rousseau. 1992. Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *The American Journal of Physiology* 262 (3 Pt 1) (Mar): L327-36.
- Schafer, C., S. Walther, M. Schafer, L. Dieterich, S. Kasseckert, Y. Abdallah y H. M. Piper. 2003. Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation. *Cardiovascular Research* 58 (1) (Apr 1): 149-55.
- Schmidt, M., F. J. Dekker y H. Maarsingh. 2013. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): A multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacological Reviews* 65 (2) (Feb 27): 670-709.
- Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney y K. H. Jakobs. 2001. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a rap GTPase. *Nature Cell Biology* 3 (11) (Nov): 1020-4.

- Schmidt, M., C. Sand, K. H. Jakobs, M. C. Michel, and P. A. Weernink. 2007. Epac and the cardiovascular system. *Current Opinion in Pharmacology* 7 (2) (Apr): 193-200.
- Schubert, R., V. N. Serebryakov, H. Mewes, and H. H. Hopp. 1997. Iloprost dilates rat small arteries: Role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *The American Journal of Physiology* 272 (3 Pt 2) (Mar): H1147-56.
- Schwabe, U., M. Miyake, Y. Ohga y J. W. Daly. 1976. 4-(3-cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): A potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Molecular Pharmacology* 12 (6) (Nov): 900-10.
- Schwarz, J. R. y C. K. Bauer. 2004. Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8 (1) (Jan-Mar): 22-30.
- Seamon, K. B. y J. W. Daly. 1986. Forskolin: Its biological and chemical properties. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 20: 1-150.
- Sellak, H., X. Yang, X. Cao, T. Cornwell, G. A. Soff y T. Lincoln. 2002. Sp1 transcription factor as a molecular target for nitric oxide- and cyclic nucleotide-mediated suppression of cGMP-dependent protein kinase-I alpha expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 90 (4) (Mar 8): 405-12.
- Serban, D. N., B. Nilius y P. M. Vanhoutte. 2010. The endothelial saga: The past, the present, the future. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 459 (6) (May): 787-92.
- Sette, C., E. Vicini y M. Conti. 1994. The ratPDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (28) (Jul 15): 18271-4.
- Shayo, C., C. Davio, A. Brodsky, A. G. Mladovan, B. L. Legnazzi, E. Rivera y A. Baldi. 1997. Histamine modulates the expression of c-fos through cyclic AMP production via the H2 receptor in the human promonocytic cell line U937. *Molecular Pharmacology* 51 (6) (Jun): 983-90.
- Shi, Y., N. Cui, W. Shi y C. Jiang. 2008. A short motif in Kir6.1 consisting of four phosphorylation repeats underlies the vascular KATP channel inhibition by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (5) (Feb 1): 2488-94.
- Silver, P. J., R. J. Michalak y S. M. Kocmund. 1985. Role of cyclic AMP protein kinase in decreased arterial cyclic AMP responsiveness in hypertension. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 232 (3) (Mar): 595-601.
- Smyth, J. T., S. Y. Hwang, T. Tomita, W. I. DeHaven, J. C. Mercer y J. W. Putney. 2010. Activation and regulation of store-operated calcium entry. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (10) (Oct): 2337-49.
- Soboloff, J., M. A. Spassova, M. A. Dziadek y D. L. Gill. 2006. Calcium signals mediated by STIM and orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763 (11) (Nov): 1161-8.

- Somlyo, A. P. y A. V. Somlyo. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews* 83 (4) (Oct): 1325-58.
- Somlyo, A. V. y A. P. Somlyo. 1968. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 159 (1) (Jan): 129-45.
- Srinivasan, R., S. Forman, R. A. Quinlan, J. Ohanian y V. Ohanian. 2008. Regulation of contractility by Hsp27 and hic-5 in rat mesenteric small arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (2) (Feb): H961-9.
- Stangherlin, A. y M. Zaccolo. 2012. Phosphodiesterases and subcellular compartmentalized cAMP signaling in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (2) (Jan): H379-90.
- Ster, J., F. De Bock, N. C. Guerineau, A. Janossy, S. Barrere-Lemaire, J. L. Bos, J. Bockaert, and L. Fagni. 2007. Exchange protein activated by cAMP (epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (7) (Feb 13): 2519-24.
- Suenaga, H. y K. Kamata. 2002. Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses in rat aorta via activation of tyrosine kinase. *British Journal of Pharmacology* 135 (3) (Feb): 789-99.
- Sukhanova, I. F., L. M. Kozhevnikova, E. G. Popov, O. N. Podmareva y P. V. Avdonin. 2006. Activators of epac proteins induce relaxation of isolated rat aorta. *Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections / Translated from Russian* 411 (Nov-Dec): 441-4.
- Sumara, G., M. Belwal y R. Ricci. 2005. "Jnking" atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (21) (Nov): 2487-94.
- Supattapone, S., S. K. Danoff, A. Theibert, S. K. Joseph, J. Steiner y S. H. Snyder. 1988. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (22) (Nov): 8747-50.
- Surks, H. K. 2007. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: A tale of two isoforms. *Circulation Research* 101 (11) (Nov 26): 1078-80.
- Sward, K., M. Mita, D. P. Wilson, J. T. Deng, M. Susnjar y M. P. Walsh. 2003. The role of RhoA and rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. *Current Hypertension Reports* 5 (1) (Feb): 66-72.
- Szewczyk, M. M., J. Pande, G. Akolkar y A. K. Grover. 2010. Caloxin 1b3: A novel plasma membrane Ca²⁺-pump isoform 1 selective inhibitor that increases cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells. *Cell Calcium* 48 (6) (Dec): 352-7.

- Taguchi, K., M. Ueda y T. Kubo. 1997. Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteric artery cells. *Japanese Journal of Pharmacology* 74 (2) (Jun): 179-86.
- Takuwa, Y., N. Takuwa y H. Rasmussen. 1988. The effects of isoproterenol on intracellular calcium concentration. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (2) (Jan 15): 762-8.
- Tanaka, R., K. Muraki, S. Ohya, H. Yamamura, N. Hatano, Y. Itoh y Y. Imaizumi. 2008. TRPV4-like non-selective cation currents in cultured aortic myocytes. *Journal of Pharmacological Sciences* 108 (2) (Oct): 179-89.
- Tasker, P. N., C. W. Taylor y G. F. Nixon. 2000. Expression and distribution of InsP(3) receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (3) (Jul 14): 907-12.
- Taylor, C. W., Taufiq-Ur-Rahman y E. Pantazaka. 2009. Targeting and clustering of IP3 receptors: Key determinants of spatially organized Ca²⁺ signals. *Chaos (Woodbury, N.Y.)* 19 (3) (Sep): 037102.
- Taylor, C. W. y S. C. Tovey. 2012. From parathyroid hormone to cytosolic Ca²⁺ signals. *Biochemical Society Transactions* 40 (1) (Feb): 147-52.
- Taylor, C. W. y S. C. Tovey. 2010. IP(3) receptors: Toward understanding their activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (12) (Dec): a004010.
- Tepel, M., C. Ruess, N. Mehring, M. Neusser y W. Zidek. 1994. Effect of inhibition of sarcoplasmic Ca(2+)-ATPase on vasoconstriction and cytosolic Ca²⁺ in aortic smooth muscle from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 16 (4) (Jul): 493-506.
- Terrin, A., S. Monterisi, A. Stangherlin, A. Zoccarato, A. Koschinski, N. C. Surdo, M. Mongillo et al. 2012. PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *The Journal of Cell Biology* 198 (4) (Aug 20): 607-21.
- Tertyshnikova, S. y A. Fein. 1998. Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (4) (Feb 17): 1613-7.
- Thibonnier, M., A. L. Bayer, M. S. Simonson y M. Kester. 1991. Multiple signaling pathways of V1-vascular vasopressin receptors of A7r5 cells. *Endocrinology* 129 (6) (Dec): 2845-56.
- Tilley, D. G. y D. H. Maurice. 2002. Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4 activities and levels are regulated by cyclic AMP in vivo. *Molecular Pharmacology* 62 (3) (Sep): 497-506.
- Tokay, A., A. Çetin, F. Uzuner y Yesilkaya A. 2012. Observing better transfection efficiency in primary cultured VSMCs: Comparison and development of two different protocols. *Turkish Journal of Biochemistry* 37 (1): 94-98.

