

2013



Máster Universitario en Investigación Biomédica

Universidad de Valladolid – IBGM – CSIC

Lucía Alonso Carbajo

Directores: Dra. M^a Teresa Pérez García
Dr. José Ramón López López

[EL EFECTO DEL CINAMALDEHÍDO (CA) EN LOS CANALES DE CALCIO TIPO L DE LAS CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR]

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 SISTEMA CARDIOVASCULAR: Células del músculo liso vascular	2
1.1.1 Estructura de las células del músculo liso vascular	3
1.1.2 Función de las células del músculo liso vascular	3
1.1.3 Control del tono vascular	3
1.1.4 Canales iónicos presentes en las células del músculo liso vascular	4
1.1.4.1 Canales de calcio operados por voltaje: <i>canales tipo L</i>	4
1.1.4.2 Canales TRP en el músculo liso vascular	6
1.1.4.3 Canales TRPA1 como moduladores del tono vascular	6
1.2 Estructura de los canales TRPA1	7
1.2.1 Farmacología del TRPA1.....	7
1.3 Cinamaldehído (CA)	9
1.3.1 Estructura y propiedades	9
1.3.2 Aplicaciones.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1 Cirugía	12
3.2 Disociación de las células del músculo liso vascular	12
3.3 Soluciones	13
3.3.1 SMDS.....	13
3.3.2 Soluciones enzimáticas.....	13
3.3.3 Soluciones para electrofisiología.....	14
3.4 Estudios electrofisiológicos	14
3.4.1 Técnica del “ <i>patch clamp</i> ”	14
3.4.2 Set-up de electrofisiología	16
3.4.3 Preparación de las micropipetas	17
3.4.4 Procedimiento para los registros de corriente a través de los LTCCs.....	17
3.4.5 Protocolos utilizados en el registro de corrientes de calcio.....	18
4. RESULTADOS	20
4.1 Efecto del CA sobre los LTCCs	20
4.2 Dosis-dependencia del efecto del CA	21
4.3 Estudio de la dependencia de voltaje del efecto del CA	23
4.4 Efecto del CA sobre la inactivación de los LTCCs	24
4.4.1 Efecto del CA sobre la cinética de inactivación.....	24
4.4.2 Efecto del CA sobre la inactivación en el estado estacionario	25
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES	30
7. BIBLIOGRAFÍA	31

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- SISTEMA CARDIOVASCULAR: *Células del músculo liso vascular*

El sistema cardiovascular está formado principalmente por el corazón y un sistema de tubos o vasos, los vasos sanguíneos. Su función es distribuir los nutrientes y el oxígeno a las células y recoger los desechos metabólicos, así como regular la temperatura corporal e intervenir en las defensas del organismo (Levy, 2007).

La circulación mayor está formada por la aorta que conduce la sangre desde el ventrículo izquierdo del corazón y se divide en un conjunto de arterias más finas. Estas a su vez se dividen en ramas, que van reduciendo su diámetro progresivamente, formando arterias minúsculas de 0.1-0.5 μm de diámetro que acaban en lechos capilares en los cuales tiene lugar el intercambio de nutrientes en los tejidos. La sangre retorna al corazón por el sistema venoso.

Teniendo en cuenta estas características, los vasos sanguíneos del sistema cardiovascular se pueden clasificar en: **arterias** (elásticas y musculares), **vasos de resistencia** (pequeñas arterias y arteriolas), **capilares, vénulas y venas**.

Las arterias son capaces de regular la presión arterial dilatándose o constriñéndose. De esta manera regulan el flujo sanguíneo en los órganos y distribuyen la sangre al resto del cuerpo.

Los cambios que se producen en el diámetro de las arterias se deben a la activación de las células del músculo liso de la pared del vaso, como consecuencia de la actividad del sistema autónomo, de las señales metabólicas y de las sustancias vasoactivas liberadas por los propios vasos (Aaronson *et al.*, 2004).

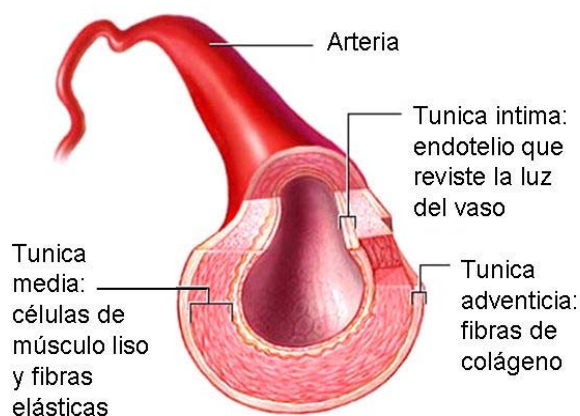


Figura 1. Estructura de la pared de una arteria, en la que se aprecian las tres capas. En nuestro caso, estudiamos pequeñas arterias que poseen un mayor número de células vasculares de músculo liso.

La pared de los vasos sanguíneos, ya sean arterias o venas, está compuesta por tres capas: **la túnica íntima** (la capa más interna), **la túnica media** (capa intermedia) y **la túnica externa o adventicia** (la más superficial). (Figura 1)

La túnica íntima es una delgada capa interna formada por una monocapa de células endoteliales unidas por uniones estrechas (*tight junction*) y mantenidas mediante tejido conectivo. Estas células controlan la permeabilidad vascular y juegan un papel crucial en la regulación de la vasoconstricción.

La túnica media está formada por células musculares lisas, embebidas en una matriz extracelular compuesta fundamentalmente por colágeno, elastina y proteoglicanos.

La túnica adventicia contiene fibras de colágeno que sirven de soporte a fibroblastos y nervios. En las grandes arterias y venas la túnica adventicia contiene pequeños vasos

sanguíneos (*vasa vasorum*) que penetran en la porción externa de la túnica media, suministrando oxígeno y nutrientes a la pared vascular (Aaronson *et al.*, 2004).

1.1.1.- Estructura de las células del músculo liso vascular

La mayoría de las células del músculo liso vascular (VSMC, *vascular smooth muscle cells*), se encuentran localizadas en la túnica media, y presentan una forma de huso con un diámetro entre 5-10 μ m y una longitud que varía entre 50 y 200 μ m. (Figura 2)

El citoplasma de las VSMC contiene proteínas contráctiles (actina y miosina), aunque organizadas de forma diferente al músculo cardíaco o esquelético ya que no se organizan en sarcómeros. Cada filamento de miosina está rodeado por varios filamentos de actina, y éstos están unidos y anclados dentro de la célula. Al igual que en los cardiomiocitos, las VSMC están eléctricamente conectadas por uniones tipo gap. Estas conexiones de baja resistencia intracelular permiten propagar las señales a lo largo de todo el vaso sanguíneo. De esta manera, una despolarización y contracción en una zona localizada, puede provocar la despolarización de otra zona distante del mismo vaso, debido a la propagación de las corrientes despolarizantes de una célula a otra (Klabunde *et al.*, 2005; Levick *et al.*, 2003).

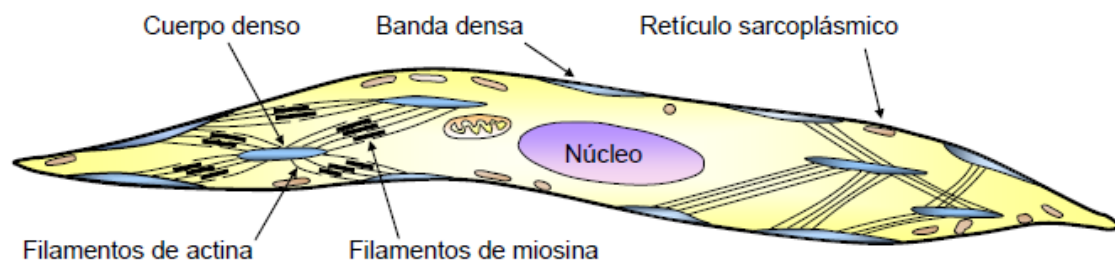


Figura 2. Ultraestructura de una célula del músculo liso vascular.

1.1.2.- Función de las células del músculo liso vascular

Las VSMC en condiciones normales tienen una función contráctil, y su papel fundamental es el control del tono vascular. Para llevar a cabo su función contráctil, estas células están altamente diferenciadas, y expresan, además de las proteínas contráctiles, una gran variedad de receptores, canales iónicos y proteínas reguladoras de calcio.

Las características contráctiles y los mecanismos responsables de la contracción difieren considerablemente entre las células de músculo liso vascular y los miocitos cardíacos. Así, el músculo liso vascular tiene un retículo sarcoplásmico poco desarrollado (Figura 2), y presenta contracciones lentas y sostenidas, mientras que el músculo cardíaco tiene un retículo sarcoplásmico muy desarrollado y presenta contracciones rítmicas, rápidas y mucho más cortas (Owens *et al.*, 1995).

