



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
FISIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL:

**PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO
Y LAS MITOCONDRIAS EN LA PROLIFERACIÓN
DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO
VASCULAR**

Presentada por **EVA MUÑOZ CONEJERO** para optar al
grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. CARLOS VILLALOBOS JORGE
Dra. LUCÍA NÚÑEZ LLORENTE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
I.INTRODUCCIÓN	8
1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR	9
1.1 ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR.....	10
1.2 ESTRUCTURA DEL MIOCITO VASCULAR.....	13
1.3 MODELOS DE ESTUDIO.....	14
2. HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR	16
2.1 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CALCIO EN VSMCs.....	18
2.1.1 HOMEOSTASIS DEL CALCIO CITOSÓLICO	20
2.1.1.1 Canales de Ca ²⁺ de la membrana plasmática.....	20
a) Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje (VOCs):.....	20
b) Canales de Ca ²⁺ operados por receptor (ROCs):.....	22
c) Canales de Ca ²⁺ activados por segundos mensajeros (SMOCs):.....	22
d) Canales de Ca ²⁺ operados por depósito (SOCs):.....	22
2.1.1.2 Sistemas de extrusión del calcio citosólico.....	23
2.2 HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	24
2.2.1 CANALES DE CALCIO EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	
24	
2.2.2 SISTEMAS DE EXTRUSIÓN DEL CALCIO EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO	25
3. ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca²⁺ (ECC)	26
3.1 Stim1 y Orai1.....	28
3.2 LA SUPERFAMILIA DE CANALES IÓNICOS TRP	31
3.3 CONTROL MITOCONDRIAL DE LA ENTRADA CAPACITATIVA.	32
4. FISIOPATOLOGÍA VASCULAR	35
4.1 MODULACIÓN FENOTÍPICA O CAMBIO FENOTÍPICO	35
4.2 ATROSCLEROSIS.....	38
4.3 RESTENOSIS	40
5. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	43
II.OBJETIVOS	48
III. MATERIAL y MÉTODOS	50
A. MÉTODOS EXPERIMENTALES	51
1. CULTIVOS CELULARES	51
2. MEDIDAS DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO.....	52

2.1. IMAGEN DE FLUORESCENCIA DE Ca^{2+} CITOSÓLICO.....	52
2.2 IMAGEN DE BIOLUMINISCENCIA DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL...	54
3. PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR.....	59
4. MIGRACIÓN CELULAR.....	60
5. ESTUDIO DEL POTENCIAL MITOCONDRIAL	61
6. MEDIDAS DE LOS NIVELES DE ATP CELULAR	62
7. EXTRACCIÓN DE ARN, RT-PCR y Qrt-PCR	62
8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOTTING.....	66
9. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: Técnica del “patch-clamp”	67
9.1 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN CÉLULAS RBL-2H3 MEDIANTE “patch-clamp” CONVENCIONAL:.....	69
9.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA MEDIANTE “patch-clamp” PLANAR:	70
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
B. LÍNEAS CELULARES Y PLÁSMIDOS	72
D. MATERIALES Y REACTIVOS	74
IV.RESULTADOS	78
1ª PARTE RESULTADOS:.....	79
MODELO ESTUDIO: LÍNEA CELULAR A10	79
1. VÍAS DE ENTRADA DE Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE AORTA EMBRIONARIA DE RATA A10.....	79
2. EL SALICILATO Y OTROS AINES INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS A10.....	84
3. LOS AINEs INHIBEN SOCE PERO NO VOCE EN LAS CÉLULAS A10 ⁸⁷	
4. LOS AINEs NO INHIBEN SOCE ACTUANDO DIRECTAMENTE SOBRE EL CANAL IÓNICO RESPONSABLE	90
5. CONTROL MITOCONDRIAL DE SOCE EN LAS CÉLULAS A10.....	95

6. SALICILATO Y OTROS AINES DESPOLARIZAN LA MITOCONDRIA EN LAS CÉLULAS A10	97
7. SALICILATO Y DEMÁS AINES PREVIENEN LA CAPTACIÓN DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS A10.....	99
2ª PARTE RESULTADOS:	102
MODELO ESTUDIO: CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA (hCASMCs)	102
1. LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA DISMINUYE CON EL TIEMPO DE CULTIVO	102
2. LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA DEPENDE DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE SOCE.....	103
3. SOCE ES PREDOMINANTE EN CÉLULAS PROLIFERANTES MIENTRAS QUE VOCE PREDOMINA EN CÉLULAS QUIESCENTES	106
4. LA VARIACIÓN EN SOCE Y VOCE CON EL NÚMERO DE PASES, NO ES DEBIDA A CAMBIOS A NIVEL DE RNAm DE GENES IMPLICADOS EN ESTAS VÍAS DE ENTRADA DE Ca^{2+}	111
5. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS STIM1, ORAI1 Y LA SUBUNIDAD α_{1c} DE $Ca_v1.2$, EN CÉLULAS CORONARIAS PROLIFERATIVAS Y QUIESCENTES.....	112
6. LOS AINES INHIBEN LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN DE LAS hCASMCs.....	114
6.1 LOS AINES INHIBEN SOCE	116
6.2 SOCE ESTÁ CONTROLADA POR LA MITOCONDRIA EN LAS hCASMCs	117
V. DISCUSIÓN	121
VI. CONCLUSIONES.....	133
VII. BIBLIOGRAFÍA	136

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_{mit}$	Diferencia de potencial mitocondrial
2-APB	2-aminoeoxidifenil borato
AEQ	Aecurina
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
BTP-2	N-{4-[3,5-bis (Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl}-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide
$[Ca^{2+}]_{cit}$	Concentración de calcio libre citosólica
$[Ca^{2+}]_{mit}$	Concentración de calcio libre mitocondrial
CaM	Calcio-calmodulina
COX1/COX2	Ciclooxigenasa 1/2
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- (β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético
FCCP	Carbonil cianida para-trifluorometoxifenil hidrazina
hCASMCs	Células de músculo liso de arteria coronaria humana
I_{CRAC}	Corriente activada por liberación de calcio
IP₃ (InsP₃)	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IP₃R (InsP₃R)	Receptor de inositol 1, 4, 5-trifosfato
I_{SOC}	Corriente activada por depósitos
MLCK	Kinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ de la membrana plasmática
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor nuclear kB
PMCA	Ca ²⁺ /ATP _{asa} de la membrana plasmática
RE	Retículo endoplásmico
SERCA	Ca ²⁺ /ATP _{asa} de la membrana del retículo endoplásmico
SOCE	Entrada de calcio operada por depósitos
SOCs	Canales de calcio operados por depósitos
TMRM	Éster metílico de la tetrametil rodamina
VOCE	Entrada de calcio operada por voltaje
VOCs	Canales de calcio operados por voltaje
VSMCs	Vascular smooth muscle cells

I. INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

El sistema cardiovascular está formado por el corazón, los vasos sanguíneos (arterias y venas) y, las células y el plasma de la sangre. Su función primaria es transportar sustancias (nutrientes, agua, gases, desechos) hacia y desde todas las partes del cuerpo.

El corazón es un órgano muscular, del tamaño aproximado a un puño, que se ubica en el centro de la cavidad torácica. Está dividido por una pared central o tabique (septum) en dos mitades: izquierda y derecha. Cada mitad funciona como una bomba independiente formada por una aurícula y un ventrículo. La aurícula recibe la sangre que regresa al corazón desde los vasos sanguíneos y el ventrículo bombea sangre hacia los vasos sanguíneos. El lado derecho del corazón recibe sangre desde los tejidos y la envía desde el ventrículo hacia los pulmones para su oxigenación, de donde retorna a la aurícula izquierda, denominándose a este proceso circulación pulmonar. El lado izquierdo del corazón, recibe sangre recién oxigenada desde los pulmones y la bombea hacia los tejidos de todo el organismo, regresando al lado derecho del corazón y constituyendo la denominada circulación sistémica (Silverthorn-Andrew, C. 2009). Cabe destacar asimismo la conocida circulación coronaria, que, aunque menos citada que la circulación pulmonar y sistémica, es de gran importancia fisiopatológica.

La circulación coronaria satisface los requerimientos energéticos del músculo cardíaco y está constituida por un conjunto de vasos sanguíneos, entre los que destacan las venas cardíacas y dos ramas de la aorta, llamadas arteria coronaria derecha y arteria coronaria izquierda, ésta última dividida a su vez en dos ramas principales: arteria coronaria descendente anterior y arteria circunfleja. La arteria descendente anterior desciende por el surco interventricular anterior, suele rodear la punta cardíaca y asciende por la cara posterior en un corto trecho. La rama circunfleja recorre el surco AV izquierdo y dobla hacia la izquierda y atrás. La arteria coronaria derecha, tras discurrir entre la arteria pulmonar y la aurícula derecha, pasa por el surco AV derecho hacia atrás y suele descender, como rama interventricular posterior, por el surco interventricular homónimo. Microscópicamente existen gran número de anastomosis entre las diversas ramas coronarias. En casos de obstrucciones éstas pueden hacerse muy evidentes en la angiografía como circulación colateral, capaces de funcionar de manera eficaz como mecanismo de reserva.

El corazón está compuesto principalmente por músculo cardíaco o miocardio, cubierto por capas (externa e interna) delgadas de epitelio y tejido conectivo. Posee células musculares estriadas típicas, con fibras contráctiles organizadas en sarcómeros, y células autorríticas, denominadas marcapasos porque regulan el ritmo del latido cardíaco, son más pequeñas que las contráctiles y con pocas fibras y células contráctiles.

1.1 ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

Las paredes de los vasos sanguíneos están compuestas por tres capas (Figura 1): la túnica íntima (capa más interna), la túnica media (capa intermedia) y la túnica externa o adventicia (capa más superficial).

- La **túnica íntima** es una lámina formada por una monocapa de células endoteliales que se apoyan sobre la lámina basal, constituida principalmente por tejido conectivo. Estas células endoteliales delimitan el lumen del vaso, y se encuentran estrechamente unidas unas con otras restringiendo la difusión de moléculas de gran tamaño a través del endotelio. Así, la capa endotelial constituye una membrana semipermeable que retiene el plasma, y los componentes celulares de la sangre en la circulación, mientras que permite el paso de nutrientes entre la sangre y los tejidos. Las estructuras que controlan esta barrera de permeabilidad activa son el glicocálix y las uniones intercelulares. Estas estructuras son permeables a solutos de pequeño tamaño como la glucosa, la adrenalina y diversas drogas, pero impiden la difusión de solutos grandes como las proteínas del plasma. El endotelio a su vez secreta agentes vasoactivos como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), o la prostaciclina (PGI₂), que actúan sobre las células sanguíneas y/o las células del músculo liso adyacentes regulando el flujo sanguíneo local, la angiogénesis y la hemostasis (Levick, J.R. 2003). La túnica íntima es relativamente más gruesa en arterias grandes, y puede contener algunas células de músculo liso en venas y arterias de gran o medio calibre.

- La **túnica media** suministra la fuerza mecánica para la contracción, y está formada por células de músculo liso dispuestas helicoidalmente embebidas en una matriz de fibras de colágeno, elastina y proteoglicanos. Existen dos capas de fibras de elastina, la lámina elástica

externa y la lámina elástica interna, las cuales delimitan la túnica media. La estructura molecular de la elastina permite a las arterias expandirse durante la sístole y encogerse durante la diástole, amortiguando los cambios en el flujo sanguíneo debidos al comportamiento de la bomba cardiaca. Esta propiedad es fundamental en el caso de las arterias elásticas como la aorta, en las que las células musculares de la túnica media están organizadas en múltiples capas concéntricas separadas por distintas láminas de elastina. El grosor relativo de la túnica media aumenta gradualmente desde la arteria aorta hasta las arteriolas, que poseen una estructura predominantemente muscular.

- La **túnica externa** o **adventicia** es una vaina de tejido conectivo sin distinción con el borde exterior. Contiene fibras de colágeno que sirven de soporte de fibroblastos y nervios. Su función consiste en mantener unido el vaso al tejido circundante. El colágeno está presente en las tres capas de la pared vascular y actúa como armazón de anclaje de las células musculares. A medida que la presión intraluminal aumenta, el entramado de fibras de colágeno se va haciendo más rígido, limitando la distensibilidad vascular. Este fenómeno es particularmente importante en venas, donde la abundancia de esta proteína es mucho mayor. La adventicia de arterias y de venas grandes contiene pequeños vasos denominados *vasa vasorum* ("vasos de vasos") que abastecen de oxígeno y nutrientes a la túnica media (Aronson, P.I. y Ward, J.P.T. 2004).

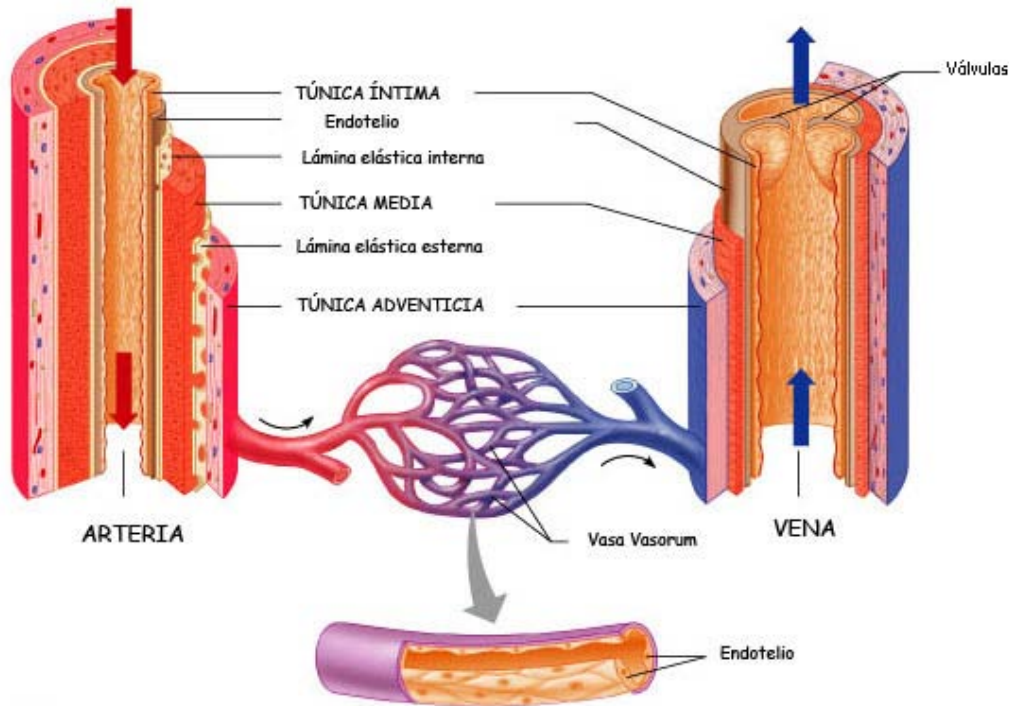


Figura 1: Estructura de la pared vascular.

Aunque las arterias y las venas comparten la misma estructura básica de la pared vascular, las diferentes capas están mucho menos definidas en el sistema venoso. Las venas, comparadas con las arterias, tienen una túnica media más delgada con un menor número de células de músculo liso, que a su vez tienden a presentar una orientación más desordenada.

Los vasos sanguíneos, además de transportar la sangre, tienen propiedades funcionales específicas que permiten controlar el funcionamiento global del aparato circulatorio. Desde este punto de vista, las arterias se clasifican en dos categorías principales: arterias elásticas y arterias musculares.

Las **arterias elásticas** como la arteria aorta o la iliaca poseen una pared vascular muy distensible debido a que su túnica media es rica en elastina. La elastina proporciona a estas arterias la capacidad de expandirse hasta un 10% durante cada latido del corazón, y por tanto, permite dar cabida a toda la sangre propulsada. La retracción de los vasos elásticos durante la diástole, convierte el flujo intermitente de la aorta ascendente en un flujo continuo a través de arterias más distales.

Las **arterias musculares** son las de pequeño a medio calibre, como las arterias cerebrales, mesentéricas o coronarias. La túnica media de estas arterias es relativamente más gruesa y contiene más células de músculo liso en comparación con las arterias elásticas. La presión sanguínea media varía muy poco a lo largo de las arterias elásticas y conductoras debido a que su lumen ofrece poca resistencia al flujo sanguíneo. Los mayores cambios en presión se producen en arterias pequeñas, ya que su resistencia al flujo es mucho mayor, y en alusión a este hecho, estas arterias terminales y arteriolas se denominan arterias de resistencia. Estas arterias pueden incrementar o reducir el flujo sanguíneo en función de la demanda local. Así, cuando un vaso de resistencia se dilata, la resistencia baja y el flujo local aumenta; por el contrario, la vasoconstricción de estas arterias aumenta la resistencia local y disminuye el flujo sanguíneo en el tejido (Levick, J.R. 2003).

1.2 ESTRUCTURA DEL MIOCITO VASCULAR

La túnica media arterial está formada fundamentalmente por células de músculo liso o **miocitos vasculares** (VSMCs, del inglés vascular smooth muscle cells). Son células pequeñas (5 x 50 µm), con forma de huso que se disponen normalmente en pequeños ángulos helicoidales en las paredes de los vasos sanguíneos. En algunos vasos, no en todos, estas células musculares contiguas presentan uniones *gap* similares a las del miocardio, donde se localizan una serie de canales que atraviesan la membrana plasmática, denominados conexones, los cuales comunican eléctricamente a las células y facilitan el flujo de iones de unas a otras. Esto permite la propagación de la despolarización de una célula a las adyacentes (Levick, J.R. 2003).

Como en otras células musculares, el movimiento de distensión y contracción del músculo liso se produce como resultado de la interacción cruzada entre filamentos contráctiles gruesos de miosina y filamentos delgados de actina. En este caso no están dispuestos de manera regular formando los denominados sarcómeros, visibles al microscopio como las estrías características de las células del músculo esquelético y cardiaco.

Los filamentos de actina en el músculo liso son mucho más largos que en el músculo estriado. Algunos de estos filamentos de actina se anclan a cuerpos densos dentro del citoplasma, y a bandas densas en la cara interna de la membrana plasmática. Las bandas y los cuerpos densos se encuentran unidos

mediante haces de filamentos intermedios, compuestos principalmente por proteínas del citoesqueleto como la desmina y la vimentina. Los filamentos de miosina se encuentran entremezclados a los de actina de una forma más al azar, dispuestos oblicua e incluso transversalmente a los ejes, no siguiendo el patrón tan regular del músculo estriado donde dichos filamentos están alineados a lo largo de los ejes.

Al igual que en el músculo estriado, el mecanismo que controla la interacción entre los filamentos de actina y miosina es el ciclo de los puentes cruzados, provocando acercamiento de los cuerpos densos, lo que genera acortamiento y engrosamiento del citoesqueleto y por lo tanto de la célula. Las bandas densas están unidas a la matriz extracelular mediante integrinas, permitiendo la distribución de la fuerza contráctil a través de toda la pared vascular (Gunst, S.J. y Zhang, W. 2008). Como se verá en detalle más adelante, el Ca^{2+} intracelular juega un papel determinante en la contracción de las células de músculo liso vascular.

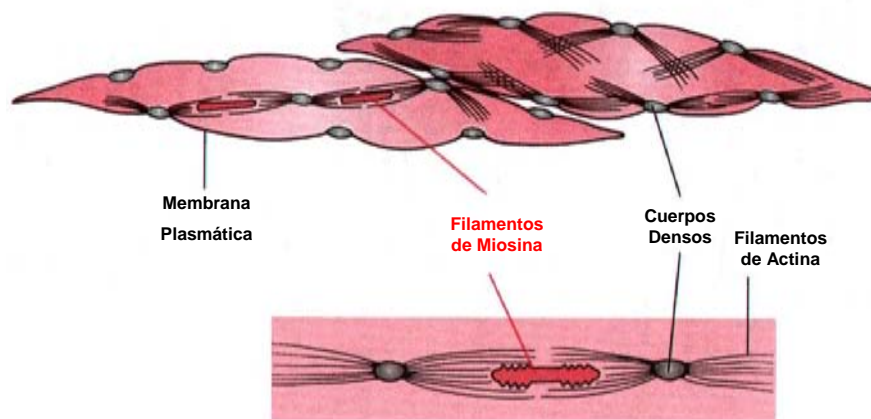


Figura 2: Estructura de las células de músculo liso. Se representa la relación existente entre los cuerpos densos, los filamentos de actina y los de miosina (Imagen tomada de Tratado de Fisiología Médica, 10ª Ed.)

1.3 MODELOS DE ESTUDIO

El estudio de las diferentes características y enfermedades del sistema cardiovascular es posible gracias a la utilización de diversos modelos de estudio, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Uno de los modelos de células de músculo liso vascular más utilizados es la línea celular **A10**, obtenida a partir de aorta torácica de rata BDIX embrionaria de 14-17 días. Se designó como línea celular de músculo liso vascular por su origen anatómico, sus propiedades electrofisiológicas, sus características ultraestructurales, la presencia de mioquinasa y fosfoquinasa creatina muscular, junto con el resultado negativo obtenido en las tinciones para proteínas como la citoqueratina y otras proteínas específicas de neuronas. No obstante, ciertos marcadores que se utilizan para caracterizar a las células de músculo liso vascular (VSMCs), no se habían aplicado a esta línea celular, por lo que en 1997 Rohini S. Pao y colaboradores, quisieron ir más allá y aplicarlos a estas células, para así hacer una mejor caracterización y asegurar de esta forma la calidad de la línea celular A10 como modelo de células de músculo liso vascular. Tras diversos análisis, comprobaron que las células A10 presentan un fenotipo de músculo liso vascular, ya que expresan α -actina de músculo liso, calponina de músculo liso y α SM22. Deben considerarse células no diferenciadas debido a la ausencia de la cadena pesada de la miosina de músculo liso. A su vez, las células A10 se consideran células diferentes a las postnatales P-SMC. Por todo ello, las células A10 se consideran un buen modelo de células de músculo liso vascular y de formación de neoíntima (Rao, R.S. et al. 1997).

Otros modelos celulares utilizados son los cultivos primarios de células de músculo liso vascular, aisladas a partir de arterias de diferentes territorios vasculares de animales adultos (normalmente ratas y ratones), por disociación enzimática (Golovina, V.A. y Blaustein, M.P. 2006) o bien a partir de explantes de arterias de animales o de pacientes humanos intervenidos quirúrgicamente (Miguel-Velado, E. et al. 2005).

Respecto a los modelos *in vivo*, se llevan utilizando desde hace muchos años modelos animales para el estudio de enfermedades cardiovasculares, contribuyendo sustancialmente al progreso en el conocimiento de su patogenia. Dentro de estos modelos animales se incluyen a roedores como ratas y ratones, conejos, gatos, perros, cerdos e incluso primates como los chimpancés. Una ventaja de ciertos mamíferos pequeños, consiste en que presentan varios tipos de modelos de alteraciones cardiovasculares, que bien ocurren por mutaciones genéticas espontáneas o pueden ser inducidas mediante modificaciones específicas del genoma o bien modificaciones de la dieta. No obstante, los modelos animales también poseen sus limitaciones, destacando entre ellas las

diferencias existentes entre la enfermedad humana y la inducida experimentalmente, tanto en los mecanismos de regulación genética, como en los factores que determinan la función cardiaca y vascular. Además, existen diferencias estructurales entre el sistema cardiovascular de los diferentes animales y el humano (Chorro, F.J. et al. 2009).

2. HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR

En condiciones normales, la $[Ca^{2+}]$ libre en el citosol está altamente regulada por la célula. Mientras en el exterior celular la $[Ca^{2+}]$ es aproximadamente de 1-2 mM, en el citosol es unas 10.000 veces menor (50 a 100 nM). Existen concentraciones similares a las del medio extracelular en los distintos depósitos intracelulares de Ca^{2+} , fundamentalmente el retículo endoplásmico (RE). Por ello, el mantenimiento de estos gradientes conlleva un enorme gasto energético para la célula, que aún así utiliza este ión para multitud de señalizaciones. No ocurre lo mismo en la mitocondria, considerada originalmente un depósito intracelular de Ca^{2+} , las modernas metodologías han determinado que la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial es similar a la del citosol (Montero, M. et al. 2000) y lo mismo ocurriría en el núcleo (Alonso, M.T. y Garcia-Sancho, J. 2011).

Al enorme gradiente químico se le une el potencial de membrana, negativo en el interior celular, que hace que el gradiente electroquímico favorezca enormemente la entrada de Ca^{2+} . Gracias por un lado a la baja permeabilidad a Ca^{2+} de la membrana plasmática, que sólo puede entrar a la célula a través de proteínas de transporte, y por otro lado, a la actividad de una serie de sistemas de transporte activo que extruyen (bombean) Ca^{2+} del citosol, las células mantienen en reposo este enorme gradiente. Ello es muy relevante, porque en la célula existen numerosas proteínas y enzimas cuya actividad está regulada directa o indirectamente por Ca^{2+} , de forma que pequeños cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ pueden inducir la activación de múltiples procesos celulares (Berridge, M.J. 1995).

Además de los canales de Ca^{2+} , presentes en la membrana plasmática, que permiten la entrada de este ión al interior celular, existen otros sistemas de transporte, que retiran Ca^{2+} del citosol al exterior, o bien al interior de los orgánulos para mantener dichos gradientes de Ca^{2+} . En todos los casos,

excepto en la mitocondria, este transporte hacia los orgánulos subcelulares es en contra de gradiente, por lo que se requiere energía en forma de ATP (bombas) o almacenada en forma de otros gradientes que se disipan al transportar Ca^{2+} (intercambiadores). La capacidad de las ATPasas para bombear Ca^{2+} , es una función exponencial de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, de modo que un aumento en dicha concentración provoca un incremento de la actividad de las bombas de Ca^{2+} , que retorna a suestado basal una vez normalizados los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Las bombas y los intercambiadores son, por tanto, responsables del control de la homeostasis en reposo, y los canales de Ca^{2+} se encargan del control dinámico de la homeostasis de dicho ión. De esta manera, las señales intracelulares de Ca^{2+} se generan, más que por cambios en la actividad de las bombas, por cambios en la actividad de los canales, tanto aquellos presentes en la membrana plasmática como los específicos de endomembranas, generándose una red reguladora de Ca^{2+} muy estricta, muy específica y compleja. En la figura 3 se resumen los elementos más importantes que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

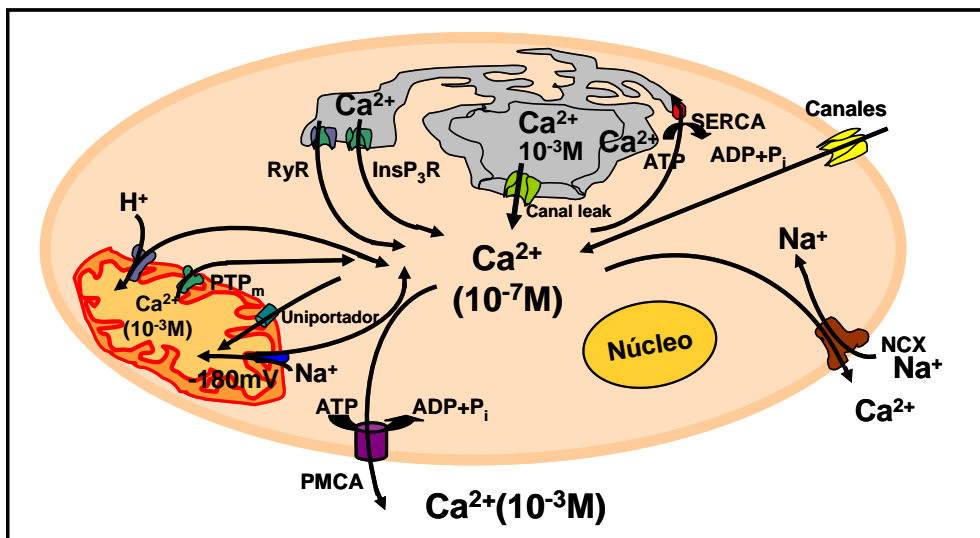


Figura 3: Homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En la membrana plasmática, los canales de Ca^{2+} permiten la entrada de Ca^{2+} del exterior celular (1mM Ca^{2+}) al interior celular (100nM Ca^{2+}) a favor del enorme gradiente electroquímico. La bomba de Ca^{2+} tipo PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) permiten la salida de Ca^{2+} en contra de gradiente. El Ca^{2+} citosólico puede ser tamponado por proteínas citosólicas que unen Ca^{2+} y/o captado por el retículo endoplasmático, en contra de gradiente a través de bombas de Ca^{2+} tipo SERCA, donde alcanza una concentración muy elevada (1mM). El exceso de Ca^{2+} también puede ser captado por la mitocondria a favor de gradiente electroquímico a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. El Ca^{2+} almacenado en los depósitos puede ser liberado al citosol o al núcleo a través de canales de Ca^{2+} de endomembranas activados por IP_3 (IP_3R), a través del receptor de rianodina (RyR) o por el canal leak. Las mitocondrias no se consideran un depósito de Ca^{2+} , ya que el Ca^{2+} que entra a éstas, regresa inmediatamente al citosol a través de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, o bien al activarse el poro de transición de permeabilidad en la membrana mitocondrial interna. (Figura adaptada de Carafoli, 2002)

2.1 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CALCIO EN VSMCs

El Ca^{2+} intracelular tiene un papel fundamental en la fisiología de todas las células, al conocerse desde hace mucho tiempo su implicación en proliferación, crecimiento celular, expresión génica, muerte celular, exocitosis, etc. Es especialmente importante en los cardiomiocitos y miocitos vasculares, ya que además de sus funciones como segundo mensajero, tiene una función esencial en el acoplamiento entre la excitación y la contracción (Bers, D.M. y Guo, T. 2005).

Muchos tipos de señales pueden estimular la contracción del músculo liso, entre ellas, señales nerviosas, estimulación hormonal, la propia distensión del músculo y otros varios estímulos. Como se ha mencionado anteriormente, este proceso está regulado por el ciclo de los puentes cruzados, y en un primer momento es controlado por los niveles de Ca^{2+} intracelular libre, los cuales varían de 10^{-7} M en el músculo relajado a 10^{-6} M durante una contracción máxima.

Los diferentes pasos que llevan a la interacción de los filamentos contráctiles por el consiguiente aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$), son diferentes en el músculo liso con respecto al músculo estriado:

- En primer lugar el Ca^{2+} forma un complejo con la proteína de unión a Ca^{2+} llamada Calmodulina (CaM).
- El complejo Ca^{2+} - CaM activa un enzima que fosforila a la miosina llamada MLCK (myosine light chain kinase).
- A continuación la miosina fosforilada adquiere afinidad por la actina, con lo que se inicia el ciclo de los puentes cruzados.
- La energía para que este proceso se lleve a cabo se obtiene de la hidrólisis del ATP, permitiéndose el acortamiento del músculo y el desarrollo de la tensión.

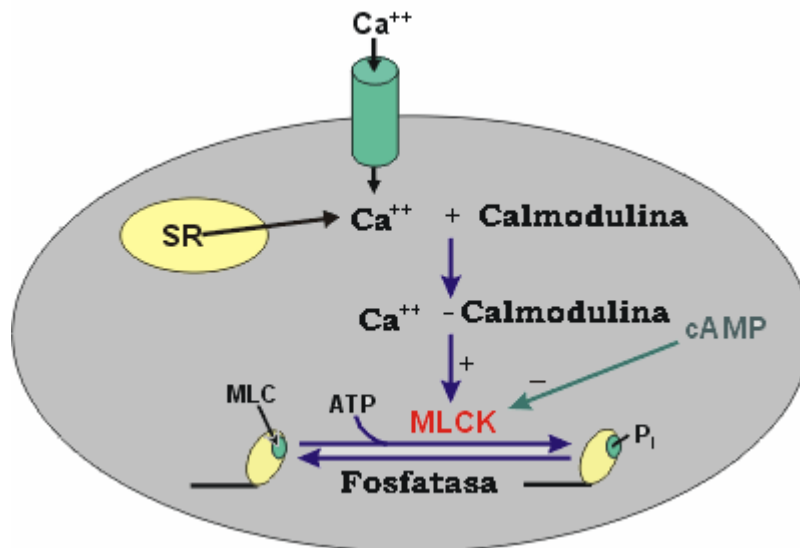


Figura 4: Esquema representativo de los principales componentes implicados en el ciclo de los puentes cruzados.

Una característica única del músculo liso consiste en que una vez se consigue el desarrollo de la tensión, ésta puede mantenerse a un coste energético muy bajo, mediante la regulación de la velocidad del ciclo de los puentes cruzados, regulando el equilibrio entre la fosforilación y desfosforilación de la miosina por mecanismos dependientes de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Mohrman, D.E. y Heller, L.J. 2006).

Así, a niveles elevados de Ca^{2+} citosólico, la MLCK está completamente activada y el enzima que desfosforila la miosina (MLCP, myosin light chain phosphatase), está inactivo, con lo que todos los puentes cruzados están fosforilados y la velocidad de contracción es máxima. Por el contrario, a niveles basales de Ca^{2+} citosólico, en el músculo relajado, la MLCP está activa y la MLCK inactiva, los puentes cruzados desfosforilados y la miosina y la actina separadas. Entre estas dos situaciones extremas, las variaciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico determinan niveles intermedios de activación de estos dos enzimas, lo que conlleva velocidades de contracción intermedias, proporcionales al porcentaje de cabezas de miosina fosforiladas. No obstante, esta regulación covalente, supone aparentemente un coste de ATP inconsistente con la extraordinaria economía de mantenimiento de la fuerza en el músculo liso, por lo que se ha postulado que además de los mecanismos reguladores dependientes de calcio, existen mecanismos independientes de éste, capaces de modificar la sensibilidad del calcio en la maquinaria contráctil modulando la actividad de la MLCP (Martinez-Lemus, L.A. et al. 2009).

2.1.1 HOMEOSTASIS DEL CALCIO CITOSÓLICO

2.1.1.1 Canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática

Los canales de calcio son proteínas integrales de membrana, ubicuas, que forman poros a través de los cuales se produce el flujo selectivo de calcio a favor de gradiente electroquímico.

Se pueden clasificar en función de su localización subcelular o según su mecanismo de activación (del inglés "gating"), agrupándose según este último en 2 familias:

- canales de Ca²⁺ operados por voltaje (VOCs), dominantes en células excitables.
- canales de Ca²⁺ no operados por voltaje pero regulados por receptor (ROCs), segundos mensajeros (SMOCs) o depósitos (stores, SOCs) en general predominantes en células no excitables aunque también presentes en las células excitables.

A continuación se hace una breve descripción de todos ellos:

a) Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VOCs):

Estos canales se abren bruscamente en respuesta a una despolarización suficiente de la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca²⁺ desde el espacio extracelular al citosol. Esta entrada suele ser muy rápida debido al enorme gradiente electroquímico para este ión. La repolarización de la membrana produce el cierre de estos canales. Además, todos los VOCs presentan una inactivación dependiente del tiempo. Todos los tipos de VOCs son muy selectivos para el Ca²⁺ respecto al Na⁺ o al K⁺, e insensibles a los bloqueantes tradicionales de canales de Na⁺, como la tetrodotoxina o la saxitoxina. Desde un punto de vista funcional, basándose en el rango de voltaje aplicado para lograr su apertura, existen dos grandes tipos de VOCs: los canales de bajo umbral de activación, también denominados tipo T (transitorios) y los de alto umbral de activación, donde existen varios subtipos: canales L (por su larga duración), N (por su origen neuronal), P (llamados así por su descripción original en células de Purkinje), Q y R (por su carácter residual). La

diversidad estructural de los canales de alto umbral parece estar relacionada con una especialización funcional, aunque las características biofísicas de todos ellos son muy parecidas (Catterall, W.A. 2000). En células de músculo liso vascular tienen especial importancia los canales tipo T y tipo L, variando su expresión en respuesta a eventos biológicos, principalmente diferenciación celular y proliferación.

Los canales **tipo T** se activan por pequeñas despolarizaciones desde potenciales muy negativos y se inactivan rápidamente de un modo dependiente de voltaje. Estos canales son insensibles a dihidropiridinas (DHP), a los antagonistas de Ca^{2+} orgánicos y a la mayoría de los inorgánicos. En miocitos vasculares los canales tipo T se expresan en células proliferantes, al parecer con un papel potenciador de la proliferación de dichas células (House, S.J. et al. 2008), pues la densidad de corriente de Ca^{2+} a través de estos canales se aprecia un poco en la fase G1 del ciclo celular y es máxima en fase S, fase previa a la división celular (Sunagawa, M. 2010).

Los canales **tipo L** se activan por despolarizaciones más intensas de la membrana plasmática y son quizás los mejor caracterizados. La inactivación es mucho más lenta que la de los canales de bajo umbral, con una constante de tiempo de un segundo. La concentración de Ca^{2+} intracelular desempeña un papel fundamental en el proceso de inactivación de canales de calcio tipo L y en general de todos los canales de alto umbral. Los canales tipo L se bloquean selectivamente con algunas dihidropiridinas y otros antagonistas orgánicos como el verapamil y el diltiazem, pero no son sensibles ni a las conotoxinas ni a las agatoxinas. Los canales de calcio tipo L están altamente expresados en células de músculo liso vascular diferenciadas contráctiles. Este tipo de canales son de gran importancia en los miocitos vasculares, ya que la despolarización de la membrana plasmática aumenta la probabilidad de apertura de dichos canales, aumentando así la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que está implicado, entre otros, en el importante fenómeno de la contracción. Se ha visto además, que la función de este tipo de canales tipo L está alterada en condiciones fisiopatológicas como la aterosclerosis (Sunagawa, M. 2010).

b) Canales de Ca²⁺ operados por receptor (ROCs):

Canales de la membrana plasmática cuya apertura resulta de la unión de un agonista al receptor, independientemente del cambio en el potencial de membrana. En músculo liso vascular (aorta, arteria de oreja, vena porta) se han descrito varios canales ROCs con elevada permeabilidad al Ca²⁺, activados por numerosos agonistas, entre los que destacan acetilcolina, angiotensina II, endotelina-1, serotonina y vasopresina. El clásico canal P2X cuyo ligando es el ATP se observó inicialmente en arteria de oreja de conejo (Benham, C.D. y Tsien, R.W. 1987) (Suzuki, H. 1985), observándose su expresión con el paso de los años en diferentes lechos vasculares de distintas especies, incluso en vena safena humana (Loirand, G. y Pacaud, P. 1995). El receptor de la mayoría de canales ROCs en músculo liso posee 7 dominios transmembrana acoplados a la proteína G, cuyo principal papel es la ruta de transducción entre la activación del receptor y la apertura del canal catiónico no selectivo.

c) Canales de Ca²⁺ activados por segundos mensajeros (SMOCs):

La actividad de los llamados SMOCs está modulada por determinadas moléculas que actúan como segundos mensajeros en el interior celular, siendo las más comunes los derivados de inositolfosfato, distintos nucleótidos cíclicos, o mensajeros derivados de lípidos como el diacilglicerol, el ácido araquidónico y sus metabolitos (Parekh, A.B. y Putney, J.W., Jr. 2005).

d) Canales de Ca²⁺ operados por depósito (SOCs):

Los SOCs son canales de Ca²⁺ que forman una vía de entrada de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática, activada tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺. Este mecanismo denominado entrada capacitativa de Ca²⁺ o entrada de Ca²⁺ operada por depósitos (ECC o SOCE), es un mecanismo ubicuo de entrada de Ca²⁺ especialmente relevante en las células no excitables, aunque también está presente en células excitables. Esta ruta de entrada de Ca²⁺ regula muchas funciones celulares, entre ellas la proliferación celular. Además, guarda una importante relación funcional con orgánulos subcelulares, que participan en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, como son el RE y la mitocondria. Su búsqueda, iniciada hace más de 20 años, condujo al descubrimiento de una nueva superfamilia de canales iónicos, los TRP (del inglés "transient receptor potencial"), algunos de los cuales son

considerados SOCs. Además, recientemente se han descubierto dos nuevas proteínas (Stim y Orai) que podrían explicar a nivel molecular, la entrada capacitativa de Ca^{2+} , por lo que más adelante se dedica un apartado que describe en detalle este mecanismo de gran novedad científica e importancia fisiológica.