- Tosun, M., R. J. Paul y R. M. Rapoport. 1998. Coupling of store-operated Ca^{2+} entry to contraction in rat aorta. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 285 (2) (May): 759-66.
- Tovey, S. C., S. G. Dedos, T. Rahman, E. J. Taylor, E. Pantazaka y C. W. Taylor. 2010. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP independent of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (17) (Apr 23): 12979-89.
- Tovey, S. C., S. G. Dedos, E. J. Taylor, J. E. Church y C. W. Taylor. 2008. Selective coupling of type 6 adenylyl cyclase with type 2 IP3 receptors mediates direct sensitization of IP3 receptors by cAMP. *The Journal of Cell Biology* 183 (2) (Oct 20): 297-311.
- Trebak, M., R. Ginnan, H. A. Singer y D. Jour'd'heuil. 2010. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: An essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (5) (Mar 1): 657-74.
- Trepakova, E. S., P. Csutora, D. L. Hunton, R. B. Marchase, R. A. Cohen y V. M. Bolotina. 2000. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (34) (Aug 25): 26158-63.
- Tugba Durlu-Kandilci, N., M. Ruas, K. T. Chuang, A. Brading, J. Parrington y A. Galione. 2010. TPC2 proteins mediate nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)- and agonist-evoked contractions of smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (32) (Aug 6): 24925-32.
- Tzeng, B. H., Y. H. Chen, C. H. Huang, S. S. Lin, K. R. Lee y C. C. Chen. 2012. The $\text{Ca}_v3.1$ T-type calcium channel is required for neointimal formation in response to vascular injury in mice. *Cardiovascular Research* 96 (3) (Dec 1): 533-42.
- Ushio-Fukai, M., S. Abe, S. Kobayashi, J. Nishimura y H. Kanaide. 1993. Effects of isoprenaline on cytosolic calcium concentrations and on tension in the porcine coronary artery. *The Journal of Physiology* 462 (Mar): 679-96.
- Utz, J., R. Eckert y W. Trautwein. 1999. Changes of intracellular calcium concentrations by phenylephrine in renal arterial smooth muscle cells. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 438 (6) (Nov): 725-31.
- Vallot, O., L. Combettes, P. Jourdon, J. Inamo, I. Marty, M. Claret y A. M. Lompre. 2000. Intracellular Ca^{2+} handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (5) (May): 1225-35.
- van Breemen, C. y K. Saida. 1989. Cellular mechanisms regulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annual Review of Physiology* 51: 315-29.
- Vandecasteele, G., F. Rochais, A. Abi-Gerges y R. Fischmeister. 2006. Functional localization of cAMP signalling in cardiac myocytes. *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 4) (Aug): 484-8.

- Waldron, G. J. y W. C. Cole. 1999. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 26 (2) (Feb): 180-4.
- Walker, R. L., J. R. Hume y B. Horowitz. 2001. Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 280 (5) (May): C1184-92.
- Wamhoff, B. R., D. K. Bowles y G. K. Owens. 2006. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circulation Research* 98 (7) (Apr 14): 868-78.
- Wang, H., C. Long, Z. Duan, C. Shi, G. Jia y Y. Zhang. 2007. A new ATP-sensitive potassium channel opener protects endothelial function in cultured aortic endothelial cells. *Cardiovascular Research* 73 (3) (Feb 1): 497-503.
- Webb, R. C. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education* 27 (1-4) (Dec): 201-6.
- Welling, A., A. Ludwig, S. Zimmer, N. Klugbauer, V. Flockerzi y F. Hofmann. 1997. Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca²⁺ channels. *Circulation Research* 81 (4) (Oct): 526-32.
- Wellman, G. C. y M. T. Nelson. 2003. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: Sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels. *Cell Calcium* 34 (3) (Sep): 211-29.
- Wettschureck, N. y S. Offermanns. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews* 85 (4) (Oct): 1159-204.
- White, R. E., J. P. Kryman, A. M. El-Mowafy, G. Han y G. O. Carrier. 2000. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation Research* 86 (8) (Apr 28): 897-905.
- Willette, R. N., A. O. Shiloh, C. F. Sauermelech, A. Sulpizio, M. P. Michell, L. B. Cieslinski, T. J. Torphy y E. H. Ohlstein. 1997. Identification, characterization, and functional role of phosphodiesterase type IV in cerebral vessels: Effects of selective phosphodiesterase inhibitors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17 (2) (Feb): 210-9.
- Willoughby, D. y D. M. Cooper. 2007. Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews* 87 (3) (Jul): 965-1010.
- Willoughby, D. y D. M. Cooper. 2008. Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nature Methods* 5 (1) (Jan): 29-36.
- Willoughby, D., K. L. Everett, M. L. Halls, J. Pacheco, P. Skroblin, L. Vaca, E. Klussmann y D. M. Cooper. 2012. Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling. *Science Signaling* 5 (219) (Apr 10): ra29.

- Willoughby, D., M. L. Halls, K. L. Everett, A. Ciruela, P. Skroblin, E. Klusmann y D. M. Cooper. 2012. A key phosphorylation site in AC8 mediates regulation of Ca(2+)-dependent cAMP dynamics by an AC8-AKAP79-PKA signalling complex. *Journal of Cell Science* 125 (Pt 23) (Dec 1): 5850-9.
- Wilson, A. J. y L. H. Clapp. 2002. The molecular site of action of K(ATP) channel inhibitors determines their ability to inhibit iNOS-mediated relaxation in rat aorta. *Cardiovascular Research* 56 (1) (Oct): 154-63.
- Wray, S. y T. Burdyga. 2010. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiological Reviews* 90 (1) (Jan): 113-78.
- Wray, S., T. Burdyga, and K. Noble. 2005. Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium* 38 (3-4) (Sep-Oct): 397-407.
- Wynne, B. M., C. W. Chiao y R. C. Webb. 2009. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH* 3 (2) (Mar-Apr): 84-95.
- Yáñez, M., J. Gil-Longo y M. Campos-Toimil. 2012. Calcium binding proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 461-82.
- Yang, C. M., C. T. Chiu, C. C. Wang, H. L. Tsao y L. W. Fan. 1999. Forskolin inhibits 5-hydroxytryptamine-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilisation in canine cultured aorta smooth muscle cells. *Cellular Signalling* 11 (9) (Sep): 697-704.
- Yang, G., T. Li, J. Xu y L. Liu. 2010. PKC plays an important mediated effect in arginine vasopressin induced restoration of vascular responsiveness and calcium sensitization following hemorrhagic shock in rats. *European Journal of Pharmacology* 628 (1-3) (Feb 25): 148-54.
- Yang, X. R., M. J. Lin y J. S. Sham. 2010. Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 661: 109-22.
- Yokoyama, U., S. Minamisawa, H. Quan, T. Akaike, M. Jin, K. Otsu, C. Ulucan *et al.* 2008. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (4) (Oct): H1547-55.
- Yusufi, A. N., J. Cheng, M. A. Thompson, J. C. Burnett y J. P. Grande. 2002. Differential mechanisms of Ca(2+) release from vascular smooth muscle cell microsomes. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 227 (1) (Jan): 36-44.
- Zaccolo, M., P. Magalhaes y T. Pozzan. 2002. Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Current Opinion in Cell Biology* 14 (2) (Apr): 160-6.
- Zadran, S., S. Standley, K. Wong, E. Otiniano, A. Amighi, and M. Baudry. 2012. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: Visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96 (4) (Nov): 895-902.

- Zeng, L., S. V. Webster y P. M. Newton. 2012. The biology of protein kinase C. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 639-61.
- Zhang, J., C. Ren, L. Chen, M. F. Navedo, L. K. Antos, S. P. Kinsey, T. Iwamoto *et al.* 2010. Knockout of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in smooth muscle attenuates vasoconstriction and L-type Ca²⁺ channel current and lowers blood pressure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 298 (5) (May): H1472-83.
- Zhang, K. Y., G. L. Card, Y. Suzuki, D. R. Artis, D. Fong, S. Gillette, D. Hsieh *et al.* 2004. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Molecular Cell* 15 (2) (Jul 23): 279-86.
- Zhang, S., H. H. Patel, F. Murray, C. V. Remillard, C. Schach, P. A. Thistlethwaite, P. A. Insel y J. X. Yuan. 2007. Pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and IPAH patients show divergent cAMP-mediated effects on TRPC expression and capacitative Ca²⁺ entry. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 292 (5) (May): L1202-10.
- Zhang, W. y M. Trebak. 2011. STIM1 and Orai1: Novel targets for vascular diseases? *Science China. Life Sciences* 54 (8) (Aug): 780-5.
- Zhang, X., J. Wen, K. R. Bidasee, H. R. Besch Jr, R. J. Wojcikiewicz, B. Lee y R. P. Rubin. 1999. Ryanodine and inositol trisphosphate receptors are differentially distributed and expressed in rat parotid gland. *The Biochemical Journal* 340 (Pt 2) (Pt 2) (Jun 1): 519-27.
- Zhang, X. F., Y. Iwamuro, T. Enoki, M. Okazawa, K. Lee, T. Komuro, T. Minowa *et al.* 1999. Pharmacological characterization of Ca²⁺ entry channels in endothelin-1-induced contraction of rat aorta using LOE 908 and SK&F 96365. *British Journal of Pharmacology* 127 (6) (Jul): 1388-98.
- Zhao, H., Q. Guan, C. J. Smith y J. Quilley. 2008. Increased phosphodiesterase 3A/4B expression after angioplasty and the effect on VASP phosphorylation. *European Journal of Pharmacology* 590 (1-3) (Aug 20): 29-35.
- Zieba, B. J., M. V. Artamonov, L. Jin, K. Momotani, R. Ho, A. S. Franke, R. L. Neppel *et al.* 2011. The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19) (May 13): 16681-92.