1.1.3.- Control del tono vascular

El tono vascular es un término que se usa comúnmente para caracterizar el estado contráctil de un vaso, y se puede tomar como indicador del nivel de activación de las VSMC de

ese vaso. El tono vascular determina el diámetro del vaso, y de ese modo regula el flujo sanguíneo local, la presión arterial, la presión capilar y la presión venosa central.

Así, un aumento en el tono causa vasoconstricción y disminución de la luz del vaso mientras que una disminución del mismo causa vasodilatación, ya que la pared se distiende al relajarse la túnica media. La actividad contráctil de las VSMC, y por tanto el tono vascular, está estrechamente ligada a la concentración de calcio intracelular, de forma que el aumento del calcio determina la contracción del vaso (Levick *et al.*, 2003). A su vez, los niveles de calcio intracelular y por tanto el grado de contracción de las VSMC están estrechamente ligados al potencial de membrana de las células. A diferencia de lo que ocurre en el músculo cardíaco o esquelético, en el músculo liso vascular los cambios en el potencial de membrana no generan potenciales de acción, aunque sí modulan la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (ver más adelante). Así, el tono vascular se consigue como resultado de la continua interacción entre mecanismos vasodilatadores y vasoconstrictores que actúan sobre el vaso sanguíneo y que determinan cambios en el potencial de membrana de las células. Por este motivo, el estudio de los mecanismos que controlan el potencial de membrana de las células y su modulación por vasodilatadores y vasoconstrictores es muy relevante para entender la fisiología y la fisiopatología de los vasos.

1.1.4.- Canales iónicos presentes en las células del músculo liso vascular

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros hidrófilos a través de los cuales se produce el flujo de iones a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos participan en un gran número de procesos fisiológicos fundamentales, ya que permiten cambios rápidos y selectivos en la permeabilidad de la membrana. Las alteraciones en su función o su distribución dan lugar a un gran número de enfermedades muy diversas (“*canalopatías*”).

En los canales iónicos dependientes de voltaje, la apertura o el cierre del canal está determinada por cambios en el potencial transmembrana (V_m). Esta dependencia se debe a la presencia de un sensor de voltaje que detecta los cambios que se producen en el potencial de la membrana y los traduce en un cambio conformacional que afecta al paso de iones a través del poro. Además existen canales iónicos activados por ligando, en los que el cambio conformacional se desencadena por la unión de un agonista, y canales operados por presión, que se activan en respuesta a la deformación mecánica.

1.1.4.1.- Canales de calcio operados por voltaje: *canales tipo L*

En los miocitos arteriales se han descrito una gran variedad de canales iónicos de los tres tipos. Sin embargo, debido a la estrecha dependencia entre el potencial de membrana y el estado de contracción o relajación del vaso, los canales de calcio operados por voltaje (VOCCs), han sido objeto de numerosos estudios. Se sabe que la concentración global de Ca^{2+} depende principalmente de la probabilidad de apertura (P_o) de estos canales. La entrada de Ca^{2+} a través de los VOCCs está determinada por el V_m , que a su vez está gobernado por distintos canales iónicos (canales de K^+ , de Cl^- y canales catiónicos no selectivos, como los canales de potencial transitorio (TRPs)) (Wellman *et al.*, 2003). Por todo esto, podemos decir que los

VOCCs, constituyen el vínculo entre los cambios en el potencial de membrana y los niveles de Ca^{2+} intracelular.

El papel de los VOCCs en la contracción del músculo liso y cardíaco y su contribución a determinar el tono y la presión arterial hacen de ellos objetivos terapéuticos para el tratamiento de algunas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (Hockerman *et al.*, 1997).

Concretamente, las corrientes de los canales de calcio tipo L (LTCCs) se activan por la despolarización, y se inactivan lentamente. Estos canales presentan una conductancia de unos 25 pS. Los bloqueantes de estos canales (como la nifedipina y sus derivados) reducen la entrada de calcio a las VSMC y producen relajación de los vasos, contribuyendo así a aumentar el flujo sanguíneo y a reducir la presión arterial (Catterall *et al.*, 2005).

Estructuralmente, los LTCCs están formados por una subunidad principal (α_1), y una serie de subunidades accesorias (β , $\alpha_2\delta$ y γ), tal y como se muestra en la *Figura 3*.

La **subunidad α_1** (~250 KDa), confiere la mayoría de las propiedades funcionales al LTCC. Incluye el poro, el sensor de voltaje, el mecanismo de apertura y los sitios de regulación del canal por segundos mensajeros, fármacos y toxinas. Presenta cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales tiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6). El segmento S4 es el sensor de voltaje, mientras que el asa entre los segmentos S5 y S6 determina la conductancia y selectividad iónica del canal. Además, los extremos amino y carboxilo terminal, juegan papeles fundamentales en la modulación del canal y su expresión (Sonkusare *et al.*, 2006).

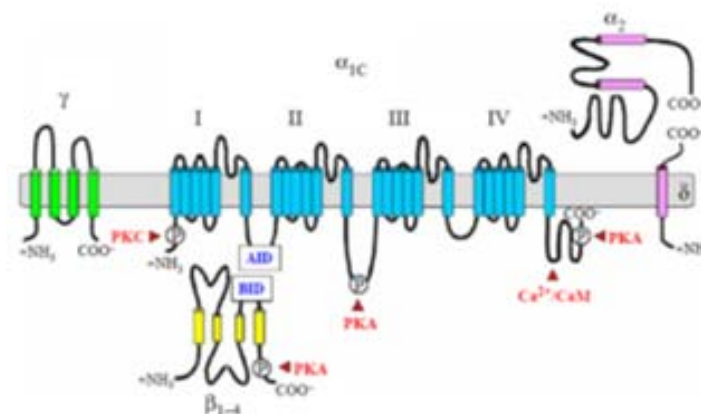


Figura 3. Estructura del canal de calcio operado por voltaje de tipo L (LTCC)

Las **subunidades β** son citoplasmáticas y se unen a los dominios I-II de la subunidad α_1 . Las **subunidades $\alpha_2\delta$** proceden del splicing alternativo de un único gen y están formadas por dos fragmentos unidos por un puente disulfuro: la subunidad α_2 , extracelular, y la subunidad δ , transmembrana. Las **subunidades γ** son transmembrana, aunque se han descrito sólo en músculo esquelético y neuronas y su papel no está muy claro (Moreno *et al.*, 1999). Sin embargo, se sabe que las subunidades $\alpha_2\delta$ y β modifican la expresión de la subunidad α_1 en la membrana, su dependencia de voltaje, su cinética de apertura y cierre y su sensibilidad a fármacos de forma específica de subunidad.

1.1.4.2.- Canales TRP en el músculo liso vascular

Los canales TRP son canales catiónicos inespecíficos que debe su nombre al mutante TRP de *Drosófila*, que tiene alteraciones en la visión debido a un potencial de receptor transitorio (TRP) en vez de mantenido. Hasta la fecha se han descrito 28 genes de TRPs de mamíferos, que se agrupan en 6 subfamilias: **TRPC**, **TRPM**, **TRPV**, **TRPA**, **TRPP** y **TRPML**. Todas las proteínas TRP son canales catiónicos, pero presentan una gran variedad de mecanismos de “gating” y selectividad. Los canales TRP se pueden abrir por la unión de ligandos, por vías de señalización acopladas a proteínas G, por estímulos mecánicos o por despolarización. La mayor parte de estos canales son permeables a calcio de forma no selectiva, pero las excepciones son frecuentes: TRPV5 y TRPV6 son muy selectivos para calcio, TRPM4 y TRPM5 no son permeables a calcio y TRPM6 y TRPM7 son selectivos para magnesio (Nishida *et al.*, 2006; Stine *et al.*, 2005; Parnas *et al.*, 2011). Un gran número de estos canales se han descrito en los vasos, donde median flujos catiónicos de entrada a las células del endotelio y del músculo liso, contribuyendo así a procesos como la contracción de las VSMC, el control de la presión arterial, la respuesta a la hipoxia, al estrés oxidativo, al calor y a agentes químicos. Esta familia de canales son fundamentales en mecanosensación, quimiosensación, sensación de frío (Venkatachalam *et al.*, 2007; Damann *et al.*, 2008) y están involucrados en múltiples enfermedades inflamatorias y cardiovasculares (Nilius *et al.*, 2007).

En relación con su función en el músculo liso vascular, numerosos estudios destacan su papel en la respuesta miogénica de los vasos, el llamado *efecto Bayliss*, que consiste en que el aumento de la presión en los vasos de resistencia desencadena un aumento de la tensión activa por la contracción de las VSMC, contribuyendo así a mantener estable el flujo ante variaciones de la presión de perfusión (Minke *et al.*, 2006). En la activación de este mecanismo son esenciales canales mecanosensores, y de hecho se ha descrito recientemente el papel de los canales TRPM4 y TRPC6 en esta respuesta.