2.1.1.2 Sistemas de extrusión del calcio citosólico

Durante el proceso de estimulación celular los mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} al citosol y, consecuentemente, de la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, son los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Sin embargo, una elevación mantenida de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tiene efectos negativos que pueden conducir a la muerte celular. Así, para evitar la continua activación celular, mantener los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y preparar las células para posteriores estímulos existen diversos sistemas de extrusión del Ca^{2+} del interior celular. Entre estos destacan:

a) PMCA: Bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática presentes en todas las células eucariotas. Su nombre deriva del inglés "plasma membrane Ca^{2+} ATPase". Su afinidad por el Ca^{2+} es muy alta ($K_{50}=0,1 \mu\text{M}$), transportando dicho ión desde el citosol al medio extracelular en contra del gradiente electroquímico. Pertenecen al grupo de las ATPasas de tipo P, ya que originan un intermedio fosforilado en su ciclo de funcionamiento. Transportan un ión de Ca^{2+} por cada molécula de ATP que hidrolizan, y requieren la presencia en el lado citosólico de Mg^{2+} . Este catión no se transporta, y si está elevada su concentración resulta inhibitorio para la PMCA, al competir con el Ca^{2+} por el sitio de transporte.

b) NCX: Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ situado en la membrana plasmática. Es un transportador electrogénico, de baja afinidad y alta capacidad, que en condiciones normales intercambia un ión de Ca^{2+} citosólico por 3 iones de Na^+ extracelular. Normalmente la energía para este flujo proviene del gradiente electroquímico para el Na^+ , que lo impulsa vigorosamente hacia el interior de la célula. No obstante, el sistema es reversible, y la dirección de los flujos puede variar dependiendo de la magnitud y polaridad del potencial de membrana y de los gradientes iónicos. En condiciones de reposo, el flujo neto de Ca^{2+} es prácticamente nulo.

c) Proteínas que unen Calcio: Proteínas localizadas en el interior celular que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular al actuar como tampones de Ca^{2+} . Una de las más conocidas es la calmodulina (Clapham, D.E. 2007).

2.2 HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Los depósitos intracelulares de Ca^{2+} no son un almacén pasivo de Ca^{2+} , participan directamente en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que suceden durante la activación celular. Incluso en condiciones de reposo, existe un equilibrio dinámico entre el continuo rellenado por bombeo, y la fuga permanente a través de los canales de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Entre todos ellos podríamos enunciar el aparato de Golgi, la envoltura nuclear, ciertas vesículas en células especializadas y sin duda el más conocido por su implicación en la señalización del Ca^{2+} , el RE, cuya concentración de Ca^{2+} en condiciones normales es similar a la presente en el líquido extracelular (Montero, M. et al. 2000). El núcleo y las mitocondrias también almacenan Ca^{2+} pero sólo de un modo transitorio, ya que en condiciones basales presentan una concentración de Ca^{2+} libre similar a la del citosol (Montero, M. et al. 2000; Chamero, P. et al. 2002).

2.2.1 CANALES DE CALCIO EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Los principales canales de Ca^{2+} del RE pertenecen a dos familias diferentes desde el punto de vista molecular en función de su sensibilidad a un segundo mensajero fisiológico, el inosito trifosfato (IP_3), y a un alcaloide de origen vegetal, la rianodina (Ry). Ambas familias están altamente conservadas, presentan homología parcial de secuencia y organización estructural, así como cierta similitud fisiológica, lo que implica que podrían derivar de una proteína ancestral común (Berridge, M.J. 1993). A su vez, ambos tipos de canales pueden coexistir en una misma célula.

a) Canal de calcio del receptor de IP_3 : Los receptores de IP_3 son tetrámeros, compuestos por grandes subunidades que rodean un poro catiónico poco selectivo. Cada subunidad con un único sitio de unión para el IP_3 posee un dominio transmembrana situado cerca del extremo carboxilo-terminal, que atraviesa 6 veces la membrana, y participa en la formación del poro (Taylor, C.W. y Moneer, Z. 2004). En el dominio citosólico se encuentra el sitio de unión

al IP₃ y a la calmodulina junto al extremo amino-terminal de la proteína. Entre el sitio de unión al IP₃ y los dominios transmembrana existe una región (dominio modulador) con numerosos sitios de unión a otras señales (Ca²⁺, ATP y sitios de fosforilación entre otros) que modulan el comportamiento del IP₃R. Por lo que el IP₃R posee 3 dominios funcionales básicos: el de unión al IP₃, el modulador y el poro. La sensibilidad de los IP₃Rs por el IP₃ varía según el tipo de receptor, siendo el IP₃R2 el de mayor afinidad, y con menor afinidad los receptores 1 y 3. El efecto del Ca²⁺ citosólico sobre los IP₃Rs también depende del subtipo del receptor y de la mediación de la CaM (Taylor, C.W. y Laude, A.J. 2002; Hattori, M. et al. 2004).

b) Canal de calcio del receptor de rianodina: Los receptores de rianodina presentan estructuralmente gran homología con los receptores de IP₃, sobre todo en la zona de anclaje a la membrana del RE y al igual que ellos son tetrámeros (Taylor, C.W. y Moneer, Z. 2004). Los principales sitios de unión son a Ca²⁺, CaM y ATP, localizados aproximadamente entre el extremo amino-terminal y la zona de inserción en la membrana, situada en el extremo carboxilo terminal. En tejidos de mamíferos se han encontrado tres isoformas distintas: RyR1, RyR2 y RyR3, co-expresándose con una o más isoformas de IP₃Rs. La isoforma RyR1 se expresa fundamentalmente en músculo esquelético y la RyR2 en miocardio, no estando claro el papel de estos receptores de rianodina en células no musculares.

2.2.2 SISTEMAS DE EXTRUSIÓN DEL CALCIO EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

a) SERCA: La bomba de Ca²⁺ tipo SERCA (del inglés "sarcolemmal and endoplasmic reticulum calcium ATPase") es un sistema de transporte activo primario situado en el RE que bombea Ca²⁺ desde el citosol hacia el interior del RE con muy alta afinidad (K₅₀=0,1 μM). Esta bomba puede modificar su tasa de transporte en respuesta a pequeñas elevaciones de la [Ca²⁺]_{cit} y ajustar los valores basales en reposo. Es muy similar a la bomba PMCA, siendo una ATPasa de Ca²⁺ tipo P presente en todas las células eucariotas. Existen una serie de inhibidores selectivos de las SERCA:

i. Tapsigargina: origen vegetal, se une con alta afinidad e inhibe irreversiblemente a todas las SERCA.

ii. TBH (2,5-di-(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona): menor afinidad que la tapsigargina y con efecto reversible.

iii. CPA (ácido ciclopiazónico): metabolito producido por *Aspergillus* y *Penicillium*, selectivo, pero de menor afinidad que la tapsigargina y con efecto reversible.

Existen distintas isoformas de las SERCA que se expresan en diferentes tejidos:

- o SERCA1: se expresa exclusivamente en el músculo esquelético de contracción rápida.

- o SERCA2: se expresa en músculo esquelético de contracción lenta y músculo cardiaco. Existen 2 isoformas dentro de este subtipo: la SERCA2a y la SERCA2b. La expresión de la SERCA2a disminuye en las células de músculo liso vascular al pasar de fenotipo contráctil a fenotipo proliferativo.

- o SERCA3: se expresa en tejidos no musculares.

b) SPCAs: Bombas de Ca^{2+} conocidas como Ca^{2+} /ATPasas de la vía secretora. Se relacionan con las SERCA pero con funciones y propiedades distintas. Las SPCAs pueden ser responsables de la acumulación de Ca^{2+} en los compartimentos del sistema de Golgi (Mitchell, P. y Moyle, J. 1967; Rizzuto, R. 2001), que son cruciales para la regulación de la secreción y de los contactos celulares.

3. ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+} (ECC)

El término entrada capacitativa de calcio o entrada de calcio operada por depósitos (ECC o SOCE) fue definido a mediados de los años 80, cuando James W. Putney Jr. (Putney, J.W., Jr. 1986) propuso que la entrada de Ca^{2+} a las células se activaba precisamente por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de éste. Dicho mecanismo de acción se considera la vía de entrada de Ca^{2+} más importante en las células no excitables, aunque también se describió en las células excitables (Villalobos, C. y Garcia-Sancho, J. 1995).

Originalmente, Putney propuso que el vaciamiento de los depósitos inducía la entrada de Ca^{2+} directamente desde el medio extracelular a los

depósitos y, de éstos, al citosol (Putney, J.W., Jr. 1986). Dos descubrimientos acontecidos por esa época, que indicaban que los depósitos se rellenaban desde el citosol y no desde el medio extracelular, hicieron que Putney revisara su hipótesis (Putney, J.W., Jr. 1990). El primero de estos eventos fue el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes, para medir de un modo indirecto las concentraciones de Ca^{2+} citosólico en células vivas a tiempo real (Grynkiewicz, G. et al. 1985). El segundo, la identificación de la tapsigargina, un inhibidor específico de las bombas de Ca^{2+} tipo SERCA del RE. Este inhibidor vacía irreversiblemente los depósitos intracelulares, activando de esta forma una vía de entrada de Ca^{2+} (Takemura, H. et al. 1989).

Estas evidencias experimentales indicaban que el rellenado de los depósitos ocurría desde el citosol, lo que debía de existir una señal retrógrada entre el nivel de llenado de los depósitos y los canales de la membrana plasmática. Ello requería en primer lugar, la existencia de un sensor de Ca^{2+} capaz de sentir el contenido de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares. En segundo lugar, una señal de activación de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Según esto, para dar explicación al mecanismo se propusieron tres modelos (Parekh, A.B. y Putney, J.W., Jr. 2005):

- **Modelo del mensajero difusible:** El vaciamiento de los depósitos generaría un factor soluble llamado CIF (del inglés: Calcium Influx Factor) capaz de abrir canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática. Este mensajero podría almacenarse en el RE liberándose hacia el citosol tras el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} .

- **Modelo de fusión vesicular:** Este modelo proponía que la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , se debía a la inserción de nuevos canales de Ca^{2+} incorporados en vesículas intracelulares exocitóticas.

- **Modelo del acoplamiento conformacional:** Este modelo fue propuesto por Berridge (Berridge, 1995). Apoyaba la idea de que los receptores InsP_3 del RE, llevarían a cabo una interacción "íntima" con los canales de la membrana plasmática, de un modo similar a la interacción de los receptores de dihidropiridinas y el receptor de rianodina en el músculo esquelético.

Pocos años más tarde, Hoth y Penner descubrieron en mastocitos de rata que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , inducía la aparición

de una corriente hasta el momento no conocida, pequeña y muy selectiva a Ca^{2+} , la cual denominaron I_{CRAC} (del inglés Ca^{2+} -release activated current) (Hoth, M. y Penner, R. 1992). Esta corriente es independiente de voltaje y tiene una relación I/V característica. Presenta una gran amplitud a potenciales negativos, pero se aproxima a 0 a potenciales muy positivos ($> +60\text{mV}$), lo que indica una gran selectividad para el Ca^{2+} . Se estima que la selectividad de este canal por el Ca^{2+} respecto al Na^+ es 1.000:1, similar a los VOCs, pudiendo haber al menos 5.000 canales funcionales por célula. Tiene una conductancia pequeña, aproximadamente de 24 fS y el rango de amplitud de corriente es de 0,5 a 1,1 pA/pF. Los bloqueantes más potentes de esta corriente son los cationes trivalentes La^{3+} y Gd^{3+} , además del compuesto 2-APB a altas concentraciones. I_{CRAC} no es la única corriente activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares, pues en los últimos años se han descrito nuevas corrientes a las que se ha llamado I_{SOC} (del inglés store-operated current). Estas corrientes presentan propiedades electrofisiológicas diferentes a la corriente I_{CRAC} , podrían estar relacionadas con ciertos canales de la superfamilia TRPC y sugieren que la entrada capacitativa de Ca^{2+} está mediada por una familia de canales más que por un único canal.

3.1 Stim1 y Orai1

Ninguno de los tres modelos propuestos para explicar el mecanismo de activación de la ECC definía claramente dicho proceso. Sin embargo, en los últimos años se han descubierto una serie de proteínas que podrían explicar de un modo convincente la ECC. Estas proteínas son las siguientes: Stim1, que actúa como sensor de Ca^{2+} en el RE, y Orai1, una de las subunidades del canal, concretamente la unidad formadora del poro del canal.

- **Stim1** (del inglés "Stromal Interaction Molecule 1"): Inicialmente fue llamada *Drosophila Stim*, por identificarse como un componente muy importante de los mecanismos de activación de la ECC en las células S2 de *Drosophila* (Roos, J. et al. 2005). Ese mismo año fue también aislada en células HeLa (Liou, J. et al. 2005). *Drosophila* sólo tiene un gen Stim, pero las células de mamífero presentan dos isoformas llamadas Stim1 y Stim2. La función de Stim2 no está muy clara, pudiendo estar involucrado en el mantenimiento de las concentraciones de Ca^{2+} o actuando como un inhibidor de los canales SOC, sólo en el caso de que se exprese a niveles muy altos. (Soboloff, J. et al. 2006).

Stim1 se ha definido como sensor de los niveles de Ca^{2+} en el RE. Contiene un único dominio transmembrana, un dominio llamado "coiled-coil" (CC) y una región rica en prolinas en contacto con el citoplasma, y en el extremo N-terminal, orientados hacia el RE, un dominio "mano-EF" de unión a Ca^{2+} intraluminal y un motivo- α (SAM).

- **Orai1** fue identificada en un primer momento por Feske y colaboradores en 2006, al realizar un mapeo genético en linfocitos carentes de ECC, procedentes de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (Feske, S. et al. 2006). Se definió como el canal responsable de la corriente I_{CRAC} . Diversos estudios han demostrado que la inhibición de la expresión de Orai y mutaciones puntuales disminuyen la ECC y modifican las corrientes SOC respectivamente (Yeromin, A.V. et al. 2006) (Gwack, Y. et al. 2007). Orai se expresa en todos los animales multicelulares, desde nematodos hasta humanos. En vertebrados, existen tres proteínas de la familia Orai (Orai1-3), activados exclusivamente por el vaciamiento de los depósitos (Feske, S. et al. 2006). Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática, presentan cuatro dominios transmembrana y tanto el C-terminal como el N-terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma y son importantes para la interacción con la proteína Stim1. Parece ser que los canales Orai son tetrámeros formados por cuatro monómeros Orai. Dos residuos de glutamato, uno en la región del poro (E106) y otro en el dominio transmembrana 3 (E190), están implicados en la selectividad del canal, mientras que los glutamatos conservados en el dominio C-terminal están relacionados con la inactivación del canal (Prakriya, M. et al. 2006) (Vig, M. et al. 2006) (Lee, K.P. et al. 2009). Orai2 y Orai3 se activan por proteínas Stim1 de manera similar a Orai1 cuando se coexpresan en células Hek293 (DeHaven, W.I. et al. 2007). Se ha demostrado que Orai3 codifica en células de cáncer de mama una corriente I_{CRAC} con conductancia similar a la nativa (Motiani, R.K. et al. 2010). El papel de Orai2 en la participación de la entrada de Ca^{2+} no está tan claro.

Estas dos proteínas, Stim1 y Orai1, participan en la entrada capacitativa de Ca^{2+} a través de su interacción directa, mediante un mínimo de 100 aminoácidos de la región C-terminal de Stim1 y C-N-terminal de Orai1. La expresión ectópica de estos 100 aa de Stim1 se denomina SOAR (Stim Orai Activating Region) o CAD (CRAC activation Domain), siendo suficiente para activar los canales Orai1 e inducir entrada de Ca^{2+} independientemente del vaciamiento de los depósitos (Yuan, J.P. et al. 2009).

Cuando se activan los receptores de la membrana plasmática, (receptores acoplados a proteínas G o receptores con actividad tirosina quinasa), activan, a su vez, a la fosfolipasa C generándose IP₃. Éste se une a su receptor en el RE provocando la salida de Ca²⁺ de los depósitos. El Ca²⁺ en el RE en reposo está unido a la proteína Stim1 mediante el dominio mano-EF. Cuando la concentración de Ca²⁺ del depósito disminuye, las proteínas Stim1 libres de Ca²⁺ tienden a oligomerizar acumulándose en unas estructuras llamadas "puncta" en la membrana de los depósitos, próximas a la membrana plasmática donde se encuentran las proteínas Orai. La interacción de Stim1 y Orai1 activa a éstas últimas, formadoras de los canales selectivos de Ca²⁺. El relleno de los depósitos revierte la situación (Hewavitharana, T. et al. 2007).

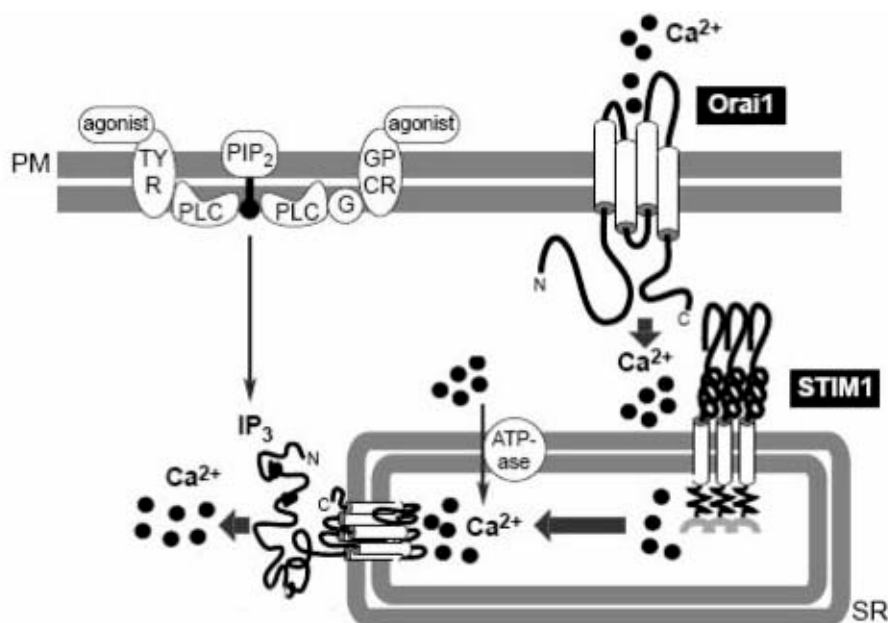


Figura 5: Regulación de la entrada de Ca²⁺ por Stim1 y Orai1. La activación por un agonista de los receptores de la membrana plasmática, acoplados a proteínas G (GPCR) o con actividad tirosina quinasa (TYR) activan a la fosfolipasa C (PLC), generándose IP₃ y activando a su receptor IP₃R, lo que causa el vaciamiento de Ca²⁺ del RE. Este Ca²⁺ que estaba unido reversiblemente al motivo mano-EF de Stim-1, se disocia provocando la redistribución y oligomerización de Stim1 dentro del RE hacia áreas cercanas de los canales Orai1 de la membrana plasmática. La interacción de ambas proteínas activa a los canales de Ca²⁺, estimulando la entrada de dicho ión al interior celular y por consiguiente relleniéndose los depósitos (Imagen modificada de Fernanda R. C. Giachini et al. 2001)

En estudios con modelos *in vivo* de proliferación y migración de VSMCs, se muestra que Stim1 se sobreexpresa en arterias carótidas de ratas lesionadas tras ser sometidas a dilatación con balón (Guo, R.W. et al. 2009). Lo mismo sucede con la proteína Orai1, la cual se encuentra sobreexpresada también en

la media y neointima de arterias carótidas de ratas lesionadas tras dilatación con balón (Bisaillon, J.M. et al. 2010).

Por el contrario, el silenciamiento molecular, usando siRNA, tanto de Stim1 como de Orai1 disminuye la entrada de Ca^{2+} , en vena safena humana (Li, J. et al. 2008), en aorta humana y de rata (Baryshnikov, S.G. et al. 2009) (Potier, M. et al. 2009) y en arteria pulmonar de ratón (Ng, L.C. et al. 2009). Esto demuestra, que tanto Stim1 como Orai1 forman parte del mecanismo molecular responsable de la ECC en músculo liso vascular. Sin embargo, mientras hay un consenso general en que Stim1 es el sensor de Ca^{2+} , tanto en células excitables como en no excitables, respecto a Orai1, la cosa no está tan clara, pues hay investigadores que cuestionan su capacidad para formar un canal altamente selectivo para Ca^{2+} , CRAC, en células no excitables, y un canal catiónico no selectivo en células excitables como las de músculo liso vascular (Gwozdz, T. et al. 2008).

3.2 LA SUPERFAMILIA DE CANALES IÓNICOS TRP

Otras proteínas identificadas como candidatas para formar los canales permeables a Ca^{2+} durante la ECC son los homólogos mamíferos de los canales TRP (Transient Receptor Potential Channels) de *Drosophila*. Se clasificaron en 7 grandes familias en función de su homología de secuencia y similitudes funcionales: TRPC (canónica), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPP (policistina), TRPML (mucopolipina), TRPA (ankirina) y TRPN (NOMPC) (Pederser, 2005). Estos canales TRP están constituidos por 6 segmentos transmembrana (S1-S6) y extremos N- y C- terminales citoplasmáticos. Se ensamblan formando homo o heterotetrámeros delimitando entre los segmentos S5 y S6 de cada subunidad el poro del canal (Clapham, D.E. 2003).

Una de las familias estudiadas con especial atención ha sido la familia de los TRPC, siendo el primer homólogo identificado en mamíferos humanos el TRPC1, primer miembro de la familia TRP propuesto para formar un canal iónico. El grupo de los TRPC se puede dividir en subfamilias (TRPC1, TRPC4-5, TRPC3, 6, 7, y TRPC2), en función de la homología de su secuencia y las similitudes funcionales (Clapham, D.E. 2003). Esta familia es de gran importancia en los miocitos vasculares, ya que según la combinación de diferentes proteínas TRPC, se generan diferentes isoformas de SOCs con distintas características fisiológicas en los diversos vasos sanguíneos. En un

principio se pensaba que la combinación de proteínas TRPC era sólo posible entre miembros de la misma subfamilia, pero hoy en día se ha demostrado que existen canales catiónicos funcionales compuestos por subunidades o proteínas pertenecientes a subfamilias diferentes, como por ejemplo, la combinación de TRPC5 y TRPC6, o TRPC5 y TRPC7 (Saleh, S.N. et al. 2008).

Se ha observado que en ciertas enfermedades vasculares, o cuando modelos animales de las mismas son sometidos a cierto daño, como el sufrido tras la colocación de un stent post-angioplastia, hay un aumento significativo de los canales TRPC, relacionado con el paso de las células a un fenotipo proliferativo y el consecuente aumento de entrada capacitativa de Ca^{2+} a las células. Las proteínas más expresadas en la vasculatura son las isoformas TRPC1, 4 y 6 (House, S.J. et al. 2008). Existen diferencias en función de los vasos donde se expresen. Así, en vena de safena humana co-localizan TRPC1 y TRPC5 (Xu 2006), mientras que en arteria coronaria, los canales están formados por heterotetrámeros de proteínas TRPC3 y 7 (Peppiatt-Wildman, C.M. et al. 2007). No obstante, el papel de las proteínas TRPC en la ECC no está aceptado por todos los expertos, ya que algunos canales formados por estas proteínas pueden funcionar fisiológicamente como canales no operados por depósitos, activados por fosfolipasa C, como el canal original de *Drosophila*.

Sin embargo, una de las evidencias más concluyentes de la participación de TRPC1 en la ECC fue la identificación del mecanismo por el cual Stim1 activa este canal. Para que TRPC1 sea funcional, necesita de una interacción electrostática entre dos aspartatos de su C-terminal (D639-d640) y dos lisinas (K684-K685) de la región rica en lisinas de Stim1 (Zeng, W. et al. 2008). A su vez, recientemente se ha demostrado la función de Orai1 en la regulación de la actividad del canal TRPC (Liao, Y. et al. 2007; Liao, Y. et al. 2008). Uno de los últimos estudios realizados en plaquetas humanas que expresan Stim1, Orai1 y TRPC1, indicaba la mediación de Orai1 en la comunicación entre Stim1 y TRPC1, necesaria para la activación de este último y la consecuente activación de ECC (Salido, G.M. et al. 2009).

3.3 CONTROL MITOCONDRIAL DE LA ENTRADA CAPACITATIVA.

La ECC no está regulada exclusivamente por el RE. La mitocondria juega un papel importante en la regulación de las señales de Ca^{2+} en general (Rizzuto,

R. et al. 2000), y también en el control de la ECC en particular (Hoth, M. et al. 1997; Hoth, M. et al. 2000; Parekh, A.B. 2008).

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares móviles y plásticos de un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 μm , con forma cilíndrica, alargada y rígida, similares a las bacterias.

Cada mitocondria está constituida por dos membranas altamente especializadas y con funciones muy diferentes. Ambas membranas definen dos compartimentos mitocondriales diferentes: la matriz mitocondrial interna y el espacio intermembrana, más estrecho que la anterior. Desde el punto de vista funcional, el espacio más importante es la matriz y la membrana mitocondrial interna que lo delimita. En la matriz mitocondrial se encuentran los enzimas del ciclo Krebs, necesarios para la síntesis de los equivalentes de reducción que alimentan los sistemas de transporte de electrones de la cadena respiratoria, localizados en la membrana mitocondrial interna.

La función más importante de las mitocondrias es la síntesis aerobia de ATP a partir de ADP, por la enzima $\text{ATP}_{\text{sintasa}}$, también localizada en la membrana mitocondrial interna. Tanto la síntesis de ATP, como la respiración, dependen en buena medida de la velocidad de formación de los equivalentes de reducción por los enzimas de Krebs, proceso regulado por la concentración intramitocondrial de calcio (Rizzuto, R. et al. 2000). Debido a ello, las mitocondrias poseen una serie de sistemas de transporte de Ca^{2+} , siendo la principal vía de entrada el uniportador de Ca^{2+} , un canal de Ca^{2+} activado por este ión alostéricamente y localizado en la membrana interna (Kirichok, Y. et al. 2004)(Kirichok et al., 2004). Muy recientemente se han comenzado a desentrañar las bases moleculares del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial ((Perocchi, F. et al. 2010).

Este proceso se lleva a cabo gracias al enorme potencial mitocondrial (negativo en el interior de la mitocondria), estimado en torno a -180, y generado por la salida de H^+ de la matriz por la cadena respiratoria. A su vez, el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intramitocondrial aumenta los procesos catabólicos mitocondriales debido a la estimulación de 3 deshidrogenasas mitocondriales, por lo que el metabolismo mitocondrial y la homeostasis del Ca^{2+} están mutuamente conectados. Además, el metabolismo activado por Ca^{2+} mantiene

la generación del potencial mitocondrial, necesario para que el flujo del propio Ca^{2+} suceda.

Diversos experimentos "in vitro" han mostrado que la afinidad del uniportador mitocondrial por el Ca^{2+} es relativamente baja (K_d alrededor de $10\mu\text{M}$). Como la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ oscila de 100nM a $1\mu\text{M}$ de células en reposo a células activadas respectivamente, se podría pensar que la mitocondria no podría captar Ca^{2+} con efectividad, no obstante, se acepta que la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial comienza cuando la concentración extramitocondrial de éste alcanza los 400nM .

Varios estudios llevados a cabo en los laboratorios de Lewis (Hoth, M. et al. 1997; Hoth, M. et al. 2000) y Parekh (Gilabert, J.A. y Parekh, A.B. 2000; Gilabert, J.A. et al. 2001) (Glitsch, M.D. et al. 2002) mostraron la necesaria captación de calcio por la mitocondria para el correcto funcionamiento de la ECC en las células Jurkat y RBL-1. La corriente de calcio conocida como I_{CRAC} sólo se activaba si las mitocondrias se encontraban en estado energizado o polarizado. Este requisito de las mitocondrias es debido a su papel como sumidero de Ca^{2+} porque la inhibición de la captación mitocondrial de Ca^{2+} con protonóforos, como el FCCP, que colapsan el $\Delta\psi$, la fuerza electromotriz impulsora de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, promueve la generación de altos dominios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que favorecen la inactivación dependiente de Ca^{2+} , de I_{CRAC} e inhiben la ECC (Hoth, M. et al. 1997; Hoth, M. et al. 2000) (Glitsch, M.D. et al. 2002) (Parekh, A.B. 2003). Del mismo modo durante la liberación de Ca^{2+} del RE, la captación mitocondrial de Ca^{2+} evita la inactivación de receptor de IP_3 lo que permite que el depósito de Ca^{2+} se deplete más eficazmente y se produzca una activación máxima de la ECC. (Gilabert, J.A. y Parekh, A.B. 2000). De este modo, la ECC está regulada por la interacción dinámica entre los flujos de Ca^{2+} de la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria (Parekh, A.B. 2003).

Por otra parte, las mitocondrias no son estáticas, si no que son capaces de recorrer grandes distancias para situarse en lugares específicos donde poder modular la ECC. Ese parece ser el caso de la sinapsis inmunológica donde las mitocondrias son esenciales para el mantenimiento de la ECC y la expansión clonal del linfocito T activado (Quintana, A. et al. 2011).

La mitocondria por tanto, juega un doble papel en el control de la ECC, ya que facilita su activación al favorecer el vaciamiento de los depósitos, y además, impide la inactivación al retirar el Ca^{2+} a medida que entra a la célula. Además, la corriente I_{crac} inactiva rápidamente por Ca^{2+} de un modo independiente de mitochondrials. (Parekh, A.B. y Putney, J.W., Jr. 2005). En resumen, la ECC está regulada por Ca^{2+} de tres modos diferentes:

- Inactivación rápida: Producida por la generación de microdominios elevados de Ca^{2+} en las proximidades de los canales CRAC tras su activación. No controlada por las mitocondrias.
- Dos inactivaciones lentas: Reguladas por las mitocondrias energetizadas.
 - o Rellenado de los depósitos conduce al cierre de los canales de Ca^{2+} .
 - o Dependiente de la entrada de Ca^{2+} pero independiente de los depósitos.

4. FISIOPATOLOGÍA VASCULAR

4.1 MODULACIÓN FENOTÍPICA O CAMBIO FENOTÍPICO

Las células de músculo liso no están diferenciadas de modo irreversible en el tejido vascular maduro, pudiendo modular su fenotipo bajo ciertas condiciones. Esta característica única de estas células, fue definida bajo el término de modulación fenotípica hace más de 30 años por Julie Chamley-Campbell y colaboradores (Chamley-Campbell, J. et al. 1979).

En un primer momento el cambio o modulación fenotípica se basó únicamente en cambios morfológicos de las células, pero posteriormente se han descubierto alteraciones en las propiedades funcionales y estructurales de éstas, incluyendo cambios en los patrones de expresión génica, en los mecanismos de señalización y en la contractibilidad.

Las células de músculo liso vascular (VSMCs) "diferenciadas" o contráctiles, presentan poca o nula capacidad de proliferación y migración, así como una tasa muy baja de síntesis de componentes de la matriz extracelular, por lo que la célula se restringe casi únicamente a desempeñar su principal

función de contracción y regulación del tono vascular. Por el contrario, las células “desdiferenciadas” o proliferativas, muestran una elevada actividad migratoria y proliferativa, junto a un elevado grado de síntesis proteica. Cabe destacar, que cuando las células adquieren este fenotipo proliferativo, ello conlleva la alteración de varios componentes de las rutas de señalización del Ca^{2+} como son: la pérdida de los canales de Ca^{2+} tipo L, la ganancia de los canales de Ca^{2+} tipo T y el aumento en la expresión de los canales TRPC (concretamente TRPC1, 4 y 6), que han sido implicados en la entrada capacitativa de Ca^{2+} y en la proliferación celular (House, S.J. et al. 2008). También se ha observado un incremento en la expresión proteica de Stim1 y Orai1, lo que conlleva un aumento de la ECC en las células con fenotipo proliferativo.

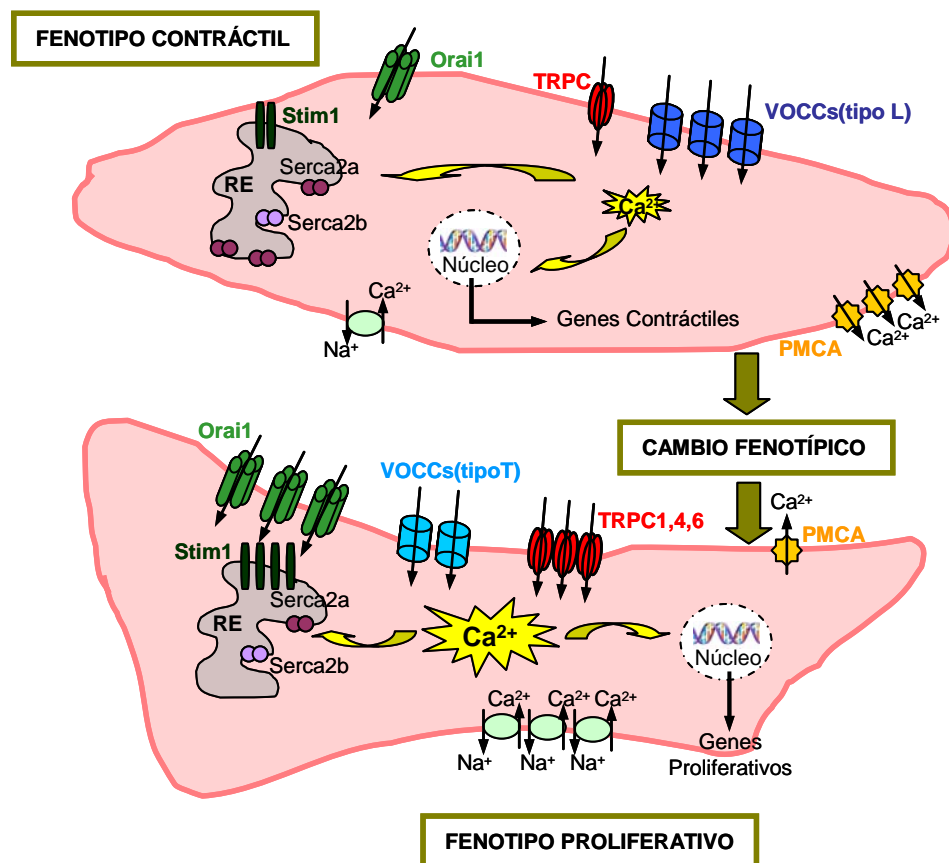


Figura 6: Modulación de los canales iónicos implicados en la homeostasis del calcio durante el cambio fenotípico de las VSMCs. La entrada de calcio en las células con fenotipo contráctil se produce fundamentalmente a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. Cuando las células presentan fenotipo proliferativo el calcio entra al interior celular por canales de calcio dependientes de voltaje tipo T, canales TRPC (1, 4, 6), y por canales SOCs, cuya proteína formadora del poro es la proteína Orai1. Las bombas de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y del retículo endoplasmático (SERCA 2a) disminuyen su expresión en las células con fenotipo proliferativo (Figura modificada de House S.J. et al. 2008).

El cambio fenotípico es muy importante fisiológicamente durante el desarrollo vascular, en la adaptación de los vasos en función de las demandas funcionales de flujo, y para reparar pequeños daños producidos en los vasos. En algunos casos, además de las VSMCs preexistentes, participan subpoblaciones de VSMCs fenotípicamente diferentes a las VSMCs contráctiles, e incluso células progenitoras de la médula ósea, ya que se ha visto, que tras un daño vascular, por estimulación mecánica, inmunológica o humoral, se liberan estas células a la circulación para participar en este proceso de remodelado. El problema aparece, cuando en ciertas circunstancias este cambio no es reversible, y contribuye al desarrollo de ciertas enfermedades vasculares como la aterosclerosis, el fallo venoso y la restenosis tras intervención percutánea o angioplastia (Kawai-Kowase, K. y Owens, G.K. 2007).

La identificación de los factores que pueden participar en el control y regulación de este proceso de desdiferenciación tiene un gran interés médico, aunque todavía no están totalmente establecidos. Dentro de todos los factores, tienen gran importancia los factores ambientales, entre los que destacan: factores de crecimiento, interacciones célula-célula, factores mecánicos, componentes de la matriz extracelular como la laminina y el colágeno tipo I y IV, y mediadores inflamatorios (Owens, G.K. et al. 2004).

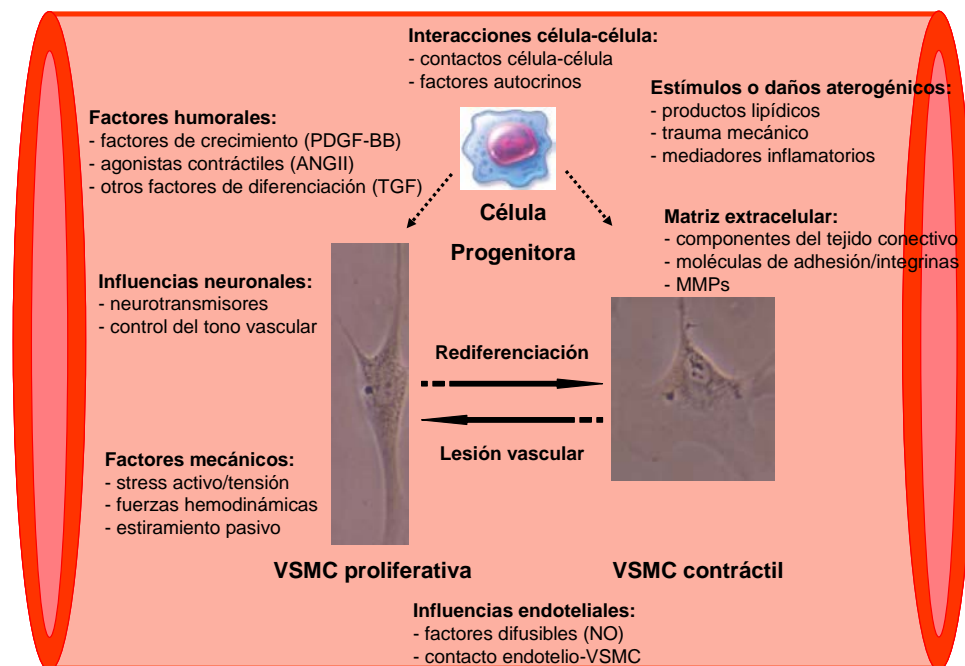


Figura 7: Factores que regulan la modulación fenotípica de las VSMCs (Figura modificada de Owens, G.K. et al. 2004).

4.2 ATEROSCLEROSIS

La enfermedad aterosclerótica es una forma de respuesta de la pared vascular frente a determinadas agresiones o estímulos nocivos. En condiciones normales, la pared arterial se encuentra separada del torrente circulatorio por una capa de células endoteliales, que actúa como una barrera semipermeable y funcionalmente activa, responsable de mantener la homeostasis vascular. Pequeñas agresiones mantenidas en ciertas áreas del árbol arterial, pueden alterar el normal funcionamiento del endotelio, provocando, entre otros, un aumento de la permeabilidad a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y un incremento en el reclutamiento de monocitos, ambos elementos claves en el inicio de las lesiones ateroscleróticas. Los agentes o factores nocivos, capaces de alterar la función del endotelio e iniciar las lesiones ateroscleróticas se conocen como factores de riesgo. A pesar de una exposición similar de toda la superficie vascular a concentraciones elevadas de LDL u otros factores de riesgo cardiovascular, las lesiones ateroscleróticas sólo se desarrollan en determinadas zonas del árbol arterial. Por tanto, además de los factores sistémicos, deben existir factores locales que determinen el lugar, y probablemente también el grado de progresión de las lesiones ateroscleróticas.

Se ha demostrado, que los patrones de flujo característicos de las bifurcaciones predisponen al desarrollo de las placas de aterosclerosis. En estas zonas, las fuerzas de cizalladura promueven alteraciones morfológicas que provocan cambios en la permeabilidad y otras disfunciones del endotelio, explicando la formación de lesiones ateroscleróticas en el árbol coronario.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso aterosclerótico comienza con la disfunción del endotelio y el consecuente paso de lipoproteínas LDL a la capa íntima del vaso. La infiltración de monocitos y macrófagos, produce liberación de factores de crecimiento, citoquinas y metaloproteinasas de la matriz (MMP), provocando una modificación del ambiente, y como consecuencia, un cambio fenotípico de las células de músculo liso adyacentes. Estas células, que presentaban un fenotipo contráctil, se desdiferencian, migran hacia la capa íntima, entran en el ciclo celular, secretan proteínas de la matriz extracelular y proliferan, constituyendo el principal componente celular de la placa de ateroma. Conforme la placa va progresando, se va desarrollando un núcleo de lípidos trombogénicos, protegido del contacto con la sangre por una capa de VSMCs que secretan una matriz rica en colágeno. Esta capa protectora

puede desaparecer por un aumento local de células inflamatorias, ya que los mediadores derivados de leucocitos pueden inhibir la proliferación de las células musculares lisas e inducir su apoptosis. A su vez, las células inflamatorias secretan MMP pudiendo degradar la matriz de colágeno. La disminución de las células de músculo liso vascular debilita la matriz fibrosa, exponiendo el núcleo lipídico al flujo sanguíneo y aumentando las probabilidades de su rotura (Clunn, G.F. et al. 2010). La rotura de una placa aterosclerótica vulnerable favorece la trombosis, causa de los síndromes clínicos cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio (Libby, P. et al. 2002).

La aterosclerosis no es un proceso lineal continuo, sino que más bien parece una enfermedad con fases alternantes de estabilidad e inestabilidad (Davies, M.J. 1996). Los cambios bruscos e impredecibles de los síntomas parecen estar relacionados con la rotura o erosión de la placa. Las placas que son propensas a dicha rotura tienen un núcleo lipídico grande, una densidad baja de células de músculo liso, una densidad elevada de macrófagos, un casquete fibroso con colágeno desorganizado y una concentración alta de factor tisular (Falk, E. y Fernandez-Ortiz, A. 1995).