Anexos



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Vascular Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vphCyclic AMP relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated in part by decrease of depletion of intracellular Ca^{2+} stores and inhibition of capacitative calcium entryAndrea Cuñías, Jacobo Elías¹, Francisco Orallo², Manuel Campos-Toimil^{*}

Departamento de Farmacología, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2012

Received in revised form 9 August 2012

Accepted 26 August 2012

Keywords:

Cyclic AMP

Forskolin

Rat aorta

Phosphodiesterase 4

p38-mitogen-activated protein kinase

ABSTRACT

Despite a large number of studies, the mechanism by which 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) induces vasorelaxation is not fully understood. The comparison between results obtained in different vessels or species has often been the source of conflicting reports. In order to shed more light onto this mechanism, we studied the effects of forskolin in phenylephrine-pre-contracted endothelium-denuded rat aorta and measured cAMP levels in rat aortic myocytes by enzyme-immunoassay. Nanomolar forskolin relaxed phenylephrine-induced contractions. This effect was mimicked by dibutyryl-cAMP and was potentiated by rolipram or a p38-mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) inhibitor (SB-203580). Nifedipine and verapamil partially relaxed phenylephrine-induced contractions, while further application of cAMP-elevating agents fully relaxed these contractions. In Ca^{2+} -free extracellular solution, forskolin reduced phenylephrine-induced transient contractions and reduced the Ca^{2+} -induced contraction after depletion of intracellular stores. Nanomolar concentrations of forskolin increased basal cAMP levels only in the presence of rolipram or phenylephrine, which did not modify intracellular levels of cAMP by themselves. In conclusion, relaxation by cAMP is mediated in part by decrease of depletion of intracellular Ca^{2+} stores and inhibition of capacitative calcium entry. This study provides the first evidence that inhibition of PDE4 or p38-MAPK potentiates the vasodilator effect of cAMP-elevating agents in rat aortic myocytes.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is generally accepted that the increase in intracellular adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) levels ($[\text{cAMP}]_i$) and the subsequent activation of cAMP-dependent signalling pathways leads to the relaxation of vascular smooth muscle. Several major mechanisms have been proposed to explain this action (Akata, 2007; Bruce et al., 2003; Morgado et al., 2012):

- a) A decrease of cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) that could be mediated by: i) a reduced release of Ca^{2+} from intracellular stores (Yang et al., 1999); ii) a reduced entry of Ca^{2+} from

the extracellular space through ion channels (Ishikawa et al., 1993; Orlov et al., 1996); iii) an increase of the Ca^{2+} transport towards intracellular Ca^{2+} stores (Lincoln and Cornwell, 1991); iv) an increased extrusion of Ca^{2+} from the cell (Karashima et al., 2007). However, reported results on the regulation of Ca^{2+} levels by cAMP signalling are contradictory and the crosstalk between changes in $[\text{cAMP}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_c$ is still not fully understood.

- b) A reduction of the sensibility of contractile filaments to $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Nishimura and van Breemen, 1989; Ushio-Fukai et al., 1993).
c) An activation of certain K^+ channels subtypes, including Ca^{2+} -activated K^+ channels (K_{Ca}) (White et al., 2000) or ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) (Schubert et al., 1997; Waldron and Cole, 1999).

The physiological relevance of these mechanisms seems to vary between different vascular preparations and, even in the same preparation, depending on the agonist used to induce the contraction (Bugrim, 1999; Morgado et al., 2012; Santos-Silva et al., 2008). These differences may be attributed, in part, to the machinery that regulates $[\text{cAMP}]_i$ within cells, since they may express different isoforms of adenylyl cyclases (enzymes that synthesize cAMP from intracellular ATP) (Willoughby and Cooper, 2007) and phosphodiesterases (PDE, enzymes that degrade cAMP into inactive metabolites) (Lugnier, 2006), leading to the generation of cAMP microdomains that control both extent and duration of cAMP signals (Baillie, 2009;

Abbreviations: cAMP, adenosine 3',5'-cyclic monophosphate; $[\text{Ca}^{2+}]_c$, cytoplasmic Ca^{2+} concentration; PDE, phosphodiesterase; KBS, Krebs bicarbonate solution; db-cAMP, dibutyryl cyclic AMP; FFA, flufenamic acid; SERCA, sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase; RASMC, rat aortic smooth muscle cells; EIA, enzyme-immunoassay; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

^{*} Corresponding author at: Departamento de Farmacología, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 881815006; fax: +34 981594595.

E-mail address: manuel.campos@usc.es (M. Campos-Toimil).

¹ Current address: Division of Cardiovascular and Neuronal Remodelling, Leeds Institute of Genetics, Health and Therapeutics, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK.

² In memoriam of Dr. F. Orallo.

Willoughby and Cooper, 2007). Also, depending on the cell model, $[cAMP]_i$ increases may activate distinct pathways, such as protein kinase A (PKA), exchange proteins activated by cAMP (Epac) or cyclic nucleotide-gated channels (Kopperud et al., 2003).

In order to shed more light into the mechanisms of the cAMP vasorelaxant effects, we have here studied several of the processes that could be implicated in the relaxation induced by cAMP in the endothelium-denuded rat aorta previously contracted with phenylephrine, using forskolin, an AC activator, and dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP), a cell permeable cAMP analogue. The absence of endothelium avoids the interference of the L-arginine-NO-cGMP pathway and the release of endothelial factors that could participate in the regulation of the vascular tone, as well as in the control of cAMP levels themselves (Campos-Toimil et al., 2008; Cary et al., 2006). Finally, in order to establish a correlation between vasorelaxant effects and $[cAMP]_i$ changes, we have also measured $[cAMP]_i$ in isolated rat aortic smooth muscle cells (RASMC) by means of enzyme-immunoassay (EIA) techniques.

2. Material and methods

2.1. Animals and ethical approval

Male Wistar–Kyoto (WKY) rats (Iffa-Credo) weighing 200–350 g were used throughout this study. They were housed, cared for and acclimatized (before the experiments) as previously indicated (Orallo et al., 2000). For experiments, rats were killed by CO₂ inhalation and exanguinated. All experimental protocols were approved by the bioethics committee of the University of Santiago de Compostela (Spain) and the bioethics committee for research (CEIC) of the Xunta de Galicia (Spain).

2.2. Contraction-relaxation studies in isolated rat thoracic aorta rings

The thoracic aorta was rapidly removed, placed in a Petri dish with Krebs bicarbonate solution (KBS) of the following composition (in mM): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.5 CaCl₂·2H₂O, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.03 EDTA-Na₂, 0.6 L-(+)-ascorbic acid and 11 glucose; pH 7.4, oxygenated with carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) at 37 °C. Then, the aorta was cleaned of fat and connective tissue, deprived of endothelium by rubbing the intimal layer with a cotton bud and cut into ~4 mm long cylindrical segments.

Aortic rings were immediately transferred to an organ bath containing 10 ml of KBS, thermoregulated at 37 °C and bubbled with carbogen. Two stainless steel pins were inserted through the lumen of each arterial segment: one pin was fixed to the organ bath and the other connected to a Dynamometer UF-1 transducer (Pioden Controls Ltd., Canterbury, UK) to record the isometric tension with a MacLab/16 s and Chart 3.6 software or a PowerLab/8sp and Chart 4.1 software Data Acquisition system (AD Instruments Castle Hill, Australia).