1.1.4.3.- Canales TRPA1 como moduladores del tono vascular

Aunque hasta hace poco la expresión de los canales TRPA1 se consideraba confinada a las neuronas sensoriales y a las células ciliadas del oído interno, se han descrito recientemente varios efectos del canal especialmente relevantes en el control del tono arterial.

En primer lugar, los canales TRPA1 se han involucrado en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio. En arterias cerebrales, donde se ha descrito la expresión endotelial de TRPA1, la activación de estos canales produce vasodilatación por la hiperpolarización del músculo liso mediada por el endotelio, en la que participan canales de potasio. Además, los canales TRPA1 presentes en los nervios perivasculares contribuyen a la vasodilatación de las arterias periféricas a través de un mecanismo que requiere la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Aubdool *et al.*, 2011).

Se ha sugerido también que los agonistas del canal TRPA1 inducen vasodilatación actuando sobre los canales TRPA1 presentes en las VSMC. Cuando se estudia el efecto vasodilatador de los agonistas del canal TRPA1 en anillos de aorta precontraídos, se observa que la vasodilatación disminuye, pero no desaparece, tras quitar el endotelio, sugiriendo un efecto directo de estos agentes sobre las VSMC (Clapham *et al.*, 2003).

Finalmente la administración sistémica de agonistas del canal da lugar a una respuesta de vasodilatación transitoria (el efecto mediado por el endotelio) que se sigue de un aumento mantenido en la frecuencia cardíaca y la presión arterial, y que se ha sugerido que es consecuencia de un aumento de actividad simpática.

De estos estudios parece deducirse que la activación de TRPA1 afecta a la función vascular, aunque los mecanismos parecen múltiples y su relevancia relativa no está clara. No hay acuerdo con respecto a la localización precisa de los canales, y tampoco respecto a cómo se interpretan los datos obtenidos con los moduladores del canal (agonistas y antagonistas) en los que se basan gran parte de los resultados funcionales. De hecho, la selectividad de algunos de estos agentes para TRPA1 es controvertida (ver más adelante), por lo que la interpretación de los resultados no es siempre inequívoca.

1.2.- ESTRUCTURA DE LOS CANALES TRPA1

El canal TRPA1 es un canal iónico permeable de calcio no selectivo que regula el potencial de membrana modulando el flujo de cationes, no solo de calcio, sino también de otros iones como el sodio, y que se clonó a partir de cultivos de fibroblastos humanos (Jaquemar *et al.*, 1999).

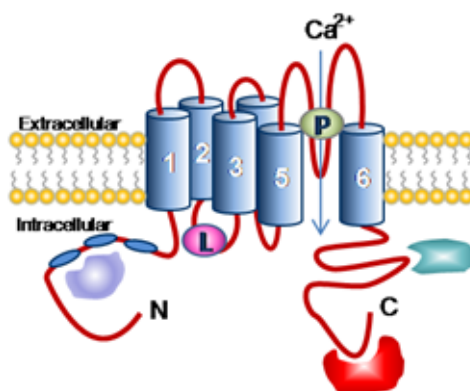


Figura 4. Estructura general del canal TRPA1. Los seis dominios transmembrana están representados por cilindros de color azul. N y C señalan respectivamente las regiones amino y carboxilo intracelulares. Los segmentos en color azul del extremo amino representan los dominios de anquirina. El dominio poro está señalado por la letra P.

Como otros miembros de la familia, los canales iónicos funcionales de TRPA1 se forman a través de la tetramerización de 4 subunidades, cada una conteniendo seis dominios transmembrana, un asa que constituye el poro entre el dominio transmembrana 5 (S5) y 6 (S6) y dominios amino y carboxilo terminales intracelulares. (Figura 4) Una característica peculiar de la estructura de TRPA1 es una larga región amino terminal que presenta 14 repeticiones de anquirina (Story *et al.*, 2003). Estas repeticiones podrían servir para la interacción con otras proteínas (Mosavi *et al.*, 2004).

1.2.1.- Farmacología del TRPA1

El TRPA1 muestra un mecanismo molecular de activación único. A diferencia de los quimiorreceptores tradicionales, el TRPA1 es modulado por un amplio rango de moléculas

estructuralmente distintas con alta reactividad química. La lista de moduladores del canal TRPA1 incluye un gran número de activadores (agonistas) e inhibidores (antagonistas).

Entre los inhibidores de la actividad de TRPA1 se encuentran compuestos de origen natural como son el alcanfor (Xu *et al.*, 2005) y el mentol (Story *et al.*, 2003), aunque el efecto se produce a concentraciones altas. Otros inhibidores son el gadolinio, el rojo de rutenio (conocido como un bloqueante inespecífico de varios canales iónicos), el antibiótico gentamicina, el diurético amiloride (Nagata *et al.*, 2005) o los compuestos sintéticos HC-030031 y AP18.

Los canales TRPA1 son activados a través de compuestos electrófilos (Andre *et al.*, 2008), compuestos no reactivos permeables a la membrana (Talavera *et al.*, 2009; Komatsu *et al.*, 2012), agentes redox (Andersson *et al.*, 2008), pequeñas moléculas (Takahashi *et al.*, 2012) y metales pesados (Gu *et al.*, 2010). Entre ellos se encuentra el aceite de mostaza (alil isocianato) conocido desde hace muchos años por inducir dolor e irritación al ser aplicado de forma tópica sobre la piel (Guimaraes *et al.*, 2007). Además, el canal iónico TRPA1 se activa por otros compuestos procedentes de plantas y conocidos también por sus propiedades irritantes. Estos compuestos incluyen el eugenol, el gingerol, el metil salicilato y el cinamaldehído (CA) (Bandell *et al.*, 2004).

Algunos de estos activadores del canal TRPA1 son por tanto sustancias presentes en alimentos comunes y plantas utilizadas en la medicina tradicional. De hecho los activadores más comunes del canal son el alil isocianato, la alicina y el CA presentes en la mostaza, el ajo y la canela respectivamente. En el caso del alil isocianato, aunque sin duda es un activador del TRPA1, estudios recientes sugieren que tiene efectos independientes de TRPA1 (Capasso *et al.*, 2012; Everaerts *et al.*, 2011) lo cual pone de manifiesto la importancia de contar con agentes farmacológicos selectivos o con ratones knockout para el canal al objeto de demostrar la especificidad de la respuesta.

Se ha descrito que la activación de TRPA1 por aceite de mostaza, CA, dialil disulfido, y acroleína tiene lugar a través de la modificación covalente de residuos de cisteína localizados en el extremo amino terminal de este canal iónico. Estas sustancias tienen en común ser reactivos electrófilos que tienen la capacidad de reaccionar covalentemente con el grupo tiol de los residuos cisteína (Macpherson *et al.*, 2007).

Tal y como se ha comentado, la activación del TRPA1 media en la vasodilatación y puede ocasionar cambios en la presión sanguínea. Sin embargo, el papel de estos canales en el sistema vascular no está bien establecido. Si bien parece demostrada su presencia en la pared vascular, y el hecho de que su activación con agonistas químicos causa vasodilatación, no se sabe en qué situaciones fisiológicas o fisiopatológicas se activan estos canales. La activación de los canales TRPA1 por sustancias presentes en el ajo, la mostaza o la canela ha llevado a sugerir que esta respuesta podría ser la base de los putativos efectos cardioprotectores de estos alimentos, pero este punto no se ha demostrado experimentalmente. De hecho parece bastante improbable que la detección de sustancias de la dieta sea la función primaria de los canales TRPA1 vasculares. Parece más probable que otros factores como el estrés oxidativo y la hipoxia sean los reguladores endógenos de los canales TRPA1 (Pozsgai *et al.*, 2010; Aubdool *et al.*, 2011).

Es importante resaltar que en gran medida, el papel fisiológico de los canales TRPA1 se ha determinado asignando a este canal los efectos de algunas de las moléculas descritas en los párrafos anteriores, asumiendo que su interacción con el canal es específica. Así, por ejemplo, en la literatura se considera que el CA es un agonista específico de los canales TRPA1, por lo que los efectos vasculares de esta sustancia se interpretan como debidos a la activación del canal TRPA1.

1.3.- CINAMALDEHÍDO (CA)

1.3.1.- Estructura y propiedades

El CA es un compuesto orgánico viscoso que se presenta en estado líquido con un color amarillento pálido y capaz de proporcionar el sabor y olor característico de la canela.

Este compuesto se presenta de forma natural como trans-cinamaldehído aunque también existe el compuesto cis-cinamaldehído. Fue aislado del aceite esencial de canela por Dumas y Péligot en 1834. Se encuentra presente en la corteza del árbol de la canela y otras especies del género *Cinnamomum*.