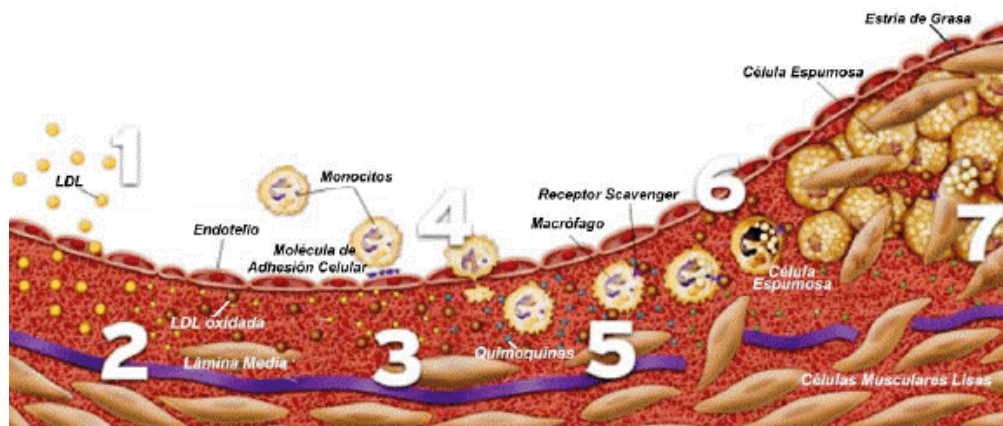


Figura 8: Etapas en el desarrollo de la placa aterosclerótica. 1 y 2 Disfunción del endotelio y paso de lipoproteínas LDL a la capa íntima del vaso. 3 y 4 Infiltración de monocitos y macrófagos liberando factores de crecimiento y citoquinas, provocando un cambio fenotípico de las células de músculo liso adyacentes. 5 y 6 Formación de células espumosas. 7 Placa aterosclerótica.



Figura 9: Progreso de la aterosclerosis en corte transversal de arteria afectada

4.3 RESTENOSIS

La angioplastia transluminal, incremento de la luz de un vaso estenótico empleando un catéter intravascular, fue desarrollada inicialmente por Dotter y Judkins en 1964 (Dotter, C.T. y Judkins, M.P. 1989). En su descripción inicial, una guía era avanzada a través de una estenosis arterial aterosclerótica, lo que permitía el avance de dilatadores rígidos cada vez de mayor diámetro. De esta forma se producía una mejoría en el diámetro de la luz estenótica.

Aunque esta técnica parecía claramente efectiva en arterias periféricas, la necesidad de introducir dilatadores de gran calibre a través de la punción arterial, y las elevadas fuerzas de rozamiento que esta técnica aplicaba sobre la placa aterosclerótica, limitaron su aplicación clínica. Por lo que en 1974 Andreas Gruntzig modificó la técnica reemplazando el dilatador rígido por un balón hinchable montado en un pequeño catéter (Gruntzig, A. y Kumpe, D.A. 1979). Este sistema era introducido percutáneamente con un mínimo traumatismo arterial, cruzaba con facilidad las estenosis, y podía ser hinchado con suficiente presión para incrementar el diámetro de la luz estenótica.

En 1977, tras una serie de experiencias en animales, en cadáveres y en arterias coronarias de pacientes sometidos a cirugía coronaria, Gruntzig y colaboradores aplicaron la técnica de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) a arterias coronarias de pacientes (Gruntzig, A.R. et al. 1979). Con el paso de los años se han producido mejoras en el equipamiento y en la técnica, lo que ha producido un espectacular incremento en el número de angioplastias realizadas en los últimos años. A pesar del 90-95% de satisfacción primaria que presenta la angioplastia coronaria, el 30-45% de los pacientes sufre restenosis tardía tras 6 meses.

La restenosis de arterias coronarias y periféricas después de dilatación por balón es un problema clínico de gran importancia. Los mecanismos relacionados con el proceso incluyen la constricción elástica inmediata de la arteria, la constricción vascular tardía y la respuesta proliferativa de las células de músculo liso vascular. Sería engañoso suponer que los procesos implicados en el desarrollo de la lesión aterosclerótica son equivalentes a los que rigen la lesión restenótica que se forma después de la angioplastia. Los tiempos de formación de la lesión son dispares, al igual que algunas características de las lesiones. Por otra parte, existen ciertas semejanzas, ya que productos de oxidación lipídica, lipoproteínas y células musculares lisas están presentes en ambos casos.

La superficie luminal de los vasos normales está cubierta por una monocapa de células endoteliales constituyendo una superficie no trombogénica. Cuando el endotelio es débilmente dañado, las plaquetas inmediatamente se depositan sobre el tejido subendotelial. Generalmente no progresa a la formación de un trombo, simplemente hay una cicatrización. Si el daño es más profundo, como en el caso de una angioplastia, se expone colágeno, tejido elástico y células de músculo liso, activando a las plaquetas circulantes y la cascada de coagulación, con la consiguiente formación del trombo.

Actualmente, se están investigando y aplicando *stents* (pequeños tubos flexibles metálicos) recubiertos con diferentes sustancias que intentan actuar sobre los dos componentes del proceso de la restenosis, el mecánico y el biológico.

Los *stents* recubiertos pueden dividirse en dos categorías: *stents* con materiales biocompatibles y *stents* liberadores de fármacos. Los *stents* con materiales biocompatibles (carbón, carburo de silicio...) parecen tener menos efecto trombogénico e inflamatorio que los *stents* convencionales. Los *stents* liberadores de fármacos consisten en una malla metálica recubierta, en general, por un polímero que aporta integridad estructural y hace las veces de transportador de la droga activa, permitiendo su liberación. Destacan los *stents* con agentes anticoagulantes (ej. Heparina, hirudina), con agentes antiinflamatorios (dexametasona) y con agentes antiproliferativos (principalmente sirolimus, taxol y sus derivados paclitaxel y tacrolimus). El objetivo de añadir un fármaco antiproliferativo consiste en intentar inhibir la hiperplasia neointimal mediante acción citostática y citotóxica.

Los estudios iniciales en humanos se han llevado a cabo con sirolimus (rapamicina) y paclitaxel. El sirolimus parece tener doble mecanismo de acción: inhibición de la proliferación de las células musculares lisas y reducción de la actividad inflamatoria local celular en la pared del vaso. El taxol y sus derivados (paclitaxel) son compuestos naturales que ejercen su acción antiproliferativa a través de la alteración de la función microtubular, reduciendo la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular. Los resultados parecen favorables para los *stents* antiproliferativos en lesiones de *novo*, ya que en los pacientes con restenosis *intra-stent*, los resultados preliminares de los registros con *stent* recubiertos de fármacos antiproliferativos no parecen seguir la misma línea, destacando la aparición de trombosis tardía.

Hay que destacar además que todos los ensayos clínicos realizados hasta la fecha no han superado los 12 meses de duración, periodo de estudio demasiado corto, existiendo la posibilidad de que estos agentes simplemente retrasen el comienzo de la restenosis. Se necesitan por tanto ensayos clínicos en el que se apliquen *stents* con fármacos antiproliferativos durante periodos mayores, lesiones largas, restenóticas, arterias de pequeño calibre, oclusión crónica, lesiones bifurcales o del tronco común de la arteria coronaria izquierda o en el contexto del Infarto Agudo de Miocardio (IAM).

Todos estos estudios son necesarios pues aun con la terapia antitrombótica convencional administrada, se produce una importante formación trombo-plaquetaria como resultado del fuerte daño producido por la intervención. La activación de las plaquetas circulantes, se asocia con la liberación de sus α -gránulos que contienen mitógenos (PDGF, TGF- β , trombina) y agentes vasoactivos (TxA_2). El PDGF es un potente quimioatrayente de las VSMCs y junto a otros mitógenos funcionan como una matriz para la migración y proliferación de estas células. Se ha demostrado, que anticuerpos específicos α -PDGF disminuyen la proliferación producida por el daño tras la angioplastia, y un análisis con trapidil, un inhibidor de PDGF, también mostraba una reducción de la incidencia de la restenosis en pacientes tras angioplastia, tratados con él respecto a los controles.

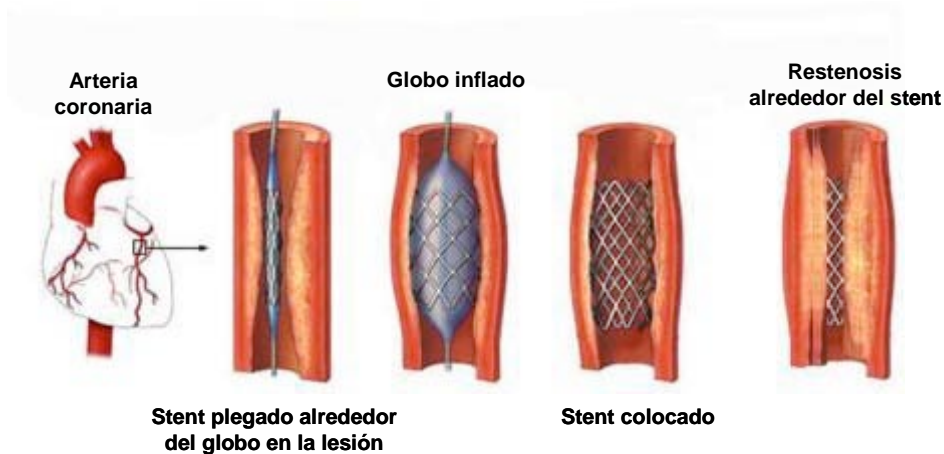


Imagen 10: Colocación de un stent en una arteria coronaria obstruida y restenosis alrededor de dicho stent.

A pesar de todos los resultados obtenidos, existen limitaciones importantes en el uso e interpretación de los datos de los modelos animales. Se utilizan conejos porque desarrollan fácilmente lesiones ateroscleróticas, pero tienen claras diferencias de las humanas. Las arterias de las ratas son morfológicamente diferentes de las de los humanos, ya que no presentan vasa vasorum, con lo que los datos más cercanos a los observados en los humanos son los obtenidos en el cerdo y en modelos de primate (Badimon, J.J. et al. 1998).

5. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

El principal tratamiento farmacológico para los desórdenes vasculares descritos anteriormente se basa en la administración de antihiperlipidémicos, antiagregantes y/o anticoagulantes. Pocos estudios se han centrado en la investigación de tratamientos que actúen sobre el componente celular, inhibiendo la proliferación de las células musculares lisas, factor de gran importancia en el progreso tanto de la aterosclerosis como de la restenosis. Desde este punto de vista, y con las investigaciones realizadas, serían buenos candidatos en el tratamiento de estas enfermedades los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs). Estos compuestos corresponden a un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos con efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético, que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Los antiinflamatorios naturales, segregados por el propio organismo, son derivados de los corticoides, sustancias de origen esteroideo.

Los primeros indicios de su utilización se remontan a mediados del S. XVIII, cuando en 1761 el reverendo Edmund Stone escribió a la Real Sociedad de Medicina Inglesa ciertos informes, acerca de las observaciones tomadas en pacientes febriles tratados con pociones de corteza de sauce. En 1829, Leroux fue capaz de aislar por primera vez en forma pura el ingrediente activo de la corteza del tronco de sauce, un glucósido amargo con propiedades antipiréticas al que llamó salicina. Pocos años más tarde, en 1859, H. Kolbe obtuvo ácido salicílico a partir de la síntesis química de la salicina. Este compuesto presentaba algunos inconvenientes, como su excesivo sabor amargo e irritación intestinal. Entre 1893 y 1897, el químico alemán Félix Hoffmann, de la compañía Bayer, sintetizó ácido acetilsalicílico a partir de ácido salicílico, siendo comercializado con el nombre de aspirina e iniciándose con este producto una nueva etapa en la farmacología. Ya en el siglo XX, desde los años 50 empezaron a desarrollarse una serie de nuevos fármacos con efectos similares, a los que denominaron antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Entre estos AINES, algunos de los más destacados, por su utilización en clínica además de la aspirina son: ibuprofeno, indometacina, flurbiprofeno, sulindac, etc. Se clasifican según diferentes parámetros, entre los que destacan su estructura molecular, dividiéndose en:

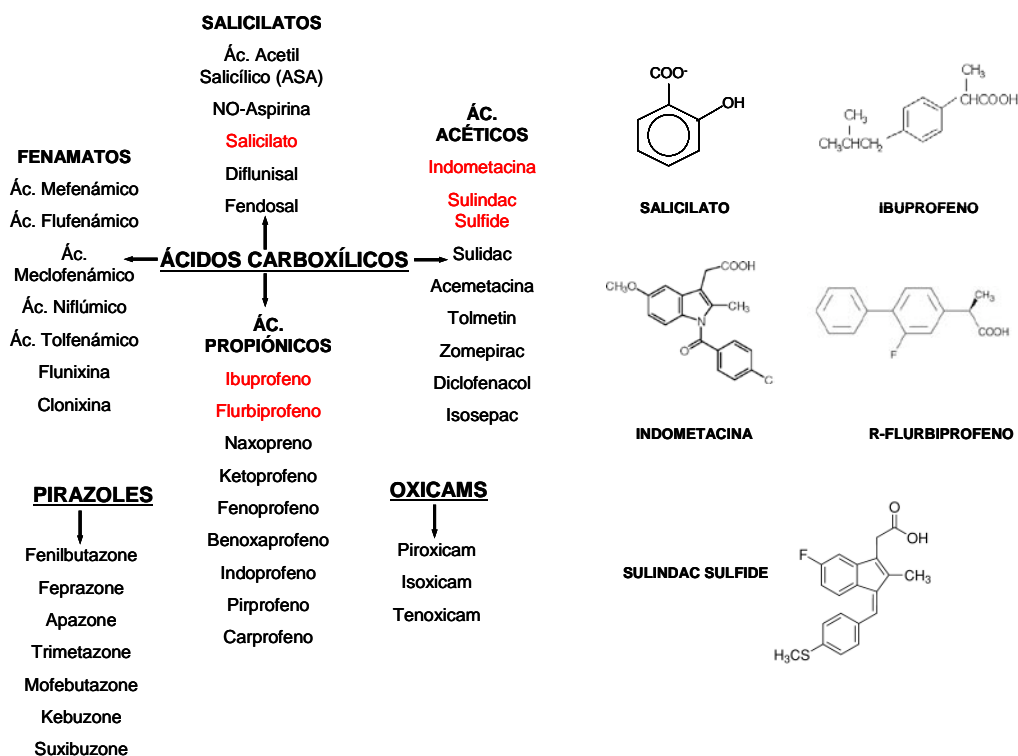


Figura 11: Clasificación de los principales anti-inflamatorios no esteroideos en función de su estructura molecular. En rojo se indican los AINES utilizados en este trabajo, mostrándose sus estructuras moleculares a la derecha (Adaptado de Taketo, 1998).

En el año 1971, el farmacólogo John Robert Vane (Vane, J.R. 1971) describió el efecto inhibitorio de la aspirina en la síntesis de prostaglandinas, al acetilar e inhibir irreversiblemente la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) Por este trabajo recibió el premio Nobel en Medicina en 1982, poniéndose a su vez de manifiesto la importancia de la enzima COX en los procesos inflamatorios. Esta enzima cataliza la conversión de ácido araquidónico (AA) a tromboxanos y prostaglandinas. Se conocen desde la década de los años noventa la existencia de dos isoformas de la COX: la isoforma constitutiva COX-1 y, la isoforma inducible COX-2, que se induce típicamente por el lipopolisacárido bacteriano (LPS), citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α).

El ácido acetilsalicílico (aspirina) acetila la Serina 530 (Ser-530) tanto de la enzima COX-1 como de la COX-2, inhibiendo de esta forma la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Parece ser, que los efectos nocivos producidos por aspirina y otros AINEs a nivel del aparato digestivo son debidos a la inhibición de COX-1, ya que participa en la regeneración de la mucosa y la agregación plaquetaria. Por el contrario, la inhibición de la isoforma COX-2 conlleva a la acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética de estos compuestos, lo que llevó al desarrollo de inhibidores específicos de la isoforma 2, llamados COXIBs. Estos fármacos mantienen los efectos anti-inflamatorios sin producir daño gastrointestinal. Entre todos ellos destacamos el celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, lumiracoxib y valdecoxib, con los que se han realizado diversos estudios clínicos. Sin embargo, el uso de alguno de estos compuestos a largo plazo incrementa el riesgo cardiovascular (Paramo, J.A. et al. 2005).

Diversos estudios indican que el consumo regular de aspirina está asociado con un menor riesgo de sufrir infarto de miocardio, al inhibirse las ciclooxigenasas plaquetarias y por consiguiente disminuir el riesgo de formación de trombos. Además, se conoce desde hace algunos años que algunos AINES no específicos tienen efectos antiinflamatorios y antiproliferativos independientes de la actividad COX (Tegeder, I. et al. 2001). Las primeras evidencias de que el salicilato y otros AINEs tenían efectos antiproliferativos independientes de las plaquetas, fueron descritos en 1983 por Waddell y colaboradores. Estos investigadores administraron sulindac a pacientes con síndrome de Gardner, observando tras el tratamiento una disminución de los pólipos presentes en el colon, típicos de esta enfermedad (Waddell, W.R. y Loughry, R.W. 1983). Desde entonces se ha estudiado mucho los efectos de los salicilatos en el crecimiento de células tumorales, demostrándose que la

administración de aspirina y salicilato en dosis comprendidas entre 0.5 y 10 mM inhibe el crecimiento celular, la síntesis proteica y el paso de la fase G1 a fase S en el ciclo celular en un gran número de tipos celulares.

En 1994, los investigadores Koop y Ghosh describieron un nuevo mecanismo de acción para el salicilato y la aspirina, la inhibición del factor nuclear de transcripción NF- κ B (Kopp, E. y Ghosh, S. 1994). Este factor es muy importante en la regulación de genes implicados en la inflamación, diferenciación y crecimiento celular. Normalmente se encuentra inactivo en el citoplasma unido a la subunidad I κ B. La kinasa IKK fosforila a la subunidad I κ B permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo donde realiza su función de regulación génica. La aspirina actuaría a nivel de la kinasa IKK, inhibiendo su actividad (Baeuerle, P.A. y Baltimore, D. 1996).

Este factor NF- κ B tiene un papel muy importante en la proliferación de células de músculo liso vascular, viéndose aumentada su actividad en lesiones ateroscleróticas humanas (Brand, K. et al. 1996) y en arterias de rata tras la lesión producida por el balón del catéter de la angioplastia (Landry, D.B. et al. 1997). Sin embargo, si se trataban a las ratas con altas dosis de aspirina no se activaba el factor NF- κ B, inhibiéndose la proliferación de las VSMCs, y por consiguiente disminuyendo el espesor de la neointima formada tras el daño por el balón.

Está bien establecido que la proliferación de la neointima se produce 2-3 semanas después del daño arterial, al igual que la formación del resto de la placa sobre la matriz extracelular en expansión. Esta observación sugiere, que durante este periodo, un tratamiento con altas dosis de salicilato podría evitar el estrechamiento del lumen arterial, producido por la excesiva proliferación. De hecho, estudios realizados en animales apoyan esta conclusión (Cerxıcek et al, 1997).

En el año 2001, Napoli y colaboradores desarrollaron un nuevo compuesto, un derivado éster-nitrato de la aspirina conocido como NCX-4016, con beneficiosos efectos en restenosis e hipercolesterolemia en ratones. El NCX-4026, era un 25% más efectivo en prevenir restenosis que altas dosis de aspirina, utilizado a dosis un 40% más bajas que ésta (Napoli, C. et al. 2001).

Otro AINE muy estudiado en el ámbito vascular ha sido el sulindac. Posee una importante capacidad inhibitoria en la formación de la neointima, inhibiendo la proliferación y migración de las SMCs tras un daño arterial. Parece

ser que esta actividad podría ser independiente de COX, pudiendo estar implicados otros mecanismos moleculares como la fosfodiesterasa-5 dependiente de cGMP, Ras, o un aumento en la formación intracelular de ceramida, un importante inductor de apoptosis. El sulindac también puede actuar a nivel de otros tipos celulares importantes en las patologías vasculares como son los macrófagos o las células endoteliales. Como resultados importantes de los estudios realizados en restenosis, cabe destacar los bajos niveles plasmáticos de sulindac necesarios para ser eficiente, y la ausencia de toxicidad del compuesto, ya que son tratamientos a corto plazo en relación a la administración crónica necesaria para otro tipo de afecciones (Reis, E.D. et al. 2000).

II.OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis ha sido el estudio del papel de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en la proliferación de las células de músculo liso vascular y en el posible efecto antiproliferativo de anti-inflamatorios no esteroideos. Para alcanzar este objetivo, nos hemos planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- A. Caracterizar la entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE), su control por la mitocondria y su papel en la proliferación en las células A10 de músculo liso vascular de aorta de rata embrionaria.
- B. Determinar los efectos antiproliferativos de salicilato y otros anti-inflamatorios no esteroideos en las células A10, y estudiar si éstos son debidos a la inhibición de la entrada capacitativa.
- C. Determinar si los AINEs inhiben la entrada capacitativa de Ca^{2+} directamente o a través de un mecanismo indirecto mediado por la mitocondria.
- D. Caracterizar las vías de entrada de Ca^{2+} y su papel en la proliferación de células de músculo liso vascular de arteria coronaria humana.
- E. Caracterizar si se producen cambios fenotípico-funcionales desde un fenotipo proliferativo a otro no proliferativo en el cultivo primario de células de músculo liso de arteria coronaria humana, y si éstos están relacionados con la remodelación de las vías de entrada de Ca^{2+} .
- F. Estudiar los efectos antiproliferativos de los anti-inflamatorios no esteroideos y su mecanismo de acción en las células de músculo liso de arteria coronaria humana.

III. MATERIAL y MÉTODOS

A. MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. CULTIVOS CELULARES

La **línea celular A10** está formada por células de músculo liso de aorta torácica embrionaria de rata. Estas células se mantienen en medio DMEM suplementado con suero, antibióticos y glutamina (ver medios de cultivo) en un incubador a 37 °C y con una atmósfera con un 10% de CO₂. El tiempo de duplicación de las células A10 está en torno a las 96 horas, unos 4 días aproximadamente, por lo que se realiza el subcultivo una vez por semana. Para ello, se retira el medio de cultivo y las células son lavadas con un volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X (Ph=7,4) suficiente para cubrir el fondo del frasco (~ 2-3 ml para frascos de 25 cm² y 4-5 ml para frascos de 75 cm²). A continuación se incuban las células con una solución que contiene tripsina/EDTA (1ml si es un frasco de 25 cm² y 3 ml si es de 75 cm²) durante 1 min a 37 °C, hasta que las células comienzan a redondearse y la mayoría empiezan a despegarse del fondo del frasco, momento en el que la solución de tripsina/EDTA se neutraliza con medio de cultivo completo (3 ml si es frasco de 25 cm² y 5 ml si es frasco de 75 cm²). Toda la suspensión celular es transferida entonces a un tubo de centrifuga de 11 ml estéril y ésta es centrifugada durante 4 min a 200 g. Finalmente se aspira el sobrenadante y el sedimento ("pellet") se resuspende en medio de cultivo antes de su siembra en diferentes frascos de cultivo.

Las **células RBL-2H3** son una línea celular de leucemia basofílica de rata Wistar aislada y clonada en 1978. Su mantenimiento en cultivo se realiza con el medio α -MEM suplementado con suero, antibióticos y glutamina (ver medios de cultivo) en un incubador a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂. Se dividen cada 50-60 horas aproximadamente, por lo que se suelen subcultivar cada 2-3 días.

Las **células de músculo liso de arteria coronaria humana** son un cultivo primario procedente de un donante, varón blanco de 21 años sin patologías conocidas. Su mantenimiento es similar al de la línea celular A10 salvo con pequeñas diferencias. En primer lugar, las células coronarias humanas se cultivan en medio SmBulletKit (ver medios de cultivo). El incubador celular debe tener una atmósfera al 5% de CO₂ ya que dicho medio contiene menos bicarbonato. El tiempo de duplicación de las células coronarias es un

poco más corto, aproximadamente 3 días. Finalmente, la tripsina/EDTA actúa rápidamente, en tan solo 30 s y las células son extraordinariamente delicadas, por lo que su manipulación debe ser muy cuidadosa.

2. MEDIDAS DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO

2.1. IMAGEN DE FLUORESCENCIA DE Ca^{2+} CITOSÓLICO

El estudio de los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) a nivel de célula única se realizó mediante un equipo de microscopía de fluorescencia utilizando el colorante fluorescente fura-2/AM, un derivado acetoximetil éster de la molécula fura-2, un quelante de Ca^{2+} unido a un resto fluorescente (Grynkiewicz, G. et al. 1985), cuyo espectro de excitación cambia notablemente con la concentración de Ca^{2+} . Una vez en el interior celular, el derivado fura-2/AM se de-esterifica por esterasas intracelulares, liberándose la molécula fura-2 en su forma de ácido libre y quedando retenida en el citosol por su carga e incapacidad de permear la membrana celular. La unión entre el Ca^{2+} y el colorante tiene una estequiometría 1:1. Dicha unión aumenta la emisión de fluorescencia excitada a longitudes de onda de 340 nm y disminuye a 380 nm. El colorante es sensible en el rango aproximado de concentraciones de Ca^{2+} entre 20 nM y 2 μM , un rango de interés fisiológico. El registro de la emisión de fluorescencia en tiempo real permite la monitorización continua, en células vivas, de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ estimada a partir del cociente de las fluorescencias de excitación a 340 y a 380 nm. Este método basado en excitar a dos longitudes de onda diferentes, permite que las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ sean independientes de la cantidad de colorante acumulado en el interior celular, y eliminar además muchos artefactos que habitualmente afectan de forma similar a las fluorescencias correspondientes a cada longitud de onda quedando compensados al calcular el cociente de ambas.

Para los experimentos de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} citosólico, las células se sembraron sobre cubreobjetos esterilizados de cristal de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml) a una densidad de 5.000-7.000 células/60 μl . Una vez adheridas, aproximadamente a las 24 h, las células se incubaron con fura-2/AM 4 μM durante 60-90 min a T^{a} ambiente. La incubación se realizó en Medio Externo Completo (MEC) de la siguiente composición (en mM): NaCl 145; KCl 5; CaCl_2 1; MgCl_2 1; Glucosa 10; HEPES/NaOH 10; (Ph=7,42).

Después de la carga con fura-2, los cubreobjetos con las células adheridas se colocaron sobre una cámara de perfusión que se fija a la platina de un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert S100TV). Las células fueron constantemente \square utsider \square a \square con MEC utilizando un sistema de perfusión de electroválvulas Warner. El medio de perfusión era continuamente mantenido a 37 °C gracias a un sistema de calentamiento de tubos de perfusión también de Warner. Las células fueron epiluminadas alternativamente con luz monocromática de excitación a 340 y 380 nm gracias a una rueda de filtros de excitación (Sutter Instruments, Novato, CA, EE.UU.). La fluorescencia emitida a longitudes de onda mayores de 520 nm es recogida a través de un objetivo de inmersión en aceite 40X (AN 1.3) y era capturada mediante una cámara digital ORCAER de Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, Japón).

Para las medidas de entrada capacitativa de Ca^{2+} las células se trataron previamente durante 10 min con tapsigargina (1 μM), un inhibidor de la bomba de Ca^{2+} del RE (SERCA) en medio externo nominalmente libre de Ca^{2+} (EGTA 0,5 Mm) para \square utsider o vaciar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Una vez \square utsider \square a los depósitos, las células fueron \square utsider \square a \square en medio libre de Ca^{2+} mientras se monitorizaba el cociente de fluorescencias excitadas a 340 y 380 nm, respectivamente. Para inducir la entrada capacitativa de Ca^{2+} , las células se \square utsider \square a \square n con medio que contenía elevada [Ca^{2+}] (1 Mm). El incremento de la razón de fluorescencias es una medida indirecta de la entrada capacitativa. Un segundo pulso de Ca^{2+} induce un incremento similar del cociente de fluorescencias. Esta propiedad puede ser aprovechada para investigar los efectos de antagonistas de la entrada de Ca^{2+} . En estos casos, una vez registrado un primer incremento del cociente de fluorescencias, las células son \square utsider \square a \square durante un tiempo con el antagonista en medio libre de Ca^{2+} . Tras ello, se perfunde las células con medio con Ca^{2+} en presencia del antagonista. La disminución del incremento del cociente de fluorescencias en el segundo pulso (en presencia del antagonista) respecto del primero (en ausencia del antagonista) permitirá estimar el porcentaje de inhibición del antagonista.

Para el estudio de la entrada de Ca^{2+} operada por voltaje, se indujo la despolarización de la membrana plasmática con medio externo con un contenido elevado de K^+ (75 Mm en el caso de las células A10 y 145 Mm para las células coronarias). El exceso de K^+ fue siempre acompañado de una disminución equivalente de Na^+ para mantener la osmolaridad de la solución

constante. Como en el caso anterior, el incremento del cociente de fluorescencias inducido por despolarización es bastante reproducible, por lo que se puede investigar el efecto de antagonistas y comparar los efectos de un antagonista sobre un segundo pulso despolarizante en relación con un primer pulso despolarizante en ausencia de antagonista.

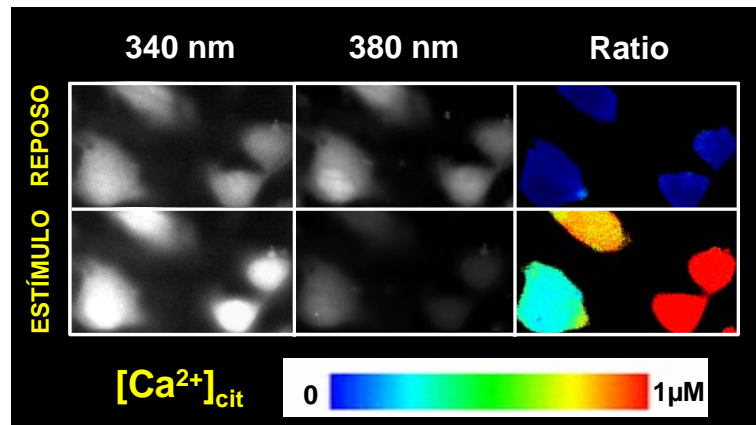


Figura 12: Imágenes de fluorescencia de 3 células A10 excitadas a 340 y 380 nm, y del cociente F340/F380 codificado en pseudocolor en situación de reposo y tras la aplicación de un estímulo. Obsérvese que la estimulación aumenta la fluorescencia excitada a 340 nm y disminuye la emisión de fluorescencia excitada a 380 nm. La escala de pseudocolor bajo las imágenes, muestra el código de colores para el Ratio F340/F380 representándose 0 como azul y 1 como rojo.

2.2 IMAGEN DE BIOLUMINISCENCIA DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Para monitorizar los niveles de la $[Ca^{2+}]$ en orgánulos intracelulares utilizamos sondas de Ca^{2+} basadas en proteínas susceptibles de ser dirigidas específicamente al orgánulo a estudiar, en nuestro caso la mitocondria, por lo que hemos empleado la proteína aecuorina (AEQ) dirigida a mitocondria. La AEQ es una fotoproteína procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que emite luz azul en presencia de Ca^{2+} sin necesidad de ser iluminada (Bioluminiscencia). Esta proteína presenta tres dominios de unión a Ca^{2+} (Shimomura, O. et al. 1962; Shimomura, O. 1995). La luz emitida por la AEQ como resultado de su unión a Ca^{2+} tiene lugar una vez reconstituída la proteína en su forma activa. Durante la reconstitución, la apoaeuorina expresada en las células, se une mediante ataque peroxidativo a su cofactor la celenterazina. La celenterazina es muy lipofílica, por lo que atraviesa las membranas celulares con facilidad (Blinks, J.R. et al. 1976). La AEQ una vez reconstituída es capaz de emitir luz azul en el rango visible ($\lambda_{m\acute{a}x} = 465$ nm) en función de la $[Ca^{2+}]$ sin necesidad de ser iluminada, por lo que la bioluminiscencia emitida es función de la concentración de dicho ión. En este proceso, se genera un producto intramolecular formado por el complejo apoaeuorina, celenteramida y CO_2 (Fig. 13).

Una vez oxidada la celenterazina a celenteramida, la unión de la apoaeuorina a una nueva molécula de celenterazina es lenta, pudiéndose considerar el proceso esencialmente irreversible. De este modo, la cantidad de proteína disponible para la medida de Ca^{2+} disminuye progresivamente a lo largo de cada experimento, siendo la velocidad relativa de consumo proporcional a la concentración de Ca^{2+} en el entorno, en este caso, la mitocondria.

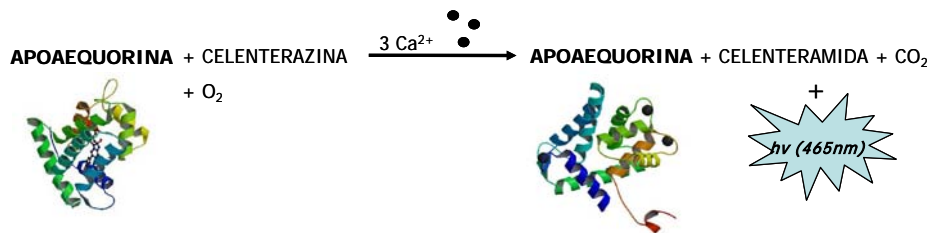


Figura 13: Reacción bioluminiscente de la aeuorina. La apoaeuorina es reconstituída en aeuorina original por incubación con celenterazina. En presencia de O₂, los iones de Ca²⁺ se unen a la aeuorina reconstituida provocando la oxidación de celenterazina a celenteramida, a la vez que se genera CO₂ y se emite luz azul ($\lambda=465\text{nm}$).

Para transformar los datos de luminiscencia en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$, es necesario conocer la cantidad total de luminiscencia que es emitida por la AEQ en cada experimento, por lo que al final de cada uno de ellos, las células son $\square_{\text{utsider}}\square_{\text{a}}$ con la solución estándar conteniendo 100 μM del detergente $\square_{\text{utsider}}\square_{\text{a}}$ para permeabilizar la membrana plasmática en presencia de una solución con un gran exceso (10 Mm) de CaCl_2 , que permite la saturación del remanente de AEQ y la emisión de toda la luminiscencia residual de la AEQ.

A continuación, un programa informático substraer el fondo ("background") de los valores de luminiscencia en cada punto. Para el cálculo de la $[\text{Ca}^{2+}]$ se utilizó el método descrito por Brini (Brini, M. et al. 1995), basado en la relación existente entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ y la proporción de luz (L) medida en cuentas por segundo (cps) registradas en un momento dado del experimento menos el fondo, frente a las que se registrarían si toda la AEQ de la células se expusiera de repente a una $[\text{Ca}^{2+}]$ saturante ($L_{\text{máx}}$). Por eso, al final de cada experimento es necesario $\square_{\text{utsider}}\square_{\text{a}}$ las células con un exceso de Ca^{2+} (10 Mm) en un medio que contiene el detergente $\square_{\text{utsider}}\square_{\text{a}}$ (100 μM) para medir la emisión de luz por liberación de todos los fotones residuales.

Para transformar los valores del cociente $L/L_{\text{máx}}$ en valores de Ca^{2+} se utiliza el siguiente algoritmo matemático:

$$[\text{Ca}^{2+}]_m = [(L/L_{\text{máx}})^{1/n} + (L/L_{\text{máx}})^{1/n} K_{\text{TR}} - 1] / [K_{\text{R}} - (L/L_{\text{máx}})^{1/n} K_{\text{R}}];$$

Donde:

- K_{TR} : es la proporción de sitios en estado T frente al estado R. Cada uno de los sitios de unión al Ca^{2+} de la AEQ presenta estos dos estados: T y R. La emisión de bioluminiscencia se produce cuando todos los sitios de unión se encuentran en estado R, al cual se une el Ca^{2+}

- K_{R} : es la constante de asociación a Ca^{2+}

- n : es el número de sitios de unión a Ca^{2+}

- λ : es la constante de velocidad de consumo de AEQ a la $[\text{Ca}^{2+}]$ saturante

Tanto este algoritmo matemático, como los parámetros (K_{TR} , K_{R} , n y λ) derivan de un modelo matemático propuesto originalmente para explicar, desde un punto de vista molecular, la dependencia de la luminiscencia de la AEQ con la $[\text{Ca}^{2+}]$, aunque se puede utilizar como una simple transformación matemática independiente del modelo (Allen, D.G. et al. 1977).

Por otra parte, la expresión de la AEQ dirigida a mitocondria en células de músculo liso vascular requiere la transfección de dichas células. Este tipo celular presenta muy baja incidencia de transfección. Tras diferentes ensayos con diversos métodos, se concluyó que la nucleofección era el método más eficaz. El plásmido utilizado para la transfección celular contiene la proteína AEQ dirigida a mitocondria unida a la proteína fluorescente GFP (GFP-AEQmit) (Baubet, V. et al. 2000; Rogers, K.L. et al. 2005). La finalidad de utilizar un plásmido que contenga la proteína GFP es múltiple. No sólo permite identificar en el microscopio de fluorescencia las células transfectadas, y así facilitar la elección de un campo microscópico adecuado en el que se realizará el

experimento de medida de Ca^{2+} a nivel de célula única, sino que aumenta la emisión de bioluminiscencia respecto a la proteína sin GFP. Para realizar la transfección, las células se resuspenden en la solución de nucleofección junto con el ADN (~ 4 μg) en un volumen final de 100 μl y se colocan en la cubeta correspondiente para insertar en un equipo Nucleofector® de Amaxa Biosystems (Gaithersburg, MD, EE.UU), donde se selecciona el programa adecuado de nucleofección según el tipo celular. Una vez nucleofectadas las células, se añaden 900 μl de medio de cultivo completo a la cubeta y se dejan reposar durante 30 min a T^a ambiente. Transcurrido este tiempo, las células se siembran mediante la adición de una suspensión celular del tamaño de una gota sobre cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina, a una densidad aproximada de 12×10^3 células/cristal. Tras ello, se dejan las células reposar durante al menos 1 h en el incubador con el fin de que se adhieran bien al cubreobjetos. Por último añadimos 500 μl de medio de cultivo completo a cada pocillo y transcurridas aproximadamente 24 h las células están listas para ser utilizadas.

Antes de comenzar los experimentos, las células se incubaron en oscuridad durante 2 h en medio externo (MEC) suplementado con 4 μM de celenterazina "h" a T^a ambiente para la reconstitución de la enzima. Una vez reconstituída la proteína (AEQ), los cubreobjetos con las células se colocaron en la cámara termostaticada a 37 °C de un microscopio invertido (Zeiss Axiovert S100 TV). Las células se \square utsider \square a \square n continuamente con medio estándar precalentado a 37 °C en presencia de los estímulos correspondientes.

Para el estudio de los efectos de la entrada capacitativa de Ca^{2+} sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$, las células fueron tratadas previamente con tapsigargina (1 μM , 10 min) en medio nominalmente libre de Ca^{2+} (+EGTA 0,5 Mm) y se indujo la entrada de Ca^{2+} por perfusión con MEC (conteniendo 1 Mm de CaCl_2). Los efectos de la activación de la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje (VOCE) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ se monitorizaron tras inducir la despolarización de la membrana plasmática con un medio que contenía elevada $[\text{K}^+]$ (75 ó 145 Mm) ,de un modo similar al descrito anteriormente, para monitorizar los efectos de la entrada capacitativa de calcio al citosol.

En los experimentos con células permeabilizadas, las células se \square utsider \square a \square n en primer lugar con 20 μM de \square utsider \square a en medio interno durante 30 s. A continuación, las células se incubaron con ese mismo medio interno

conteniendo bajas concentraciones de Ca^{2+} (200 Nm) en presencia o ausencia de los diferentes AINEs durante 5 min, antes de pasar al medio que contenía 10 μM de Ca^{2+} (con o sin AINEs) durante 1 min.

Los medios con bajas $[\text{Ca}^{2+}]$ se prepararon con diferentes cantidades de CaCl_2 y los tampones de Ca^{2+} H-EDTA y tris-EGTA, según el programa informático MaxQuelator (Chris Patton, Universidad de Stanford).

Todos los experimentos de aequorina finalizaron con la perfusión de medio (externo o interno, según si son células permeabilizadas o no) con 100 μM de Ca^{2+} y 10 Mm de Ca^{2+} para que se liberasen todos los fotones restantes y así hacer una correcta cuantificación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$.

La bioluminiscencia emitida se capturó con una cámara de imagen de fotones Hamamatsu acoplada a un procesador Argus-20 también de Hamamatsu. La emisión de fotones se integraba en periodos de 10 s. A su vez, estos fotones emitidos por cada célula en cada imagen fueron cuantificados utilizando el software Aquacosmos 2.6 de Hamamatsu.

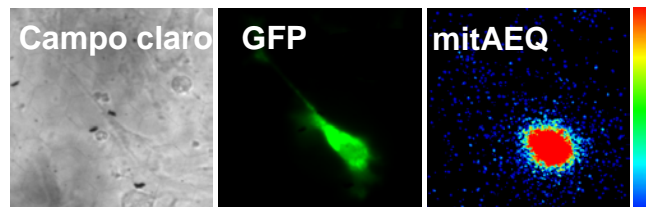


Figura 14: Célula transfectada con GFP-AEQmit y fotones emitidos como consecuencia de la unión del Ca^{2+} a la aequorina mitocondrial.