Rat aortic rings were equilibrated at a resting tension of 2 g for at least 60 min, during which the physiological solution was replaced every 15 min. Thereafter, a contraction was induced by the addition of phenylephrine (1 μM). Once the contraction stabilized, the total absence of acetylcholine relaxant action (1 μM) was used to verify the complete removal of endothelial cells. After assessing the absence of endothelium, vascular tissues were allowed to recuperate for 1 h during which the physiological solution was replaced every 15 min, before any experiment protocol was started.

For experiments in calcium-free medium, aorta preparations were equilibrated for 60 min in 1.5 mM Ca²⁺-containing KBS and then in a Ca²⁺-free KBS for 20 min before a phenylephrine contraction was elicited (Ca²⁺-free KBS had the same composition that KBS except that CaCl₂ was replaced by 0.5 mM EGTA).

2.3. Cell culture

RASMC were isolated from the medial layer of thoracic aorta of male WKY rats by means of collagenase-elastase dissociation as has been previously described (Álvarez-Castro et al., 2004). Briefly, the culture medium was Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F12 medium (DMEM/F-12, 1:1) supplemented with L-glutamine (2 mM), L-(+)-ascorbic acid (50 μM), L-proline (1 μM), antibiotics/antimycotic (100 units/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin sulphate and 0.25 μg/ml amphotericin B) and 10% (v:v) heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). Freshly dissociated RASMC were seeded in 25 cm² culture flasks at ~20,000 cells/cm² density and kept in culture at 37 °C and 5% CO₂ in air. Medium was renewed every 2–3 days.

At confluence, RASMCs were harvested by treatment with a Ca²⁺-free trypsin/EDTA (0.05%/0.5 mM) solution for 10 min at 37 °C and either frozen or passaged at a constant 1:2 split ratio in 75 cm² flasks. Cells were used between passages 3 and 11.

2.4. Measured intracellular cAMP levels in RASMC by EIA

For cAMP determination, RASMC were seeded on 96-well plates (~50,000 cells/cm²) for 24 h (37 °C, 5% CO₂ in air). Cells were then incubated for 20 min with the corresponding drugs or vehicle (controls) and lysed using dodecyltrimethylammonium bromide (0.5% w/v) under continuous shaking for 10 min. Total cAMP of 100 μl aliquots from each non-acetylated sample was determined by enzyme-immunoassay (Amersham cAMP Biotrak, GE Healthcare Europe GmbH) following the manufacturer's instructions and evaluated using a Fluostar Optima multi-well plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

2.5. Data presentation and statistical analysis

Unless otherwise specified, results shown in the text, tables and figures are expressed as mean ± s.e.m. The following tests were used for statistical analysis: Two-tailed Student's *t* test for unpaired data in the contraction-relaxation studies and one-way analysis of variance (ANOVA) (followed by a Bonferroni's *post-hoc* test) in the EIA experiments, with *P* < 0.05 being considered significant.

In the experiments carried out in pre-contracted rat aortic rings, relaxant responses are expressed as a percentage of the maximal contraction (*E*_{max} = 100%) produced by phenylephrine. In cumulative experiments, sigmoidal concentration-response curves for the vasorelaxant effects of forskolin were fitted using the program Origin™ 7.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, USA), with estimation of IC₅₀ values (i.e. concentrations inducing 50% relaxation) for phenylephrine-induced contractions.

2.6. Drugs and chemicals

Acetylcholine chloride, antibiotics/antimycotic (penicillin G, streptomycin sulphate and amphotericin B), L-(+)-ascorbic acid, db-cAMP sodium salt, DMSO, forskolin, L-glutamine, nifedipine dymethyl ester, L-phenylephrine hydrochloride, L-proline, rolipram, SB-203580, thapsigargin and (±)-verapamil hydrochloride were from Sigma-Aldrich. Ca²⁺-free/EDTA trypsin, DMEM/F-12 and FBS were from Gibco-Life Technologies.

Stock solutions of these compounds were prepared and stored at –20 °C as follows: acetylcholine (100 mM), db-cAMP (50 mM), phenylephrine (1 mM) and verapamil (10 mM) in deionised water; forskolin (10 mM), nifedipine (10 mM), rolipram (100 mM), SB-203580 (10 mM) and thapsigargin (1 mM) in DMSO. Dilutions from these stocks were prepared freshly in distilled water or physiological buffer every day as needed for experiments. The final concentration of DMSO never exceeded 0.01% (v/v). Control groups received treatment with the solvent alone.

Studies involving light-sensitive compounds nifedipine and verapamil were performed in the dark. All other chemicals were of analytical grade.

3. Results

3.1. Effects of forskolin, db-cAMP, rolipram and SB-203580 on phenylephrine-precontracted rat aortic rings

In 1.5 mM Ca²⁺-containing KBS, a single addition of phenylephrine (1 μM) induced a sustained contraction of endothelium-denuded rat aortic rings. The maximal tension reached was 1.99 ± 0.04 g (n = 239). This contractile effect was maintained without significant tension changes in control rings for at least 90 min. In all control assays, equivalent dilutions of vehicle (DMSO) used in experiments had no significant effects on phenylephrine-induced contractions.

Cumulative addition of forskolin (10 nM–10 μM) relaxed phenylephrine-induced contractions with a IC₅₀ of 87.9 nM (n = 12). A single application of forskolin (0.1 μM) induced a significant relaxation of phenylephrine-induced contraction (% of relaxation: 44.0 ± 2.9, n = 19, P < 0.01 with respect to vehicle) (Fig. 1). db-cAMP (50 μM) also relaxed phenylephrine-induced contractions (49.9 ± 2.8%, n = 21, P < 0.01 with respect to vehicle) (Fig. 1). On the other hand, rolipram, a selective PDE4 inhibitor, (100 μM) did not significantly relax phenylephrine-induced contraction (4.1 ± 0.8%, n = 22, P > 0.05). In the presence of rolipram (100 μM), the relaxation induced by forskolin (0.1 μM) or db-cAMP (50 μM) was significantly potentiated (58.3 ± 4.3%, n = 6 and 72.6 ± 6.2%, n = 6, respectively; P < 0.05 and P < 0.01 with respect to the results in absence of rolipram) (Fig. 1).

The addition of SB-203580 (10 μM), a selective p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor, did not significantly modify the sustained contraction induced by phenylephrine (1 μM). In these conditions, the relaxation induced by forskolin (0.1 μM) or db-cAMP (50 μM) was significantly increased (62.3 ± 1.9%, n = 8 and 83.4 ± 7.3%, n = 9, respectively; P < 0.01 with respect to the controls in absence of SB-203580, in both cases) (Fig. 2).

3.2. Effects of forskolin, rolipram and phenylephrine on cAMP production in isolated RASMC

In another set of experiments, [cAMP]_i were assessed by EIA in isolated rat aortic smooth muscle cells. Basal [cAMP]_i was 27.2 ± 9.6 fmol/well (n = 8). This value was not affected by 0.1 μM forskolin

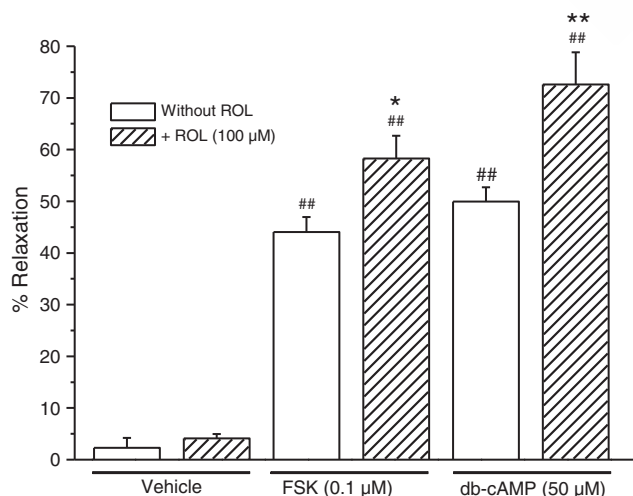


Fig. 1. Effects of rolipram (ROL) on the relaxation induced forskolin (FSK) and db-cAMP in endothelium-denuded rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine (1 μM). Data are mean ± s.e.m. of at least 6 experiments. ##P < 0.01 with respect to vehicle control; *P < 0.05 or **P < 0.01 with respect to the results in the absence of rolipram.