La molécula de CA está formada por un grupo fenilo enlazado a un aldehído insaturado. El doble enlace conjugado proporciona la geometría a este compuesto plano. (Figura 5)

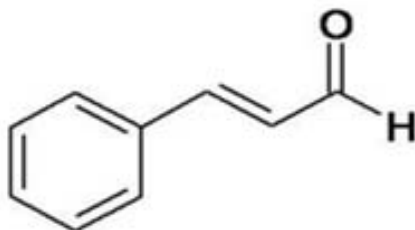


Figura 5. Molécula de cinamaldehído formada por un grupo fenilo enlazado a un aldehído insaturado y encargada del sabor y olor de la canela.

Algunas peculiaridades de esta sustancia son su baja solubilidad en medios acuosos y su punto de ebullición en torno a 248°C.

1.3.2.- Aplicaciones

- **Saborizante:** Una de las aplicaciones más obvias para el CA es como saborizante o alimento adulterante en forma de polvo aromatizado, es decir, lo que se conoce comúnmente como canela en polvo (Fahlbusch *et al.*, 2002).
- **Bioplaguicida ó fungicida:** Otra aplicación de este compuesto se presenta en el manejo y control de plagas. Esto es debido a su elevada actividad antibacteriana y baja toxicidad. Por lo tanto, el CA es un insecticida efectivo, mostrando unas propiedades potenciales antimicrobianas y biodegradables (Porrás *et al.*, 2009).

- **Antimicrobiano:** Es especialmente eficaz contra ciertos tipos de bacterias inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Helander *et al.*, 1998).
- **Agente contra el cáncer:** Según estudios de investigación recientes se ha demostrado que este compuesto bloquearía la proliferación, invasión y crecimiento tumoral aunque solo a dosis elevadas que no serían alcanzables a través de la ingesta alimentaria (Cabello *et al.*, 2009).

Asimismo, se ha postulado que como agonista selectivo de los canales TRPA1 vasculares, el CA tendría un efecto vasodilatador, contribuyendo así a aumentar el flujo sanguíneo y reducir la presión arterial.

Sin embargo, algunos de los efectos del CA son difícilmente explicables por la activación de los canales TRPA1, y de hecho están presentes en los ratones knockout para el TRPA1. Por ese motivo, en este proyecto hemos querido comprobar si la especificidad del CA sobre los TRPA1 no es absoluta, pudiendo provocar un efecto adicional sobre otras proteínas reguladoras del tono vascular desconocido hasta ahora. En concreto hemos analizado en este trabajo el efecto del CA sobre los canales de calcio operados por voltaje tipo L (LTCCs) en el músculo liso vascular procedente de arterias mesentéricas de ratón.

2.- OBJETIVOS

Como hemos resaltado a lo largo de la introducción, los canales TRPA1 se han involucrado recientemente en el control del tono vascular. En muchos casos, este papel funcional de los canales TRPA1 se basa en los efectos obtenidos con moléculas activadoras, como el CA) que se consideran específicas. Sin embargo, parte del efecto obtenido con los moduladores de los canales TRPA1 persiste en los animales knock-out. La hipótesis más sencilla es asumir que dichos moduladores pueden interactuar con otras proteínas que participen en el control del tono vascular. En concreto en este trabajo exploramos la posibilidad de que el CA pueda ser un modulador de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (LTCCs) del músculo liso vascular.

Para ello hemos estudiado los efectos del CA sobre las corrientes a través de los LTCCs de las células del músculo liso vascular de arterias mesentéricas de ratón. En concreto nos hemos propuesto abordar estos aspectos:

1. Caracterizar y cuantificar el efecto del CA sobre los LTCCs mediante la realización de una curva dosis-respuesta.
2. Estudiar la interacción del CA con los LTCCs analizando la dependencia de voltaje de la interacción y los efectos sobre la inactivación de los canales.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- CIRUGÍA

Para obtener las células de músculo liso vascular (VSMC) se emplean ratones hembras adultos de la cepa BPN (*Blood Pressure Normal*, Laboratorios Jackson).

En el procedimiento de la cirugía, primeramente se anestesian los ratones en una cámara hermética conectada a una bala de CO₂, donde se les administra un flujo continuo de CO₂ al 50% y finalmente se sacrifican por decapitación. A continuación se practica una incisión longitudinal en la zona abdominal del animal, se extrae el intestino con su lecho vascular y se realiza la cirugía en placa de Petri con una base de elastómero de silicona (Sylgard®) utilizada como soporte para clavar los pins de cirugía. Se añade a la placa de Petri una solución salina SMDS (*Smooth Muscle Dissociation Solution* 10 μM Ca²⁺) (Tabla 1) entre 0 y 4 °C para realizar la separación del mesenterio del tejido intestinal restante. Posteriormente, bajo una lupa de disección, se procede a la limpieza y aislamiento de las arterias mesentéricas de segundo y tercer orden, eliminando para ello el tejido conectivo y adiposo adyacente. Una vez realizada la disección, se procede a la obtención de las VSMC mediante disociación enzimática.

3.2.- DISOCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

El procedimiento que se lleva a cabo consiste en someter a las arterias a dos soluciones enzimáticas (Tabla 2). Primeramente, se transfieren las arterias a un vial que contiene papaína y se incuban a 37°C durante 10-12 minutos. A continuación se procede con la segunda incubación utilizando un vial que contiene colagenasa tipo F precalentada a 37°C durante un periodo de 10-12 minutos y posterior parada de la reacción con SMDS 10μM Ca²⁺ frío. (Tabla 1)



Figura 6. Esquema del procesado de la muestra desde la extracción del intestino hasta la reacción enzimática para obtener finalmente las VSMC disociadas en agudo utilizadas para los estudios electrofisiológicos.

Tras finalizar el periodo de digestión se realizan cuatro o cinco lavados en SMDS 10μM Ca²⁺ de manera que se eliminen las enzimas y posibles restos de tejido conjuntivo o hemático. Finalmente, se realiza la trituración del tejido de manera mecánica, resuspendiendo las arterias con pipetas Pasteur de diferentes diámetros con las puntas flameadas para evitar la adhesión de los tejidos a las puntas de las pipetas. Las células aisladas se conservan en un vial con el medio SMDS 10μM Ca²⁺ a 4°C, para su posterior utilización en los registros

electrofisiológicos. Estos siempre se realizaron en el mismo día en que se obtuvieron las células. (Figura 6)

3.3.- SOLUCIONES

3.3.1 SMDS (Smooth Muscle Dissociation Solution)

La solución SMDS $10\mu\text{M Ca}^{2+}$ es utilizada a lo largo del procedimiento experimental tanto en la cirugía, disección y limpieza de las arterias como en la solución enzimática para la obtención de las VSMC. Concretamente, se utilizan dos tipos de SMDS para las soluciones enzimáticas; teniendo como base en una la solución de SMDS $10\mu\text{M Ca}^{2+}$ y en la otra la solución SMDS libre de Ca^{2+} . (Tabla 1)

	SMDS $\emptyset \text{Ca}^{2+}$ (mM)	SMDS $10\mu\text{M Ca}^{2+}$ (mM)
NaCl	145	145
KCl	4.2	4.2
CaCl ₂	--	0.01
Mg ₂ Cl	1.2	1.2
KH ₂ PO ₄	0.6	0.6
HEPES	10	10
Glucosa	11	11

El pH de la solución se ajusta a **7.4** con NaOH

Tabla 1. Solución SMDS $\emptyset \text{Ca}^{2+}$ y SMDS $10\mu\text{M Ca}^{2+}$

3.3.2 Soluciones enzimáticas

Las soluciones enzimáticas se emplean para la disociación de las VSMC de las arterias mesentéricas. Esencialmente, se utilizan dos soluciones con distintas enzimas con una base de la solución SMDS carente de calcio en el caso del vial de papaína y una solución SMDS $10\mu\text{M Ca}^{2+}$ para la enzima colagenasa. (Tabla 2)

	VIAL PAPAÍNA (mM)	VIAL COLAGENASA (mM)
Colagenasa tipo F (Sigma)	--	0.56 mg/ml
Papaína (Worthington)	0.8 mg/ml	--
Albúmina bovina (Sigma)	1 mg/ml	1 mg/ml
DTE (Sigma)	1 mg/ml	--

Tabla 2. Soluciones enzimáticas para la disociación de las arterias mesentéricas.