Para la amplificación del plásmido GFP-AEQmit, los stocks de bacterias *E.coli* (XL Blue) transformadas con el plásmido GFP-AEQmit se encuentran congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este plásmido contiene también el gen de resistencia a la ampicilina, que permite seleccionar a las bacterias transformadas, pues al colocar en el medio de cultivo ampicilina crecerán únicamente las bacterias resistentes a dicho antibiótico. El procedimiento debe realizarse en condiciones de esterilidad, por lo que se debe llevar a cabo lo más próximo a la llama del mechero encendido en la poyata del laboratorio. En primer lugar se deja atemperar el medio LB-Broth autoclavado y guardado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se enciende el mechero Bunsen. Tras descongelar en hielo la ampicilina y los stocks de bacterias, se abre y deja cerca de la llama el tubo de crecimiento de bacterias

estéril (tubo de fondo redondo de polipropileno). Se añade en cada tubo en el que queremos crecer bacterias 3 ml de LB-Broth + 3 µl Ampicilina ($[I]_F = 50 \mu\text{g/ml}$) + 50 µl de bacterias (abierto el criotubo cerca de la llama). A continuación se agitan los tubos en un agitador a 250 rpm y 37 °C. Tras 5 o 6 h, se retiran los tubos del agitador y se observa si el líquido está turbio, indicando así que las bacterias han crecido adecuadamente. Tras encender de nuevo el mechero, se añaden a una serie de matraces autoclavados 100 ml de LB-Broth + 100 µl Ampicilina ($[I]_F = 50 \mu\text{g/ml}$) y se vierten los 3 ml de LB-Broth turbio donde han crecido las bacterias sobre los 100 ml de LB-Broth nuevos del matraz. Se colocan los matraces en el agitador a 250 rpm y 37 °C durante toda la noche (máximo 16 h). Trascorrido este tiempo se retiran los matraces de la agitación y se comprueba la turbidez de la suspensión. Finalmente se aísla el plásmido de las bacterias mediante una MAXIPREP siguiendo el protocolo que nos indica la casa comercial de QIAGEN.

3. PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

Para el estudio de proliferación celular en células A10, y en células de músculo liso de arteria coronaria humana, se sembraron las células en placas de 6 pocillos (NUNC) a una densidad de aproximadamente 10.000 células/pocillo, con un volumen final en el pocillo de 3 ml, y se incubaron con las diferentes soluciones de estudio durante 15 días para las células A10, y 10 días en el caso de las células coronarias.

Las soluciones de estudio fueron medio de cultivo completo (situación control), o medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de salicilato (100, 500, 2000 µM) y otros AINEs como Indometacina, R-Flurbiprofeno y Sulfuro de Sulindac, todos ellos a una concentración de 100 µM. El recuento celular se realizó mediante una cámara de contaje celular Neubauer y un microscopio de campo claro. El número de células se cuantificó a las 24 h de la siembra (día 1) y los días 10 ó 15 de cada experimento. La muerte celular fue estimada mediante el método de exclusión con azul de tripano 0,4 % en solución de NaCl al 0,9 % con una dilución 1:1.

4. MIGRACIÓN CELULAR

Los experimentos para estudiar la migración de las células de músculo liso de arteria coronaria humana se realizaron mediante un equipo de registro de impedancia xCELLigence de Roche (Barcelona, España), el cual consta básicamente de dos componentes: una estación de trabajo donde se insertan las placas de cultivo con las células, colocada en un incubador a 37 °C y conectada a un ordenador donde se analizan mediante un programa informático los datos obtenidos del experimento. La estimación de la migración celular se basa en la lectura del valor de impedancia para cuantificar no invasivamente el estado celular en tiempo real. Para ello las células se cultivan en una placa especial (CIM-Plate 16) que tiene integrados unos microelectrodos en el fondo de cada pocillo. La aplicación de un pequeño voltaje (20 Mv) genera un entorno iónico dentro del pocillo de la placa que es un reflejo del número de células que hay en su interior, de la morfología de las mismas, y de su adherencia celular. El aumento del valor de este parámetro está relacionado con la migración (corto plazo) y proliferación (largo plazo) celulares. A tiempos cortos (<10 h), los cambios en la impedancia se deben fundamentalmente a la migración celular.

El número de células sembradas en cada pocillo debe ser igual (aproximadamente 30.000 células), cambiando únicamente de un pocillo a otro el medio de cultivo, siendo éste, medio de cultivo completo, en el caso de los pocillos controles, y medio de cultivo con el correspondiente tratamiento en el caso de los pocillos estudio, para saber cómo afectan los diferentes compuestos en la migración celular. En nuestro caso, los tratamientos aplicados fueron:

- Medio de cultivo esencialmente libre de Ca^{2+} (EGTA 2 Mm).
- Medio de cultivo con salicilato 500 Mm o indometacina 100 Mm.
- Medio de cultivo con 2-APB (10 μM), un antagonista de la entrada capacitativa de calcio.

Las concentraciones elegidas para los tratamientos estudiados fueron las mismas concentraciones utilizadas en el estudio de los efectos de estos fármacos sobre la proliferación celular y la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las mismas células.



Figura 15: Equipo y placa de cultivo para el estudio de la migración celular mediante xCELLigence

5. ESTUDIO DEL POTENCIAL MITOCONDRIAL

La estimación del potencial mitocondrial en células intactas se llevó a cabo mediante imagen de fluorescencia en células cargadas con una sonda fluorescente, TMRM (éster metílico de la tetrametil rodamina), que se acumula en las mitocondrias de acuerdo al potencial negativo de éstas con respecto al citosol (Nunez, L. et al. 2006; Valero, R.A. et al. 2008). Cuando se produce una despolarización mitocondrial ello induce la salida del colorante y por tanto la disminución de la fluorescencia de las sondas acumuladas en las mitocondrias. Para las medidas, las células se incubaron con TMRM (100 Nm) durante 30 min a T^a ambiente, tras los cuales el cubreobjetos con las células se colocó en la cámara de perfusión de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100 TV. Las células se utsider a n continuamente con MEC precalentado a 37 °C. El flujo de la perfusión es de aproximadamente 5 ml/min y el tiempo de intercambio de unos pocos segundos. Las imágenes de fluorescencia se capturaron a intervalos de 10 s con una videocámara Hamamatsu OrcaER, acoplada al puerto lateral del microscopio. En todos los casos, los experimentos finalizaban con la adición del desacoplante mitocondrial FCCP (10 µM) durante 5 min, para medir la fluorescencia restante tras el colapso total del potencial mitocondrial. Este valor fue sustraído de todos los valores de fluorescencia, y éstos expresados como porcentaje de fluorescencia respecto a la emitida justo antes de la adición de la solución test.

6. MEDIDAS DE LOS NIVELES DE ATP CELULAR

Los niveles de ATP celular se cuantificaron por el método de la luciferina/luciferasa. En la reacción de bioluminiscencia luciferina/luciferasa en presencia de ATP, la enzima hidrofóbica luciferasa cataliza, en presencia de O₂ y de ATP, la oxigenación de la luciferina, para transformarla en un producto excitado que emite luz (Fig.16). En presencia de concentraciones saturantes de luciferina y luciferasa, la reacción únicamente depende de la concentración de ATP. Por lo tanto la luz emitida cuando se dispara la reacción con extractos de luciferina-luciferasa, es directamente proporcional a la concentración de ATP.



Figura 16: Reacción de oxidación de la luciferina. En presencia de Mg²⁺ y la enzima luciferasa, la luciferina es oxidada a oxiluciferina utilizando la energía química contenida en la molécula de ATP. Como resultado se genera AMP y se emite luz visible en cantidad proporcional a los niveles de ATP presentes.

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y cultivadas con medio de cultivo completo o con medio de cultivo completo y diferentes AINEs durante 3 días, periodo tras el cual las células fueron lavadas 2 veces con PBS a 37 °C, añadiéndose a cada pocillo 1 ml de una mezcla hirviendo de Tris (20 Mm) y EDTA (4 Mm) a Ph=7,75. Transcurridos 2 min, las muestras con los extractos celulares se sedimentaron por centrifugación a 10.000 g y 4 °C durante 5 min. Los sedimentos se resuspendieron en tampón añadiéndole 20 µl de extracto de colas de luciérnaga (Sigma), midiéndose a tiempo constante la emisión de bioluminiscencia mediante un luminómetro Cairn. Finalmente los niveles de ATP fueron cuantificados utilizando una curva de calibración fabricada con muestras preparadas con concentraciones conocidas de ATP.

7. EXTRACCIÓN DE ARN, RT-PCR y Qrt-PCR

La extracción de ARN total se realizó a partir de placas petri de cultivo celular (10 cm²) con células crecidas a confluencia. En el caso de la línea celular A10 se sembraron aproximadamente 1.5x10⁶ de células, y para las células

musculares de arteria coronaria humana se sembraron unas 3×10^5 células a pases bajos y 6×10^5 células cuando se trataba de células a pases altos. En ambos casos se utilizó el reactivo TRIZOL. El ARN total resultante se trató con ADNasa I para eliminar totalmente la posible contaminación por ADN. La calidad del ARN se comprobó mediante medidas de densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm, y electroforesis en geles de agarosa. A partir de 2 µg de ARN total se obtuvo ADN complementario mediante la enzima transcriptasa inversa (MultiScribe Reverse Transcriptase). Se mezclaron 10 µl de mezcla maestra (*Master Mix*) que contenía H₂O libre de DNasa 3,2 µl; 10X Tampón de PCR 2 µl; 10X cebadores aleatorios (random primers) 2 µl; mezcla dNTPs 0,8 µl; enzima 1 µl (inhibidor de ARNasa) por cada 10 µl de ARN total y se aplicó la siguiente secuencia en el termociclador: 25 °C (10min), 37 °C (120 min), 85 °C (5s) y 4 °C (infinito).

Los cebadores (primers) para los genes Stim1 y Orai1 se diseñaron mediante el programa informático PRIMER 3, siendo éstos los siguientes:

Stim1: Forward 5'-TAA CTG GAC CGT GGA TGA GG-3'
Reverse 3'-GTC CAC TAA CAC CGC TCA G-5'

Orai1 : Forward 5'-TGG TAG CGA TGG TGG AAG TC-3'
Reverse 3'-TGC CTC AAC TCC AAC ACC TG-5'

Los primers fueron sintetizados por VWR International Eurolab (Barcelona, España).

Las condiciones utilizadas para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 25-30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 60 s, anillamiento a 60 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 30 s, finalizando con una extensión a 72 °C durante 10 min.

La identificación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando bromuro de etidio como marcador de los ácidos nucleicos amplificados.

La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo a partir del ADN complementario obtenido de las células de músculo liso de arteria coronaria humana y el equipo

PCR en tiempo real "LightCycler 480" de Roche. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l, 1 μ l de muestra y 19 μ l de mezcla maestra (*Master Mix*). La *Master Mix* contiene KAPA SYBR FAST Qpcr Kit (Kapa Biosystems); 0,3 μ M de cebador directo (primer forward); 0,3 μ M de cebador inverso (primer reverse) y agua de grado PCR. Las condiciones de esta amplificación fueron las siguientes:

	temperatura (°C)	tiempo (s)	n° ciclos
Pre-incubación	95	300	1
Amplificación	95	15	45
	60 ó 57 (*)	20	
	72	5	
Curva de Melting	95	5	1
	55	60	
	95	---	
Enfriamiento	40	10	1

(*) 60 °C para la β -ACTINA y CACNA1C y 57 °C para STIM1 y ORAI1.

La cuantificación del ADN es posible gracias al SYBR Green I contenido en KAPA SYBR FAST Qpcr Kit, un fluoróforo que al unirse al ADN de doble cadena aumenta considerablemente la emisión de fluorescencia. Así, a medida que avanza el proceso de amplificación durante la PCR cuantitativa aumenta la emisión de fluorescencia. El número de copias sintetizadas durante la reacción es directamente proporcional al ARNm de partida del gen diana y al ADNc obtenido a partir de éste. También, es indirectamente proporcional a la Ct, que se define como el número de ciclos de reacción necesarios para producir un aumento significativo de la fluorescencia respecto a la señal base. Para determinar que este aumento es significativo, el equipo establece un umbral de fluorescencia. Por tanto, cuanto mayor sea la expresión del gen diana, mayor será el número de copias amplificadas durante la PCR cuantitativa, así como la cantidad de fluorescencia emitida por el SYBR Green I, y menor, la Ct.

En este estudio realizamos una cuantificación relativa utilizando como control endógeno la β -actina, ya que su expresión en las células coronarias humanas según nuestros resultados previos no varía a pases bajos y altos. El control endógeno permite cuantificar la expresión del gen diana en el caso de que las concentraciones de ADNc de las muestras a comparar no sean exactamente las mismas. Para normalizar los valores de expresión de cada gen diana frente al control endógeno calculamos $2^{-\Delta Ct}$ para cada muestra donde $\Delta Ct = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$. De este modo, llevamos a cabo una cuantificación relativa frente al control endógeno. Si lo que queremos es la cuantificación relativa de cada gen objeto de estudio a pases altos respecto a pases bajos debemos hallar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{pases altos}} - \Delta Ct_{\text{pases bajos}}$.

Cuando se realiza una PCR cuantitativa utilizando SYBR Green I es necesario comprobar si las secuencias cebadoras (primers) se unen específicamente a las regiones deseadas del ADNc, dado que éste se une sin más al ADN de doble cadena. Para ello, el equipo LightCycler 480 nos permite llevar a cabo una curva de \square_{outside} para cada una de las muestras. Así, se representa la derivada de la fluorescencia respecto al tiempo con signo negativo a distintas temperaturas. Lo ideal es la obtención de un único pico de \square_{outside} , que sugiere la presencia de un solo amplicón. Por el contrario, si apareciera más de un pico en esta representación indicaría que los primers se unen a diferentes regiones del ADNc de forma no específica. En este último caso, deberíamos ajustar la temperatura de anillamiento de los primers o, si fuera necesario, incluso, diseñarlos de nuevo.

Para la realización de las RT-PCR cuantitativas los primers se obtuvieron de las siguientes referencias: Yoichiro Takahashi et al. 2007; Yoichiro Takahashi et al. 2007; Xi-Tao Wang et al. 2000.

hstim1: Forward 5' –AGGGTACTGAGAATGAGCGGA-3'
Reverse 3' –CACAGAGGATCTCGATCTGT-5'

horai1: Forward 5' –AGCAACGTGCACAATCTCAA-3'
Reverse 3' –GTCTTATGGCTAACCAGTGA-5'

hcacna1C: Forward 5' – TGAACAGCGACGGGACAGTCATG-3'
Reverse 3'- GAACGTGGCGTAGAACTTGCCAA-5'

h β -ACTINA: Forward 5'- TACGCCAACACAGTGCTGTCTGG-3'
Reverse 3'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-5'
(modificado)

También fueron sintetizados por VWR International Eurolab (Barcelona, España).

8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOTTING

La extracción de proteínas se llevó a cabo a partir de placas petri de cultivo celular (10 cm²), en las que se habían sembrado unas 100.000 células coronarias humanas, en el caso de células a pases bajos y 250.000 células, cuando se trataba de pases altos. Cada muestra presentaba células provenientes de seis placas. Para la obtención de éstas, se añadió a cada placa 3 ml de una solución que contenía RIPA, PESTATINA ($\mu\text{g/ml}$), PSMF ($\mu\text{l/ml}$) y un cóctel de inhibidores de proteasas. A continuación se levantaron las células pasando un rascador celular (*scraper*) por toda la superficie de la placa. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 2x a partes iguales y se calentaron a 100 °C antes de la electroforesis, para romper los puentes disulfuro y desnaturalizar las proteínas. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Bis/Acrilamida, Tris HCl Ph 8,9, 375 Mm, SDS 0,1%, APS 0,05% y TEMED). El gel destinado al estudio de la expresión de la subunidad $\alpha_1\text{c}$ de Ca_v1.2 contenía un 8% Bis/Acrilamida, ya que su peso molecular es 249 kDa. Sin embargo, el que se utilizó para STIM1 y ORA11 presentaba un 10% de Bis/Acrilamida, puesto que sus pesos moleculares son mucho menores (77 y 33 kDa, respectivamente). Cada gel se transfirió a una membrana de \square utsider \square a de polivinilideno (PVDF). Tanto para la electroforesis como para la transferencia se utilizó el sistema de Bio-Rad.

La membrana se incubó con una solución de bloqueo conteniendo 5% de leche en polvo desnatada diluida en solución de lavado TTBS (TBS-Tween20, 0,1%), durante una hora. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con TTBS a temperatura ambiente y, posteriormente, se incubó cada membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en agitación. A continuación lavamos de nuevo con TTBS e incubamos durante otra hora en agitación a T^a ambiente las membranas con un anticuerpo secundario conjugado con \square utsider \square a de rábano.

Las bandas de proteína de interés se pusieron de manifiesto con la mezcla de dos sustratos (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) mediante quimioluminiscencia y la detección de éstas se llevo a cabo en un equipo VersaDoc 4000 (BioRad). Las cantidades relativas de proteína fueron estimadas por densitometría de las bandas utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). La proteína β -actina fue utilizada como control de carga, normalizando los resultados de expresión de las proteínas estudiadas Cav 1.2 ($\alpha 1c$), STIM1 y ORAI1 respecto a ésta.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los Western Blot fueron:

Anticuerpo primarios	Tipo	Dilución
Conejo α -hCav1.2 ($\alpha 1c$)	Policlonal	1:200
Conejo α -hstim1	Policlonal	1:200
Conejo α -horai1	Policlonal	1:200
Ratón α - β actina	Monoclonal	1:5000

Anticuerpos secundarios	Tipo	Dilución
Cabra anti-conejo	Policlonal	1:1000
Conejo anti-ratón	Policlonal	1:10000

9. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: Técnica del “patch-clamp”

En un primer momento se denominó técnica de “fijación de voltaje” porque permitía controlar o fijar el potencial de membrana de una célula al voltaje deseado. El método inicialmente combinaba el uso de dos electrodos intracelulares. Uno de ellos medía el potencial de membrana y el otro inyectaba corriente en la célula. Un amplificador comparaba el potencial que se medía con el voltaje al cual se quería mantener la célula. El circuito introducía la corriente necesaria en la célula para llevar el potencial de membrana al nivel deseado. Esta corriente es exactamente igual (y de sentido contrario) a la cantidad de corriente que se mueve a través de la membrana de la célula. De esta manera, la técnica de fijación de voltaje, nos indica cómo el potencial de membrana influye en las corrientes iónicas a través de la membrana, e indirectamente

como las corrientes que fluyen a través de la membrana determinan el potencial. Esta técnica permitió a Hodgkin y Huxley realizar un modelo de la generación del potencial de acción que les hizo ganar el premio Nobel de Medicina en 1963 (Hodgkin, A.L. et al. 1952).

Años más tarde, sobre la década de los 70, Neher y Sakmann desarrollaron la hoy conocida técnica del "patch clamp" y por la que consiguieron el Premio Nobel en 1991 (Neher, E. y Sakmann, B. 1976). Esta técnica utiliza un único electrodo y se basa en poner en contacto una micropipeta de vidrio con un diámetro de punta muy pequeño con la membrana de la célula. Después de la aplicación de una pequeña succión en la pipeta se forma un sello de alta resistencia (del orden de $G\Omega$) entre la pipeta y la membrana. A través de la pipeta que lleva un electrodo en su interior, se inyecta a la célula la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana fijado en el nivel deseado, se aplican los diferentes protocolos de estimulación y se registran las corrientes iónicas resultantes a través de un amplificador electrónico conectado a la pipeta. Existen cuatro modalidades de esta técnica dependiendo del área de membrana a través de la cual se controla el potencial: *cell-attached*, *inside-out*, *whole-cell* y *outside-out* (Fig.17). Cuando la punta de la pipeta se adhiere a la membrana plasmática de la célula, obteniéndose un sello de alta resistencia, estamos en la configuración de *cell-attached*. Si se separa el parche de membrana del resto de la célula, se obtiene la configuración de *inside-out*, que permite modificar el medio al cual la cara interna de la membrana se encuentra expuesta. Otra posibilidad es que partiendo de la configuración de *cell-attached*, se aplique una ligera succión y se consiga que el parche de membrana comprendido en la punta de la pipeta se rompa, estableciéndose un contacto entre la solución de la pipeta y el medio intracelular. Esta modalidad se conoce como *whole-cell* (célula entera). La configuración de *outside-out* se obtiene a partir de la configuración de *whole-cell*. Para ello se separa la pipeta de la célula, con lo cual nos quedamos con un parche de membrana en el cual la cara externa de la membrana está hacia el baño y la cara interna hacia la solución de la pipeta.

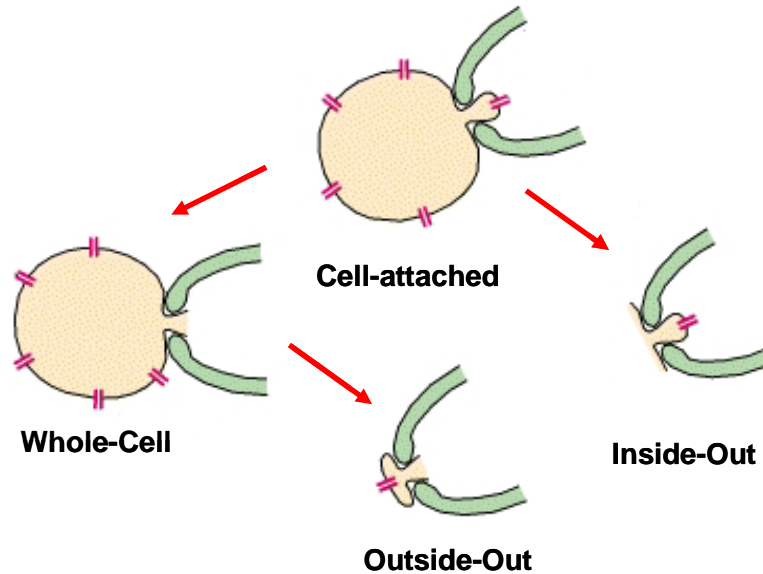


Figura 17: Esquema en el que se representan las posibles modalidades de la técnica de "patch-clamp" (*cell-attached, whole-cell, Inside-out, outside-out*).

9.1 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN CÉLULAS RBL-2H3 MEDIANTE "patch-clamp" CONVENCIONAL:

Las corrientes I_{crac} en células RBL-2H3 se registraron mediante la técnica de "patch-clamp *whole-cell*" convencional en la configuración de fijación de voltaje a T^a ambiente (21-25 °C). Para el estudio de esta corriente se utilizaron rampas despolarizantes de 200 ms de duración, desde -150 a +100mV, a partir del potencial de membrana de 0 mV, a una frecuencia de 0,5 HZ durante 400s.

En todos los experimentos se aplicaron -12 mV para corregir la diferencia de potencial entre las soluciones de registro (interna y externa). Las corrientes fueron filtradas a 2,0 Hz y se digitalizaron y mostraron a 10 KHz. Las corrientes capacitativas transitorias se cancelaron con el sistema de compensación automático del amplificador. Para estudiar el desarrollo de la I_{CRAC} y analizar su inactivación, la amplitud máxima de ésta fue medida a -130 mV. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. La comparación entre los grupos experimentales se realizó con la prueba estadística t-student, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Las diferentes soluciones utilizadas en los experimentos fueron las siguientes:

Solución externa: NaCl 120Mm, MgCl₂ 2Mm, CaCl₂ 10Mm, Tetraetilamonio-Cl 10Mm, Hepes 10Mm, Glucosa 10 Mm, Ph=7.2 con NaOH (300 mosmoles/l).

Solución interna: IP₃ 0,05 Mm, tapsigargina 5x10⁻⁸ Mm, glutamato de Cs 120 Mm, NaCl 8 Mm, Cs-BAPTA 10 Mm, MgCl₂ 3 Mm, CaCl₂ 4 Mm, Hepes 10 Mm, Ph=7.2 con CsOH (300 mosmoles/l).

Solución para tamponar débilmente el Ca²⁺ de la pipeta: EGTA 1,2 Mm, IP₃ 0,05 Mm, tapsigargina 5x10⁻⁸ Mm, aspartato de Cs 145 Mm, NaCl 8 Mm, Cs-Hepes 10Mm, Ph=7.2 con CsOH (280 mosmoles/l).

Solución para preservar la respiración mitocondrial: Mg-ATP 5Mm, Tris-GTP 0,5 Mm, ácido málico 2,5 Mm, piruvato de Na 2,5 Mm, NaH₂PO₄ 1Mm.

9.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA MEDIANTE “patch-clamp” PLANAR:

Las corrientes operadas por depósitos (SOCs) en las células de músculo liso de arteria coronaria humana (hCASMCs) fueron registradas utilizando la técnica de “patch-clamp *whole-cell*” con el sistema de registro planar (Nanion Port-a-patch planar; Nanion Technologies, Munich, Alemania) en la configuración de fijación de voltaje.

Para el registro, las células fueron despegadas del frasco de cultivo con Detachin (AMS Biotechnology) o HBSS (medio de cultivo libre de Ca²⁺ y Mg²⁺). Después, éstas se resuspendieron en la solución externa (en Mm): 145 NaCl, 2.8 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 D-glucosa (Ph 7.4) a una densidad de 1-5x10⁶ células/MI y se utilizaron en los 90 min siguientes. Esta solución externa también se utilizó como solución de registro externo, excepto por la concentración de CaCl₂ (10 Mm). Los chips utilizados para el registro eléctrico tenían una resistencia de 2-3 MΩ cuando se depositaba la solución de registro intracelular, la cual contenía (en Mm): 145glutamato de Cs, 8 NaCl, 1 MgCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 2 Na-ATP (Ph ajustado a 7.2 con CsOH). Inmediatamente después de alcanzar la configuración *whole cell* se midió la capacitancia de la

célula, las resistencias en serie y de la membrana. Estos valores se revisaron continuamente, y si variaban +10%, el experimento fue descartado.

Las SOC's se midieron utilizando una rampa de voltaje (-100 a + 100 Mv en 120 ms) aplicada cada 5 s (0.2 Hz) desde un voltaje de mantenimiento de 0 Mv. Las SOC's se adquirieron con un amplificador EPC-10 (HEKA). La amplitud de las corrientes se midió a un voltaje de -80 Mv, y se normalizó con respecto al valor de la capacitancia de cada célula. La corriente de fuga se obtuvo del promedio de las primeras 5 corrientes generadas por la rampa de voltaje, aplicadas al inicio del experimento y antes de la activación de las SOC's. A todas las corrientes obtenidas se les restó la corriente de fuga. La diferencia de potencial entre las soluciones de registro (interna y externa) y las corrientes capacitativas transitorias se cancelaron con el sistema de compensación automático del amplificador (EPC10). Los registros se filtraron a una frecuencia de 10 kHz y se muestrearon a 5 kHz.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-25°C). Los datos se analizaron con el software Patchmaster (Nanion Technologies, Munich, Alemania) y Microcal Origin 7 (OriginLab, Ma, USA). Los resultados se representan de la misma manera que los obtenidos en las células RBL-2H3 (apartado 9.1).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos mostrados provienen de al menos tres experimentos independientes. Cuando se compararon 2 medias se utilizó la *t de Student* para muestras pareadas o no, según correspondiese. La comparación de datos incluidos en dos o más grupos se realizó con el análisis de la varianza *ANOVA* de dos vías, y las medias se compararon utilizando el test de comparaciones múltiples de *Bonferroni*. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

B. LÍNEAS CELULARES Y PLÁSMIDOS

La línea celular A10 fue donada por el Prof. Santiago Lamas (CIB, CSIC, Madrid).

Las células de músculo liso de arteria coronaria humana son un cultivo primario suministrado por LONZA.

Las células RBL-2H3 fueron donadas por el Dr. Markus Hoth (Saarland University, Homburg, Alemania).

El plásmido que codifica para la aecuatorina dirigida a mitocondria, unida a la proteína GFP (GFP-AEQmit) fue amablemente donado por el Dr. Philip Brulet (Instituto Pasteur, Gif-sur-Yvette, París).

- C. MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y SOLUCIONES

DMEM 1 g/l glucosa (LONZA)

- + 10000 u/ml Penicilina y 10000 µg/ml Estreptomicina
- + 1 % L- Glutamina
- + 10 % FBS

α-MEM (LONZA)

- + 10000 u/ml Penicilina y 10000 µg/ml Estreptomicina
- + 1 % L- Glutamina
- + 15 % FBS

SmBulletKit (LONZA)

- + 5 % FBS
- + Suplementos:
 - 0,1 % Sulfato de Gentamicina + Anfotericina B
 - 0,1 % Insulina humana recombinante
 - 0,1 % rhEGF (factor de crecimiento epidérmico humano)
 - 0,2 % factor B de crecimiento de fibroblastos humanos

Tampón fosfato salino (PBS)

NaCl 136 Mm
KCl 2,7 Mm
NaH₂PO₄ 8 Mm
KH₂PO₄ 1,5 Mm
Ajustar a Ph=7,4

Medio Externo Completo (MEC)

NaCl 145 Mm
KCl 5 Mm
MgCl₂ 1 Mm
Hepes 10 Mm
Glucosa 10 Mm
CaCl₂ 1 Mm
Ajustar a Ph=7,42

Medio Interno Completo + ATP 0,1 M (MIC)

KCl 130 Mm
MgCl₂ 2 Mm
Succinato sódico 5 Mm
Hepes 20 Mm
NaCl 5 Mm
KH₂PO₄ 2 Mm
EGTA-Tris 0,45 M
H-EDTA-Na 0,1 M en Tris 1 M
ATP 1 Mm
Ajustar a Ph=6,8

Soluciones para Western Blot:

-**Tampón de muestra 2x:** Tris-HCl 62,5 Mm (Ph=6,8), SDS 2%, glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.05%.

-**Tris-HCl 2M** (Ph=8,9)

- **Tris-HCl 1M** (Ph=6,8)
- **APS 20 %**
- **Tampón de electroforesis 10X (Ph=8,3)**: Trizma base 0,25 M, glicina 192 M y SDS 1%.
- **Tampón de transferencia Ph=8,3 (tris-glicina-metanol)**: Trizma base 25 Mm, glicina 192 Mm y metanol 20%.
- **TBS 10x (Ph=7,5)**: Tris-HCl 25 Mm y NaCl 0,9%.
- **TBS tween 0,1% (TTBS)**: TBS 10X y tween 20 (0,1%).
- **Tampón de Bloqueo**: TTBS y leche desnatada en polvo (5%).
- **Azul de Comassie**: Azul de Coomassie 0,1%, metanol 40%, ácido acético 5% y agua desionizada.
- **Solución de desteñir**: metanol 30%, ácido acético 10% y agua desionizada.

D. MATERIALES Y REACTIVOS

Ab-cam (Cambridge, UK)

- Anticuerpo 1^{ro} y 2^{ro} α -beta actina para WB

Alomone Labs (Jerusalén, Israel)

- Nifedipina
- Tapsigargina
- Anticuerpos α -STIM1, α -ORAI1, α -Cav1.2 subunidad α 1c para WB

AMAXA biosystems (Maryland, EE.UU)

- NucleofectorTM II

Applied Biosystems (Madrid, España)

- Kit retrotranscripción inversa
- DNAsa I (Ambion)

BD Falcon

- Tubos de fondo redondo de polipropileno estériles (15 ml)

Calbiochem

- 2-APB
- BTP2

Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EE.UU)

- Ibuprofeno
- Indometacina
- R-Flurbiprofeno
- Salicilato
- Sulfuro de Sulindac

Corning

- Frascos de cultivo celular de 75 cm²
- Rascador celular (*scraper*)

Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Madrid, España)

- ECL
- Taq ADN polimerasa
- RIPA

INVITROGEN Corporation (Carlsbad, California, EE.UU)

- Celenterazina
- Fura-2/AM
- TMRM

- TRIZOL

LONZA (Barcelona S.L., España)

- Medio DMEM
- Medio SmBulletKit
- Suero bovino fetal (FBS)
- Antibióticos: Penicilina, Estreptomicina
- L-Glutamina
- Tripsina-EDTA
- Solución de tampón fosfato (PBS)

Millipore (Madrid, España)

- Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)

Merck (Madrid, España)

- Ácido clorhídrico
- Butanol
- Cloruro cálcico
- Cloruro de magnesio
- Cloruro potásico
- DMSO
- Etanol
- Hidróxido sódico
- Isopropanol
- Metanol
- Bis-acrilamida

Nunc Labclinics (Barcelona, España)

- Frascos de cultivo celular de 25 cm²
- Placas de cultivo de 4 pocillos
- Placas de cultivo de 6 pocillos

Sigma Aldrich (Madrid, España)

- Ácido etilendiamonio tetra-acético (EDTA)
- Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA)
- PS (Fluka)
- Azul de tripano (Trypan Blue)
- ATP
- Cloruro de Lantano
- Digitonina
- Dodecil sulfato sódico (SDS)
- Glicina
- Hepes
- LB-Broth
- Luciferina-Luciferasa ("Firefly Latern Extract")
- Pestatina
- PMSF
- TEMED
- Tween 20
- B-Mercaptoetan

IV.RESULTADOS

1ª PARTE RESULTADOS:

MODELO ESTUDIO: LÍNEA CELULAR A10

1. VÍAS DE ENTRADA DE Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE AORTA EMBRIONARIA DE RATA A10

En primer lugar investigamos las principales vías de entrada de Ca^{2+} en las células A10. Mediante experimentos de imagen de fluorescencia se monitorizó la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) en las células de músculo liso vascular de aorta de rata embrionaria A10. En la Fig.18A se observa en células con depósitos intactos (no tratadas con tapsigargina), que la re-adición de Ca^{2+} en el medio extracelular a células en medio libre de Ca^{2+} no produce incremento del cociente de fluorescencias de fura2 excitadas a 340/380. En cambio, cuando los depósitos de Ca^{2+} intracelular eran previamente depletados al tratar las células con tapsigargina (un inhibidor irreversible de la bomba SERCA del RE) en medio libre de Ca^{2+} , la re-adición de Ca^{2+} al medio extracelular inducía un gran incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ reflejo de la entrada de éste a través de SOCE (Fig.18B). Se comprobó también en estas células, la presencia de otros mecanismos de entrada de Ca^{2+} , como los canales dependientes de voltaje (VOCE). Para ello, estimulamos las células con un medio extracelular despolarizante que contenía alta concentración de K^+ (75 mM), lo que inducía el incremento significativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Fig.18C). La entrada de Ca^{2+} inducida por voltaje (VOCE) era significativamente menor que la inducida por SOCE, y era sólo aparente en una fracción de células significativamente menor que la inducida por SOCE (Fig.18D).

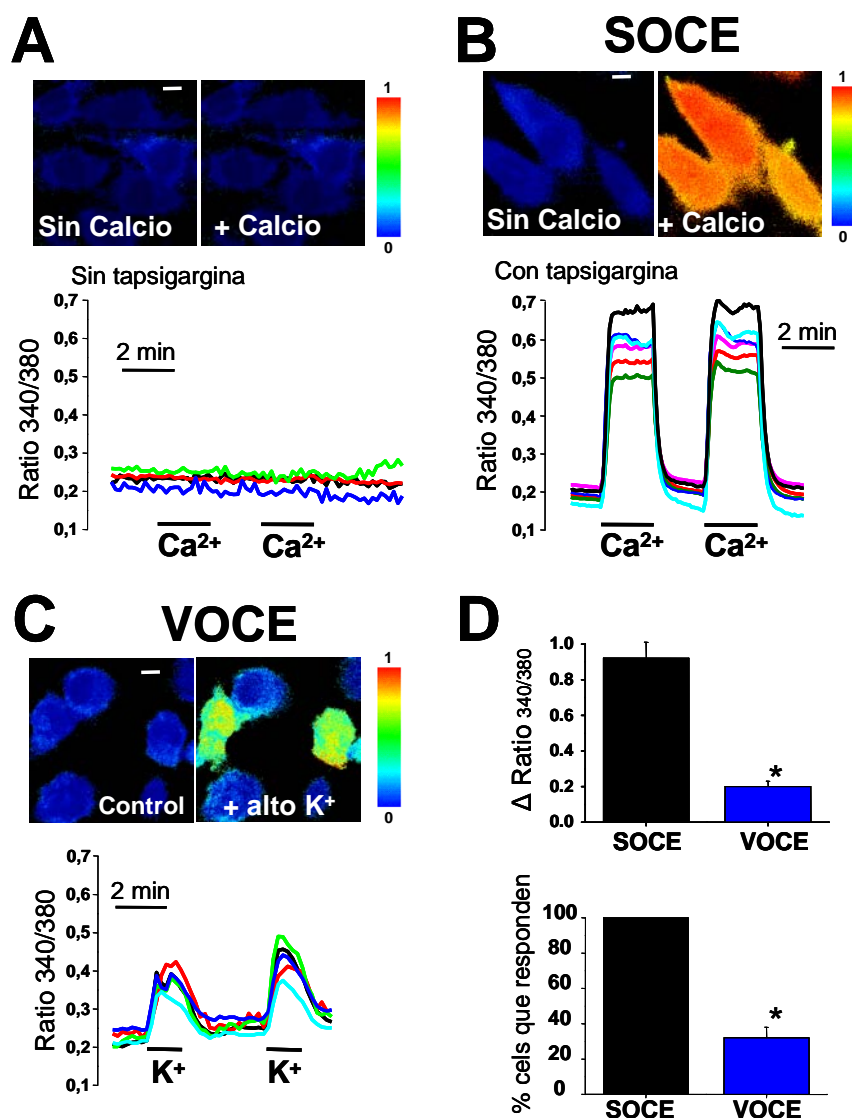


Figura 18: Las células A10 muestran SOCE y VOCE. Las células se cargaron con la sonda de Ca²⁺ intracelular fura-2/AM durante 90 min y se midió la [Ca²⁺]_{cit} mediante imagen de fluorescencia. **A**, en células no tratadas con taspargina (1 μM) no hay cambios en la [Ca²⁺]_{cit} (representado como Ratio 340/380) tras la aplicación de Ca²⁺ en el medio extracelular, incremento sí apreciable en las células tratadas previamente con taspargina, consecuencia directa de SOCE (**B**), en ambos casos se muestran células representativas de 3 experimentos. En los paneles superiores se observan imágenes representativas del ratio codificadas en pseudocolor (Ratio de 0 a 1). **C**, la despolarización de la membrana plasmática con un medio alto en K⁺ (75mM) induce un pequeño incremento en el ratio de ciertas células reflejando VOCE (células representativas de 3 experimentos). **D**, la gráfica superior muestra la media ± EEM del incremento en el ratio generado por SOCE y VOCE en las células que responden (n=200 y 39 células respectivamente). La gráfica inferior indica el porcentaje de células que presentan SOCE y VOCE (*p<0,05).

Para caracterizar más profundamente la SOCE en estas células estudiamos la expresión de dos proteínas recientemente descubiertas implicadas directamente en SOCE, Stim1 (Liou, J. et al. 2005) y Orai1 (Prakriya, M. et al. 2006), pues su expresión había sido previamente observada en otros tipos de células de músculo liso vascular, como las células de safena humana y arteria coronaria humana. (Takahashi, Y. et al. 2007; Li, J. et al. 2008).

Utilizando la técnica de la RT-PCR comprobamos la expresión del RNA mensajero Stim1 y Orai1 en nuestro modelo celular (Fig.19).

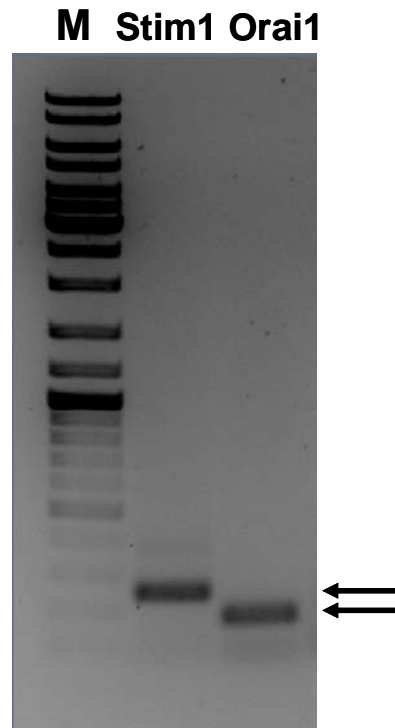


Figura 19: Las células A10 expresan el RNAm de Stim1 y Orai1. Las bandas corresponden a los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR, (Stim1=243 pb; Orai1=178 pb) identificados en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Se muestra un experimento representativo de los 3 independientemente realizados.

A continuación se realizó una caracterización farmacológica de SOCE en las células A10. Para ello, estudiamos los efectos de antagonistas clásicos de SOCE como LaCl_3 y 2-APB así como un nuevo y más potente antagonista de I_{CRAC} , el BTP-2 (Zitt, C. et al. 2004) sobre SOCE en células A10 (Fig.203). Todos los antagonistas de SOCE empleados inhibieron SOCE en células A10 sin afectar VOCE (Fig.20B). Por otro lado, Nifedipina, un antagonista específico de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L no inhibió SOCE (Fig.20C) excluyendo así contribución alguna de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la entrada de Ca^{2+} inducida por SOCE.