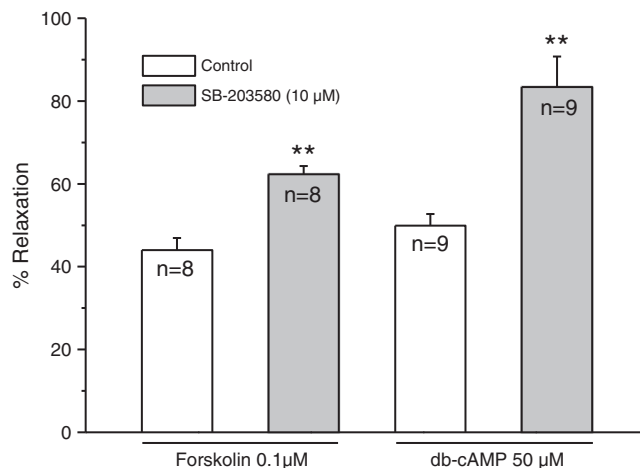


Fig. 2. Effects of SB-203580 on the relaxation induced by forskolin and db-cAMP in endothelium-denuded rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine (1 μM). Data are mean ± s.e.m. of at least 8 experiments. **P < 0.01 with respect to the results in the absence of SB-203580.

(39.0 ± 7.5 fmol/well, n = 8, P > 0.05), although it was significantly increased by 10 μM forskolin (94.2 ± 24.6 fmol/well, n = 8, P < 0.05) (Fig. 3A).

Rolipram (100 μM, 1 mM) did not modify basal [cAMP]_i, but significantly potentiated forskolin-induced increases when they were administered together ([cAMP]_i in fmol/well: 96.8 ± 17.3 for 0.1 μM forskolin and 186.4 ± 73.8 for 10 μM forskolin in the presence of 100 μM rolipram; 668.2 ± 107.3 for 0.1 μM forskolin and 926.8 ± 91.0 for 10 μM forskolin in the presence of 1 mM rolipram; P < 0.01 with respect to the corresponding levels in the absence of rolipram, n = 8 in all cases; Fig. 3A).

A 10 min preincubation with phenylephrine (1 μM) did not significantly modify basal [cAMP]_i in RASMC. The subsequent addition of rolipram (100 μM, 1 mM) significantly increased [cAMP]_i ([cAMP]_i in fmol/well: 71.3 ± 15.8 and 128.9 ± 44.2, respectively; n = 8, P < 0.05 in both cases). After 10 min in the presence of phenylephrine (1 μM), the addition of forskolin (0.1 μM, 10 μM) significantly increased basal [cAMP]_i ([cAMP]_i in fmol/well: 120.2 ± 81.0, n = 8 and 491.4 ± 96.5, n = 7, respectively; P < 0.01 with respect to basal values in the absence of phenylephrine in both cases) (Fig. 3B). Also, a 10 min preincubation with phenylephrine (1 μM) significantly potentiated the increases of [cAMP]_i induced by the combination of 100 μM rolipram and 0.1 μM forskolin when they were administered together (228.1 ± 65.0 fmol/well, n = 8, P < 0.01).

A 10 min preincubation with SB-203580 (10 μM) did not significantly modify basal or forskolin-enhanced [cAMP]_i values ([cAMP]_i in fmol/well after treatment with SB-203580: 18.9 ± 10.7 in vehicle-treated cells; 36.3 ± 13.7 in cells treated with 0.1 μM forskolin and 88.0 ± 19.6 in cells treated with 10 μM forskolin; n = 6, P > 0.05 with respect to the controls in the absence of SB-203580 in all cases) (Fig. 3C).

3.3. Effects of L-type Ca²⁺ channels inhibitors in forskolin-induced vasorelaxation

The L-type voltage operated Ca²⁺ channel (VOCC) inhibitors nifedipine (1 μM) and verapamil (1 μM) partially inhibited the phenylephrine-induced contraction (% of relaxation of the phenylephrine-induced contraction: 46.2 ± 2.6, n = 12 for nifedipine and 39.0 ± 2.2, n = 12 for verapamil; P < 0.01 with respect to vehicle in both cases). Once the relaxation induced by nifedipine or verapamil was stabilized, the subsequent addition of forskolin (0.1 μM) almost completely relaxed the remaining contraction (% of relaxation with respect to the initial contraction with phenylephrine: 46.5 ± 5.8%, n = 6

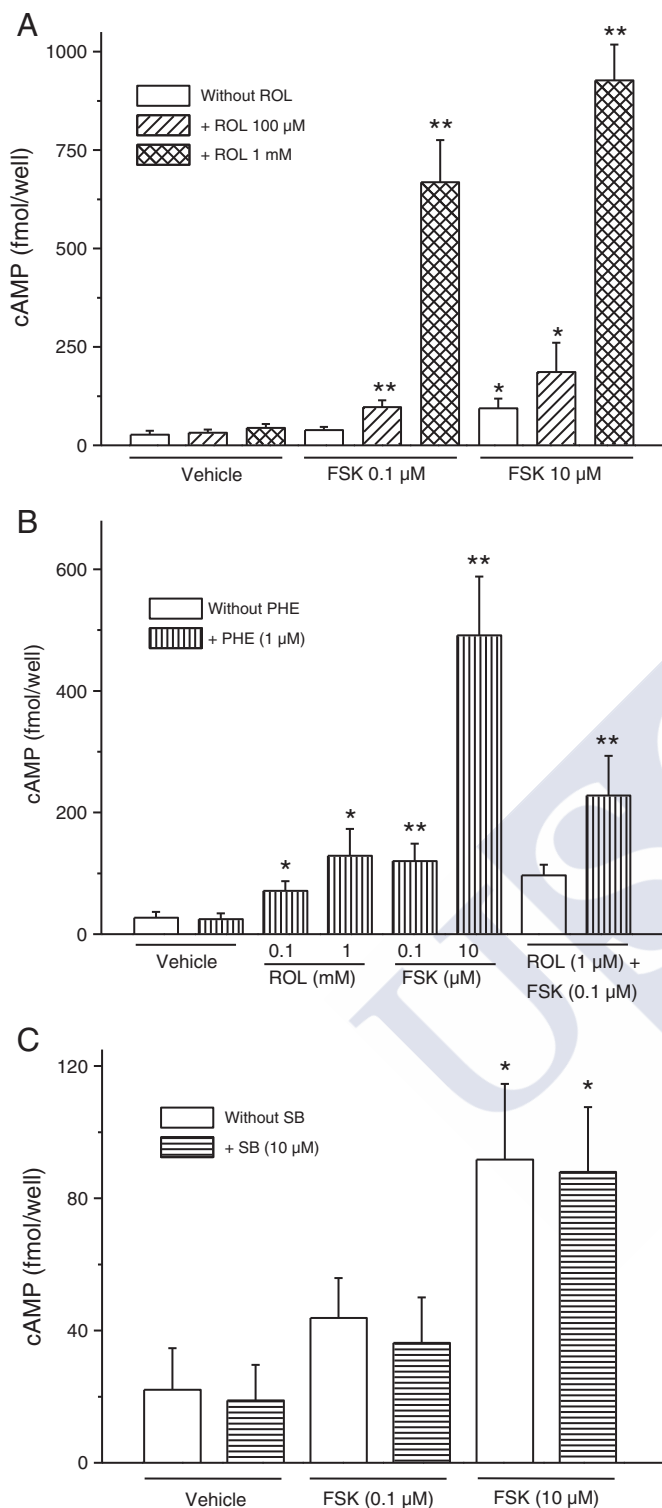


Fig. 3. Measurement of [cAMP]_i in RAMSC by EIA (A) Forskolin (FSK)-induced increases on [cAMP]_i are potentiated in the presence of the PDE4 inhibitor rolipram (ROL). Data are mean ± s.e.m. of at least 8 experiments. ***P* < 0.01 with respect to the results in the absence of ROL. (B) In the presence of phenylephrine (PHE), rolipram induce a significant increase of [cAMP]_i and the increase of [cAMP]_i induced by FSK or by ROL + FSK is significantly enhanced. Data are mean ± s.e.m. of at least 8 experiments. **P* < 0.05 or ***P* < 0.01 with respect to the results in the absence of PHE. (C) Pretreatment of RAMSC with SB-203580 (SB) did not modify [cAMP]_i in basal conditions or in the presence of FSK. **P* < 0.05 with respect to controls with vehicle.

and 51.3 ± 1.8%, n = 6 in the presence of nifedipine or verapamil, respectively; *P* > 0.05 with respect to the controls in the absence of nifedipine or verapamil) (see representative trace in Fig. 4).