3.3.3 Soluciones para electrofisiología

Los registros de corrientes iónicas de Ca^{2+} en configuración *whole-cell* se realizan en presencia de varios tipos de soluciones:

- **Solución interna:** se utiliza para rellenar el interior de la pipeta de registro, que va a constituir el medio intracelular. Su composición facilita el estudio de las corrientes de calcio en aislamiento y es (en mM) : 130 CsCl; 2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 HEPES; 10 BAPTA (o 10 EGTA); 4 Na_2ATP . El pH de la solución se ajusta a 7.2 con CsOH.
- **Solución externa estándar o de bario:** es la solución que baña a las células durante los registros. Su composición responde a una reproducción del medio extracelular. Para amplificar las corrientes de calcio se utiliza bario como charge-carrier ya que los canales de calcio son más permeables a este ión que a calcio. (Tabla 3)
- **Solución externa de bario en presencia de CA:** solución que baña a las células reproduciendo el medio extracelular, sin embargo contiene un componente extra, el CA, en un intervalo de concentraciones comprendido entre $100\mu\text{M}$ -3mM. (Tabla 3)

	Solución estándar (mM)	Solución de BaCl_2 (mM)	Solución con CA (mM)
NaCl	141	140	140
KCl	4.7	2.7	2.7
MgCl_2	1.2	-	-
CaCl_2	1.8	-	-
BaCl_2	-	10	10
Glucosa	10	10	10
HEPES	10	10	10
CA	--	--	0.1-3

El pH de las tres soluciones se ajusta a 7.4 con NaOH

Tabla 3. Composición de las soluciones utilizadas para los registros de corriente de Ca^{2+} en configuración *whole-cell*.

3.4.- ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

3.4.1.- Técnica de "patch clamp"

La técnica de "patch clamp" o de pinzamiento de membrana permite estudiar y describir el funcionamiento de los canales iónicos presentes en un área de membrana sometida a fijación de voltaje, de forma que se registran las corrientes iónicas producidas como consecuencia de los cambios en el potencial inducidos por el experimentador (Kaneez, 2012). Esta técnica fue desarrollada en la década de los 70 por dos científicos alemanes, Erwin Neher y Bert Sakmann, y por ello obtuvieron el premio nobel de Fisiología en 1991. La técnica permite fijar el voltaje a través del área de membrana incluida en la punta de una micropipeta de vidrio gracias a la formación de un sello de alta resistencia ($>1 \text{ G}\Omega$) entre la pipeta y la

membrana. La pipeta contiene un electrodo en su interior de forma que un amplificador operacional en la configuración de un convertidor corriente-voltaje permite de forma simultánea controlar el potencial de la membrana y registrar la corriente que fluye a través de los canales iónicos presentes en la misma.

El potencial de membrana depende de diversos canales iónicos presentes en la membrana celular los cuales permiten el tránsito de iones hacia dentro o fuera de la célula en función de su gradiente electroquímico. De hecho, el comportamiento eléctrico de una membrana puede representarse por un circuito RC en paralelo, en el que la *Resistencia* representa la conductancia de los diferentes canales presentes en la membrana y la *Capacitancia* representa las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica. (Figura 7)

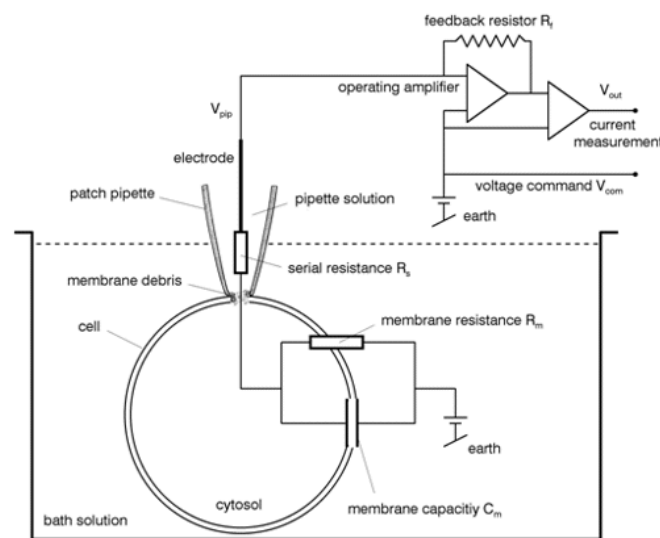


Figura 7. Representación del circuito eléctrico de una célula.

De este modo, la corriente a través de un canal viene descrita por la siguiente ecuación:

$$I_i = G_i (V_M - E_i) \quad \text{Ec. 1}$$

donde I_i es la corriente mediada por un ion determinado (Ca^{2+} o Ba^{2+} en nuestro caso), V_M es el potencial de membrana, E_i es el potencial de equilibrio para dicho ion y G_i es la conductancia del canal (que será función del V_M si el canal es dependiente de voltaje y con distintas propiedades cinéticas al variar V_M).

Cuando los canales son selectivos para un único ion, su potencial de equilibrio (o potencial de reversión) viene determinado por la ecuación de Nerst:

$$E_i = \frac{RT}{F} \log \frac{[I]_o}{[I]_i} \quad \text{Ec. 2}$$

donde E_i es el potencial de equilibrio para un único ión, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta (K), F es la constante de Faraday (aprox. 96500 C/mol), $[I]_o$ representa la concentración del ión en el medio extracelular y $[I]_i$ representa la concentración del ión en el medio intracelular.

Mediante la técnica de “*patch clamp*” el experimentador controla el V_M (mediante el conversor corriente voltaje del amplificador de registro) y el E_i (con la composición iónica de las soluciones de registro) y mide I_i , con lo que la dependencia de voltaje y las propiedades cinéticas de los canales iónicos (G_i) son fácilmente deducibles a partir de la ecuación 1.

Existen 4 configuraciones distintas de esta técnica dependiendo del área de membrana a través de la cual se controla el potencial (un parche o la célula entera). En este trabajo se ha utilizado la **configuración whole-cell**: aplicando una ligera succión a partir de la configuración de *cell-attached* (con la punta de la pipeta formando un sello con la membrana celular), se consigue que el parche de membrana en la punta de la pipeta se rompa, y así se establece contacto entre la solución de la pipeta y el medio intracelular. Con esta configuración se consigue controlar el contenido citoplasmático y poder ver las corrientes que fluyen a través de toda la membrana plasmática. En este trabajo, los protocolos de voltaje y la composición de las soluciones de registro se han escogido para estudiar las corrientes mediadas por los canales de calcio tipo L (LTCCs) (Hamill *et al.*, 1981).

3.4.2.- Set-up de electrofisiología

El set-up o equipo de registro electrofisiológico se compone de diversos elementos:

- **Cámara de perfusión**, formada por una cámara de policarbonato (RC-24E, Warner Instruments, Hamden, CT, USA), situada en una plataforma de aluminio (P1, Warner Instruments), que permite un flujo laminar y un intercambio rápido de la solución extracelular. En esta cámara se colocan las células y se perfunden con distintas soluciones para mantener a las células en las mejores condiciones posibles.
- **Microscopio invertido**, IX70 (Olympus, Tokio, Japón), adaptado con un soporte para la micropipeta “electrode holder” y un sistema de macro y micromanipulación. El “holder” además de servir de soporte para la pipeta, transmite la señal eléctrica mediante un hilo de plata clorurada al amplificador. El sistema de macro y micromanipulación permite controlar el acercamiento visual de la punta de la pipeta de registro a la célula seleccionada.
- **Amplificador**, Axopatch-200A y Multiclamp 700A (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA), amplifica la señal de corriente que fluye entre el electrodo de registro y el de tierra. Además procesa la fijación del potencial de membrana o los pulsos de voltaje y permite variar el filtrado o la ganancia de la señal. Dispone de circuitos electrónicos que compensan las capacidades de la pipeta y de la célula.
- **Digitalizador**, Digidata 1322A y 1440A (Axon Instruments), permite la comunicación entre el ordenador y el amplificador.

- **Mesa antivibratoria**, (Microg 63-544, TMC, Peabody, MA, USA), evita las vibraciones del entorno. Sobre esta mesa se coloca el microscopio invertido y sistema de perfusión y todo ello se coloca dentro de una jaula de Faraday, aislando la muestra de campos eléctricos externos.
- **Sistema de perfusión**, son reservorios que contienen las soluciones que perfunden sobre las células a través de tubos de silicona flexibles manteniendo una velocidad de perfusión constante e independiente del contenido de solución en el reservorio. El nivel de la cámara se mantiene constante mediante una aguja hipodérmica conectada a un sistema de succión formado por una bomba de vacío y un Kitasato.

3.4.3.- Preparación de las micropipetas

Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (2.0 mm o.d, WPI) mediante un doble estiramiento en el “puller” (Narishige PP-83) y puliendo la punta de las mismas con una microforja (Narishige). A continuación, se rellenan con la solución interna previamente filtrada mediante filtros de PVDF de 0.22 μm \varnothing de poro (Millex®, Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Tras rellenar las micropipetas con la solución interna, se debe comprobar que no queden burbujas de aire que impedirían el contacto eléctrico entre electrodo y solución. Estas micropipetas presentaron resistencias entre 6 y 10 M Ω .

3.4.4.- Procedimiento para los registros de corriente a través de los LTCCs

Antes de comenzar los experimentos de “*patch clamp*”, se debe comprobar el set-up para verificar que está completo y funciona de manera adecuada en la configuración deseada.