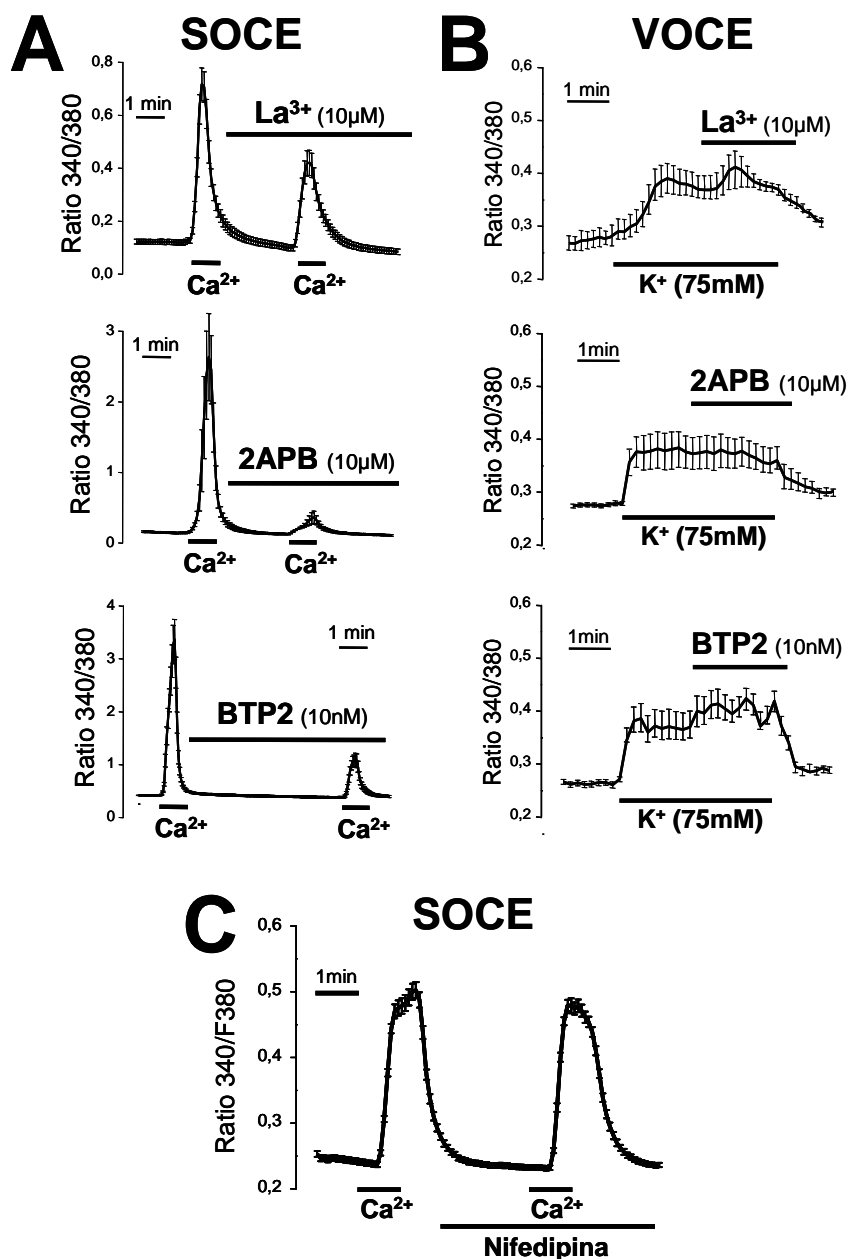


Figura 20: Diversos antagonistas clásicos y no clásicos de SOCE inhiben SOCE pero no VOCE en células A10. **A**, los registros muestran los valores del cociente de fluorescencias (media \pm EEM de 7 a 9 células) de experimentos representativos reflejo de SOCE medido en las mismas células antes y después del tratamiento con distintos antagonistas de SOCE (La^{3+} , 2-APB y BTP2). **B**, efecto de los mismos antagonistas sobre VOCE. Los experimentos son representativos de 3 experimentos independientes y en cada registro se ha representado la media \pm EEM de 10-12 células. **C**, Nifedipina (1 μM), un antagonista específico de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L no inhibe SOCE en las células A10. Registro representativo de 3 experimentos independientes (media \pm EEM de 15-18 células).

Existe numerosa bibliografía sobre el papel de SOCE en el control de la proliferación celular en diversos tipos celulares, desde el caso mejor caracterizado de los linfocitos T, (Lewis, R.S. 2001) hasta las células de músculo liso vascular (Golovina, V.A. et al. 2001), donde se conoce que la entrada capacitativa regula la expresión génica de los factores de

transcripción CREB y NFAT, relacionados con la proliferación de estas células (Barlow, C.A. et al. 2006). Para comprobar el papel de la entrada de Ca^{2+} , en general, y SOCE, en particular, en la proliferación de las células A10 investigamos el efecto de la ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular y de diversos antagonistas de SOCE sobre la proliferación celular (Fig.21). Los resultados muestran que la ausencia de Ca^{2+} extracelular inhibe significativamente, aunque no abole, la proliferación celular (Fig.21A). Por otra parte, los antagonistas de SOCE, La^{3+} , 2-APB y BTP-2 inhibieron significativamente, aunque no abolieron, la proliferación celular (Fig.21B). Los resultados anteriores sugieren que la proliferación celular depende en buena medida de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de SOCE aunque un componente independiente de Ca^{2+} extracelular pudiera contribuir a la proliferación celular.

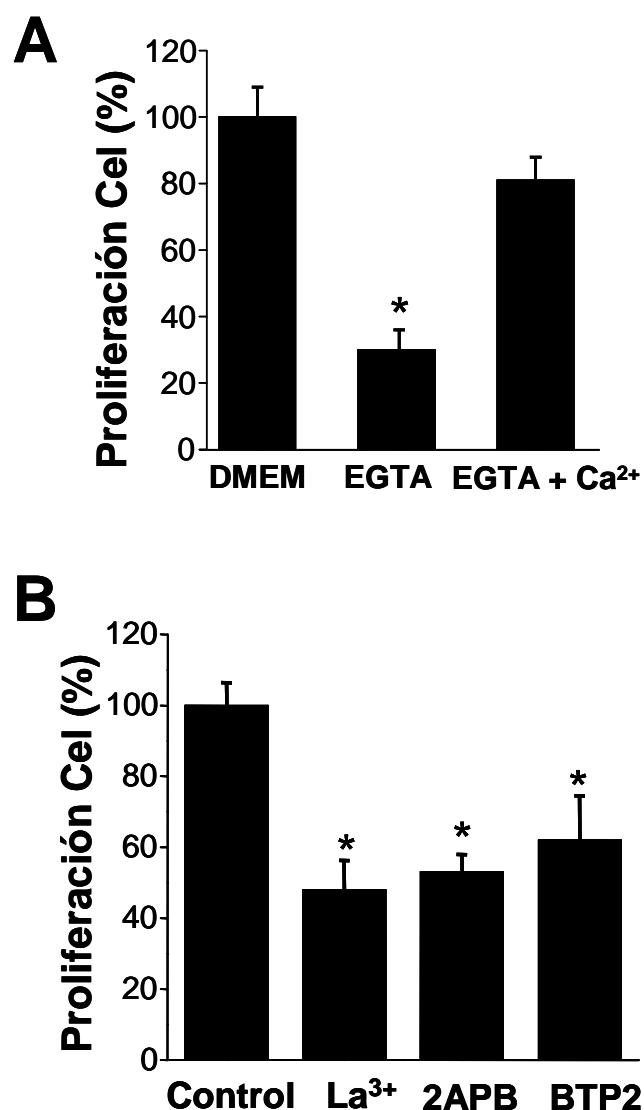


Figura 21: La retirada del Ca²⁺ extracelular y los antagonistas de SOCE inhiben la proliferación de las células A10. A, Se sembraron células A10 y se cultivaron *in vitro* en distintos medios. Al cabo de 15 días se cuantificaron la proliferación y viabilidad celulares. La adición de EGTA 1,8 mM al medio de cultivo (concentración de Ca²⁺ en el medio de cultivo 1,8 mM) inhibe la proliferación celular. La adición de EGTA 1.8 mM y 1.8 mM de Ca²⁺ al medio de cultivo revierte los efectos antiproliferativos del EGTA. **B,** las células A10 se cultivaron *in vitro* en medio de cultivo completo (control) y en presencia de LaCl₃ 100 μM, 2-APB 10 μM y BTP2 10 nM durante 15 días antes de evaluar la proliferación celular. Todos los experimentos de proliferación se realizaron durante 15 días. Las barras muestran los valores medios ± EEM de 3 experimentos independientes (*p<0,05).

2. EL SALICILATO Y OTROS AINES INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS A10

Estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron que el salicilato (principal metabolito de la aspirina y antibiótico natural de muchas frutas y hortalizas) inhibe la proliferación de células tumorales de carcinoma de colon

humano (Nunez, L. et al. 2006). Por otro lado, tanto este compuesto, como otros AINEs, han sido propuestos como posibles candidatos en el tratamiento de desórdenes proliferativos de la pared vascular. Su mecanismo de acción no está claro, aunque se cree que podría ser independiente de su acción antiinflamatoria (Weber, A. et al. 2000; Marra, D.E. y Liao, J.K. 2001; Brooks, G. et al. 2003; Gu, Q. et al. 2005). Por ello, hemos estudiado si el salicilato y otros AINEs podrían inhibir la proliferación de las células A10, modelo de músculo liso vascular. Los resultados se muestran en la Fig.22. El salicilato inhibe la proliferación de células A10 de una forma dosis dependiente (Fig.22A). El resto de AINEs testados (ibuprofeno, indometacina y sulfuro de sulindac) también inhiben significativamente la proliferación de las células A10 a concentraciones consideradas terapéuticas (100 μ M) (Fig.22B). Se estudió también el efecto de un análogo estructural, el R-Flurbiprofeno, un análogo del ibuprofeno y enantiómero óptico del S-Flurbiprofeno, un compuesto incapaz de inhibir la enzima ciclooxygenasa y que carece por tanto de actividad anti-inflamatoria. El R-flurbiprofeno inhibió la proliferación celular de un modo similar al de sus análogos estructurales (Fig.22C) sugiriendo que los efectos de los AINEs son independientes de su acción anti-inflamatoria.

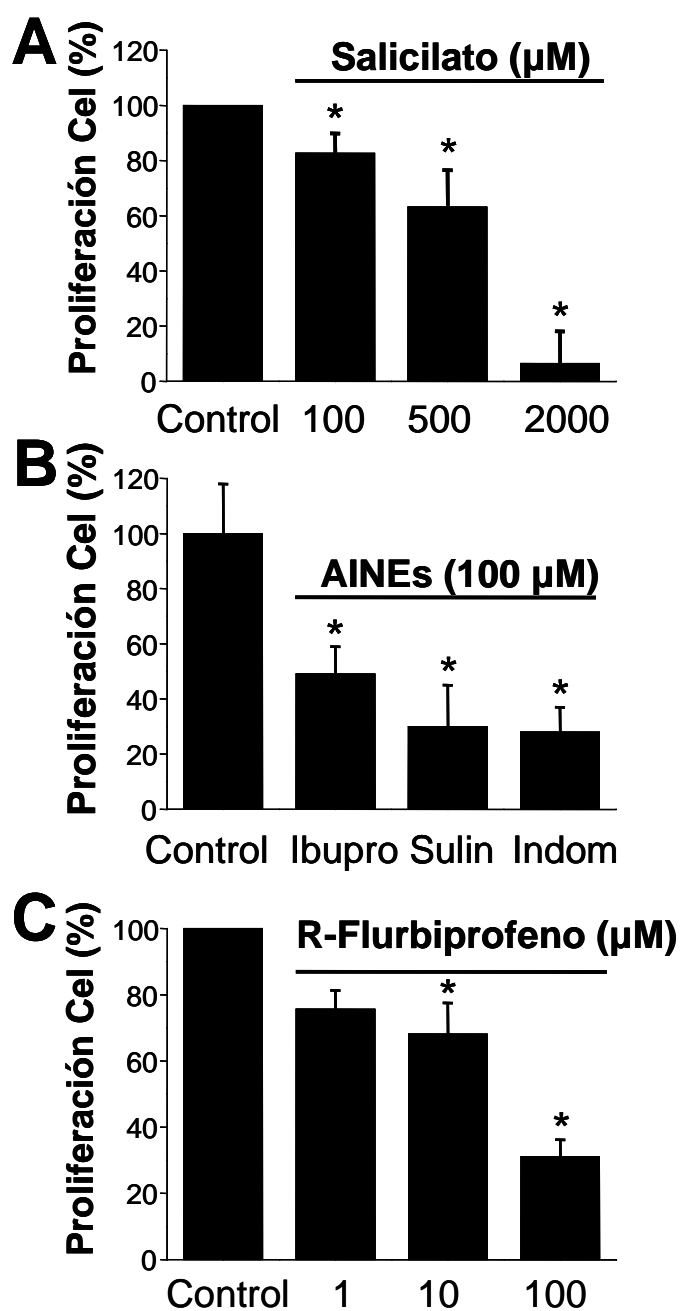


Figura 22: Los AINEs inhiben la proliferación de las células A10. **A**, el salicilato inhibe la proliferación de las células A10 de un modo dependiente de la dosis (100-2000 μM). **B**, otros AINEs incluyendo ibuprofeno, sulindac e indometacina celular también inhiben la proliferación celular a concentraciones consideradas terapéuticas (100 μM). **C**, efecto dosis dependiente de R-flurbiprofeno (1, 10, 100 μM) sobre la proliferación de las células A10. Cada barra es la media \pm EEM de 3 experimentos (* $p < 0,05$).

3. LOS AINEs INHIBEN SOCE PERO NO VOCE EN LAS CÉLULAS A10

Puesto que la proliferación celular es dependiente de la entrada de Ca^{2+} , estudiamos si los AINEs podían inhibir la proliferación actuando sobre vías de entrada de Ca^{2+} . Esta idea está basada en estudios previos de nuestro grupo, en los que se demostraba la inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{2+} por el salicilato, tanto en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano (HT29) como en la línea celular procedente de leucemia linfoblástica humana (Jurkat) (Valero, R.A. et al. 2008). Estudiamos los efectos de los diferentes AINEs testados sobre SOCE y VOCE a las mismas concentraciones a las que estos compuestos inhibían la proliferación (salicilato 10-2000 μM ; resto AINEs 100 μM). Los resultados muestran que todos los AINEs testados inhiben SOCE en las células A10 (Fig.23). Sin embargo, ninguno de los AINEs testados inhibe VOCE (Fig.24). De hecho, en todos los casos estudiados, observamos que la despolarización inducía un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debido a VOCE. En estas condiciones de elevada $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, la adición de AINEs no sólo no decrecía la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ sino que parecía elevarla.

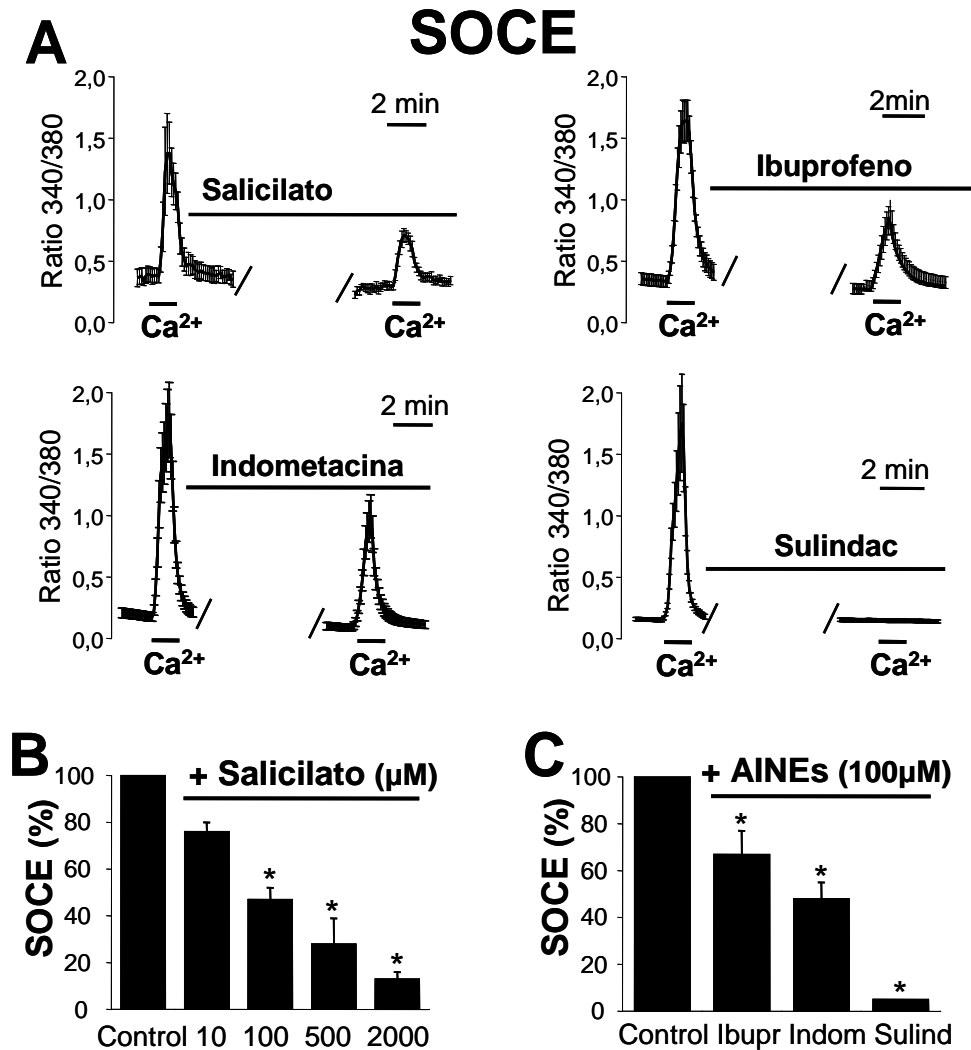


Figura 23: Los AINEs inhiben SOCE en las células A10. **A**, las células A10 se cargaron con fura-2/AM durante 90 min, periodo tras el cual fueron incubadas durante 10 min con taspigargina (1μM) en medio libre de Ca²⁺. Los experimentos comenzaron con la perfusión en medio libre de Ca²⁺, seguidamente se adicionó Ca²⁺ 1 mM al medio externo (estímulo) induciéndose un incremento en la [Ca²⁺]_{cit} reflejo directo de SOCE. A continuación, se perfundieron las mismas células en medio libre de Ca²⁺ en presencia de los diferentes AINEs (salicilato 10-2000 μM; ibuprofeno, indometacina y sulindac 100 μM), antes de readicionar en el medio Ca²⁺ junto con los AINEs para estudiar el efecto de éstos sobre SOCE. Cada una de las gráficas es un registro promedio representativo de 3 experimentos independientes siendo la media ± EEM de 9, 9, 9 y 18 células respectivamente. **B y C**, las barras de estas dos gráficas muestran la disminución dosis dependiente de SOCE inducida por salicilato y los efectos de ibuprofeno, indometacina y sulindac (100 μM), sobre el mismo parámetro. Cada una de las barras es la media ± EEM de al menos 3 experimentos independientes (*p<0,05).

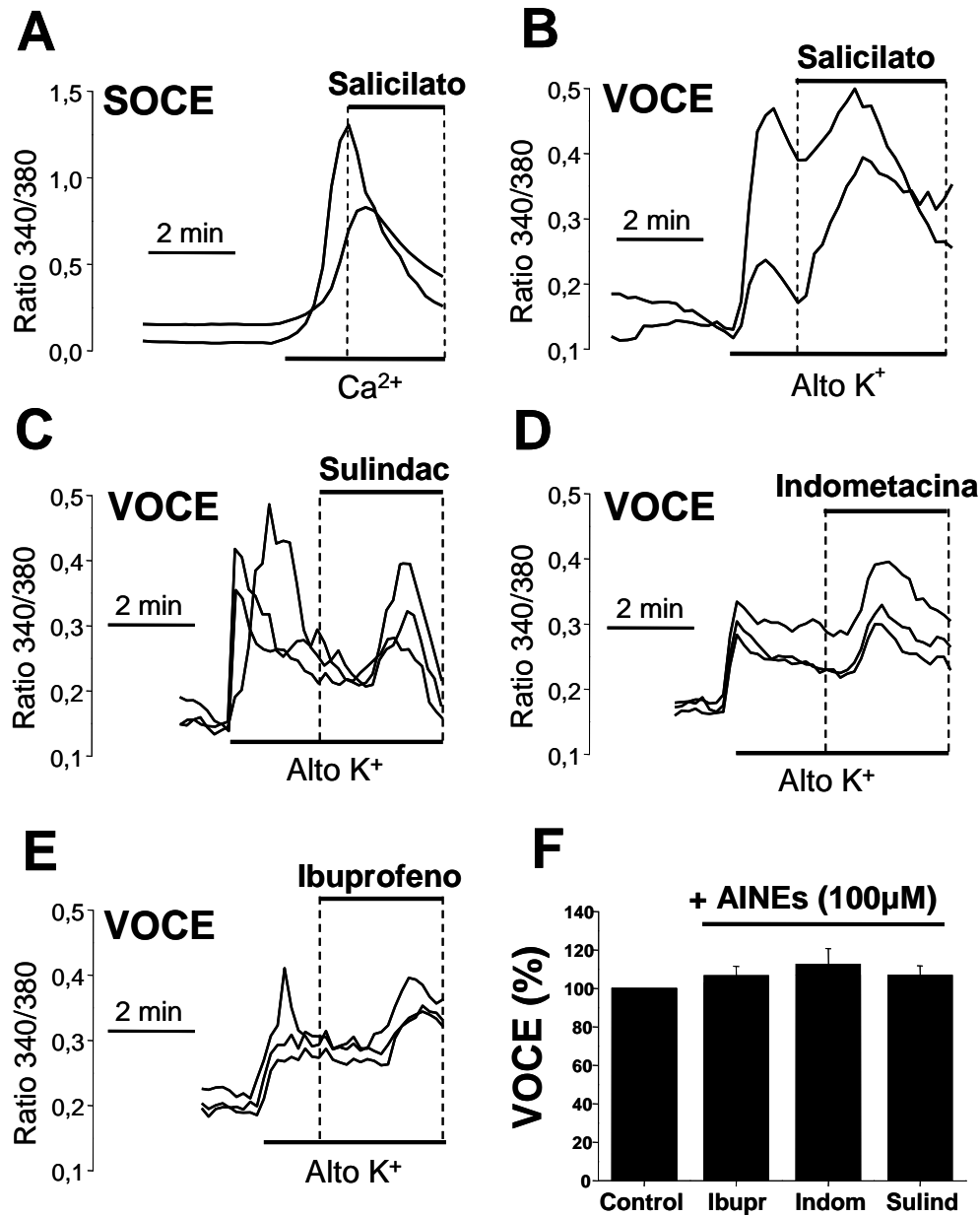


Figura 24: Los AINEs no inhiben VOCE en las células A10. Las gráficas muestran registros de Ca²⁺ representativos de células individuales de al menos 3 experimentos realizados independientemente. **A**, salicilato (500 µM) disminuye la [Ca²⁺]_{cit} una vez generada SOCE en células tratadas con tapsigargina. **B-E**, efecto de los diferentes AINEs (salicilato 500 µM, sulindac, indometacina e ibuprofeno 100 µM) sobre VOCE. Todos ellos fueron administrados durante la despolarización de la membrana plasmática, una vez generada VOCE. **F**, las barras representan la media ± EEM de la [Ca²⁺]_{cit} de unas 8 células, inducida por VOCE, antes (control) y después de la adición de los correspondientes AINEs en los registros de fluorescencia. ($p > 0,05$).

4. LOS AINEs NO INHIBEN SOCE ACTUANDO DIRECTAMENTE SOBRE EL CANAL IÓNICO RESPONSABLE

Una vez comprobado que los AINEs inhiben SOCE en las células A10 quisimos estudiar si actuaban directamente sobre los canales operados por depósitos o modulando algún mecanismo regulador de esta vía de entrada de Ca^{2+} . Para este estudio investigamos los efectos de los diferentes AINEs sobre la corriente I_{CRAC} en células RBL. Hemos utilizado este modelo celular por dos razones fundamentales: en primer lugar, porque I_{CRAC} está muy bien caracterizada en estas células (Hoth, M. et al. 2000). En segundo lugar, porque está muy bien establecido que I_{CRAC} y SOCE en estas células está controlada por la mitocondria (Gilabert, J.A. y Parekh, A.B. 2000). En primer lugar, confirmamos mediante imagen de fluorescencia la presencia de SOCE y su control por la mitocondria en las células RBL. La Fig.25 muestra registros típicos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en células RBL cargadas con fura-2/AM y tratadas con taspigargina en medio libre de Ca^{2+} extracelular. En estas circunstancias, la adición de Ca^{2+} extracelular inducía un gran incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que refleja SOCE. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ fue inhibido por el desacoplante mitocondrial FCCP consistentemente con el control mitocondrial de SOCE descrito en detalle para estas células (Fig.25B). Este efecto refleja el control mitocondrial de la entrada capacitativa de Ca^{2+} descrito en estas células. Además, comprobamos que los diferentes AINEs incluyendo ibuprofeno, indometacina, sulfuro de sulindac y salicilato (todos testados a 100 μM) inhibían también SOCE en las células RBL (Fig.25C-F).

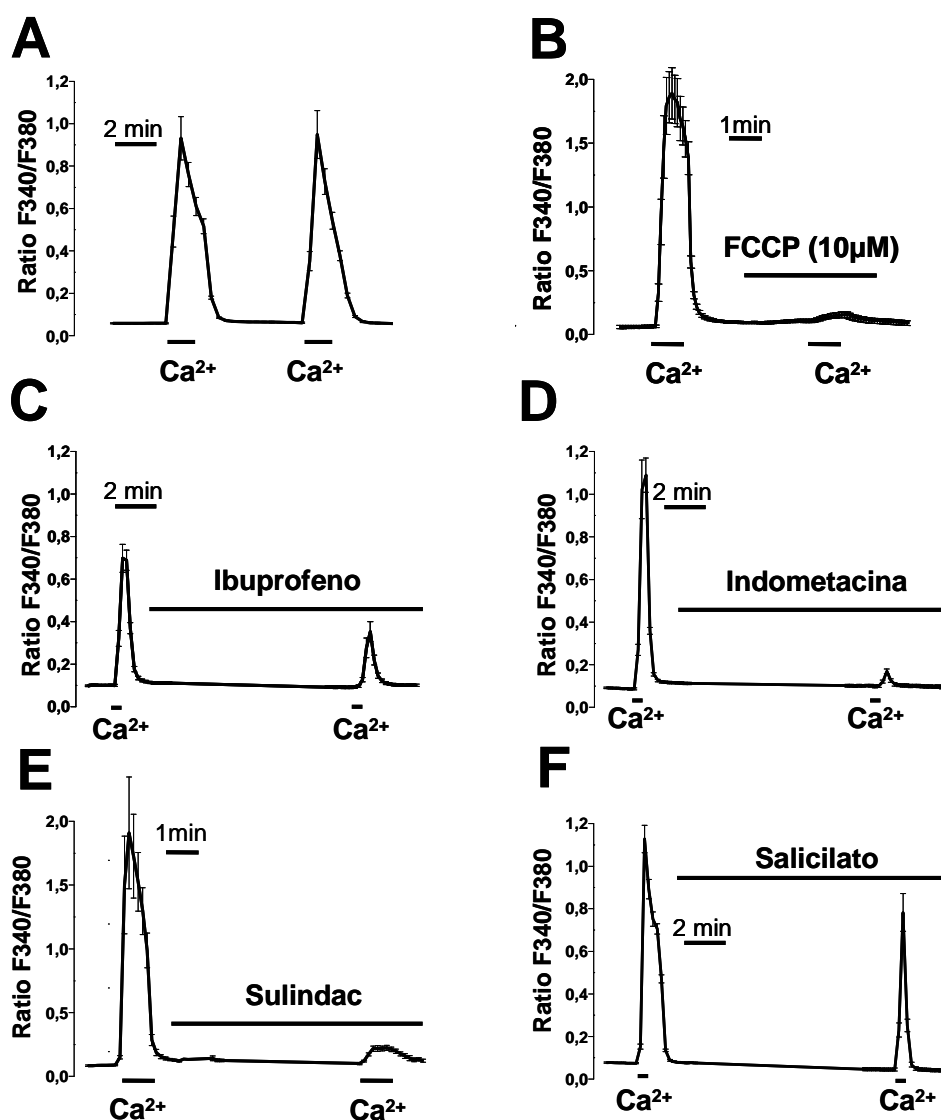


Figura 25: El desacoplante mitocondrial FCCP y los AINEs inhiben SOCE en las células RBL. Las células RBL fueron cargadas con fura-2/AM, tratadas con tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} y utilizadas para monitorizar SOCE mediante imagen de fluorescencia. **A**, la adición de Ca^{2+} en el medio extracelular en células RBL tratadas con tapsigargina induce un incremento reproducible en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ consistente con SOCE. **B**, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por SOCE fue inhibido por el desacoplante mitocondrial FCCP más oligomicina de forma reversible. **C-F**, diferentes AINEs (100 μM) inhiben SOCE en las células RBL. Cada una de las gráficas es un registro promedio (media \pm EEM) de 17, 10, 10, 14, 12 y 22 células respectivamente.

Una vez confirmada la inhibición de SOCE por AINEs en células RBL, se estudiaron los efectos de estos compuestos sobre la corriente I_{CRAC} en dichas células mediante la técnica del "patch-clamp" convencional en la configuración de whole cell. La Fig.26A muestra la relación I-V de la corriente I_{CRAC} con su típica rectificación hacia dentro, es decir, una mayor corriente a potenciales negativos que a potenciales positivos a los 2, 100 y 400 s tras el comienzo del registro en células control. La Fig.26B muestra la máxima amplitud de la

corriente medida a 2 potenciales extremos (uno muy negativo, -130 mV, y otro bastante positivo, +80 mV) a lo largo del tiempo, observándose que la amplitud máxima de la corriente no decae por el enorme poder quelante del BAPTA. Los resultados muestran que en estas condiciones de fuerte tamponamiento de Ca^{2+} (10 mM BAPTA) los diferentes AINEs testados (salicilato, ibuprofeno e indometacina) no inhiben la corriente I_{CRAC} . En estas condiciones el flujo de Ca^{2+} es rápidamente tamponado por el quelante lo que evita la inactivación por Ca^{2+} característica de la corriente I_{CRAC} (Fig.26C). Estudios previos han mostrado que si se tampona débilmente el Ca^{2+} (1,2 mM EGTA), la mitocondria es capaz de captar el Ca^{2+} acumulado cerca de los canales CRAC evitando así su inactivación (Hoth, M. et al. 1997; Hoth, M. et al. 2000). Para conseguir que la mitocondria mantuviera su capacidad de captar Ca^{2+} durante los registros de I_{CRAC} , se añadió una mezcla de varios componentes (5 mM Mg-ATP; 0,5 mM Tris-GTP; 2,5 mM ácido málico; 2,5 mM piruvato de Na^+ ; 1 mM NaH_2PO_4) a la solución de la pipeta capaz de alimentar la cadena respiratoria y mantener el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$). La figura.27A muestra que en estas nuevas condiciones permisivas para la actividad mitocondrial, la corriente I_{CRAC} se mantiene durante todo el registro, siendo significativamente reducida en presencia del protonóforo CCCP, o de los bloqueantes del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial como el rojo de rutenio y su análogo permeable rutenio 360. Estos datos sugieren en primer lugar que la mitocondria controla la corriente I_{CRAC} en las células RBL, pues la pérdida de su función disminuye la amplitud de la corriente. El tratamiento de las células con salicilato, ibuprofeno e indometacina (10-100 μM) también modificaba la cinética de la corriente (Fig.27B). En segundo lugar, los resultados sugieren, que el salicilato y otros AINEs inhiben SOCE de un modo indirecto dependiente del control mitocondrial de la corriente I_{CRAC} responsable de SOCE (Fig.27C).

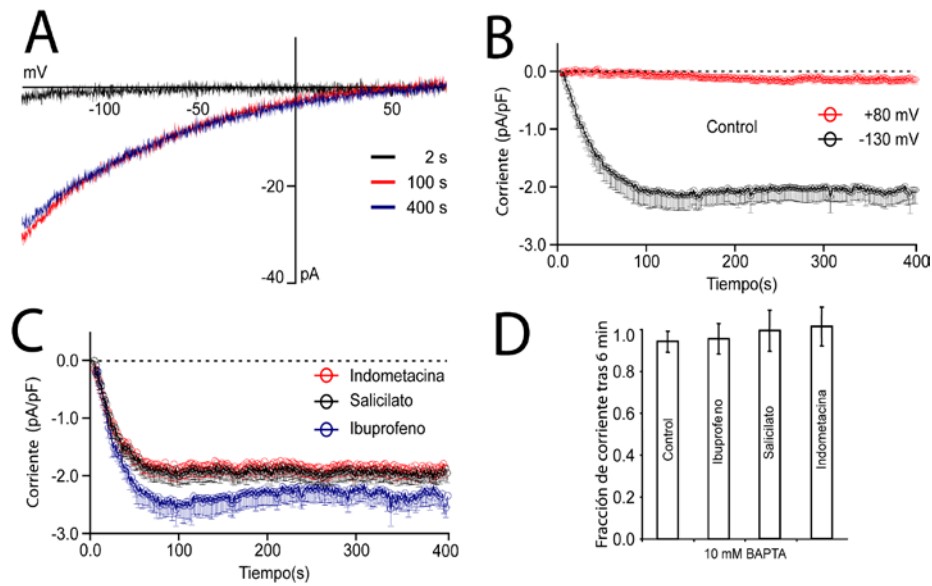


Figura 26: Los AINEs no inhiben la corriente CRAC en células RBL en condiciones de fuerte tamponamiento del Ca^{2+} intracelular. **A**, representación I/V (corriente frente a voltaje) de la corriente CRAC en las células RBL en presencia de 10 mM de BAPTA intracelular a los 2, 10 y 400 s, tras conseguir la configuración de *whole cell*. **B**, cinética de la corriente CRAC respecto al tiempo en células control medida a -130 mV (máxima) y a +80 mV (prácticamente 0). Los valores mostrados son el promedio de 16 células. **C**, cinética de la corriente CRAC en células tratadas con ibuprofeno (n=7), salicilato (n=11) e indometacina (n=6) a unas concentraciones de 10-100 μM . **D**, las barras muestran la media de las corrientes CRAC obtenidas en los experimentos representados en B (control) y C (condiciones experimentales) no siendo ninguna significativamente diferente del control. En todas las condiciones la corriente CRAC se obtuvo de eliminar la media de las corrientes activadas durante las tres primeras rampas de voltaje, antes de que se activaran los canales CRAC.

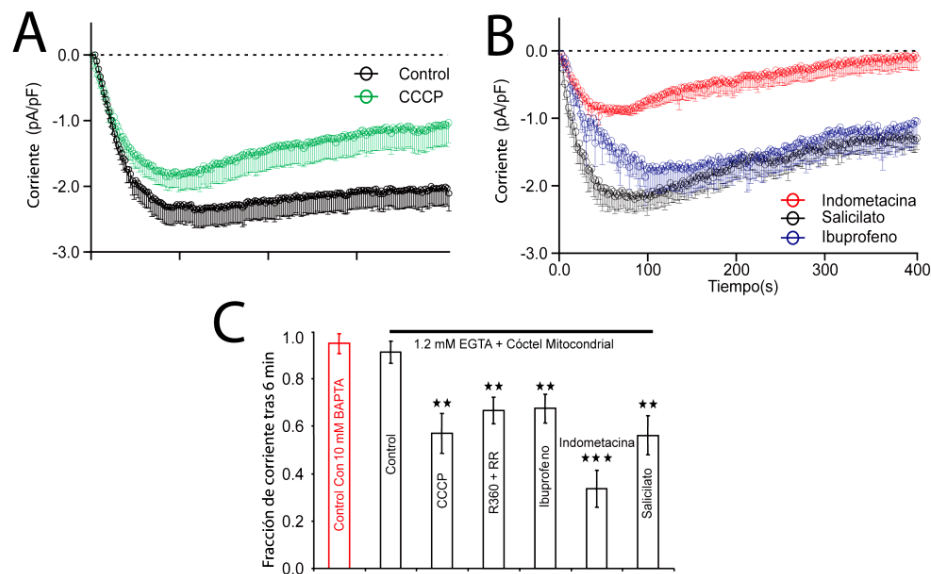


Figura 27: Los AINEs inhiben la corriente I_{crac} en células RBL en condiciones de tamponamiento débil del Ca^{2+} intracelular. Las corrientes fueron medidas utilizando una solución que contenía 1,2 mM de EGTA tamponando débilmente el Ca^{2+} y un cóctel mitocondrial que mantenía funcionales a las mitocondrias **A**, regulación de las corrientes CRAC por las mitocondrias. Se representa la cinética de la corriente en el caso control (negro) y tras incubar las células con CCCP durante 5 min (verde), impidiéndose la captación de Ca^{2+} mitocondrial y como consecuencia la inactivación de la corriente. **B**, representación de las corrientes CRAC registradas bajo las mismas condiciones que en **A**, a excepción del tratamiento de las células con los diferentes AINEs (indometacina, salicilato e ibuprofeno) generando una inactivación de las corrientes similar al efecto producido por el CCCP. **C**, análisis estadístico de las corrientes CRAC medidas 6 min después de establecerse la configuración de *whole cell* y cuando la fracción de corriente era máxima tanto en las condiciones control como en las experimentales. Todas las barras muestran los valores medios \pm EEM, siendo significativamente diferentes de la condición control (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5. CONTROL MITOCONDRIAL DE SOCE EN LAS CÉLULAS

A10

Tras mostrar que los AINEs inhiben SOCE de manera indirecta en las células RBL, decidimos estudiar si en las células A10 la mitocondria controla SOCE de la misma manera que lo hace en las células RBL (Hoth, M. et al. 1997; Gilibert, J.A. y Parekh, A.B. 2000; Hoth, M. et al. 2000; Schwarz, E.C. et al. 2007). Para ello estudiamos en primer lugar si la entrada capacitativa de Ca^{2+} induce captación de Ca^{2+} mitocondrial. Para realizar los experimentos de medición de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ mediante imagen de bioluminiscencia, las células A10 se transfectaron con aecuatorina dirigida a mitocondria (GFP-AEQmit) y se reconstituyeron con celenterazina (ver más detalles en "Material y Métodos"). La Fig.28A muestra que SOCE induce el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en las células A10. Sin embargo, la despolarización de la membrana plasmática con un medio alto en K^+ que estimularía la entrada de Ca^{2+} al citosol vía VOCE, no produce incremento alguno en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ (Fig.28B). Estos datos sugieren que las mitocondrias en las células A10 son sensibles específicamente a los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidos por SOCE, quizás porque los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que se generan por VOCE en las células A10 son muy pequeños (Fig.18).