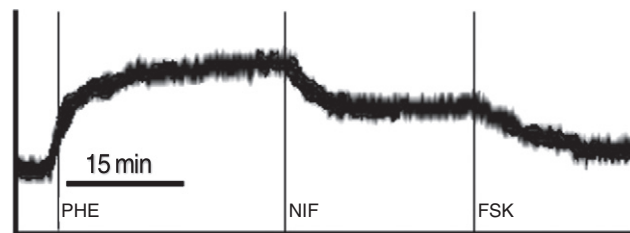


Fig. 4. Representative tension/time trace of the contractile response to phenylephrine (PHE, 1 μM) in endothelium-denuded rat aortic rings and subsequent treatment with nifedipine (NIF, 1 μM) and forskolin (FSK, 0.1 μM).

3.4. Effects of forskolin and db-cAMP on the contraction by phenylephrine in absence of extracellular Ca²⁺

After a period of 20 min in Ca²⁺-free KBS, phenylephrine (1 μM) evoked a transient contraction of the aortic rings (maximal tension reached: 0.57 ± 0.03 g, n = 46) that returned to basal values within 6 min. Then, the organs were washed for 45 min with 1.5 mM Ca²⁺-containing KBS (in order to replenish intracellular Ca²⁺ stores) followed by another 20 min period in Ca²⁺-free KBS. A subsequent application of 1 μM phenylephrine induced a second transient contraction of the aortic rings (maximal tension reached: 0.40 ± 0.02 g, n = 24) which represents 85.5 ± 4.9% of the first contraction (Table 1).

In order to study cAMP effects on phenylephrine-induced contractions in the absence of extracellular Ca²⁺, forskolin or db-cAMP (or vehicle for controls) were added to the organ bath 15 min before the second application of phenylephrine. This second phenylephrine-induced contraction was significantly reduced in the presence of forskolin (0.1 μM) (Table 1). Similar results were obtained after preincubation with 50 μM db-cAMP (Table 1).

3.5. Effects of forskolin and db-cAMP on contractions induced by activation of capacitative Ca²⁺ entry

In Ca²⁺-free medium, endothelium-denuded rat aortic rings did not contract in response to thapsigargin (1 μM), which depletes intracellular Ca²⁺ stores by blockade of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA). After treatment with thapsigargin, the change to Ca²⁺-containing medium induced a sustained contractile response (maximal tension reached: 0.38 ± 0.07 g, n = 7). This contraction, which has been attributed to the activation of the so-called capacitative Ca²⁺ entry through store-operated calcium channels (SOCC, see Discussion), was significantly relaxed by 0.1 μM forskolin or 50 μM db-cAMP (Table 1).

As described in Section 3.3, the addition of phenylephrine (1 μM) in Ca²⁺-free solution induced a transient contraction by depletion of intracellular IP₃-sensitive Ca²⁺ stores. After 15 min of washing with

Table 1

Effects of forskolin and db-cAMP on the contractions induced by a second application of phenylephrine in a Ca²⁺-free external solution, following the protocol described in Section 3.4 (2nd PHE): the results are expressed as % of the first phenylephrine induced contraction, considered as 100%. Effects of forskolin and db-cAMP on the contractions induced by reintroduction of Ca²⁺ in the external solution after depletion of the intracellular Ca²⁺ stores with 1 μM thapsigargin (Ca²⁺ after THAPS) or 1 μM phenylephrine (Ca²⁺ after PHE), following the protocols described in Section 3.5: the results are expressed as % of the contraction measured in the absence of forskolin, db-cAMP or vehicle.

	2nd PHE (1 μM)	Ca ²⁺ after THAPS	Ca ²⁺ after PHE
Vehicle	85.5 ± 4.9 (n = 24)	103 ± 3.6 (n = 8)	97 ± 4.7 (n = 10)
Forskolin (0.1 μM)	49.3 ± 7.6** (n = 12)	84.6 ± 7.0** (n = 5)	70.6 ± 6.4** (n = 9)
db-cAMP (50 μM)	60.8 ± 5.4** (n = 12)	78.4 ± 6.5** (n = 5)	73.5 ± 4.5** (n = 9)

** *P* < 0.01 with respect to controls with vehicle (equivalent dilutions of DMSO).

Ca²⁺-free medium, a second administration of phenylephrine (1 μM) did not induce a significant contraction of the preparations (data not shown). In these conditions, after treatment with phenylephrine, re-introduction of external Ca²⁺ (1.5 mM) induced a sustained contractile response on aortic rings (maximal tension reached: 0.50 ± 0.08 g, n = 32). This contraction was significantly relaxed by 0.1 μM forskolin or 50 μM db-cAMP (Table 1). The remaining contraction was completely suppressed by the addition of nifedipine (data not shown).

4. Discussion

In our experiments, forskolin relaxed endothelium-denuded rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine with higher potency to that previously described (Delpy et al., 1996) and with similar potency to that described in endothelium-intact rat aortic rings precontracted with phenylephrine (Delpy et al., 1996), noradrenaline (Sukhanova et al., 2006) or with high K⁺ concentration (Elgoyhen et al., 1992; Silver et al., 1985). Although it is generally accepted that this effect is mediated by its ability to increase [cAMP]_i (Insel and Ostrom, 2003; Rembold and Chen, 1998), other authors have suggested that the vasorelaxant actions of forskolin could be due to the inhibition of a number of membrane transport proteins and channel proteins through a mechanism that does not involve the production of cAMP (Laurenza et al., 1989). According to this last hypothesis, forskolin (0.1 μM), which relaxed phenylephrine-precontracted aortic rings in ~44%, did not significantly induce an increase in [cAMP]_i in RASMC. However the forskolin vasorelaxation observed here seems to be mainly mediated by an increase in [cAMP]_i, since:

- i) We have shown, for the first time, that low concentrations of forskolin (0.1 μM) significantly increase basal [cAMP]_i in the presence, but not in the absence, of phenylephrine, which did not modify [cAMP]_i by itself.
- ii) The effects of forskolin described here are reproduced by the cAMP analogue db-AMPC. Also, the vasorelaxant effects of forskolin and db-cAMP were similarly affected by rolipram, SB-203580, nifedipine or verapamil.
- iii) Although rolipram did not modify phenylephrine contractions, it significantly potentiated forskolin- and db-cAMP-induced relaxation. Furthermore, it has been previously described that PDE4 activity is not relevant for the regulation of rat aortic smooth muscle contractility, since rolipram did not relax endothelium-deprived rat aortic rings pre-contracted with norepinephrine or high K⁺ (Noguera et al., 2001). All this together suggests that the role of PDE4 in the regulation of rat aortic smooth muscle contractility is not relevant at basal [cAMP]_i but, when [cAMP]_i is enhanced, PDE4 activity may be increased as a mechanism of compensation to speed-up cAMP degradation, thus counteracting its vasorelaxant activity. This increase in cAMP-PDE activity should be independent of the increased expression of PDE4 detected in vascular and endothelial cells after long-term sustained [cAMP]_i increases (Campos-Toimil et al., 2008; Maurice, 1998) and could be related to PKA-dependent phosphorylation which increases PDE4 activity (Liu and Maurice, 1999; Sette et al., 1994).

Our enzyme-immunoassay experiments confirm that rolipram was unable to induce an increase of basal [cAMP]_i, indicating that RASMC does not have significant basal AC activity. Despite this, rolipram significantly potentiated the forskolin-induced increases in [cAMP]_i. This potentiation was higher in phenylephrine pre-treated RASMC, although this agonist did not increase basal cAMP levels by itself (see above). Interestingly, rolipram also induces an increase of [cAMP]_i in the presence of phenylephrine. From these results we cannot infer the mechanism by which phenylephrine potentiates cAMP increases; however previous reports have suggested that the activation of α₁-adrenoceptors may potentiate the increases in

[cAMP]_i induced by different stimuli (Etgen and Petitti, 1987; LeSage et al., 2004). With reference to our dataset it has been reported that this effect could be mediated by PKC activation (Ho et al., 1988).

It has been reported that PDE4 inhibition induces endothelium-independent relaxation of several pre-contracted vascular preparations. For example, the selective PDE4 inhibitors denbufylline and rolipram relax canine basilar artery pre-contracted with U46619, a thromboxane mimetic (Willette et al., 1997) and rolipram significantly relaxes human umbilical arteries pre-contracted with histamine and potentiates the relaxation induced by forskolin in the same preparation (Santos-Silva et al., 2008). A similar effect has been reported for Ro 20-1724, a selective PDE4 inhibitor, which induces a potentiation of the forskolin-induced relaxation in several preparations of non-vascular smooth muscle (Muller and Baer, 1983). This is, to our knowledge, the first study showing that inhibition of PDE4 potentiates the direct vasodilator effect of cAMP-elevating agents in rat aortic vascular smooth muscle. This is in contrast to the findings of Noguera et al. (2001) that PDE4 was not involved in the relaxation of rat aorta.