Se utilizan dos electrodos, uno en la micropipeta y otro en la cámara de registro (electrodo de referencia). Ambos electrodos son de plata/cloruro de plata y deben estar perfectamente clorurados. La plata se clorura sumergiendo el hilo de plata en una solución de hipoclorito sódico durante al menos media hora.

Los reservorios y vías para las soluciones externas deben estar libres de suciedad y sales, por ello, es necesario hacer pasar una solución de acético al 8% seguido de agua destilada antes de los experimentos. Tras rellenar los reservorios con las soluciones, que se utilizarán en los experimentos, se deben purgar las vías para evitar que las burbujas lleguen hasta la cámara de registro. Además la cámara debe estar limpia y sin fugas. Los reservorios se encuentran situados a una altura superior al de la cámara de registro donde posteriormente se colocarán las células, de tal manera que regulando la altura a la cual se sitúa el reservorio, se puede controlar la velocidad de perfusión, 1-2ml/min.

Las células disociadas en agudo se dispusieron directamente en la cámara de registro (0.2 ml) en la pletina del microscopio invertido, donde decantan por gravedad en la solución del baño. Estas células se dejaron asentar durante unos minutos, para que se adhiriesen al fondo de la cámara, antes de abrir la perfusión con la solución externa.

Una vez se abre la perfusión, se aproxima la micropipeta de registro a la célula seleccionada mediante el macromanipulador. Posteriormente, se establece contacto entre la punta de la micropipeta y la célula a través de un micromanipulador piezoeléctrico operando de manera visual bajo microscopio. Así se consigue un sello de alta resistencia tras aplicarle

una ligera presión negativa mediante una jeringa conectada al “holder” con un tubo de silicona (*configuración cell-attached*). En este momento sólo se registra la corriente capacitativa de la pipeta en respuesta a los pulsos de voltaje. Esta corriente capacitativa es compensada con el amplificador. A continuación se aplica un potencial negativo (-80mV) para aproximarnos al potencial de la célula en reposo. Seguidamente, se aplica una ligera succión para conseguir que el sello se rompa y obtener la *configuración whole-cell*, estableciéndose un acceso de baja resistencia al interior de la célula (resistencia de acceso o resistencia “en serie”), que permite estudiar las propiedades eléctricas de toda la membrana celular. A partir de esta configuración *whole-cell* serán registradas las corrientes iónicas a temperatura ambiente, 20-25°C (Hamill *et al.*, 1981).

Las corrientes de célula entera (*whole-cell*) se filtraron a 2 kHz (-3dB, filtro Bessel de 4 polos) y se digitalizaron muestreando a 10 kHz. La corriente *leak* se sustrajo mediante el protocolo P/4 online. (Bezanilla *et al.*, 2002) La adquisición de datos se ha realizado con el programa pCLAMP 10.2® (Axon Instruments) en un ordenador PC convencional. Los protocolos de estimulación eléctrica fueron controlados por la subrutina CLAMPEX 10.2®, que permite además, muestrear a distintas frecuencias, filtrar datos, sustraer corriente “leak” y almacenar los registros procedentes de las células.

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó utilizando CLAMPFIT 10.2 (una subrutina del software pCLAMP) y el programa ORIGIN 7.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

3.4.5.- Protocolos utilizados en el registro de corrientes de calcio

1. Curvas corriente-voltaje

La dependencia de voltaje de las corrientes mediadas por los canales de calcio tipo L se ha estudiado mediante dos protocolos:

- Rampas de 2 segundos desde un potencial de -80 mV a +40mV.
- Pulsos cuadrados despolarizantes desde -80 mV a +70 mV con incrementos de pulsos de 10 mV en sentido ascendente, de 50 ms o 250 ms de duración aplicados cada 10 segundos. (*Figura 8*)

Ambos protocolos se aplicaron en solución control (Ba^{2+}), en presencia de diferentes concentraciones de CA y de nuevo en solución control para comprobar la reversibilidad del efecto.

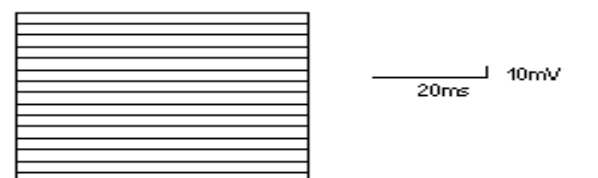


Figura 8. Protocolo de pulsos cuadrados utilizado para la obtención de una curva corriente-voltaje con una duración de 50 ms partiendo de un potencial de -80 mV, con incrementos de 10 mV hasta +70 mV, aplicado a las VSMC.

2. Inactivación en el estado estacionario (H_{∞})

Este protocolo sirve para estimar la fracción de canales inactivados en el estado estacionario en función del potencial de membrana. Se aplican prepulsos a distintos potenciales durante 500 ms desde -100 mV a +20 mV en incrementos de 20 mV, inmediatamente seguidos de un pulso de 30 ms a 0 mV. (Figura 9) El prepulso es lo suficientemente largo como para que los diferentes estados conformacionales de los canales alcancen una situación de equilibrio, de forma que la corriente obtenida durante el pulso refleja la fracción de canales no inactivados al potencial del prepulso.

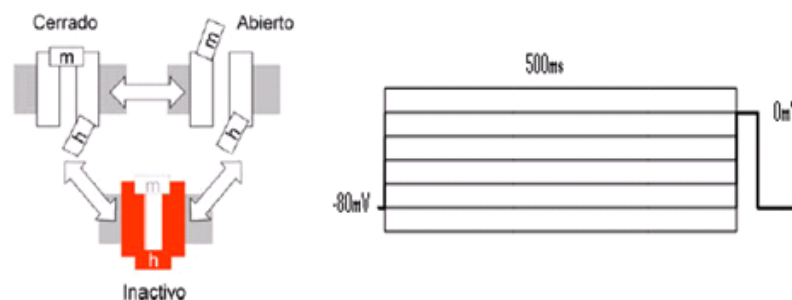


Figura 9. Protocolo utilizado para caracterizar la inactivación de los LTCCs en el estado estacionario aplicando prepulsos a distintos potenciales (desde -100 mV hasta +20 mV) durante 500 ms, seguidos de un pulso a 0mV con una duración de 30 ms.

3. Pulsos repetidos a 0 mV

Se realizó un protocolo que consistía en la aplicación repetida de pulsos a un potencial fijo de 0 mV, puesto que a ese potencial la amplitud de la corriente de los LTCCs era máxima. Se aplicaron varios pulsos de 250 ms de duración cada uno en presencia de la solución $BaCl_2$ y distintas concentraciones de la solución que contenía CA (100 μ M-3mM). Así fue posible determinar una curva dosis-respuesta dependiendo de la concentración de CA utilizada en cada pulso.

4.- RESULTADOS

4.1.- Efecto del CA sobre los canales de calcio tipo L.

Como se ha discutido en la introducción, el CA se ha considerado hasta hoy en día, un agonista específico del TRPA1 (Bandell *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se estudia el efecto del CA en la vasculatura en el ratón TRPA1^{-/-} se observa que hay una disminución significativa de la respuesta vasodilatadora aunque esta no se abole por completo (Pozsgai *et al.*, 2010; Aubdool *et al.*, 2011), lo que sugiere que el CA puede ejercer un efecto vasodilatador actuando sobre otro receptor diferente del canal TRPA1. En este trabajo, tratamos de explorar si estos efectos adicionales del CA se pueden explicar por un efecto inhibitorio sobre los canales de calcio tipo L (LTCCs).

Para ello, hemos estudiado las corrientes iónicas a través de los canales de calcio tipo L en células disociadas de arterias mesentéricas en condiciones control y en presencia de diferentes concentraciones de CA. En la parte derecha de la *Figura 10* se muestran las curvas I/V obtenidas en una célula tipo a partir de los registros, siguiendo el protocolo de pulsos descrito en la sección de métodos. En la parte izquierda se muestran como ejemplo los trazos de corriente obtenidos a tres voltajes diferentes. En condiciones control se observa una corriente de entrada que se activa en torno a -40 mV, alcanza su amplitud máxima a potenciales próximos a 0 mV y decrece a potenciales más positivos. Al añadir CA (1 mM), se comprueba que la activación de la corriente sigue el mismo patrón que en la situación control. Sin embargo la amplitud de la corriente disminuye (desde -94.46 pA hasta -32.15 pA con el pulso a