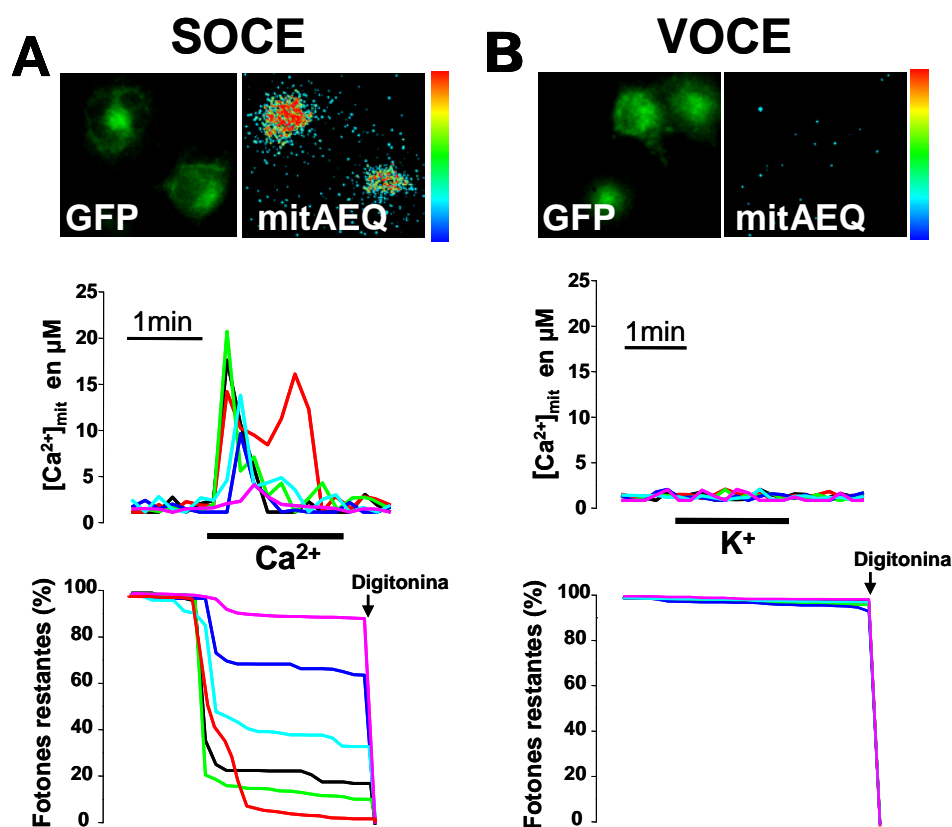
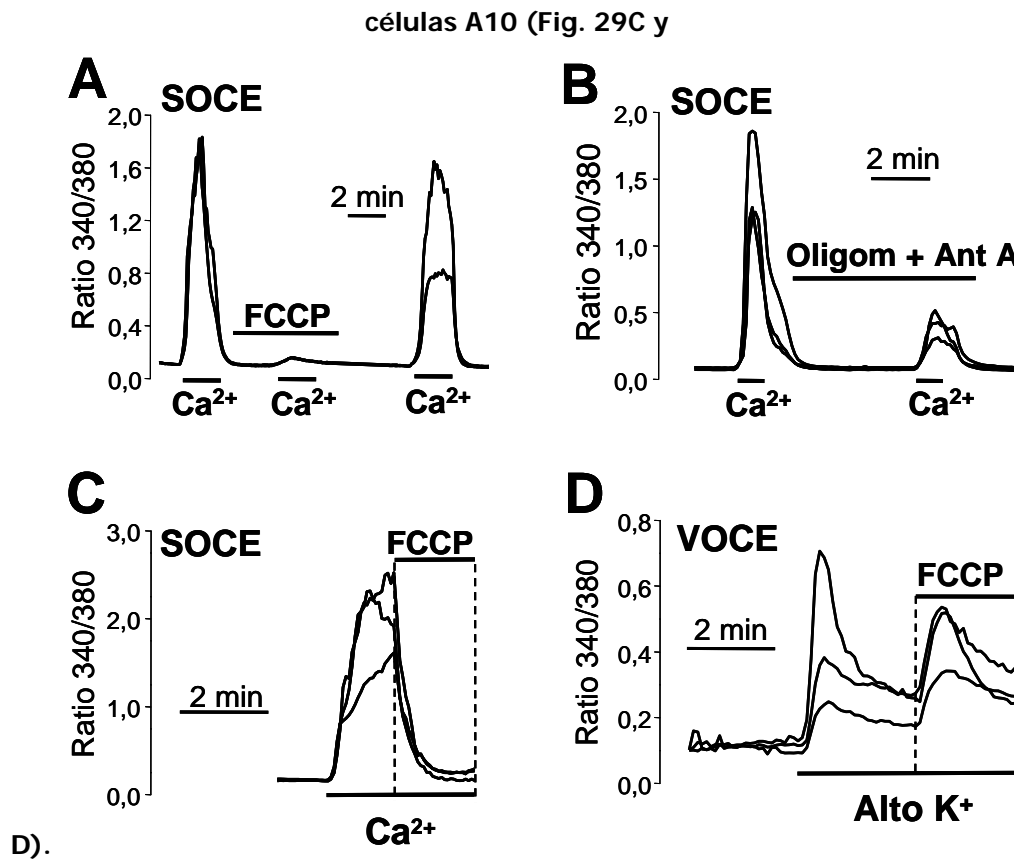


Figura 28: SOCE, pero no VOCE, induce captación de Ca^{2+} mitocondrial en las células A10. Las células A10 se transfectoraron con aecuorina dirigida a mitocondria (GFP-AEQmit), se reconstituyeron con celenterazina h, y se midió la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en célula única mediante imagen de bioluminiscencia. **A**, (SOCE) las células se trataron con tapsigargina ($1 \mu\text{M}$) durante 10 min en medio libre de Ca^{2+} para vaciar los depósitos, a continuación se perfundieron con medio externo que contenía Ca^{2+} para estimular SOCE, y los fotones emitidos reflejo de la captación de Ca^{2+} mitocondrial fueron registrados. Las imágenes superiores del panel muestran imágenes típicas de fluorescencia de células transfectadas (izquierda) y de fotones acumulados (derecha) durante SOCE. Las gráficas indican los valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células individuales y el porcentaje de fotones emitidos restantes tras las unión del Ca^{2+} a la aecuorina de esas células. **B**, (VOCE) las células se perfundieron con un medio alto en K^+ (75 mM) para inducir VOCE, y los fotones emitidos reflejan la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria. Las imágenes superiores muestran células transfectadas con el plásmido y la ausencia de fotones emitidos por la no unión de Ca^{2+} a la aecuorina. Las gráficas representan valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células individuales y el porcentaje de fotones emitidos restantes. Todos los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Las escalas de pseudocolor que se muestran en la parte superior indican valores de 0 (azul) a 10 (rojo) fotones/píxel.

En segundo lugar, hemos estudiado los efectos de la despolarización mitocondrial sobre SOCE en células A10 utilizando un desacoplante mitocondrial (FCCP $10 \mu\text{M}$). La Fig. 29A muestra la inhibición de SOCE por el colapso del potencial mitocondrial, siendo este efecto reversible tras el lavado del desacoplante. Se obtuvieron resultados similares al utilizar antimicina A ($0,5 \mu\text{g/ml}$), inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria de la mitocondria, junto a la oligomicina ($0,12 \mu\text{M}$) (Fig. 29B), un cóctel que colapsa el potencial mitocondrial y que también resulta en la inhibición de SOCE en las células A10. Además observamos que el FCCP disminuía la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ si se aplicaba durante SOCE, pero no tenía ese efecto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ si se aplicaba durante VOCE (después de despolarizar la membrana plasmática), indicando que la despolarización mitocondrial inhibe SOCE pero no VOCE en las



D). **Figura 29: La despolarización mitocondrial inhibe SOCE, pero no VOCE, en las células A10.** **A,** el desacoplante mitocondrial FCCP (10 μ M + oligomicina 0,12 μ M) inhibe de forma reversible SOCE. **B,** la despolarización mitocondrial producida por el cóctel formado por antimicina A (0,5 μ g/ml) y oligomicina (0,12 μ M) también inhibe SOCE en las células A10. **C,** la adición de FCCP (10 μ M) durante SOCE disminuye la $[Ca^{2+}]_{cit}$. **D,** FCCP (10 μ M) añadido tras la despolarización de la membrana plasmática con medio alto en K⁺ (75mM) no produce disminución de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ sino más bien un pequeño aumento. Todas las gráficas muestran registros representativos de células individuales (8-17 células) estudiadas en al menos 3 experimentos independientes para cada uno de los casos.

6. SALICILATO Y OTROS AINES_s DESPOLARIZAN LA MITOCONDRIA EN LAS CÉLULAS A10

Los resultados anteriores demuestran que la despolarización mitocondrial, una maniobra que disminuye la captación mitocondrial de Ca^{2+} , favorece la inactivación de Icrac en células RBL e inhibe SOCE en células RBL y en células A10. Por tanto, nos planteamos la posibilidad de que salicilato y otros AINEs inhibiesen SOCE y por tanto la proliferación celular actuando sobre la mitocondria. Por ello decidimos investigar los efectos de los AINEs sobre el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) y la captación mitocondrial de Ca^{2+} en células A10. Para ello utilizamos la sonda mitocondrial TMRM que se acumula en las mitocondrias en función del $\Delta\Psi$, de modo que la concentración de esta sonda (y su fluorescencia asociada) será mayor en células con mitocondrias polarizadas y menor en aquellos casos en los que exista una pérdida relativa de potencial (despolarización mitocondrial). Nuestro grupo ha estimado que 10 μM de FCCP colapsa completamente el $\Delta\Psi$ apagando totalmente la fluorescencia del TMRM (Nunez, L. et al. 2006; Valero, R.A. et al. 2008), por lo que todos los experimentos finalizaban con la perfusión del desacoplante, para tomar esos datos como fluorescencia de fondo (ver más detalles en "Material y Métodos").

La Fig.30 A y B muestra que el salicilato, de manera dosis dependiente disminuye la fluorescencia del TMRM consistentemente con una despolarización mitocondrial. Se obtuvieron resultados similares con ibuprofeno, indometacina y sulfuro de sulindac a la misma concentración (100 μM) a la que inhibían SOCE y la proliferación celular en células A10 (Fig.30 C). Para demostrar que tanto el tratamiento con salicilato como con los demás AINEs no afectaban al metabolismo celular, se estudiaron los posibles efectos de dichos compuestos sobre los niveles celulares de ATP, mostrándose que no se producían cambios significativos en los niveles celulares de éste (Fig.30 D).

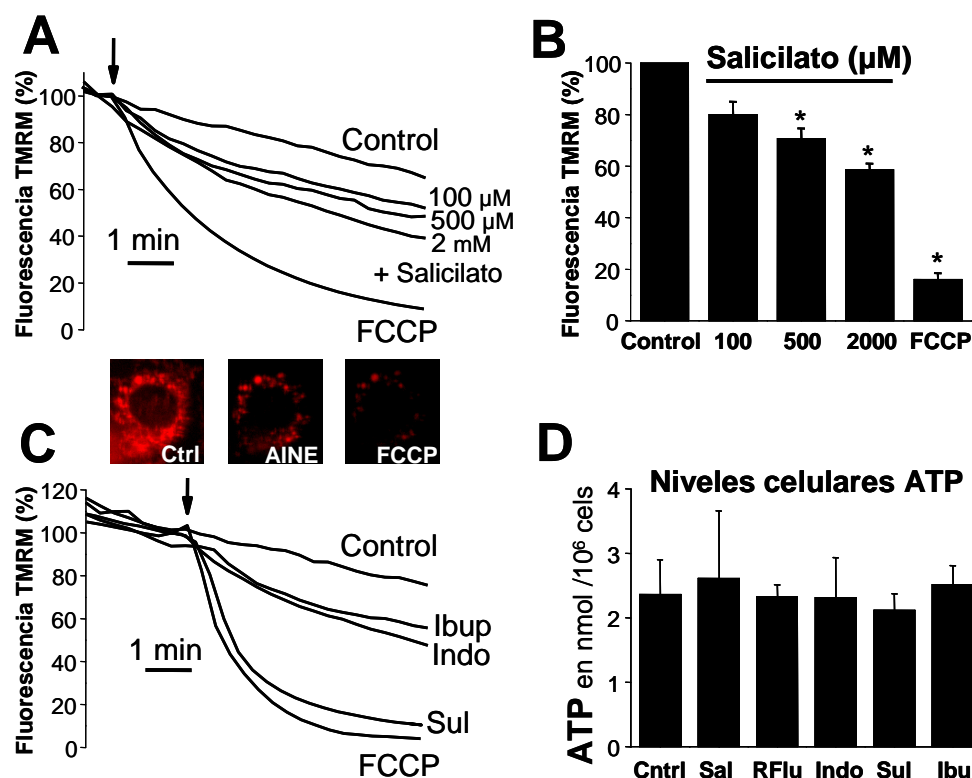


Figura 30: los AINEs despolarizan la mitocondria en las células A10. Los registros del potencial mitocondrial se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia cargando las células con la sonda TMRM (100 nM) durante 30 min a temperatura ambiente. A, los registros representativos de 3 experimentos independientes muestran el apagamiento de la fluorescencia del TMRM inducida por la adición de FCCP (10 μM) o diferentes concentraciones de salicilato (100-2000 μM). Los valores de fluorescencia para cada célula individual se normalizaron en relación a los valores obtenidos antes del tratamiento. B, dosis dependencia de la disminución de fluorescencia del TMRM por el tratamiento con salicilato, las barras muestran valores de la media ± EEM de 3 experimentos independientes (*p<0,05). C, efecto producido sobre el apagamiento de la fluorescencia del TMRM al adicionar FCCP (10 μM) o ibuprofeno, indometacina y sulindac (100 μM), normalizando los valores de cada célula individual en relación a los valores obtenidos antes del tratamiento. Experimento representativo. D, las barras indican los efectos de diferentes AINEs (R-Flurbiprofeno, indometacina, sulindac, ibuprofeno (100 μM) y salicilato (500 μM) sobre los niveles celulares de ATP de las células A10 (n=3; p>0,05).

7. SALICILATO Y DEMÁS AINEs PREVIENEN LA CAPTACIÓN DE Ca²⁺ MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS A10

Puesto que el potencial mitocondrial es la fuerza electromotriz que permite la captación de Ca²⁺ por la mitocondria, decidimos investigar en último término si los cambios producidos en dicho $\Delta\Psi$ por el salicilato y los demás AINEs, sería suficiente para inhibir la captación de Ca²⁺ mitocondrial. Para registrar las variaciones en la [Ca²⁺]_{mit} mediante imagen de bioluminiscencia, las células A10 se transfectaron con el plásmido GFP-AEQmit que permite expresar aecuoquina en la matriz mitocondrial. Transcurridas 24 h, la aecuoquina mitocondrial fue reconstituida con celenteracina y se procedió a realizar los experimentos de monitorización de la concentración de Ca²⁺ mitocondrial

mediante imagen de bioluminiscencia en células permeabilizadas en presencia de concentraciones de Ca^{2+} similares a las que se alcanzan en los microdominios de Ca^{2+} que inducen captación de Ca^{2+} mitocondrial. El motivo de hacer los experimentos en células permeabilizadas permite discernir directamente los efectos de los AINEs en la mitocondrias ya que, de hacerse en células intactas, cabe la posibilidad de que los AINEs inhiban la captación mitocondrial de Ca^{2+} simplemente al inhibir SOCE. Una vez reconstituidas las células, se procedió a seleccionar un campo microscópico con células que presentasen fluorescencia debida a GFP. Entonces, las células se permeabilizaron en presencia de digitonina (20 μM) en medio interno con una concentración de Ca^{2+} en torno a 200 nM. A continuación se perfundieron las células permeabilizadas en el mismo medio interno libre de digitonina y en ese momento, las células fueron estimuladas con el mismo medio con una concentración de Ca^{2+} intracelular elevada (10 μM) suficiente para generar un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ (Fig. 31A). Este incremento fue inhibido tras incubarse durante 5 min las células con FCCP (Fig.31B) o con los diferentes AINEs, salicilato a 500 μM (Fig.31C), ibuprofeno e indometacina a 100 μM (Fig.31D y E). Estos resultados sugieren que el salicilato y los demás AINEs despolarizan la mitocondria e inhiben la captación de Ca^{2+} por dichos orgánulos. Puesto que la captación de Ca^{2+} mitocondrial es esencial para mantener SOCE en las células A10, la presencia de los AINEs impediría que las mitocondrias retirasen el exceso de Ca^{2+} de los microdominios de Ca^{2+} , conduciendo a la inactivación de los canales SOCs y por consiguiente a SOCE. Esta interpretación es consistente con los resultados obtenidos en células RBL.

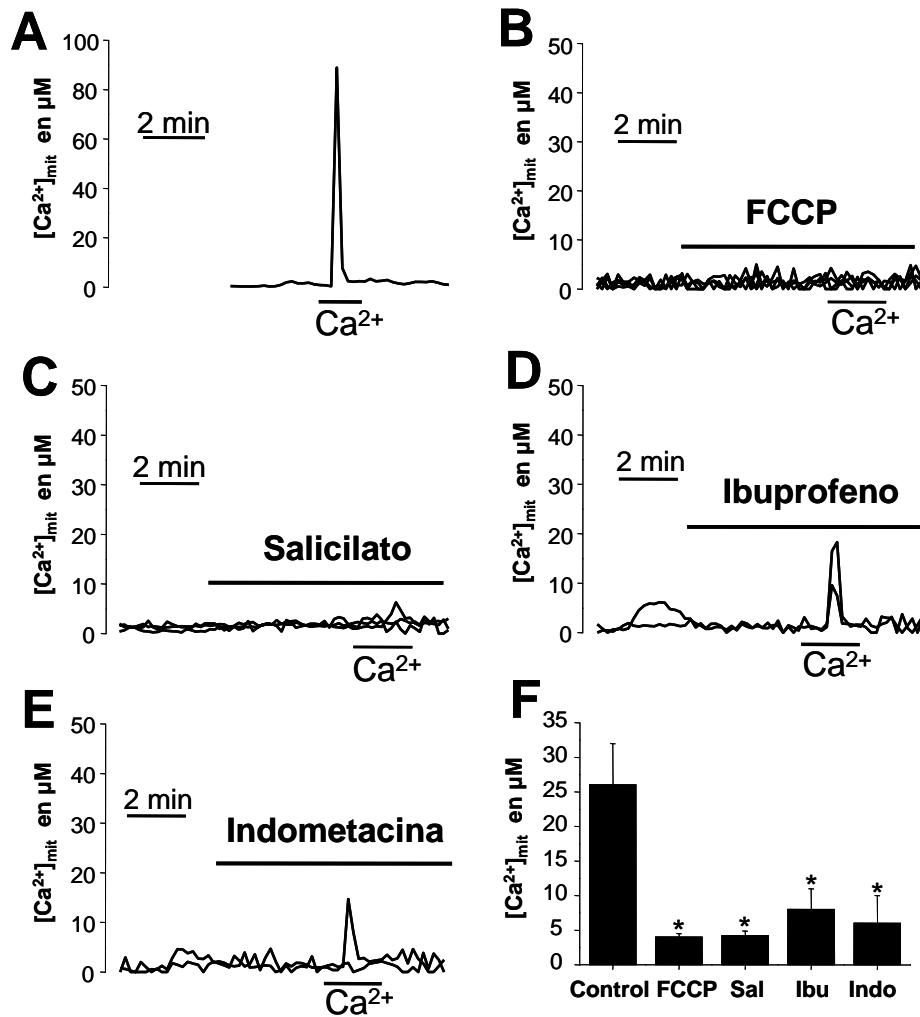


Figura 31: Los AINEs inhiben la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Las células A10 se transfectaron con el plásmido GFP-AEQmit y se estimó la captación de Ca^{2+} mitocondrial mediante imagen de bioluminiscencia en célula única. En todos los experimentos las células fueron permeabilizadas con baja concentración de digitonina (20 μM) en medio interno. **A**, incremento en la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por la perfusión de las células con medio interno que contenía 10 μM de Ca^{2+} . **B**, FCCP (10 μM) inhibe el incremento producido en la $[Ca^{2+}]_{mit}$ al perfundir las células con medio interno alto en Ca^{2+} (10 μM). **C-E**, efectos similares de inhibición en la $[Ca^{2+}]_{mit}$ se observaron al incubar las células con salicilato (C, 500 μM), ibuprofeno (D, 100 μM), e indometacina (E, 100 μM). Todas las gráficas muestran registros representativos de 4-7 células estudiadas en al menos 3 experimentos independientes. **F**, las barras muestran los valores medios \pm EEM de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_{mit}$ observados tras el tratamiento con los diferentes AINEs en al menos 3 experimentos independientes. Cada una de las barras es significativamente diferente del control (* $p < 0,05$).

2ª PARTE RESULTADOS:

MODELO ESTUDIO: CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA (hCASMCS)

Tras estudiar los efectos y el mecanismo de acción de los AINEs en las células A10, una línea celular procedente de músculo liso de aorta de rata neonatal, decidimos validar nuestros resultados en un modelo más próximo a la situación de los desórdenes proliferativos del lecho vascular en pacientes. Para ello, decidimos caracterizar el papel del Ca^{2+} y los canales de Ca^{2+} en la proliferación de las células de músculo liso de arteria coronaria humana así como estudiar los efectos de los AINEs y su mecanismo de acción en este modelo.

1. LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA DISMINUYE CON EL TIEMPO DE CULTIVO

En primer lugar observamos que las células coronarias humanas en cultivo primario sufrían un cambio morfológico con el tiempo de cultivo, pues se diferenciaba claramente una morfología fusiforme en la mayoría de las células en pases bajos ($\leq P3$), cambiando hacia una forma más poligonal a pases altos ($\geq P7$) (Fig.32A). Este cambio en la morfología iba asociado a un cambio dramático en la proliferación celular, siendo muy elevada durante los primeros pases de cultivo, y disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de cultivo de estas células hasta llegar a un estado de quiescencia celular (Fig.32B).

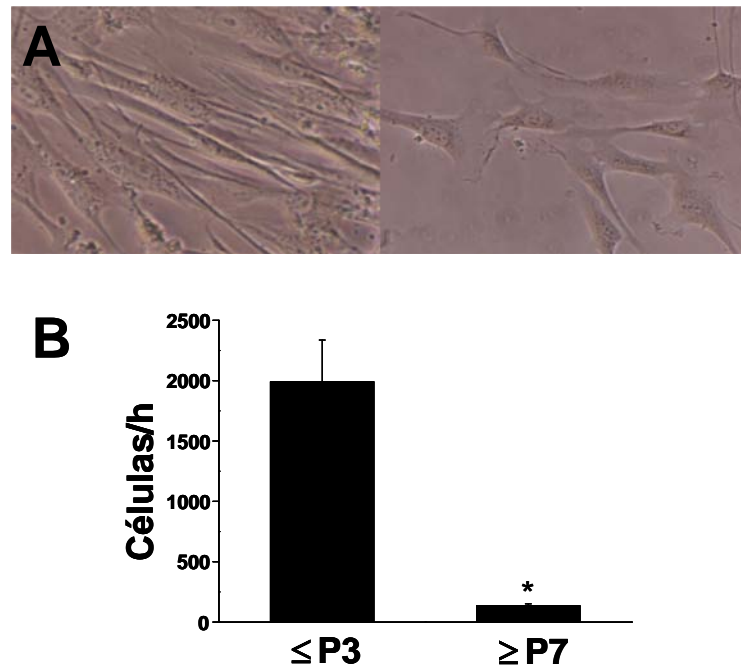


Figura 32: Proliferación de las células de músculo liso de arteria coronaria humana a pases bajos ($\leq P3$) y altos ($\geq P7$). A, imágenes de hCASMCs tomadas a diferentes pases al microscopio óptico con el objetivo 10x. B, la proliferación de hCASMCs es significativamente más alta a pases bajos que a pases altos. Las barras representan valores medios \pm EEM de la proliferación celular en tres experimentos independientes (* $p < 0,05$).

2. LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA CORONARIA HUMANA DEPENDE DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE SOCE

Conociendo previamente que la proliferación de las células A10 era inhibida muy significativamente (un 70-80% aproximadamente) en ausencia de Ca^{2+} extracelular, estudiamos la dependencia del Ca^{2+} extracelular en la proliferación de las células de músculo liso de arteria coronaria humana. Los resultados muestran que la proliferación es estrictamente dependiente del Ca^{2+} extracelular, pues al ser retirado el catión del medio de cultivo, añadiendo un quelante de dicho ión (EGTA 2 mM), las células dejaban de proliferar completamente. La readición de Ca^{2+} al medio restauraba la proliferación celular (Fig.33A). Dicha proliferación celular es también dependiente de SOCE, ya que al inhibir la entrada de Ca^{2+} por esta vía, con el antagonista clásico 2-APB (10 μ M), se inhibía la proliferación de las células, no ocurriendo lo mismo si el compuesto utilizado era un antagonista de los canales dependientes de voltaje como la nifedipina (1 μ M) (Fig.33A). Estos resultados sugieren que

SOCE, pero no VOCE, contribuye a la proliferación celular en las células de músculo liso de arteria coronaria humana.

Mediante imagen de fluorescencia estudiamos la presencia de SOCE y VOCE en las células de músculo liso de arteria coronaria humana. La Fig.33 muestra que la despolarización inducida con un medio con alta concentración de K^+ extracelular inducía el aumento de cociente de fluorescencias consistente con VOCE. Este incremento se inhibió casi completamente en presencia de 1 μ M Nifedipina, el antagonista específico de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L ($Ca_v1.2$) sugiriendo que este tipo de canal contribuye mayoritariamente a VOCE. La readición de Ca^{2+} extracelular a células tratadas con tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} indujo el incremento del cociente de fluorescencias consistente con SOCE. Este incremento fue inhibido de una manera dosis dependiente por 2-APB.

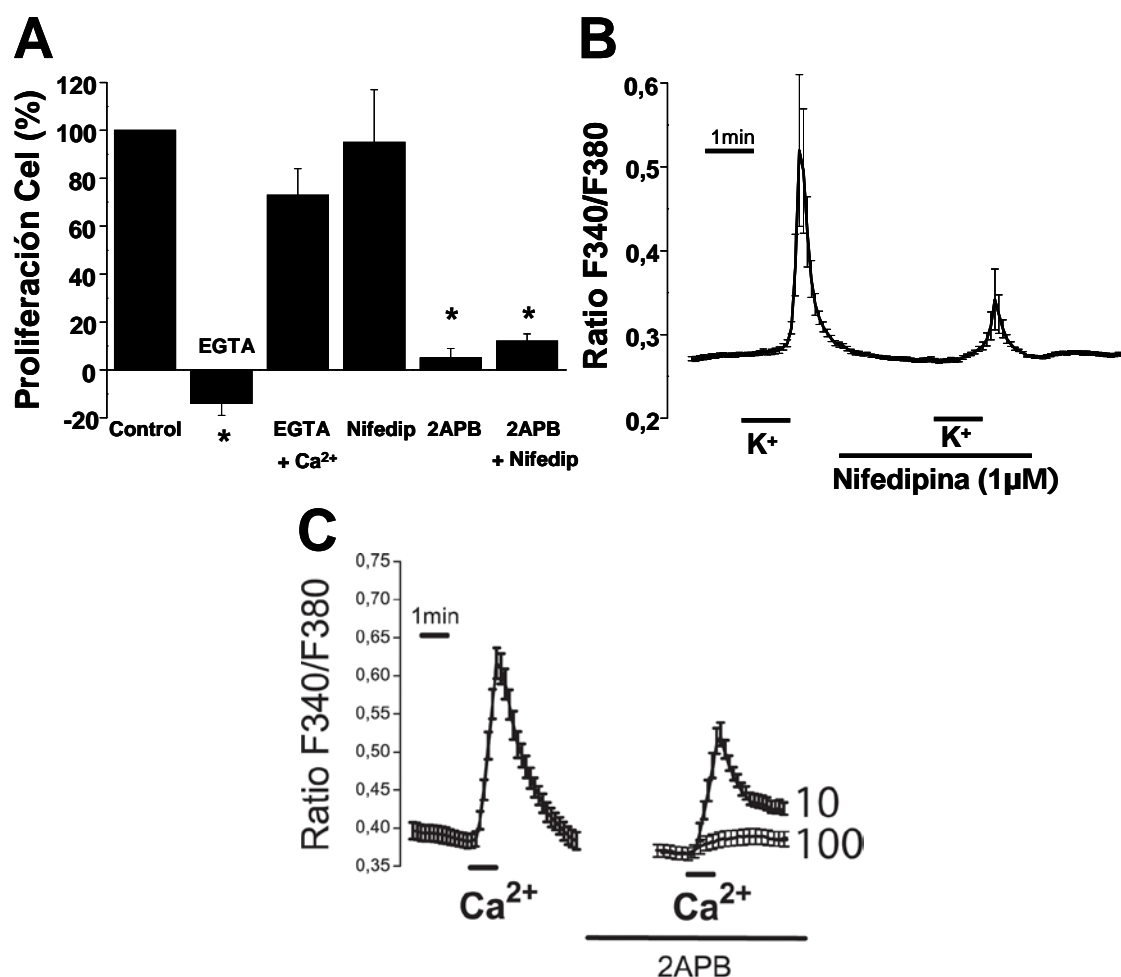


Figura 33: El Ca²⁺ y SOCE son necesarios para la proliferación de las células hCASMCs. **A**, las células fueron cultivadas *in vitro* durante 10 días en medio de cultivo completo (control) y con los diferentes compuestos (EGTA 2 mM, Nifedipina 1 μM, 2-APB 10 μM) para estudiar su efecto sobre proliferación. Los medios se cambiaron cada tres días para que no se produjera degradación o consumo de los compuestos y que estos permanecieran en las concentraciones adecuadas. Las barras muestran las medias ± EEM de 3 experimentos independientes (*p<0,05). **B**, efecto de Nifedipina 1 μM sobre el incremento del cociente de fluorescencias de fura2 inducido por un medio despolarizante con alta concentración de K⁺ extracelular (VOCE) en células de músculo liso de arteria coronaria humana. **C**, efectos de diferentes concentraciones de 2-APB (10 y 100 μM) sobre el incremento del cociente de fluorescencias de fura2 inducido por la re-adición de Ca²⁺ extracelular a células tratadas con tapsigargina (1 μM, 10 min) en medio libre de Ca²⁺ (SOCE), obtenidos en células de músculo liso de arteria coronaria humana. **B** y **C** son registros promedio representativos de al menos 3 experimentos independientes.

A continuación se caracterizó en más detalle la entrada capacitativa de Ca²⁺ en las células de músculo liso de arteria coronaria humana. Para ello se puso a punto la metodología de registro electrofisiológico de corrientes mediante la técnica de patch-clamp en su configuración whole-cell utilizando un equipo de electrofisiología planar o automático que mejora la eficiencia de los sellos de alta resistencia para la medida de corrientes de baja intensidad. El tratamiento intracelular con quelantes de Ca²⁺ inducía la aparición de una corriente de entrada consistente con la aparición de una corriente operada por vaciamiento de depósitos intracelulares. La Fig.34 muestra la cinética de la

corriente generada así como la relación I/V. Esta corriente fue inhibida con el antagonista de SOCE 2-APB.

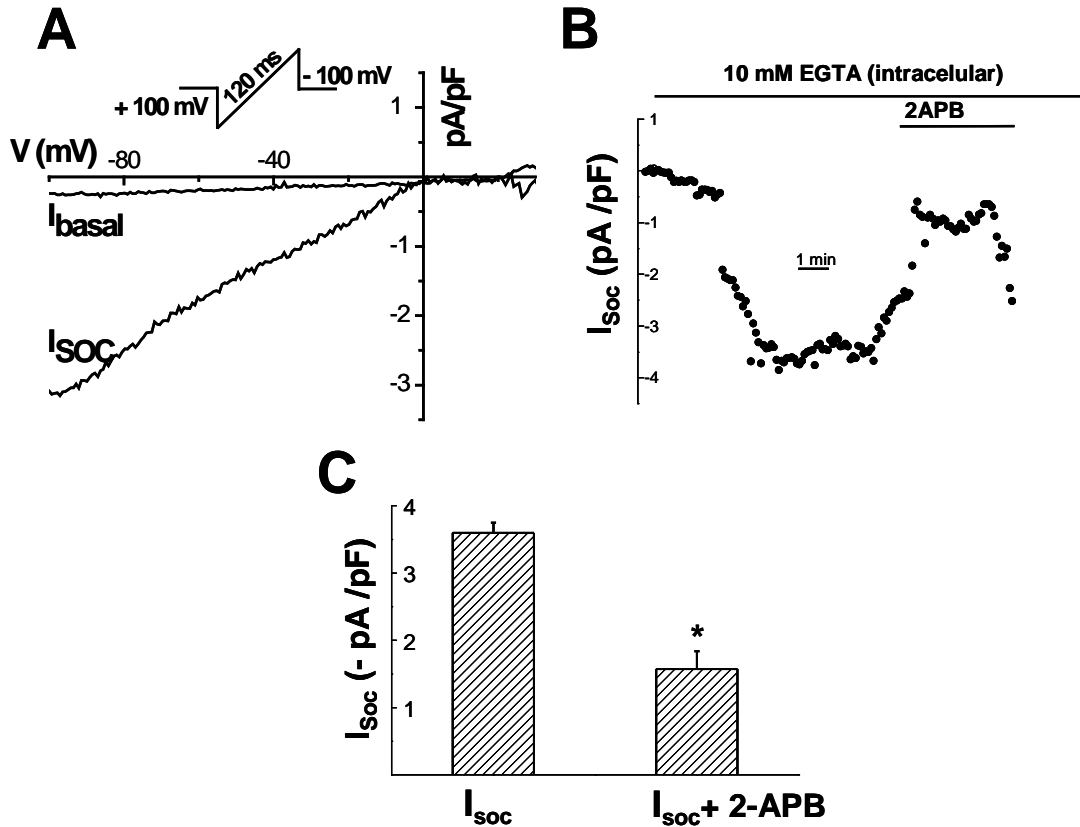


Figura 34: Corriente generada por el vaciamiento de depósitos intracelulares en células de músculo liso de arteria coronaria humana. Las hVSMCs se levantaron para obtener una suspensión celular. A continuación, las corrientes iónicas de las células se registraron con el equipo planar port-a-patch de Nanion con el que se obtuvieron sellos de alta resistencia ($G\Omega$). Usando EGTA en el medio intracelular se generó una corriente de entrada cuya relación I/V se muestran en **A**. **B**, muestra la cinética de la corriente y su inhibición por 2-APB. **C**, efectos de 2-APB sobre la densidad de la corriente. Los datos son el promedio de 3-10 células.

3. SOCE ES PREDOMINANTE EN CÉLULAS PROLIFERANTES MIENTRAS QUE VOCE PREDOMINA EN CÉLULAS QUIESCENTES

Una vez determinada la relevancia crítica de SOCE en la proliferación de estas células, estudiamos los posibles cambios en la abundancia relativa de SOCE y VOCE durante la modulación fenotípica o transición del fenotipo proliferativo al fenotipo quiescente. Para el estudio de SOCE se utilizó el mismo protocolo que para las células A10 (Fig R1), excepto en el protocolo de

retirada/readición de Ca^{2+} extracelular se utilizó una concentración de Ca^{2+} mayor en el medio extracelular (3 mM) para apreciar mejor SOCE. Observamos que todas las células mostraban SOCE, tanto aquellas estudiadas a pases bajos, cuando las células presentaban un fenotipo proliferativo, como las estudiadas a pases altos, cuando las células dejaban de proliferar. Sin embargo, la magnitud del pico de Ca^{2+} fue significativamente mayor en el fenotipo proliferativo que en el quiescente (Fig. 35A).

Para poner de manifiesto VOCE se trataron las células con un medio despolarizante que contenía alta concentración de K^+ (145 mM). Observamos que muchas células con fenotipo proliferativo no mostraban incremento alguno de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ al despolarizar. Sin embargo todas las células estudiadas en el estado quiescente mostraron VOCE. Además, el pico de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las células que respondían a la despolarización fue significativamente mayor en las células con fenotipo quiescente (Fig.35B).

Para poder comparar estadísticamente SOCE y VOCE calculamos un **parámetro de entrada de Ca^{2+}** multiplicando el incremento del cociente (Ratio) de emisiones de fluorescencia excitadas a 340 y 380 nm por el tanto por uno de células que respondieron. El resultado muestra las diferencias globales de entrada de Ca^{2+} vía SOCE y VOCE en células con fenotipo proliferativo y quiescente (Fig.36). Los resultados indican que SOCE es la vía de entrada de Ca^{2+} predominante en las células con fenotipo proliferativo mientras que tras la diferenciación, cuando las células ya no proliferan o lo hacen muy lentamente, SOCE disminuye enormemente llegando a predominar VOCE. En términos cuantitativos, el cociente SOCE/VOCE disminuye unas 15 veces desde el fenotipo proliferativo al no proliferativo, o lo que es lo mismo, la diferenciación aumenta 15 veces el cociente VOCE/SOCE.

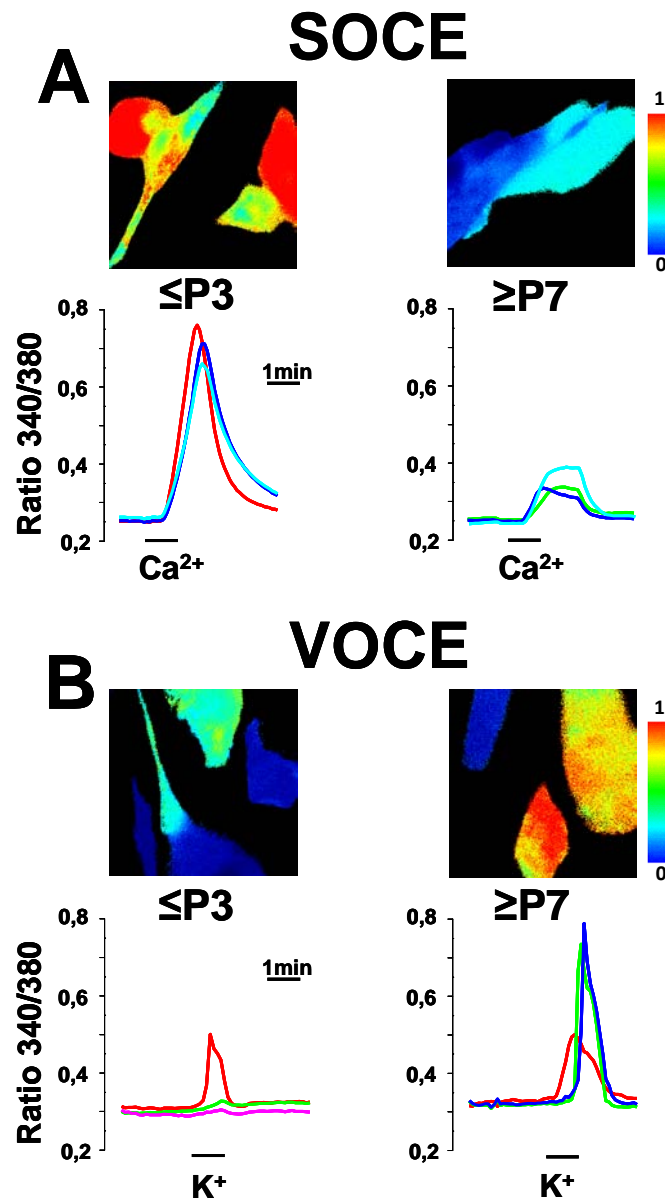


Figura 35: Incrementos del cociente de fluorescencias que reflejan la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducidos por SOCE y VOCE en células coronarias (hCASMCs) con fenotipo proliferativo ($\leq P3$) y quiescente ($\geq P7$). Las células fueron cargadas con fura-2/AM durante 90 min a T^a ambiente y se registraron los cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ mediante imagen de fluorescencia. En la parte inferior de cada panel se representan registros de incrementos en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Ratio 340/380) correspondientes a 3 células individuales representativas. En la parte superior se muestran imágenes de dicho ratio codificadas en pseudocolor. **A, la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE es mayor en células a pases bajos que altos. Las células se incubaron 10 min con tapsigargina (1 μ M) en medio libre de Ca^{2+} y posteriormente, se perfundieron con medio externo con Ca^{2+} 3 mM estimulando así la entrada de éste al interior celular, vía canales operados por depósito. **B**, se despolarizó la membrana celular con medio externo alto en K^+ (75 mM) para estimular VOCE, siendo mayor ésta en las células a pases altos.**

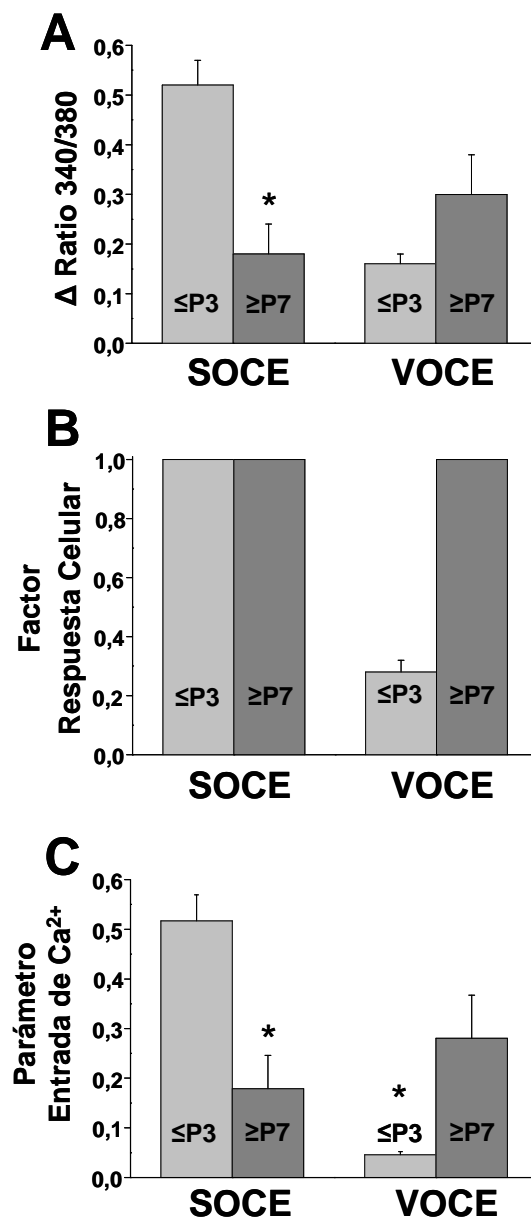


Figura 36: SOCE en hCASMCs es mayor a pases bajos y VOCE, a pases altos. A, incrementos del Ratio 340/380 inducidos por SOCE y VOCE en células coronarias a pases bajos ($\leq P3$) y pases altos ($\geq P7$). Se representa la media \pm EEM de los incrementos observados en las células que respondieron. **B**, Fracción de células (tanto por uno) que muestran SOCE o VOCE a pases bajos ($\leq P3$) y altos ($\geq P7$). **C**, El parámetro de entrada de Ca^{2+} se calculó con el producto del incremento del ratio de fluorescencias por la fracción de células que respondieron.