The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway has been shown to be implicated in vascular smooth muscle contraction (Bao et al., 2007; Srinivasan et al., 2008). In rat aorta, SB-203580, a selective p38 MAPK inhibitor, reduces the contractile effect of endothelin 1 (Park et al., 2003) or angiotensin II (Meloche et al., 2000) in endothelium-denuded preparations. It has been reported that forskolin increases the levels of phosphorylation of p38 MAPK in porcine aortic endothelial cells (Grossini et al., 2009) and that forskolin or db-cAMP reduced the thrombin-induced phosphorylation of p38 MAP kinase in aortic smooth muscle A10 cells (Nakajima et al., 2005).

Our results suggest that p38 MAPK is not involved in phenylephrine-induced contraction of rat aortic rings, since its inhibition with SB-203580 did not alter these contractions. However, the vasorelaxant effects evoked by cAMP-elevating agents in aortic rings pre-contracted with phenylephrine were potentiated in the presence of p38 MAPK inhibitor. This is, to our knowledge, the first report on the effects of p38 MAPK inhibition on the vasorelaxant effects of cAMP. Based on these results, we believe that activated p38 MAPK may counteract, in part, the cAMP-mediated relaxation by a mechanism not related to the contraction induced by the agonist itself, but by interfering with cAMP downstream signalling, since SB-203580 did not modify basal or forskolin-enhanced [cAMP]_i levels. However, further experiments are needed to confirm this possibility.

In vascular smooth muscle, phenylephrine induces contraction by activation of α₁ adrenergic G-protein-coupled receptors and the subsequent increase of [Ca²⁺]_i due to inositol 1,4,5-trisphosphate-(IP₃) mediated release of Ca²⁺ from internal stores and Ca²⁺ influx via several types of Ca²⁺-permeable channels, including receptor-coupled Ca²⁺ channels, agonist-activated non-selective cation channels, dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels and store operated Ca²⁺ channels responsible for capacitative Ca²⁺ entry (Docherty, 2010; Sanders, 2001).

Here, the complete inhibition of nifedipine- or verapamil-sensitive channels reduces by ~40% the phenylephrine induced contractions, demonstrating that L-type VOCC participate in phenylephrine-induced contraction in rat aorta, as previously reported for noradrenaline-induced contractions (Hagiwara et al., 1993), and in accordance with our results showing that the plateau phase of the angiotensin II-induced response was partially inhibited by nifedipine in isolated rat aortic myocytes (Campos-Toimil et al., 2007). Interestingly, once the relaxation induced by both VOCC inhibitors had stabilized, the remaining contraction was almost completely inhibited by forskolin. Considering the total phenylephrine contraction as 100%, the relaxation induced by forskolin is similar to that measured in the absence of the VOCC inhibitors (~50% of the total phenylephrine contraction). Although these results suggest that the vasorelaxant effect due to increases in cAMP is not mediated by a reduction of Ca²⁺ entry though L-type VOCC, contrasting results have been described by Orlov et al.

(1996), measuring $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in RASMC and by Satoh and Sperelakis (1995) using patch clamp recording in A7r5 cells, a vascular smooth muscle cell line obtained from embryonic rat aorta. Therefore care must be taken with the interpretation of this data until an explanation for these differences can be found.

In the absence of extracellular Ca^{2+} , forskolin and db-cAMP inhibited the contraction induced by phenylephrine, suggesting that increases in $[\text{cAMP}]_i$ reduce the release of Ca^{2+} from intracellular stores in rat aortic myocytes. In good agreement with our results, Ahn et al. (1992) demonstrated that both forskolin and db-cAMP reduce IP_3 production in rat aortic vascular smooth muscle. Additionally, Yang et al. (1999) have reported that $[\text{cAMP}]_i$ rises might reduce agonist-induced Ca^{2+} mobilisation from IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores in canine aortic smooth muscle cells and suggested that this effect could be mediated by PKA activation that might inhibit IP_3 generation.

It has been described that depletion of intracellular Ca^{2+} pools, either by membrane agonists or by intracellular agents, increases membrane permeability to Ca^{2+} in non-excitable cells, which, in turn, allows the refilling of depleted stores through SOCC, in accordance with the so-called “capacitative model” or store operated Ca^{2+} entry (SOCE) (Álvarez-Castro et al., 2004; Putney, 2009), a process that is associated with a functional contraction in rat aorta (Noguera et al., 1998). In recent years, transient receptor potential (TRP) and Orai channels have been presented as molecular candidates for SOCC (Potier and Trebak, 2008).

In RASMC, SOCE can be partially inhibited by nifedipine (Álvarez-Castro et al., 2004). Here, reintroduction of external Ca^{2+} after depletion of intracellular Ca^{2+} stores with phenylephrine or thapsigargin elicited a sustained contraction that was relaxed by forskolin or db-cAMP, the remaining contraction being mediated by Ca^{2+} entry through nifedipine-sensitive channels. These results suggest that forskolin- and db-cAMP-induced relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated, in part, by inhibition of Ca^{2+} entry through SOCC. The different potency of forskolin and db-cAMP to relax the SOCE-evoked contractions induced by phenylephrine or thapsigargin is probably due to the activation of different channels after depletion of intracellular stores with α -adrenergic inhibitors or SERCA inhibitors in rat aorta (Noguera et al., 1997).

The hypothesis of an inhibition of both intracellular Ca^{2+} release and capacitative Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle cells as a mechanism underlying cAMP-induced vasorelaxation is supported by our previous results with isolated rat aortic smooth muscle cells. In these cells we have measured $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with fura-2 and $[\text{cAMP}]_i$ by fluorescence resonance energy transfer (FRET) using epac-cAMPs dyes, showing that forskolin-induced increases of cAMP are able to inhibit intracellular Ca^{2+} release and the subsequent transmembrane store operated Ca^{2+} entry in an independent way (Cuiñas et al., 2010).

4.1. Conclusions

Nanomolar concentrations of forskolin induce vasorelaxation of rat aortic smooth muscle by inducing an increase in $[\text{cAMP}]_i$. The mechanism of this relaxation, at least in part, consists of a reduction of Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} reservoirs and an inhibition of the subsequent transmembrane SOCE. In our experimental conditions, the cAMP-induced relaxation of endothelium-deprived rat aortic rings is not reduced after inhibition of L-type VOCC with nifedipine or verapamil and it is potentiated by selective inhibition of p38 MAPK with SB-203580 or PDE4 with rolipram.

Conflict of Interest

None

Acknowledgements

This work was supported by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación*, Spain (SAF2010-22051) and *Xunta de Galicia*, Spain (INCITE08PXIB203092PR).