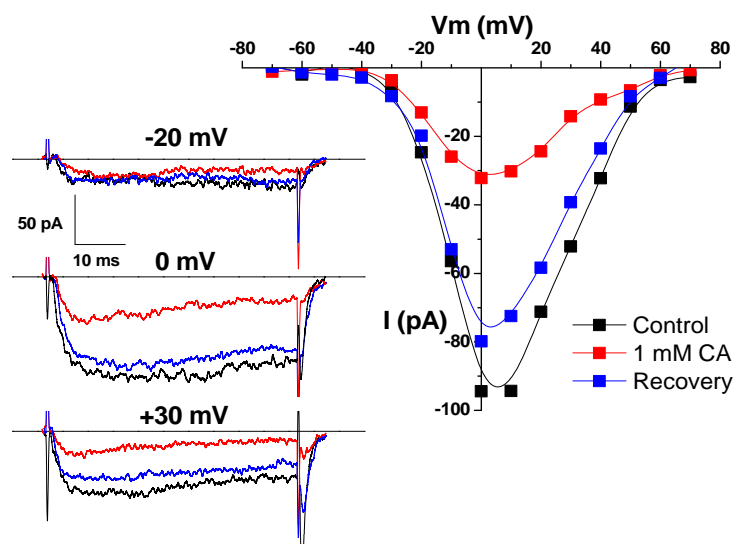


Figura 10. *Izquierda* Ejemplos de registros de corriente a través de LTCCs obtenidos en la configuración de *whole-cell* con pulsos de voltaje a -20mV, 0mV y +30mV, en solución control (trazo negro), en presencia de 1mM CA (trazo rojo) y tras volver a solución control (trazo azul). *Derecha* Curva I/V obtenida a partir de los registros de la corriente de calcio tomando para cada valor de potencial la amplitud pico de la corriente. Se representan los valores obtenidos en condiciones control (■), en presencia de 1mM CA (■) y tras volver a solución control (■).

0 mV), lo que sugiere que el CA es un bloqueante de los canales de calcio tipo L. Finalmente, al eliminar el CA de la solución de registro, la amplitud de la corriente vuelve a valores similares a los obtenidos antes de aplicar el estímulo. El hecho de que la recuperación de la corriente no sea completa es probablemente consecuencia de la disminución progresiva de las corrientes de calcio a lo largo del registro en condiciones de *whole-cell (run down)*.

4.2.- Dosis-dependencia del efecto del CA.

Tras comprobar que el CA es un bloqueante de los LTCCs, decidimos caracterizar la dosis-dependencia del efecto.

El efecto de las distintas concentraciones de CA se estudió analizando curvas I/V obtenidas mediante pulsos cuadrados o mediante una rampa, tal y como se describe en métodos. En la *Figura 11* se muestran dos ejemplos de ambos protocolos obtenidos en dos células diferentes. En estos ejemplos se aplicaron varias concentraciones de CA, obteniéndose una inhibición dependiente de la dosis y que fue máxima a 3 mM.

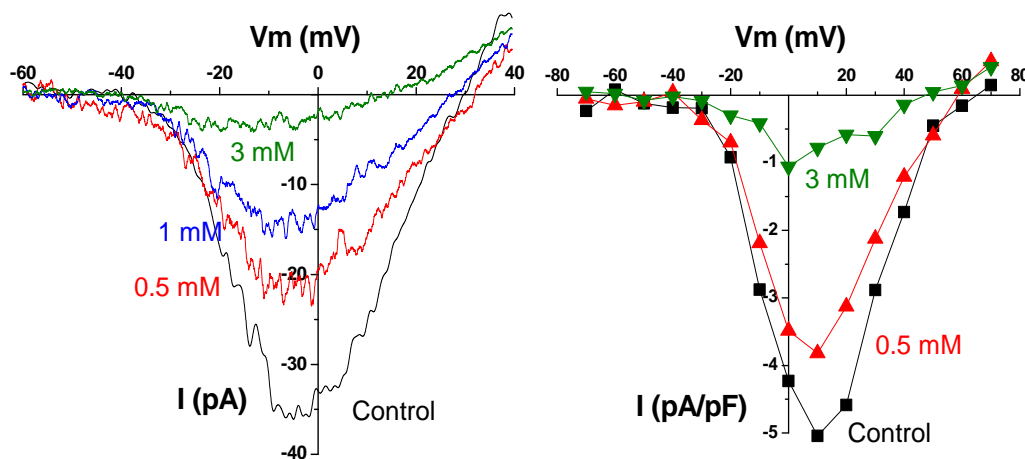


Figura 11. Izquierda. Curvas I/V obtenidas a partir del protocolo de rampas de 2 segundos. Se representan los valores obtenidos en situación control y en presencia de diferentes concentraciones de cinamaldehído (0.5-3 mM). Derecha. Curvas densidad de corriente/voltaje obtenidas mediante el protocolo de pulsos cuadrados. En este caso se representan los valores de la amplitud pico de la corriente, normalizados con la capacidad, para el control y dos concentraciones de cinamaldehído 0.5 mM y 3mM.

Las curvas I/V obtenidas con ambos protocolos son muy similares, aunque con el protocolo de rampas se obtiene la corriente máxima y el potencial de reversión a voltajes menos despolarizados que con el protocolo de pulsos cuadrados.

El potencial de reversión registrado en condiciones control se sitúa en torno a los +60 mV en el protocolo de pulsos y a los +30 mV en el caso de las rampas. Si la corriente registrada fuera exclusivamente debida al movimiento de iones Ba^{2+} a través de los LTCCs, el potencial de reversión debería ser idéntico en ambos casos y aproximarse a infinito (*Ec. 2*, métodos). Sin embargo, la corriente total registrada es la suma algebraica de las corrientes de entrada mediadas por los iones Ba^{2+} a través de los LTCCs y las corrientes de salida mediadas por los iones Cs^{+} a través de los canales de K^{+} . A potenciales positivos la corriente de Ba^{2+} va disminuyendo mientras que la corriente de Cs^{+} va aumentando, con lo que la suma algebraica

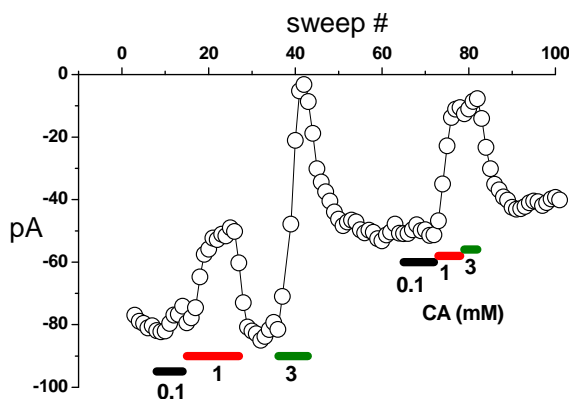


Figura 12. Amplitud de la corriente observada mediante un protocolo de pulsos a un potencial de 0 mV repetidos cada 15 segundos. Se representa la amplitud de la corriente frente al número de pulso. Las barras horizontales representan el tiempo de aplicación de las concentraciones de CA indicadas en la figura.

nos proporciona un potencial de reversión aparente próximo a +60 mV. En el caso de las rampas, el potencial de reversión es aún menos positivo debido al proceso de inactivación de los canales de calcio. Del mismo modo, el bloqueo de los canales de calcio tipo L por altas concentraciones de CA desplaza el potencial de reversión aparente (especialmente con los protocolos de rampas) hacia potenciales aún menos positivos.

La dependencia de la concentración de CA del bloqueo de los canales de calcio tipo L se estudió también mediante otro

abordaje experimental, tal y como se muestra en la *Figura 12*. En este grupo de experimentos se aplicaron pulsos de 50 ms de duración a 0 mV cada 15 segundos. La amplitud del pulso se escogió teniendo en cuenta que 0 mV es el potencial al cual se alcanza la máxima amplitud de corriente. Durante el experimento se añadieron a la solución extracelular diferentes concentraciones de CA, tal y como se muestra. Este protocolo experimental tiene como ventaja el que puede evaluarse fácilmente el *run down* de las corrientes, de forma que puede cuantificarse con más exactitud el efecto del CA utilizando la siguiente fórmula,

$$E = 100 - \frac{I_{CA}}{(I_C - I_R)/2} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde E es el % de inhibición, I_{CA} es la corriente en presencia de CA, I_C la corriente en situación control antes de aplicar el CA e I_R es la corriente obtenida tras retirar el CA y haber obtenido la máxima reversión del efecto. Los datos obtenidos como consecuencia de este análisis y representados en escala logarítmica se muestran en la *Figura 13*. La curva continua muestra el ajuste de los datos a una ecuación de Hill,

$$E = \frac{100 \cdot [CA]^n}{IC_{50}^n + [CA]^n} \quad \text{Ec. 4}$$

donde IC_{50} es la concentración de CA que produce el 50% del efecto y n es el coeficiente de Hill (Weiss *et al.*, 2006). La inhibición de los LTCCs se hace evidente a partir de una concentración de CA superior a 100 μ M y se alcanza una inhibición prácticamente completa con concentraciones en torno a 3 mM. Los parámetros obtenidos en el ajuste fueron una IC_{50} de 0.86 ± 0.02 mM y un coeficiente de Hill de 2.02 ± 0.11 .