Los datos anteriores sugieren que el cambio en la proliferación celular podría ser debido a un cambio dramático en SOCE ya que esta vía de entrada de Ca^{2+} es esencial para la proliferación de las células de músculo liso de arteria coronaria humana y esta vía disminuye dramáticamente en las células quiescentes. Para confirmar que este efecto se debe a una disminución de las corrientes operadas por depósitos estudiamos la densidad de corriente obtenida por quelación del Ca^{2+} intracelular en células proliferativas y quiescentes. Los resultados se muestran en la Fig. 20. La densidad de corriente disminuye

significativamente en células quiescentes respecto a las proliferativas sugiriendo que la disminución de SOCE se debe a una disminución de los canales implicados o a su inhibición.

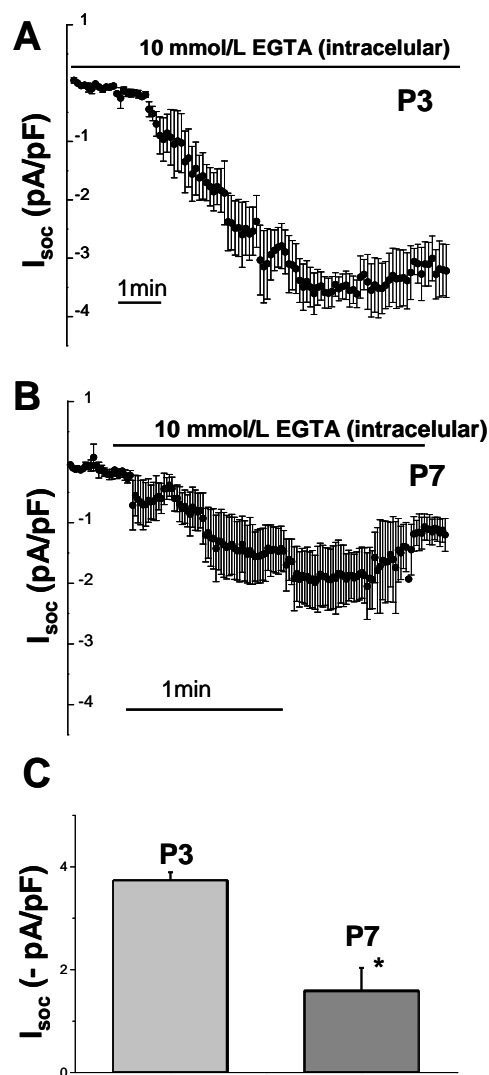


Figura 37: Densidad de corriente operada por depósitos en células de músculo liso de arteria coronaria con fenotipo proliferativo ($\leq P3$) y quiescente ($\geq P7$). La densidad de corriente inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares fue registrada en células de músculo liso de arteria coronaria humana mediante patch-clamp automático en la configuración de whole cell en células proliferativas ($\leq P3$) y células quiescentes. Los datos son la media \pm EEM de 6-10 células.

4. LA VARIACIÓN EN SOCE Y VOCE CON EL NÚMERO DE PASES, NO ES DEBIDA A CAMBIOS A NIVEL DE RNAm DE GENES IMPLICADOS EN ESTAS VÍAS DE ENTRADA DE Ca^{2+}

Para averiguar si los cambios en SOCE y VOCE observados en las células coronarias son debidos a cambios en la expresión de genes, hemos estudiado la expresión del RNAm de componentes moleculares de los canales implicados mediante RT-PCR cuantitativa, incluyendo la subunidad α_{1C} del canal de Ca^{2+} operado por voltaje tipo L $\text{Ca}_v1.2$ (*CACNA1C*), y los genes para STIM1 y ORAI1, dos proteínas implicadas en la entrada capacitativa de Ca^{2+} . En el caso de *CACNA1C* obtuvimos una abundancia relativa del mensajero similar a pases bajos ($\leq P3$) y altos ($\geq P7$). Sin embargo, tanto ORAI1 como STIM1 presentaban una abundancia ligeramente mayor a pases altos, cuando las células no proliferaban, que a pases bajos, cuando sí proliferaban, aunque la diferencia tan solo era significativa en el caso de *Orai1* (Fig.38). Para calcular la abundancia relativa tomamos como gen de referencia el gen de la β -actina, un gen que no variaba su expresión con el número de pases celulares.

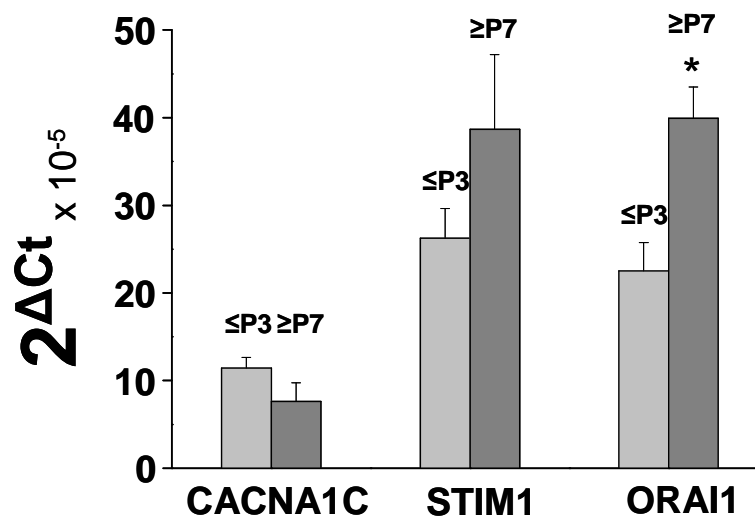


Figura 38: Expresión del RNAm de proteínas que participan en VOCE, CACNA1C, y en SOCE, STIM1 y ORAI1. Abundancia relativa de RNAm de la subunidad α_{1C} de $\text{Ca}_v1.2$, STIM1 y ORAI1 a pases bajos y altos de hCASMcs. ΔCt proviene de la diferencia entre la Ct del gen objeto de estudio y la Ct de la β -actina (gen de referencia). La expresión de ORAI1 a pases altos sufre un incremento significativo con respecto a pases bajos, mientras que la variación en el caso del canal de Ca^{2+} operado por voltaje y de STIM1 no es significativa.

5. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS STIM1, ORAI1 Y LA SUBUNIDAD α_{1C} DE $Ca_v1.2$, EN CÉLULAS CORONARIAS PROLIFERATIVAS Y QUIESCENTES

Una vez demostrado que la expresión de los genes implicados en la entrada capacitativa de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje no variaba con el número de pases, nos preguntamos si los cambios observados en SOCE y VOCE podrían ser debidos a diferencias en la abundancia relativa de las proteínas implicadas. Para ello llevamos a cabo un estudio mediante la técnica de Western blot (Fig.39) utilizando anticuerpos específicos frente a las proteínas cuya expresión génica habíamos estudiado mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron una mayor expresión de la subunidad α_{1C} del canal $Ca_v1.2$ en células quiescentes, consistente ello con el incremento de VOCE en estas células. ORAI1 fue similar en células a pases bajos (proliferativas) y a pases altos (quiescentes). Sin embargo, la proteína STIM1 estaba significativamente reducida en células quiescentes en relación a las células proliferativas.

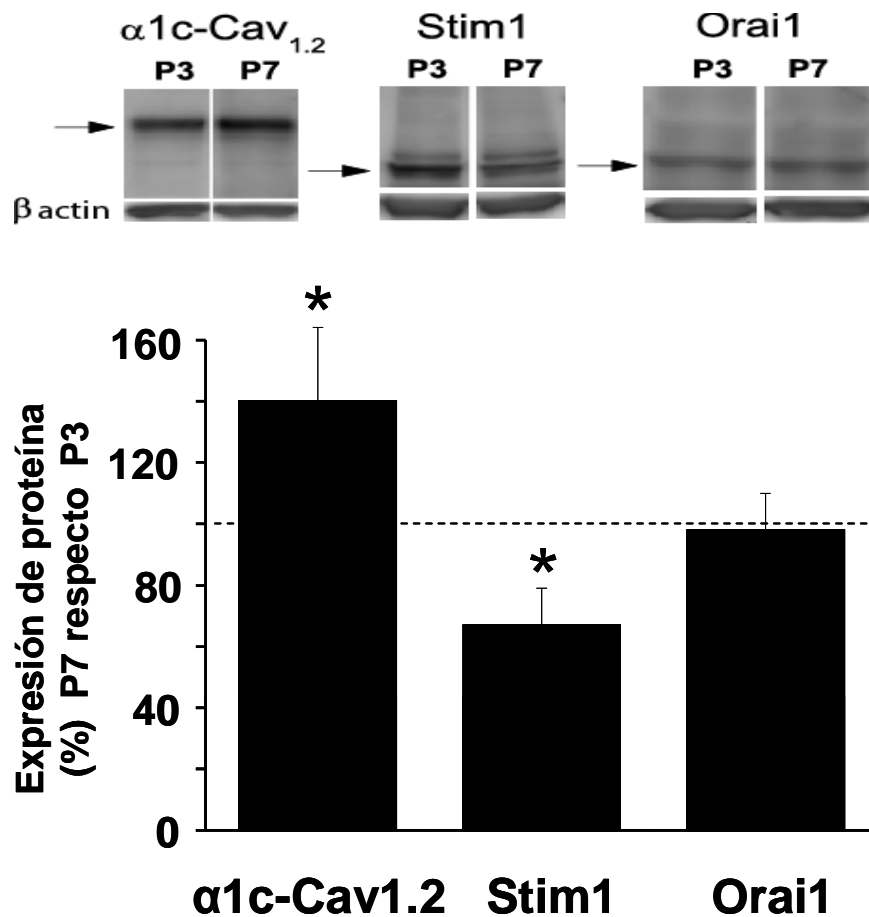


Figura 39: Niveles de α_{1c} -Ca_v 1.2, STIM1 y ORAI1 en células coronarias proliferantes y quiescentes. Análisis mediante western blot de la subunidad α_{1c} del canal Cav 1.2 y de las proteínas STIM1 y ORAI1 de células proliferativas (\leq P3) y células quiescentes (\geq P7). Las bandas específicas correspondientes a cada proteína (150 kDa α_{1c} , 75 kDa STIM1 y 50 kDa ORAI1) fueron cuantificadas en relación a la proteína β actina. En la parte superior de la figura se muestra un ejemplo de estas bandas obtenido en un western representativo. La gráfica de la parte inferior representa el nivel de expresión de cada una de las proteínas (en %) de células proliferativas (\geq P7) en relación a células quiescentes (\leq P3). Cada una de las barras muestra la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes para cada proteína, siendo significativamente diferentes cuando $p < 0,05$ (*).

6. LOS AINES INHIBEN LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN DE LAS hCASCs

Una vez caracterizado fenotípicamente nuestro cultivo primario de células coronarias, así como los canales de Ca^{2+} implicados en proliferación celular, quisimos conocer si los AINEs serían capaces de inhibir la proliferación y migración de las células coronarias a pases bajos, cuando éstas presentan una elevada tasa de ambos procesos. La figura 40A muestra un ejemplo de los experimentos de migración realizados con un equipo de registro de migración basado en la impedancia eléctrica en los que se monitorizaron los cambios en la impedancia de un cultivo celular sobre un campo de microsensores (ver más detalles en "Material y Métodos"). Como se puede observar, la retirada del Ca^{2+} del medio extracelular disminuye los cambios a corto plazo en la impedancia consistentemente con una inhibición de la migración celular. La adición del antagonista de SOCE 2-APB inducía una inhibición de la curva de impedancia consistente con la inhibición de la migración celular. A continuación estudiamos los efectos de una serie de AINEs sobre la migración celular incluyendo salicilato, ibuprofeno, indometacina y sulfuro de sulindac. Todos los AINEs indujeron efectos indistinguibles de los de 2-APB.

Por otra parte, decidimos estudiar si los AINEs anteriores eran capaces de inhibir la proliferación de las células coronarias humanas. Como se puede apreciar en la Fig.40B todos los AINEs testados inhibieron muy significativamente la proliferación de las células coronarias humanas de un modo muy similar al inducido por 2-APB. Además, el análogo estructural R-flurbiprofeno que carece de propiedades anti-inflamatorias fue igualmente capaz de inhibir la proliferación celular. Estos resultados indican que los AINEs inhiben la migración y proliferación celulares, unos parámetros que dependen, como se ha mostrado anteriormente, de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

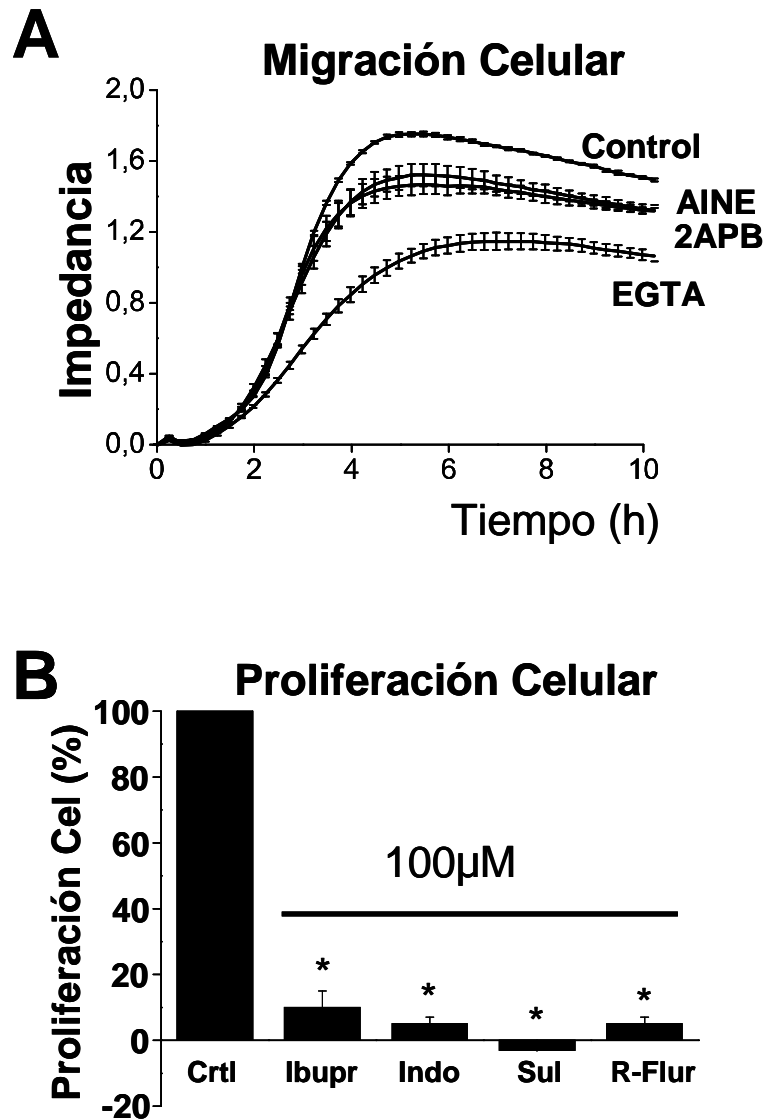


Figura 40: Los AINEs inhiben la migración y la proliferación de las hCASMCS. **A**, la migración celular es inhibida en ausencia de Ca^{2+} en el medio, o en presencia de 2APB ($10 \mu\text{M}$) o indometacina ($100 \mu\text{M}$). Prácticamente la totalidad de las células migran en las 8 primeras horas del experimento. **B**, efecto sobre la proliferación de las hCASMCS de diferentes AINEs (salicilato $500 \mu\text{M}$; ibuprofeno, indometacina y sulindac $100 \mu\text{M}$). Cada barra representa los valores medios \pm EEM de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$ respecto al control).

6.1 LOS AINEs INHIBEN SOCE

Una vez observado que los AINEs inhibían la proliferación de las hCASCs, investigamos la posibilidad de que el efecto antiproliferativo fuera consecuencia de su acción sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+} como en las células A10. Los resultados mostrados en la Fig.41 demuestran que los AINEs inhiben SOCE a las mismas concentraciones a las que inhibían la proliferación celular (salicilato 500 μM ; demás AINEs 100 μM) (Fig.40).

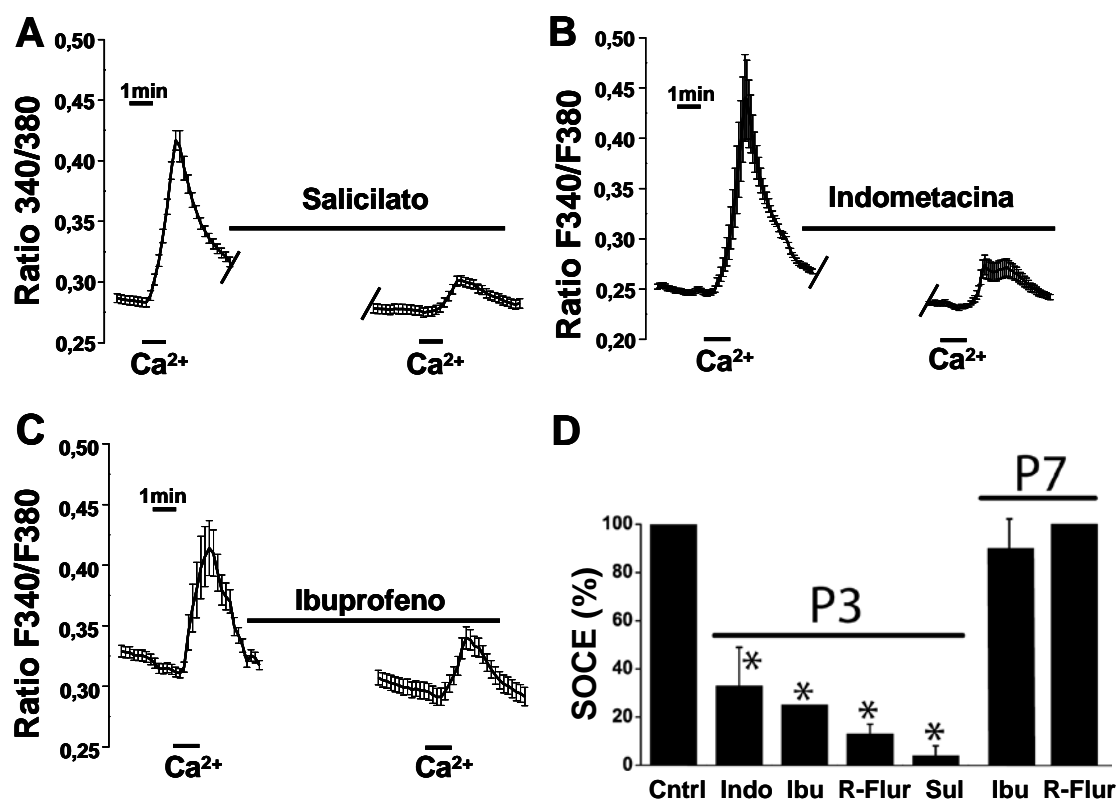


Figura 41: Los AINEs inhiben SOCE en hCASCs. Las células se cargaron con fura-2/AM durante 90 min y, a continuación, se incubaron durante 10 min con taspigargina (1 μM) en medio libre de Ca^{2+} . Los experimentos comenzaron con la perfusión en medio libre de Ca^{2+} , adicionándose éste en el medio externo (estímulo) lo que produce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ mediado por SOCE. A continuación, se perfundieron las células en medio libre de Ca^{2+} en presencia de los diferentes AINEs (salicilato 500 μM ; ibuprofeno, indometacina y sulindac 100 μM), antes de reaccionar en el medio Ca^{2+} junto con los AINEs e inducir de nuevo SOCE. Cada una de las gráficas es un registro de 3 experimentos representativos siendo la media \pm EEM de 10, 12 y 9 células respectivamente. **D**, las barras representan el efecto de los diferentes AINEs (salicilato 500 μM ; ibuprofeno, indometacina y sulindac 100 μM) sobre el porcentaje de SOCE en las células de músculo liso de arteria coronaria humana en células P3 (proliferativas) y P7 (quiescentes), obtenido mediante los experimentos de fluorescencia. Los AINEs inhibieron significativamente SOCE en células P3 (* $p < 0,05$) pero no inhibieron SOCE en células quiescentes. Téngase en cuenta que los datos son normalizados respecto al tamaño de SOCE en P3 y P7, siendo el valor absoluto de SOCE en P7 mucho menor que en P3.

6.2 SOCE ESTÁ CONTROLADA POR LA MITOCONDRIA EN LAS hCASMCS

Puesto que los AINEs inhiben la entrada capacitativa de Ca^{2+} y, de acuerdo con nuestros resultados anteriores, este efecto no es directo sino mediado por el control mitocondrial de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , se investigó si ésta está regulada por la mitocondria en las células coronarias. Para ello, en primer lugar estudiamos los efectos de la despolarización mitocondrial sobre SOCE utilizando un desacoplante mitocondrial (FCCP 10 μM) junto al inhibidor de la ATP sintasa (oligomicina 0,12 μM). La Fig.42 muestra la inhibición de SOCE por el colapso del potencial mitocondrial, siendo este efecto reversible tras el lavado del desacoplante.

A continuación comprobamos si la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducía captación de Ca^{2+} mitocondrial. Los experimentos de medida de Ca^{2+} mitocondrial se llevaron a cabo mediante imagen de bioluminiscencia de células que expresan aecurina dirigida a mitocondrias. Para ello las células se transfectaron con aecurina dirigida a mitocondria (GFP-AEQmit) y se reconstituyeron con celenterazina (ver más detalles en "Material y Métodos"). Observamos que las mitocondrias eran sensibles a los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ producidos por una vía u otra de entrada de Ca^{2+} , en función del fenotipo en el que se encontrasen las células. Así, a pases bajos (fenotipo proliferativo), SOCE producía incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ (Fig.43) pero VOCE era incapaz de hacer lo mismo. Por el contrario, a pases altos (fenotipo no proliferativo) VOCE generaba captación mitocondrial de Ca^{2+} mientras que SOCE no lo hacía (Fig.).

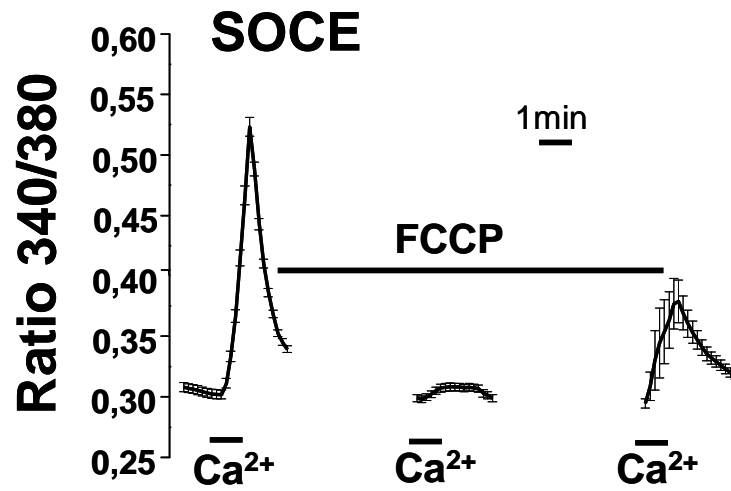


Figura 42: La despolarización mitocondrial inhibe SOCE en hCASMcs. El desacoplante mitocondrial FCCP (10 μ M + oligomicina 0,12 μ M) inhibe de forma reversible SOCE. La gráfica muestra el registro promedio del cociente de fluorescencias (media \pm EEM) de 8 células representativo de 3 registros independientes.

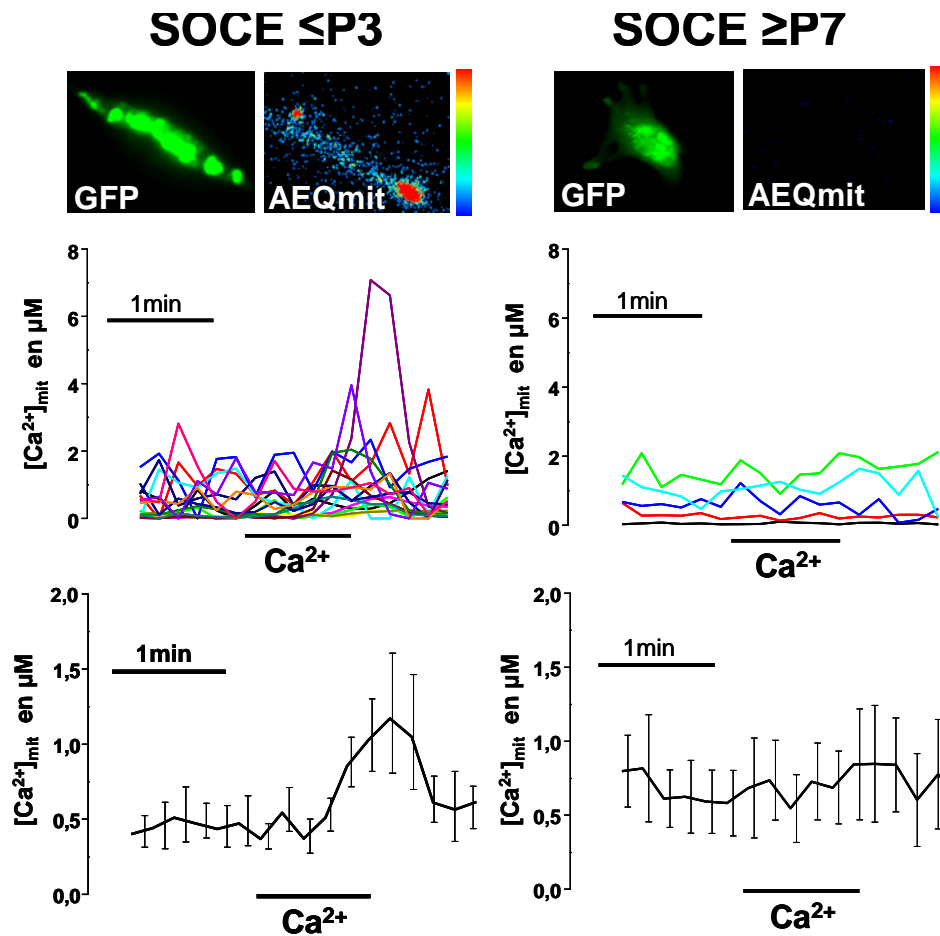


Figura 43: SOCE induce captación de Ca^{2+} mitocondrial en hCASCs a pases bajos ($\leq P3$) pero no a pases altos ($\geq P7$). Las células se transfectaron con aecuatorina dirigida a mitocondria (GFP-AEQmit), se reconstituyeron con celenterazina h, y se midió la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en célula única mediante imagen de bioluminiscencia. Las células se trataron con tapsigargina ($1 \mu M$) durante 10 min en medio libre de Ca^{2+} para vaciar los depósitos, a continuación se perfundieron con medio externo que contenía Ca^{2+} para estimular SOCE y los fotones emitidos reflejo de la captación de Ca^{2+} mitocondrial fueron registrados. Las imágenes superiores del panel muestran imágenes típicas de fluorescencia de una célula transfectada (izquierda) y de fotones acumulados (derecha) durante SOCE. Las gráficas superiores indican los valores de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las células individuales de un experimento representativo y las inferiores representan la media \pm EEM de todas las células estudiadas en el total de experimentos realizados, siendo $n=17$ células en pases $\leq P3$ y $n=5$ células en pases $\geq P7$. Las escalas de pseudocolor que se muestran en la parte superior indican valores de 0 (azul) a 10 (rojo) fotones/pixel

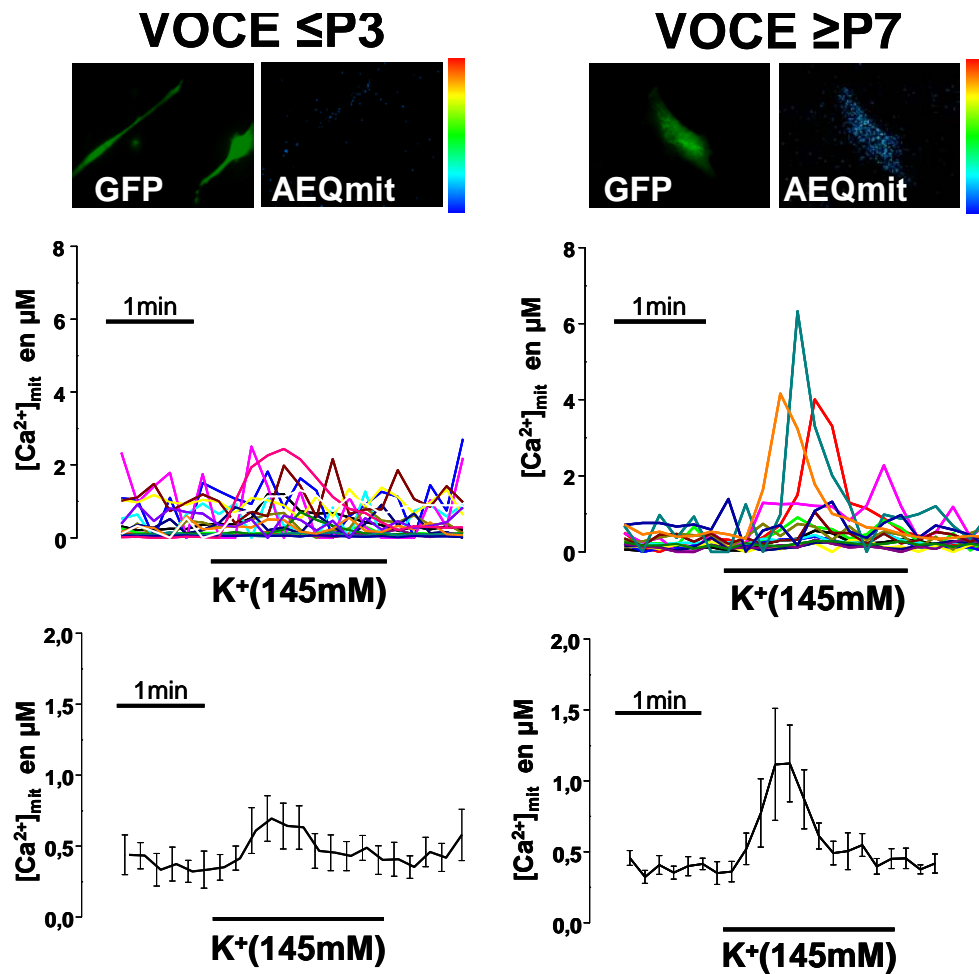


Figura 44: VOCE induce captación de Ca^{2+} mitocondrial en hCASCs a fases altas ($\geq P7$) pero no a fases bajas ($\leq P3$) Las células se transfectaron con aequorina dirigida a mitocondria (GFP-AEQmit), se reconstituyeron con celenterazina h, y se midió la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en célula única mediante imagen de bioluminiscencia. Las células se perfundieron con un medio alto en K^+ (145 mM) para inducir VOCE, y los fotones emitidos reflejan la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, sólo cuando las células ya no proliferan. Las imágenes superiores del panel muestran imágenes típicas de fluorescencia de células transfectadas (izquierda) y de fotones acumulados (derecha) durante VOCE. Las gráficas superiores indican los valores de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las células individuales de un experimento representativo y las inferiores representan la media \pm EEM de todas las células estudiadas en el total de experimentos realizados, siendo $n=18$ células en fases $\leq P3$ y $n= 15$ células en fases $\geq P7$. Las escalas de pseudocolor que se muestran en la parte superior indican valores de 0 (azul) a 10 (rojo) fotones/píxel.

V. DISCUSIÓN

Como se mencionó arriba, el **objetivo principal** del trabajo de Tesis presentado ha sido el estudio del papel de los canales de Ca^{2+} , particularmente la llamada entrada capacitativa de Ca^{2+} o SOCE en la proliferación de las células de músculo liso vascular y en el efecto antiproliferativo de ciertos anti-inflamatorios no esteroideos con posible valor terapéutico en diversos desórdenes proliferativos del lecho vascular como la restenosis y la arteriosclerosis. Para alcanzar este objetivo se han utilizado de modo secuencial dos modelos celulares de músculo liso vascular: en primer lugar la línea celular A10, una línea celular de músculo liso vascular procedente de aorta de rata embrionaria. En segundo lugar se han utilizado células de músculo liso vascular de arteria coronaria humana en cultivo primario, un modelo más cercano a la fisiopatología de las enfermedades proliferativas vasculares más corrientes como la restenosis y la arteriosclerosis. Estas últimas células son capaces de proliferar *in vitro* habiéndose sugerido que sufren un cambio fenotípico desde el fenotipo normal, contráctil y diferenciado propio del tejido intacto, al fenotipo no contráctil, indiferenciado y capaz de proliferar que podría remedar el tejido dañado.

Para alcanzar el objetivo principal mencionado arriba en primer lugar nos propusimos caracterizar la entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE), su control por la mitocondria y su papel en la proliferación en las células A10. La imagen de fluorescencia de células A10 cargadas con fura2 nos permitió identificar dos rutas principales de entrada de calcio en las células A10: la entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) y la entrada de calcio dependiente de voltaje (VOCE). Los resultados muestran que SOCE es cuantitativamente mayor que VOCE, lo que es consistente con el fenotipo indiferenciado y proliferativo de estas células (Beech, D.J. 2007; House, S.J. et al. 2008). Consistentemente, se ha descrito que la activación de SOCE promueve la expresión de genes implicados en la proliferación celular de las VSMCs, mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (VOCE) favorece más la diferenciación y la expresión de genes implicados en la contracción del músculo liso (Ren, J. et al. 2010).

La entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC) o SOCE en células A10 es muy similar a la existente en otros tipos celulares donde se describió originalmente como las células de leucemia basofílica de rata (células RBL) o las células de leucemia humana Jurkat. La SOCE descrita en las células A10 presenta ciertas características similares a la descrita en las células RBL y las Jurkat donde esta ruta y los canales subyacentes han sido caracterizados en más detalle. Por

ejemplo, la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las células A10 es inhibida por los antagonistas clásicos de SOCE como los lantánidos (La^{3+}) y el 2-APB además de por un nuevo y antagonista de I_{CRAC} el BTP-2 (Zitt, C. et al. 2004). A nivel molecular hemos comprobado que las células A10 expresan tanto Stim1 y Orai1, proteínas directamente implicadas en la activación del canal CRAC en células RBL y Jurkat y otros tipos celulares incluidas células de músculo liso vascular. Es bien conocido que SOCE es esencial para la expansión clonal (proliferación) de los linfocitos T activados. Del mismo modo, SOCE en las células A10 podría ser determinante en la proliferación de estas células. Esta conclusión se basa en que tanto la retirada del Ca^{2+} extracelular como la inhibición farmacológica de SOCE inhibe la proliferación de las células A10 de igual manera que inhibe, por ejemplo, la expansión clonal del linfocito T activado (Quintana, A. et al. 2011). Por tanto, SOCE podría ser relevante en el control de la proliferación de las células de músculo liso vascular. Otra característica común entre la SOCE descrita en las células A10 y otras descritas previamente es su modulación por las mitocondrias. Como se ha descrito anteriormente la actividad del canal CRAC en células RBL está facilitada por la habilidad de las mitocondrias de retirar calcio ávidamente a través del uniportador de calcio mitocondrial y a favor del enorme gradiente eléctrico que favorece la captación de calcio mitocondrial (Villalobos, C. et al., 2001; Núñez, L. et al., 2006; Valero, R. et al., 2008). Como describieron originalmente los grupos de los Profs. Hoth y Parekh (Hoth, M., et al., 1997; Gilabert y Parekh 2000), la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria favorece, por un lado, el correcto vaciamiento de los depósitos optimizando así la activación de SOCE y, por otro, impide la inactivación dependiente de Ca^{2+} del canal implicado. Así pues la captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias permite la activación óptima y mantenida en el tiempo de SOCE. El modo más sencillo de determinar si SOCE está regulada por la mitocondria en las células A10 es estudiar el efecto de la abolición de la captación de calcio por parte de las mitocondrias sobre esta vía de entrada. Nuestros resultados demuestran que en presencia de desacoplantes mitocondriales como FCCP, que abolen la fuerza electromotriz para la captación de Ca^{2+} mitocondria, SOCE resulta inhibido de un modo eficaz. El lavado del desacoplante restaura SOCE. En resumen, las células A10, unas células que muestran un fenotipo de músculo liso vascular proliferativo, muestran tanto SOCE como VOCE aunque SOCE es claramente predominante. Al igual que en otros casos previamente descritos, su actividad se inhibe por antagonistas de CRAC, está modulada por las mitocondrias y su inhibición previene la proliferación celular

La relevancia de SOCE en la proliferación de las células A10 y otras células de músculo liso vascular es consistente con resultados previos en los que se describe que la inhibición de ésta por antagonistas clásicos de SOCE inducía una disminución en la proliferación de las células A10, dependiente a su vez del Ca^{2+} en el medio extracelular. Estudios previos realizados en VSMCs de arterias coronarias (Takahashi, Y. et al. 2007) y aortas de rata (Potier, M. et al. 2009) relacionaban la disminución en la expresión de las proteínas Stim1 y Orai1 con una menor entrada capacitativa de Ca^{2+} , y por consiguiente, una menor proliferación celular. Estos datos podrían ser relevantes clínicamente en el tratamiento de desórdenes proliferativos vasculares. Consistentemente, la disminución de los niveles y/o actividad de Stim1 y Orai1 previene la restenosis en arterias carótidas de rata dañadas (Guo, R.W. et al. 2009). Por el contrario, el aumento de SOCE podría participar en la patología vascular. Por ejemplo, se ha descrito que en pacientes con hipertensión pulmonar producida por hipoxia, el aumento de SOCE en las células endoteliales de arteria pulmonar genera un remodelado vascular estimulando la migración y proliferación de dichas células.

Una vez determinado el papel determinante de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en la proliferación de las células A10 estudiamos, en segundo lugar los efectos antiproliferativos de salicilato y otros anti-inflamatorios esteroideos en las células A10 y si éstos están mediados por posibles acciones a nivel de canales de calcio. Estudios previos habían demostrado que diversos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben la proliferación de las VSMCs y la síntesis del DNA *in vivo* e *in vitro* independientemente de su actividad inhibitoria de la enzima ciclooxigenasa y sin resultar tóxicos para las células (Marra, D.E. et al. 2000; Weber, A. et al. 2000; Brooks, G. et al. 2003). Consistentemente con estos datos, nuestros resultados demuestran que salicilato, el principal metabolito de la aspirina, y otros AINEs incluyendo ibuprofeno, sulindac e indometacina inhiben la proliferación de las células A10. Puesto que SOCE es esencial para la proliferación en estas células estudiamos los efectos de los mismos tratamientos sobre SOCE. Todos los AINEs testados inhibían SOCE en estas células. Los efectos eran dosis dependientes y eran reproducidos por un análogo estructural (R-flurbiprofeno) que carece de actividad anti-inflamatoria ya que no inhibe la actividad ciclooxigenasa. Estos datos sugieren que los efectos anti-proliferativos de los AINEs podrían ser debidos a su capacidad de inhibir SOCE y, por tanto, serían independientes de su actividad anti-inflamatoria. Los efectos sobre el crecimiento celular no fueron debidos a posibles acciones tóxicas de estos compuestos ya que ni la viabilidad celular ni los niveles celulares de ATP fueron afectados por los diferentes AINEs. Además,

estos compuestos no inhibieron la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización excluyendo así que la diana sean los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Estos datos sugieren pues que los AINEs inhiben la proliferación de las células A10 al inhibir la entrada capacitativa de Ca^{2+} que es, como se demostró arriba, esencial en la proliferación de estas células.

Es interesante hacer notar que se observó cierta falta de correlación entre la inhibición de SOCE y la inhibición de la proliferación celular. Por ejemplo, sulindac, a 100 μM , inhibió completamente SOCE. Sin embargo, la misma concentración inhibió solamente entre un 65 y un 85 % la proliferación de las células A10. Una posible explicación a esta discrepancia es que los experimentos de medida de SOCE son agudos (10 min) mientras que los experimentos de medida de la proliferación celular requieren dos semanas. Sin embargo, el estudio de la proliferación en medio libre de Ca^{2+} reveló un dato interesante. La ausencia de Ca^{2+} extracelular no abolió completamente proliferación celular. De hecho, un componente en torno a un 20-25% de la proliferación celular sería independiente de la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE. En estas condiciones, incluso la inhibición total de SOCE, no podría abolir la proliferación celular. Consistente con esta interpretación, los antagonistas de SOCE (La^{3+} , 2B-APB y BTP2) inhibieron significativamente, aunque siempre parcialmente, la proliferación celular.