References

- Ahn, H.Y., Kang, S.E., Chang, K.C., Karaki, H., 1992. Dibutyl cyclic AMP and forskolin inhibit phosphatidylinositol hydrolysis, Ca^{2+} influx and contraction in vascular smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 59, 263–265.
- Akata, T., 2007. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J. Anesth.* 21, 232–242.
- Álvarez-Castro, E., Campos-Toimil, M., Orallo, F., 2004. (–)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369, 496–506.
- Baillie, G.S., 2009. Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J.* 276, 1790–1799.
- Bao, W., Behm, D.J., Nerurkar, S.S., Ao, Z., Bentley, R., Mirabile, R.C., Johns, D.G., Woods, T.N., Doe, C.P., Coatney, R.W., Ohlstein, J.F., Douglas, S.A., Willette, R.N., Yue, T.L., 2007. Effects of p38 MAPK Inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 49, 362–368.
- Bruce, J.I., Straub, S.V., Yule, D.I., 2003. Crosstalk between cAMP and Ca^{2+} signaling in non-excitable cells. *Cell Calcium* 34, 431–444.
- Bugrim, A.E., 1999. Regulation of Ca^{2+} release by cAMP-dependent protein kinase. A mechanism for agonist-specific calcium signaling? *Cell Calcium* 25, 219–226.
- Campos-Toimil, M., Elies, J., Álvarez, E., Verde, I., Orallo, F., 2007. Effects of trans- and cis-resveratrol on Ca^{2+} handling in A7r5 vascular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 577, 91–99.
- Campos-Toimil, M., Keravis, T., Orallo, F., Takeda, K., Lugnier, C., 2008. Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca^{2+} responses in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 154, 82–92.
- Cary, S.P., Winger, J.A., Derbyshire, E.R., Marletta, M.A., 2006. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem. Sci.* 31, 231–239.
- Cuiñas, A., Elies, J., Campos-Toimil, M., 2010. Epac proteins as a determinant for forskolin-induced vasorelaxant effect and cAMP-inhibition of store operated Ca^{2+} entry in vascular myocytes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107 (Suppl. 1), 304–305.
- Delpy, E., Coste, H., Gouville, A.C., 1996. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br. J. Pharmacol.* 119, 471–478.
- Docherty, J.R., 2010. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 405–417.
- Elgoyhen, B., Lorenzo, P.S., Tellez-Inon, M.T., Adler-Graschinsky, E., 1992. Relaxant effects of beta-carbolines on rat aortic rings. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 534–539.
- Etgen, A.M., Petitti, N., 1987. Mediation of norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation by adrenergic receptors in hypothalamic and preoptic area slices: effects of estradiol. *J. Neurochem.* 49, 1732–1739.
- Grossini, E., Molinari, C., Mary, D.A., Uberti, F., Ribichini, F., Caimmi, P.P., Vacca, G., 2009. Urocortin II induces nitric oxide production through cAMP and Ca^{2+} related pathways in endothelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 23, 87–96.
- Hagiwara, S., Mitsui, M., Karaki, H., 1993. Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 234, 1–7.
- Ho, A.K., Thomas, T.P., Chik, C.L., Anderson, W.B., Klein, D.C., 1988. Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca^{2+} influx. *J. Biol. Chem.* 263, 9292–9297.
- Insel, P.A., Ostrom, R.S., 2003. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23, 305–314.
- Ishikawa, T., Hume, J.R., Keef, K.D., 1993. Regulation of Ca^{2+} channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 73, 1128–1137.
- Karashima, E., Nishimura, J., Iwamoto, T., Hirano, K., Hirano, M., Kita, S., Harada, M., Kanaide, H., 2007. Involvement of Na^+ - Ca^{2+} exchanger in cAMP-mediated relaxation in mice aorta: evaluation using transgenic mice. *Br. J. Pharmacol.* 150, 434–444.
- Kopperud, R., Krakstad, C., Selheim, F., Døskeland, S.O., 2003. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* 546, 121–126.
- Laurenza, A., Sutkowski, E.M., Seamon, K.B., 1989. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 442–447.
- LeSage, G.D., Alvaro, D., Glaser, S., Francis, H., Marucci, L., Roskams, T., Phinzy, J.L., Marzoni, M., Benedetti, A., Taffetani, S., Barbaro, B., Fava, G., Ueno, Y., Alpini, G., 2004. Alpha-1 adrenergic receptor agonists modulate ductal secretion of BDL rats via Ca^{2+} - and PKC-dependent stimulation of cAMP. *Hepatology* 40, 1116–1127.
- Lincoln, T.M., Cornwell, T.L., 1991. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 28, 129–137.
- Liu, H., Maurice, D.H., 1999. Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J. Biol. Chem.* 274, 10557–10565.

- Lugnier, C., 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 109, 366–398.
- Maurice, D.H., 1998. Cyclic nucleotide-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. Selective effect of cyclic AMP. *Cell Biochem. Biophys.* 29, 35–47.
- Meloche, S., Landry, J., Huot, J., Houle, F., Marceau, F., Giasson, E., 2000. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H741–H751.
- Morgado, M., Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., Verde, I., 2012. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 247–266.
- Muller, M.J., Baer, H.P., 1983. Relaxant effects of forskolin in smooth muscle. Role of cyclic AMP. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 322, 78–82.
- Nakajima, K., Hirade, K., Ishisaki, A., Matsuno, H., Suga, H., Kanno, Y., Shu, E., Kitajima, Y., Katagiri, Y., Kozawa, O., 2005. Akt regulates thrombin-induced HSP27 phosphorylation in aortic smooth muscle cells: function at a point downstream from p38 MAP kinase. *Life Sci.* 77, 96–107.
- Nishimura, J., van Breemen, C., 1989. Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 929–935.
- Noguera, M.A., Ivorra, M.D., Chuliá, S., D'Ocón, P., 1997. Capacitative Ca^{2+} entry associated with α_1 -adrenoceptors in rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356, 83–89.
- Noguera, M.A., Madrero, Y., Ivorra, M.D., D'Ocón, P., 1998. Characterization of two different Ca^{2+} entry pathways dependent on depletion of internal Ca^{2+} pools in rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 357, 92–99.
- Noguera, M.A., Ivorra, M.D., Lugnier, C., D'Ocón, P., 2001. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in contractile responses of denuded rat aorta related to various Ca^{2+} sources. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 363, 612–619.
- Orallo, F., Rosa, E., García-Ferreiro, T., Campos-Toimil, M., Cadavid, M.I., Loza, M.I., 2000. Cardiovascular effects of ketanserin on normotensive rats in vivo and in vitro. *Gen. Pharmacol.* 35, 95–105.
- Orlov, S.N., Tremblay, J., Hamet, P., 1996. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 27, 774–780.
- Park, S., Kim, B., Kim, J., Won, K.J., Lee, S., Kwon, S., Cho, S., 2003. Tamoxifen induces vasorelaxation via inhibition of mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1155–1160.
- Potier, M., Trebak, M., 2008. New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflügers Arch.* 457, 405–415.
- Putney, J.W., 2009. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol. Rev.* 231, 10–22.
- Rembold, C.M., Chen, X.L., 1998. Mechanisms responsible for forskolin-induced relaxation of rat tail artery. *Hypertension* 31, 872–877.
- Sanders, K.M., 2001. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J. Appl. Physiol.* 91, 1438–1449.
- Santos-Silva, A.J., Cairrao, E., Morgado, M., Álvarez, E., Verde, I., 2008. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 582, 102–109.
- Satoh, H., Sperelakis, N., 1995. Modulation of L-type Ca^{2+} current by isoprenaline, carbachol and phorbol ester in cultured rat aortic vascular smooth muscle (A7r5) cells. *Gen. Pharmacol.* 26, 369–379.
- Schubert, R., Serebryakov, V.N., Mewes, H., Hopp, H.H., 1997. Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.* 272, H1147–H1156.
- Sette, C., Iona, S., Conti, M., 1994. The short-term activation of a rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterase by thyroid-stimulating hormone in thyroid FRTL-5 cells is mediated by a cAMP-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 9245–9252.
- Silver, P.J., Michalak, R.J., Kocmund, S.M., 1985. Role of cyclic AMP protein kinase in decreased arterial cyclic AMP responsiveness in hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232, 595–601.
- Srinivasan, R., Forman, S., Quinlan, R.A., Ohanian, J., Ohanian, V., 2008. Regulation of contractility by Hsp27 and Hic-5 in rat mesenteric small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H961–969.
- Sukhanova, I.F., Kozhevnikova, L.M., Popov, E.G., Podmareva, O.N., Avdonin, P.V., 2006. Activators of Epac proteins induce relaxation of isolated rat aorta. *Dokl. Biol. Sci.* 411, 441–444.
- Ushio-Fukai, M., Abe, S., Kobayashi, S., Nishimura, J., Kanaide, H., 1993. Effects of isoprenaline on cytosolic calcium concentrations and on tension in the porcine coronary artery. *J. Physiol.* 462, 679–696.
- Waldron, G.J., Cole, W.C., 1999. Activation of vascular smooth muscle K^+ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 180–184.
- White, R.E., Kryman, J.P., El Mowafy, A.M., Han, G., Carrier, G.O., 2000. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* 86, 897–905.
- Willette, R.N., Shiloh, A.O., Sauermelech, C.F., Sulpizio, A., Michell, M.P., Cieslinski, L.B., Torphy, T.J., Ohlstein, E.H., 1997. Identification, characterization, and functional role of phosphodiesterase type IV in cerebral vessels: effects of selective phosphodiesterase inhibitors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 210–219.
- Willoughby, D., Cooper, D.M., 2007. Organization and Ca^{2+} regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol. Rev.* 87, 965–1010.
- Yang, C.M., Chiu, C.T., Wang, C.C., Tsao, H.L., Fan, L.W., 1999. Forskolin inhibits 5-hydroxytryptamine-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} mobilisation in canine cultured aorta smooth muscle cells. *Cell. Signal.* 11, 697–704.