En tercer lugar, nos planteamos determinar el mecanismo por el cual los AINEs inhiben la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Para ello nos preguntamos si estos compuestos inhibían directamente los canales que median SOCE, o bien, inhibían esta ruta a través de un mecanismo indirecto. Para investigar estas posibilidades utilizamos un nuevo modelo celular: las células RBL de leucemia basofílica de rata. Este modelo fue seleccionado por dos razones de peso. En primer lugar, porque la corriente CRAC ha sido exhaustivamente caracterizada en estas células. En segundo lugar porque el control mitocondrial de esta corriente ha sido así mismo caracterizado original y exhaustivamente en este modelo celular. En primer lugar caracterizamos SOCE mediante imagen de fluorescencia en las células RBL. Los resultados muestran que las células RBL muestran una enorme entrada capacitativa de Ca^{2+} que es inhibida por desacoplantes mitocondriales como FCCP y por una serie de AINEs incluyendo salicilato, ibuprofeno, sulindac e indometacina. A continuación llevamos a cabo una serie de experimentos de registro de la actividad del canal mediante la técnica de "Patch-clamp".

Para el estudio electrofisiológico buscamos la colaboración del grupo del Dr. M. Hoth (Universidad de El Sarre, Homburg, Alemania) autor de la

descripción original de la corriente CRAC. Los resultados muestran que en presencia de un fuerte tamponamiento del Ca^{2+} intracelular los AINEs incluyendo salicilato, indometacina e ibuprofeno no son capaces de inhibir la corriente CRAC en las células RBL. Sin embargo, en condiciones fisiológicas de bajo tampón de Ca^{2+} y mitocondrias energetizadas, los mismos AINEs inhibieron la corriente CRAC del mismo modo que el desacoplamiento mitocondrial con CCCP o los inhibidores del uniportador de calcio mitocondrial rojo de rutenio y rutenio 360. En estas condiciones la captación mitocondrial de Ca^{2+} se hace relevante para mantener la actividad del canal al impedir la inactivación dependiente de Ca^{2+} de la corriente capacitativa. Los datos sugieren por tanto que los AINEs no inhiben directamente el canal sino que podrían actuar desactivando la capacidad de las mitocondrias de regular positivamente la corriente CRAC.

Para investigar la dependencia de la mitocondria en la inhibición inducida por los AINEs estudiamos directamente los efectos de estos compuestos sobre la homeostasis del calcio mitocondrial. Nuestros resultados previos habían mostrado que el salicilato podría actuar como un desacoplante mitocondrial e inhibir la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias (Núñez, L. et al., 2006; Valero, R.A. et al., 2008). Este efecto es debido probablemente a que el ácido salicílico es capaz de permear las mitocondrias disociándose a salicilato e hidrogeniones (H^+) en la matriz mitocondrial. Una vez allí, el carácter deslocalizado de la carga negativa del salicilato en la nube electrónica resonante de este hace que pierda buena parte de su electronegatividad. En estas condiciones la permeación del anión salicilato al exterior mitocondrial es permitida (favorecida por el carácter negativo del interior de la membrana mitocondrial interna). Una vez en el citosol, la mayor acidez de este hace que el salicilato sea reprotonado a ácido salicílico iniciándose un nuevo ciclo. En cada ciclo desacoplante, un protón es reintroducido a la matriz mitocondrial lo que hace que se produzca una pérdida de potencial mitocondrial (despolarización) y una pérdida de acoplamiento entre el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP (desacoplamiento).

Para verificar que los AINEs podrían estar actuando a nivel mitocondrial estudiamos el efecto de estos sobre el potencial mitocondrial en las células A10. Los resultados muestran que salicilato inducía una despolarización mitocondrial de una manera dosis dependiente. El resto de AINEs testados despolarizaban de un modo similar las mitocondrias en células intactas a las mismas concentraciones que inhibían SOCE y la proliferación celular. Es interesante

hacer notar que tanto el desacoplante mitocondrial (FCCP) como los AINEs inhibieron SOCE. Sin embargo, si los AINEs son presentados a las células tras la activación de VOCE, en todos los casos se observaba un aumento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica. En el caso de FCCP, este efecto se cree que puede ser debido a la liberación de Ca^{2+} desde la mitocondria despolarizada. Consistentemente con su posible acción despolarizante a nivel mitocondrial, todos los AINEs testados inducían un pequeño incremento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica cuando eran presentados a células previamente activadas por un estímulo despolarizante. Estos datos sugieren que los AINEs afectarían al potencial mitocondrial, la fuerza electromotriz necesaria para la captación mitocondrial de Ca^{2+} . Nuestros resultados previos en células de carcinoma de colon (Núñez, L., et al., 2006; Valero, R.A. et al., 2008) demostraron que la despolarización inducida por salicilato (de unos 30 mV) es suficiente para inhibir muy significativamente la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria.

Finalmente quisimos demostrar directamente los efectos de los AINEs sobre la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias en las células A10. En primer lugar comprobamos que la activación de SOCE era capaz de inducir captación mitocondrial de Ca^{2+} en células A10 intactas. Para ello utilizamos una metodología basada en imagen de bioluminiscencia de células transfectadas con la sonda de Ca^{2+} aecurina dirigida a mitocondrias. Sin embargo, la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje no fue capaz de inducir captación de Ca^{2+} por las mitocondrias. Se ha descrito previamente que la activación del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial requiere la formación de microdominios de alta concentración de Ca^{2+} que sólo serían factibles en un reducido entorno físico-temporal en la proximidad de canales de Ca^{2+} (Montero, M. et al., 2000; Villalobos, C. et al., 2002). De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados sugieren que las mitocondrias podrían estar distribuidas intracelularmente en el entorno de los canales de Ca^{2+} responsables de SOCE más que en el entorno de los responsables de VOCE. Sin embargo, el hecho de que SOCE es mucho mayor que VOCE en las células A10 sugiere que la mitocondria podría ser sensible a la entrada de Ca^{2+} vía SOCE y no vía VOCE simplemente porque el flujo de Ca^{2+} que entra es muy diferente.

Los AINEs podrían inhibir la captación mitocondrial de Ca^{2+} inducida por SOCE pero el experimento en células intactas no permitiría distinguir si este posible efecto tendría lugar a nivel de la membrana plasmática o en la membrana mitocondrial interna donde está localizado el uniportador de Ca^{2+}

mitocondrial. Para testar directamente los efectos sobre el transporte a nivel mitocondrial llevamos a cabo estudios en células permeabilizadas. La presentación de Ca^{2+} (10 μM) a células A10 transfectadas con aecuatorina mitocondrial y permeabilizadas indujo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$. Este efecto fue inhibido por el desacoplante mitocondrial (FCCP) y también por los AINEs salicilato, ibuprofeno e indometacina. Por tanto, estos resultados demuestran que los AINEs despolarizan la mitocondria e inhiben la captación de Ca^{2+} mitocondrial lo que, de acuerdo con el papel relevante de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria en el mantenimiento de SOCE sugiere que los AINEs no inhiben SOCE actuando directamente sobre el canal implicado en SOCE sino por su acción sobre flujos de Ca^{2+} a nivel subcelular. Por tanto concluimos que los canales de Ca^{2+} y las mitocondrias que los controlan contribuyen decisivamente a la proliferación en las células de músculo liso vascular A10 y a los efectos anti-proliferativos de los AINEs.

Una vez llevados a cabo los estudios anteriores en células A10 quisimos confirmar los resultados y las conclusiones obtenidas en un modelo de músculo liso vascular más próximo a los desórdenes proliferativos del lecho vascular donde poder validar el papel esencial de SOCE en la proliferación del músculo liso vascular y en la inhibición por AINEs. Por ello decidimos investigar las vías de entrada de Ca^{2+} y su papel en la proliferación en las células de músculo liso vascular de arteria coronaria humana, por ser éste un territorio vascular relacionado con un alto índice de patología obstructiva y elevada morbilidad y mortalidad. En primer lugar demostramos que en células procedentes músculo liso vascular aislado de arteria coronaria humana mantenidas en cultivo primario la proliferación celular era inhibida en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Al contrario que en las células A10, la retirada del Ca^{2+} extracelular abolía completamente la proliferación celular, no observándose ningún componente de proliferación independiente de Ca^{2+} extracelular. Mediante imagen de fluorescencia confirmamos así mismo la presencia tanto de SOCE como de VOCE en estas células. La inhibición de SOCE con 2-APB inhibía la proliferación celular mientras que nifedipina, una dihidropiridina que inhibe VOCE no afectó a la proliferación celular en absoluto. Así pues la proliferación de las células de músculo liso de arteria coronaria es muy dependiente de la entrada de Ca^{2+} por canales operados por depósitos pero totalmente independiente de la entrada de Ca^{2+} operados por voltaje, al menos aquellos sensibles a dihidropiridinas que serían los mayoritarios en estas células. Es

interesante darse cuenta que 2-APB inhibió en este caso completamente la proliferación celular mientras que en las células A10 con un componente proliferativo independiente de Ca^{2+} extracelular la inhibición por 2-APB fue sólo parcial.

Para caracterizar mejor SOCE en estas células llevamos a cabo experimentos de registro de corrientes por la técnica de "Patch-clamp" en su configuración de "whole cell". Para ello utilizamos una nueva metodología de registro basada en un sistema de "Patch-clamp" planar o automático que permite aumentar la eficiencia de la obtención de sellos de alta resistencia requeridos para el registro de corrientes de pequeña magnitud. El vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} por incubación con EGTA intracelular permitió observar la aparición de una pequeña corriente de entrada de cationes con una cinética y una relación I/V compatible con una corriente operada por depósitos. Esta corriente fue inhibida de modo significativo por 2-APB.

Estudios previos han demostrado que las células de músculo liso de diferentes territorios vasculares tanto en animales como en humanos pueden sufrir un cambio fenotípico hacia un estado proliferativo, y que la proliferación de estas células contribuye a la oclusión de los vasos (Beech, D.J. 2007; Berra-Romani, R. et al. 2008; House, S.J. et al. 2008). En nuestro caso, las células de músculo liso de arteria coronaria humana que fueron recibidas de una fuente comercial en pase 3 estaban proliferando en cultivo pero al cabo de un número suficiente de pases mostraban un cambio fenotípico hacia un fenotipo quiescente, con lo que quisimos investigar si ese cambio conllevaría diferencias relevantes en la homeostasis del Ca^{2+} entre ambos fenotipos. Puesto que la proliferación de estas células dependía de SOCE, decidimos investigar si el cambio en la proliferación podría deberse a cambios en las vías de entrada de calcio. Además, puesto que el cambio funcional era considerablemente abrupto, podría considerarse éste como un cambio fenotípico desde un fenotipo proliferativo a otro quiescente o no proliferativo que podría reflejar, en modo reverso, el cambio fenotípico característico de los vasos dañados.

Nuestros resultados muestran que las células proliferativas presentaban una considerable SOCE que disminuía dramáticamente en las células no proliferativas. Por el contrario, VOCE que era minoritario en las células proliferativas llegaba a ser dominante en las células quiescentes. A nivel electrofisiológico determinamos que la disminución de SOCE estaba asociada a

una disminución significativa de la densidad de corriente inducida por el vaciamiento de depósitos. Estos datos confirman el papel de SOCE y la corriente observada en la proliferación de las células de músculo liso de arteria coronaria humana y sugieren además que el cambio fenotípico podría deberse a cambios en la actividad y/o expresión de los canales implicados en SOCE y VOCE.

Para investigar la posibilidad anterior directamente estudiamos la expresión de Orai1 y Stim1, componentes moleculares del canal capacitativo en otros tipos celulares así como la de la subunidad α_{1c} del canal Cav1.2, el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje sensible a dihidropiridinas mayoritario en músculo liso vascular. En nuestras manos, sin embargo, no encontramos diferencias notables en los niveles relativos de ARNm de los genes anteriormente mencionados. Sin embargo, a nivel de proteínas, encontramos que Stim1 (pero no Orai1) que era elevado en células proliferativas disminuía en las células quiescentes. Por el contrario, la subunidad α_{1c} del canal Cav1.2, aumentaba significativamente en las células quiescentes. Estos cambios son consistentes con las diferencias de SOCE y VOCE en las células proliferativas y no proliferativas. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los cambios fenotípicos observados previamente cuando se han comparado células de músculo liso vascular de diferentes territorios (Berra-Romani, R. et al. 2008; House, S.J. et al. 2008; Zhang, W. et al. 2011). Sin embargo, nosotros no hemos observado diferencias a nivel de ARNm. Las discrepancias podrían deberse a diferencias entre los diferentes territorios vasculares estudiados o a posibles diferencias entre ratas y seres humanos. También podrían deberse a que el cambio fenotípico estudiado en este trabajo no refleja enteramente el que sucede *in vivo*. En cualquier caso, los resultados obtenidos son, de nuevo, consistentes con un papel relevante de SOCE y Stim1 en el control de la proliferación celular en las células de músculo liso de arteria coronaria humana y otras células de músculo liso vascular (Takahashi, Y. et al. 2007; Aubart, F.C. et al. 2009; Guo, R.W. et al. 2009; Ng, L.C. et al. 2009).

La remodelación de las vías de entrada de Ca^{2+} durante la transformación fenotípica podría tener consecuencias interesantes en la fisiología de las células además de originar cambios relevantes en el manejo del Ca^{2+} a nivel subcelular. Para investigar esta posibilidad estudiamos posibles diferencias en la captación mitocondrial de Ca^{2+} en las células proliferativas y las no proliferativas. Los resultados muestran que SOCE, pero no VOCE es

capaz de inducir captación mitocondrial de Ca^{2+} . De este modo las células de músculo liso de arteria coronaria con fenotipo proliferativo recuerdan a las A10 ya que presentan un SOCE dominante y un VOCE minoritario donde SOCE pero no VOCE induce captación mitocondrial de Ca^{2+} . Sin embargo, las células quiescentes se caracterizan porque SOCE es minoritario mientras que VOCE es dominante. Consistentemente VOCE, pero no SOCE, induce captación mitocondrial de Ca^{2+} en las células quiescentes. Puesto que el papel del Ca^{2+} en la mitocondria es la activación de diversas enzimas implicadas en el ciclo de Krebs, la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria aumenta la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP. Este proceso permite el acoplamiento entre la estimulación celular y el aumento de la síntesis de ATP para atender las nuevas demandas energéticas de las células activadas. Por ello, podría deducirse que en las células proliferativas la síntesis de ATP está acoplada a señales proliferativas mediadas por SOCE. Sin embargo, en las células quiescentes, la síntesis de ATP estaría más acoplada a señales eléctricas capaces de inducir la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y contracción muscular.

Otra consideración necesaria es que las diferencias en la captación de Ca^{2+} mitocondrial inducida por SOCE entre las células proliferativas (captan) y las no proliferativas (no captan) podría contribuir a la disminución de SOCE. El motivo es que, como se ha demostrado anteriormente, SOCE está regulado por la mitocondria de modo que un gran SOCE está favorecido por la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Sin embargo, si SOCE disminuyera digamos que por un descenso de Stim1 hasta un punto en que las mitocondrias no sienten su actividad, la falta de captación de Ca^{2+} mitocondrial disminuiría aun más SOCE. Por otra parte, el control mitocondrial de la entrada de Ca^{2+} en estas células sería también esencial para la inhibición por AINEs.

Por todo lo anterior, finalmente investigamos los efectos antiproliferativos de los anti-inflamatorios no esteroideos y el papel de SOCE y la mitocondria en las células de músculo liso de arteria coronaria humana. Nuestros resultados muestran que SOCE en las células es inhibido de un modo reversible por desacoplantes mitocondriales como FCCP de un modo reversible. Igualmente, los diversos AINEs testados inhibieron significativamente tanto SOCE como la proliferación y la migración celular en las células de músculo liso de arteria coronaria humana, un proceso que también se inhibe de modo significativo tanto en ausencia de Ca^{2+} extracelular como en presencia de 2-APB, el antagonista clásico de SOCE. Estos resultados sugieren que el mecanismo

antiproliferativo y antimigratorio de los AINEs es, de nuevo, la inhibición de SOCE. Aunque no hemos podido llevar a cabo el estudio de los efectos de los AINEs sobre corrientes en células de músculo liso vascular, hemos de suponer que el mecanismo por el que los AINEs inhiben SOCE sería similar al descrito en células RBL, es decir, un mecanismo indirecto, mediado por los efectos de estos compuestos sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Consistente con esta hipótesis, la inhibición de SOCE por los AINEs solo resultó evidente en las células coronarias con fenotipo proliferativo donde SOCE induce captación de Ca^{2+} mitocondrial. Sin embargo, en células quiescentes donde SOCE es menor e incapaz de inducir captación de Ca^{2+} por las mitocondrias SOCE no se inhibe en presencia de AINEs. De este modo, los AINEs inhiben SOCE de un modo dependiente de mitocondrias y de una manera específica de fenotipo. Si estos resultados se confirmasen, cabría suponer que los AINEs podrían inhibir SOCE específicamente en aquellas células que tornasen a un fenotipo proliferativo sin afectar a la entrada de Ca^{2+} de las células diferenciadas.

En resumen, nuestros resultados indican que la entrada capacitativa de Ca^{2+} o SOCE y, por tanto, las proteínas posiblemente implicadas en su actividad Stim1 y Orai1 así como las mitocondrias son esenciales en la proliferación de las células de músculo liso vascular, incluyendo las células de arteria coronaria humana. Además, su inhibición dependiente de mitocondria permitiría explicar los efectos anti-proliferativos de una serie de anti-inflamatorios no esteroideos incluyendo análogos estructurales sin actividad anti-inflamatoria. Estos resultados podrían explicar los efectos saludables de ciertos AINEs en varios modelos de restenosis y aterosclerosis (Reis, E.D. et al. 2000; Weber, A. et al. 2000; Brooks, G. et al. 2003). Nuestros resultados podrían tener repercusiones clínicas si se considerase el uso sistémico de derivados de AINEs sin actividad anti-inflamatoria como R-flurbiprofeno. Recientemente existe cierta controversia porque los stents pretratados con compuestos fuertemente antiproliferativos como rapamicina que han disminuido notablemente la restenosis presentan ciertos problemas de trombosis que llevan al tratamiento de por vida con antitrombóticos. Por otra parte, el desarrollo de antagonistas específicos de los canales implicados en SOCE podría permitir mejores tratamientos para prevenir y tratar las enfermedades proliferativas del lecho vascular.

VI.CONCLUSIONES

1. Las células de aorta de rata A10 presentan entrada de calcio operada por depósitos (SOCE) y, en menor medida, entrada de Ca^{2+} operada por voltaje. SOCE es sensible a La^{3+} , 2APB y BTP2, podría estar mediado por las proteínas Stim1 y Orai1, está regulado por la mitocondria y su inhibición previene, aunque no abole, la proliferación de las células A10.

2. Diversos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) incluyendo salicilato, ibuprofeno, sulindac, indometacina y el enantiómero R-flubiprofeno inhiben la proliferación y SOCE (pero no VOCE) en las células A10. El mecanismo de acción no sería la inhibición directa del canal de Ca^{2+} implicado (como sugieren los experimentos con células RBL), sino secundario a la despolarización mitocondrial y la inhibición de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, lo que impide que retirada de Ca^{2+} por la mitocondria favorezca la activación sostenida de SOCE.

3. Las células de músculo liso de arteria coronaria humana (hCASMCs) en cultivo primario muestran un cambio fenotípico desde un estado proliferativo a otro no proliferativo, asociado con una profunda remodelación de las vías de entrada de Ca^{2+} y sus componentes moleculares. Este proceso podría simular el cambio fenotípico característico del músculo liso vascular dañado que contribuye a los procesos de restenosis y arteriosclerosis.

4. En el fenotipo proliferativo, la vía de entrada mayoritaria de Ca^{2+} es SOCE, está posiblemente mediada por Stim1 y Orai1, su activación induce captación de Ca^{2+} mitocondrial y su inhibición abole la proliferación de las células coronarias. VOCE es minoritario, no induce captación mitocondrial de Ca^{2+} y su inhibición no afecta a la proliferación celular.

5. En el fenotipo no proliferativo, SOCE disminuye y no induce captación mitocondrial de Ca^{2+} , entonces la vía mayoritaria de entrada de Ca^{2+} es VOCE que ahora ya induce captación mitocondrial de Ca^{2+} . El cambio podría estar medidado por el aumento de la expresión de canales de calcio dependientes de voltaje y la inhibición de la expresión de Stim1.

6. Los anti-inflamatorios no esteroideos inhiben SOCE en las células con fenotipo proliferativo (pero no en las células con fenotipo no proliferativo), así como la migración y proliferación de las células de músculo liso de arteria

coronaria humana. La inhibición podría explicarse por los efectos de estos fármacos sobre la mitocondria y el papel diferencial que la mitocondria podría tener en el control de SOCE en células con fenotipo proliferativo y no proliferativo.

7. Nuestros resultados podrían explicar los efectos antiproliferativos y beneficiosos descritos para los AINEs en diversos desórdenes proliferativos del lecho vascular como la restenosis y la arteriosclerosis.

8. SOCE, sus componentes moleculares Stim1 y Orai1 y la mitocondria, podrían ser considerados como posibles nuevas dianas en la prevención y el tratamiento de los desórdenes proliferativos del lecho vascular.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Aaronson, P. I. and J. P. T. Ward (2004). The Cardiovascular System. Oxford.

Alonso, M. T. and J. Garcia-Sancho (2011). "Nuclear Ca²⁺ signalling." Cell Calcium 49(5): 280-289.

Allen, D. G., J. R. Blinks and F. G. Prendergast (1977). "Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component." Science 195(4282): 996-998.

Aubart, F. C., Y. Sassi, A. Coulombe, N. Mougnot, C. Vrignaud, P. Leprince, P. Lechat, A. M. Lompre and J. S. Hulot (2009). "RNA interference targeting STIM1 suppresses vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat." Mol Ther 17(3): 455-462.

Badimon, J. J., A. F. Ortiz, B. Meyer, A. Mailhac, J. T. Fallon, E. Falk, L. Badimon, J. H. Chesebro and V. Fuster (1998). "Different response to balloon angioplasty of carotid and coronary arteries: effects on acute platelet deposition and intimal thickening." Atherosclerosis 140(2): 307-314.

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). "NF-kappa B: ten years after." Cell 87(1): 13-20.

Barlow, C. A., P. Rose, R. A. Pulver-Kaste and K. M. Lounsbury (2006). "Excitation-transcription coupling in smooth muscle." J Physiol 570(Pt 1): 59-64.

Baryshnikov, S. G., M. V. Pulina, A. Zulian, C. I. Linde and V. A. Golovina (2009). "Orai1, a critical component of store-operated Ca²⁺ entry, is functionally associated with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump in proliferating human arterial myocytes." Am J Physiol Cell Physiol 297(5): C1103-1112.

Baubet, V., H. Le Mouellic, A. K. Campbell, E. Lucas-Meunier, P. Fossier and P. Brulet (2000). "Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level." Proc Natl Acad Sci U S A 97(13): 7260-7265.

Beech, D. J. (2007). "Ion channel switching and activation in smooth-muscle cells of occlusive vascular diseases." Biochem Soc Trans 35(Pt 5): 890-894.

Benham, C. D. and R. W. Tsien (1987). "Calcium-permeable channels in vascular smooth muscle: voltage-activated, receptor-operated, and leak channels." Soc Gen Physiol Ser 42: 45-64.

Berra-Romani, R., A. Mazzocco-Spezia, M. V. Pulina and V. A. Golovina (2008). "Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture." Am J Physiol Cell Physiol 295(3): C779-790.

Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." Nature 361(6410): 315-325.

Berridge, M. J. (1995). "Calcium signalling and cell proliferation." Bioessays 17(6): 491-500.

Bers, D. M. and T. Guo (2005). "Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes." Ann N Y Acad Sci 1047: 86-98.

Bisaillon, J. M., R. K. Motiani, J. C. Gonzalez-Cobos, M. Potier, K. E. Halligan, W. F. Alzawahra, M. Barroso, H. A. Singer, D. Jourd'heuil and M. Trebak (2010). "Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration." Am J Physiol Cell Physiol 298(5): C993-1005.

Blinks, J. R., F. G. Prendergast and D. G. Allen (1976). "Photoproteins as biological calcium indicators." Pharmacol Rev 28(1): 1-93.

Brand, K., S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P. A. Baeuerle and D. Neumeier (1996). "Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion." J Clin Invest 97(7): 1715-1722.

Brini, M., R. Marsault, C. Bastianutto, J. Alvarez, T. Pozzan and R. Rizzuto (1995). "Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation." J Biol Chem 270(17): 9896-9903.

Brooks, G., X. M. Yu, Y. Wang, M. J. Crabbe, M. J. Shattock and J. V. Harper (2003). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit vascular smooth muscle cell proliferation via differential effects on the cell cycle." J Pharm Pharmacol 55(4): 519-526.

Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol 16: 521-555.

Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature 426(6966): 517-524.

Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell 131(6): 1047-1058.

Clunn, G. F., P. S. Sever and A. D. Hughes (2010). "Calcium channel regulation in vascular smooth muscle cells: synergistic effects of statins and calcium channel blockers." Int J Cardiol 139(1): 2-6.

Chamero, P., C. Villalobos, M. T. Alonso and J. Garcia-Sancho (2002). "Dampening of cytosolic Ca²⁺ oscillations on propagation to nucleus." J Biol Chem 277(52): 50226-50229.

Chamley-Campbell, J., G. R. Campbell and R. Ross (1979). "The smooth muscle cell in culture." Physiol Rev 59(1): 1-61.

Chorro, F. J., L. Such-Belenguer and V. Lopez-Merino (2009). "[Animal models of cardiovascular disease]." Rev Esp Cardiol 62(1): 69-84.

Davies, M. J. (1996). "Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995." Circulation 94(8): 2013-2020.

DeHaven, W. I., J. T. Smyth, R. R. Boyles and J. W. Putney, Jr. (2007). "Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels." J Biol Chem 282(24): 17548-17556.

Dotter, C. T. and M. P. Judkins (1989). "Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application. 1964." Radiology 172(3 Pt 2): 904-920.

Falk, E. and A. Fernandez-Ortiz (1995). "Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications." Am J Cardiol 75(6): 3B-11B.

Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly and A. Rao (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature 441(7090): 179-185.

Gilabert, J. A., D. Bakowski and A. B. Parekh (2001). "Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx." EMBO J 20(11): 2672-2679.

Gilabert, J. A. and A. B. Parekh (2000). "Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC)." EMBO J 19(23): 6401-6407.

Glitsch, M. D., D. Bakowski and A. B. Parekh (2002). "Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake." EMBO J 21(24): 6744-6754.

Golovina, V. A. and M. P. Blaustein (2006). "Preparation of primary cultured mesenteric artery smooth muscle cells for fluorescent imaging and physiological studies." Nat Protoc 1(6): 2681-2687.

Golovina, V. A., O. Platoshyn, C. L. Bailey, J. Wang, A. Limsuwan, M. Sweeney, L. J. Rubin and J. X. Yuan (2001). "Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation." Am J Physiol Heart Circ Physiol 280(2): H746-755.

Gruntzig, A. and D. A. Kumpe (1979). "Technique of percutaneous transluminal angioplasty with the Gruntzig ballon catheter." AJR Am J Roentgenol 132(4): 547-552.

Gruntzig, A. R., A. Senning and W. E. Siegenthaler (1979). "Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty." N Engl J Med 301(2): 61-68.

Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem 260(6): 3440-3450.

Gu, Q., J. L. Chen and Y. M. Ruan (2005). "[Inhibitory effects of aspirin, clopidogrel, and their combination on the progression of atherosclerosis in rabbits]." Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 27(1): 87-91.

Gunst, S. J. and W. Zhang (2008). "Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction." Am J Physiol Cell Physiol 295(3): C576-587.

Guo, R. W., H. Wang, P. Gao, M. Q. Li, C. Y. Zeng, Y. Yu, J. F. Chen, M. B. Song, Y. K. Shi and L. Huang (2009). "An essential role for stromal interaction molecule 1 in neointima formation following arterial injury." Cardiovasc Res 81(4): 660-668.

Gutknecht, J. (1990). "Salicylates and proton transport through lipid bilayer membranes: a model for salicylate-induced uncoupling and swelling in mitochondria." J Membr Biol 115(3): 253-260.

Gwack, Y., S. Srikanth, S. Feske, F. Cruz-Guilloty, M. Oh-hora, D. S. Neems, P. G. Hogan and A. Rao (2007). "Biochemical and functional characterization of Orai proteins." J Biol Chem 282(22): 16232-16243.

Gwozdz, T., J. Dutko-Gwozdz, V. Zarayskiy, K. Peter and V. M. Bolotina (2008). "How strict is the correlation between STIM1 and Orai1 expression, puncta formation, and ICRAC activation?" Am J Physiol Cell Physiol 295(5): C1133-1140.

Hattori, M., A. Z. Suzuki, T. Higo, H. Miyauchi, T. Michikawa, T. Nakamura, T. Inoue and K. Mikoshiba (2004). "Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling." J Biol Chem 279(12): 11967-11975.

Hewavitharana, T., X. Deng, J. Soboloff and D. L. Gill (2007). "Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway." Cell Calcium 42(2): 173-182.

Hodgkin, A. L., A. F. Huxley and B. Katz (1952). "Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*." J Physiol 116(4): 424-448.

Hoth, M., D. C. Button and R. S. Lewis (2000). "Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 97(19): 10607-10612.

Hoth, M., C. M. Fanger and R. S. Lewis (1997). "Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes." J Cell Biol 137(3): 633-648.

Hoth, M. and R. Penner (1992). "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." Nature 355(6358): 353-356.

House, S. J., M. Potier, J. Bisailon, H. A. Singer and M. Trebak (2008). "The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease." Pflugers Arch 456(5): 769-785.

Kawai-Kowase, K. and G. K. Owens (2007). "Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol 292(1): C59-69.

Kirichok, Y., G. Krapivinsky and D. E. Clapham (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." Nature 427(6972): 360-364.

Kopp, E. and S. Ghosh (1994). "Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin." Science 265(5174): 956-959.

Landry, D. B., L. L. Couper, S. R. Bryant and V. Lindner (1997). "Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1." Am J Pathol 151(4): 1085-1095.

Lee, K. P., J. P. Yuan, W. Zeng, I. So, P. F. Worley and S. Muallem (2009). "Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels." Proc Natl Acad Sci U S A 106(34): 14687-14692.

Levick, J. R. (2003). An Introduction to Cardiovascular Physiology.

Lewis, R. S. (2001). "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes." Annu Rev Immunol 19: 497-521.

Li, J., P. Sukumar, C. J. Milligan, B. Kumar, Z. Y. Ma, C. M. Munsch, L. H. Jiang, K. E. Porter and D. J. Beech (2008). "Interactions, functions, and independence of plasma membrane STIM1 and TRPC1 in vascular smooth muscle cells." Circ Res 103(8): e97-104.

Liao, Y., C. Erxleben, J. Abramowitz, V. Flockerzi, M. X. Zhu, D. L. Armstrong and L. Birnbaumer (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/ICRAC channels." Proc Natl Acad Sci U S A 105(8): 2895-2900.

Liao, Y., C. Erxleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D. L. Armstrong and L. Birnbaumer (2007). "Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion." Proc Natl Acad Sci U S A 104(11): 4682-4687.

Libby, P., P. M. Ridker and A. Maseri (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation 105(9): 1135-1143.

Liou, J., M. L. Kim, W. D. Heo, J. T. Jones, J. W. Myers, J. E. Ferrell, Jr. and T. Meyer (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." Curr Biol 15(13): 1235-1241.

Loirand, G. and P. Pacaud (1995). "Mechanism of the ATP-induced rise in cytosolic Ca²⁺ in freshly isolated smooth muscle cells from human saphenous vein." Pflügers Arch 430(3): 429-436.

Marra, D. E. and J. K. Liao (2001). "Salicylates and vascular smooth muscle cell proliferation: molecular mechanisms for cell cycle arrest." Trends Cardiovasc Med 11(8): 339-344.

Marra, D. E., T. Simoncini and J. K. Liao (2000). "Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21(Waf1) and p27(Kip1)." Circulation 102(17): 2124-2130.

Martinez-Lemus, L. A., M. A. Hill and G. A. Meininger (2009). "The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure." Physiology (Bethesda) 24: 45-57.

Miguel-Velado, E., A. Moreno-Dominguez, O. Colinas, P. Ciudad, M. Heras, M. T. Perez-Garcia and J. R. Lopez-Lopez (2005). "Contribution of Kv channels to phenotypic remodeling of human uterine artery smooth muscle cells." Circ Res 97(12): 1280-1287.

Mitchell, P. and J. Moyle (1967). "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation." Nature 213(5072): 137-139.

Mohrman, D. E. and L. J. Heller (2006). Cardiovascular Physiology, Mc Graw Hill.

Montalvo, G. B., A. R. Artalejo and J. A. Gilibert (2006). "ATP from subplasmalemmal mitochondria controls Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels." J Biol Chem 281(47): 35616-35623.

Montero, M., M. T. Alonso, E. Carnicero, I. Cuchillo-Ibanez, A. Albillos, A. G. Garcia, J. Garcia-Sancho and J. Alvarez (2000). "Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion." Nat Cell Biol 2(2): 57-61.

Motiani, R. K., I. F. Abdullaev and M. Trebak (2010). "A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells." J Biol Chem 285(25): 19173-19183.

Munoz, E., R. A. Valero, A. Quintana, M. Hoth, L. Nunez and C. Villalobos (2011). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by enabling the Ca²⁺-dependent inactivation of calcium release-activated calcium/orai channels normally prevented by mitochondria." J Biol Chem 286(18): 16186-16196.

Napoli, C., G. Cirino, P. Del Soldato, R. Sorrentino, V. Sica, M. Condorelli, A. Pinto and L. J. Ignarro (2001). "Effects of nitric oxide-releasing aspirin versus aspirin on restenosis in hypercholesterolemic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 98(5): 2860-2864.

Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature 260(5554): 799-802.

Ng, L. C., M. D. McCormack, J. A. Airey, C. A. Singer, P. S. Keller, X. M. Shen and J. R. Hume (2009). "TRPC1 and STIM1 mediate capacitative Ca²⁺ entry in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells." J Physiol 587(Pt 11): 2429-2442.

Nunez, L., R. A. Valero, L. Senovilla, S. Sanz-Blasco, J. Garcia-Sancho and C. Villalobos (2006). "Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate." J Physiol 571(Pt 1): 57-73.

Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev 84(3): 767-801.

Paramo, J. A., J. A. Rodriguez, O. Beloqui and J. Orbe (2005). "Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis?" Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 5(4): 303-311.

Parekh, A. B. (2003). "Store-operated Ca²⁺ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane." J Physiol 547(Pt 2): 333-348.

Parekh, A. B. (2008). "Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels." Cell Calcium 44(1): 6-13.

Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev 85(2): 757-810.

Peppiatt-Wildman, C. M., A. P. Albert, S. N. Saleh and W. A. Large (2007). "Endothelin-1 activates a Ca²⁺-permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes." J Physiol 580(Pt.3): 755-764.

Perocchi, F., V. M. Gohil, H. S. Girgis, X. R. Bao, J. E. McCombs, A. E. Palmer and V. K. Mootha (2010). "MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake." Nature 467(7313): 291-296.

Potier, M., J. C. Gonzalez, R. K. Motiani, I. F. Abdullaev, J. M. Bisailon, H. A. Singer and 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 J 23(8): 2425-2437.

Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao and P. G. Hogan (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." Nature 443(7108): 230-233.

Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium 7(1): 1-12.

Putney, J. W., Jr. (1990). "Capacitative calcium entry revisited." Cell Calcium 11(10): 611-624.

Quintana, A., M. Pasche, C. Junker, D. Al-Ansary, H. Rieger, C. Kummerow, L. Nunez, C. Villalobos, P. Meraner, U. Becherer, J. Rettig, B. A. Niemeyer and M. Hoth (2011). "Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation." EMBO J 30(19): 3895-3912.

Rao, R. S., J. M. Miano, E. N. Olson and C. L. Seidel (1997). "The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells?" Cardiovasc Res 36(1): 118-126.

Reis, E. D., M. Roque, H. Dansky, J. T. Fallon, J. J. Badimon, C. Cordon-Cardo, S. J. Shiff and E. A. Fisher (2000). "Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 97(23): 12764-12769.

Ren, J., S. Albinsson and P. Hellstrand (2010). "Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle." J Biol Chem 285(41): 31829-31839.

Rizzuto, R. (2001). "Intracellular Ca²⁺ pools in neuronal signalling." Curr Opin Neurobiol 11(3): 306-311.

Rizzuto, R., P. Bernardi and T. Pozzan (2000). "Mitochondria as all-round players of the calcium game." J Physiol 529 Pt 1: 37-47.

Rogers, K. L., J. Stinnakre, C. Agulhon, D. Jublot, S. L. Shorte, E. J. Kremer and P. Brulet (2005). "Visualization of local Ca²⁺ dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters." Eur J Neurosci 21(3): 597-610.

Roos, J., P. J. DiGregorio, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Liudyno, S. Zhang, O. Safrina, J. A. Kozak, S. L. Wagner, M. D. Cahalan, G. Velicelebi and K. A. Stauderman (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." J Cell Biol 169(3): 435-445.

Saleh, S. N., A. P. Albert, C. M. Peppiatt-Wildman and W. A. Large (2008). "Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes." J Physiol 586(10): 2463-2476.

Salido, G. M., S. O. Sage and J. A. Rosado (2009). "Biochemical and functional properties of the store-operated Ca²⁺ channels." Cell Signal 21(4): 457-461.

Schwarz, E. C., C. Kummerow, A. S. Wenning, K. Wagner, A. Sappok, K. Wagershauser, D. Griesemer, B. Strauss, M. J. Wolfs, A. Quintana and M. Hoth (2007). "Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation." Eur J Immunol 37(10): 2723-2733

Shimomura, O. (1995). "Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions." Biochem Biophys Res Commun 211(2): 359-363.

Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea." J Cell Comp Physiol 59: 223-239.

Silverthorn-Andrew, C. (2009). Fisiología Humana (Un enfoque integrado), Panamericana.

Soboloff, J., M. A. Spassova, T. Hewavitharana, L. P. He, W. Xu, L. S. Johnstone, M. A. Dziadek and D. L. Gill (2006). "STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry." Curr Biol 16(14): 1465-1470.

Sunagawa, M. (2010). "Involvement of Ca(2+) channel activity in proliferation of vascular smooth muscle cells." Pathophysiology 17(2): 101-108.

Suzuki, H. (1985). "Electrical responses of smooth muscle cells of the rabbit ear artery to adenosine triphosphate." J Physiol 359: 401-415.

Takahashi, Y., H. Watanabe, M. Murakami, K. Ono, Y. Munehisa, T. Koyama, K. Nobori, T. Iijima and H. Ito (2007). "Functional role of stromal

interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun 361(4): 934-940.

Takemura, H., A. R. Hughes, O. Thastrup and J. W. Putney, Jr. (1989). "Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane." J Biol Chem 264(21): 12266-12271.

Taylor, C. W. and A. J. Laude (2002). "IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺." Cell Calcium 32(5-6): 321-334.

Taylor, C. W. and Z. Moneer (2004). "Regulation of capacitative and non-capacitative Ca²⁺ entry in A7r5 vascular smooth muscle cells." Biol Res 37(4): 641-645.

Tegeder, I., J. Pfeilschifter and G. Geisslinger (2001). "Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors." FASEB J 15(12): 2057-2072.

Valero, R. A., L. Senovilla, L. Nunez and C. Villalobos (2008). "The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation." Cell Calcium 44(3): 259-269.

Vane, J. R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol 231(25): 232-235.

Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, D. L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Huberson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner and J. P. Kinet (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry." Science 312(5777): 1220-1223.

Villalobos, C. and J. Garcia-Sancho (1995). "Capacitative Ca²⁺ entry contributes to the Ca²⁺ influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells." Pflugers Arch 430(6): 923-935.

Waddell, W. R. and R. W. Loughry (1983). "Sulindac for polyposis of the colon." J Surg Oncol 24(1): 83-87.

Weber, A., H. Yildirim and K. Schror (2000). "Cyclooxygenase-independent inhibition of smooth muscle cell mitogenesis by ibuprofen." Eur J Pharmacol 389(1): 67-69.

Yeromin, A. V., S. L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina and M. D. Cahalan (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." Nature 443(7108): 226-229.

Yuan, J. P., W. Zeng, M. R. Dorwart, Y. J. Choi, P. F. Worley and S. Muallem (2009). "SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels." Nat Cell Biol 11(3): 337-343.

Zeng, W., J. P. Yuan, M. S. Kim, Y. J. Choi, G. N. Huang, P. F. Worley and S. Muallem (2008). "STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction." Mol Cell 32(3): 439-448

Zhang, W., K. E. Halligan, X. Zhang, J. M. Bisailon, J. C. Gonzalez-Cobos, R. K. Motiani, G. Hu, P. A. Vincent, J. Zhou, M. Barroso, H. A. Singer, K. Matrougui and M. Trebak (2011). "Orai1-Mediated ICRAC Is Essential for Neointima Formation After Vascular Injury." Circ Res 109(5): 534-542.

Zitt, C., B. Strauss, E. C. Schwarz, N. Spaeth, G. Rast, A. Hatzelmann and M. Hoth (2004). "Potent inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2." J Biol Chem 279(13): 12427-12437.