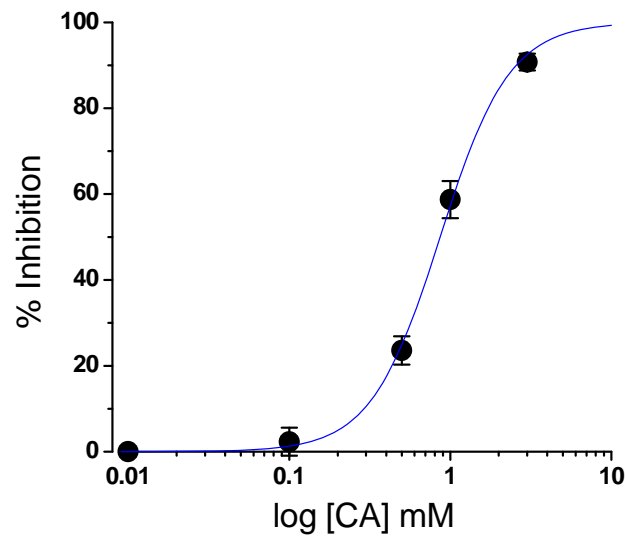


Figura 13. Porcentaje de inhibición de la corriente de los LTCCs obtenida en VSMCs de arterias mesentéricas a diferentes concentraciones de CA. Los valores representados son la media \pm error estándar de 4-8 experimentos. La línea azul representa el ajuste de los datos a una función de Hill, tal y como se describe en el texto.

4.3.- Estudio de la dependencia de voltaje del efecto del CA.

Además de estudiar el efecto inhibitor del CA sobre los LTCCs y cuantificar su magnitud en función de la dosis, nos planteamos analizar si el efecto es dependiente del voltaje. Para ello calculamos el porcentaje de inhibición para cada potencial a dos concentraciones de CA próximas a la IC_{50} , tal y como se muestra en la *Figura 14*. Aunque la magnitud de la inhibición observada es dependiente de la concentración de CA, no se encontraron diferencias

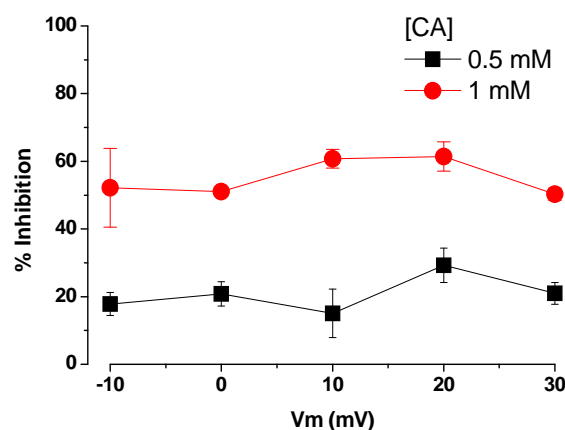


Figura 14. Efecto del CA (0,5-1mM) sobre las corrientes a través de los canales Ca_L . En la gráfica, se aprecia que la inhibición de la corriente es significativamente distinta entre concentraciones pero no dependiente del voltaje aplicado.

significativas en el efecto cuando se estudió a diferentes potenciales entre -10 y +30 mV. La cuantificación del efecto del CA a potenciales fuera de ese rango es difícil por el pequeño tamaño de las corrientes. Estos resultados sugieren que el efecto del CA no es dependiente del potencial de membrana.

4.4.- Efecto del CA sobre la inactivación de los LTCCs.

Los datos obtenidos con pulsos despolarizantes de corta duración (50 ms) sugerían que el CA además de bloquear las corrientes podría modular la cinética de inactivación de los canales (ver trazo a 0 mV de la *Figura 10*). Por ello decidimos caracterizar el efecto del CA tanto sobre la cinética de la inactivación como sobre la inactivación en el estado estacionario.

4.4.1- Efecto del CA sobre la cinética de inactivación.

Para estudiar el efecto del CA sobre el curso temporal de la inactivación se aplicaron concentraciones de CA próximas a la IC_{50} mientras se registraban las corrientes de calcio con un protocolo de pulsos despolarizantes con una duración de 500 ms. La frecuencia de estimulación se ajustó para asegurar la recuperación de la inactivación en el intervalo interpulso (> 30 seg.). Un experimento tipo se muestra en la *Figura 15*. En la parte izquierda se muestran la amplitud máxima de la corriente y el tiempo en el que la corriente decae al 50%

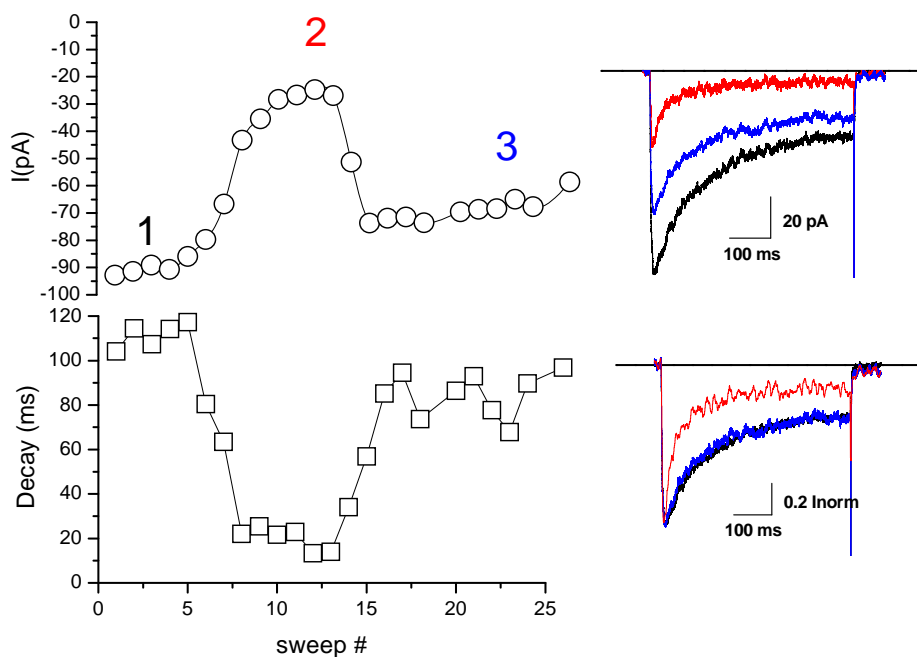


Figura 15. Izquierda. En la parte superior se representa la amplitud máxima de la corriente obtenida aplicando un pulso de 500 ms a 0 mV cada 30 segundos. Los trazos 1 a 4 se obtuvieron en solución control (1), los trazos del 5 al 13 se obtuvieron en presencia de CA 1 mM (2) y el resto tras volver a solución control (3). En el gráfico inferior está representado el tiempo en el que la corriente decae a un 50% de su valor máximo en cada pulso. **Derecha.** Trazos correspondientes a los pulsos indicados en la gráfica de la izquierda, representados como corriente (arriba) o normalizados al valor de la corriente máxima (abajo). Trazos negros: control. Trazos Rojos: CA 1mM. Trazos azules: Recuperación.

de su valor máximo (“Decay time”) en función del número de pulso. En la parte derecha se muestran los trazos de corriente correspondientes a los pulsos indicados. El CA 1mM se aplicó entre los pulsos 5 y 13. En los trazos inferiores la corriente máxima se ha normalizado a 1 en cada caso. En este ejemplo resulta evidente que el CA acelera el curso temporal de la inactivación.

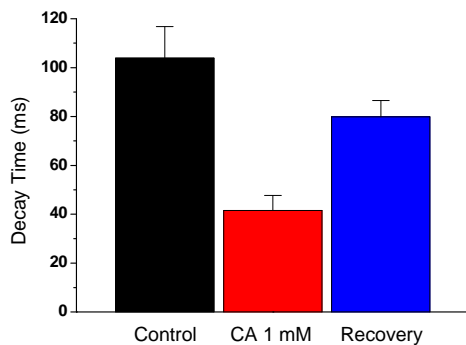


Figura 16. Diagrama de barras representando el tiempo de disminución de la corriente a un valor del 50 % de la corriente máxima. Negro: Situación control, rojo: 1mM CA y azul: recovery.

El curso temporal de la inactivación en condiciones control sigue una función monoexponencial, mientras que la inactivación en presencia de CA se describe adecuadamente con la suma de dos funciones exponenciales. Esta diferencia dificulta la comparación cuantitativa del efecto del CA, por lo que se ha decidido realizar la cuantificación utilizando el tiempo de disminución de la corriente a un valor del 50 % de la corriente máxima. Los resultados promedio obtenidos en 6 células se muestran en la *Figura 16*. En situación control las corrientes tardan $103,91 \pm 12,93$ ms en decaer al 50% de su valor máximo, mientras que en presencia de 1mM de CA ese tiempo se acorta a $41,47 \pm 6,21$ ms. Tras volver a la situación control prácticamente se recupera la cinética de activación previa a la aplicación del CA. Estos resultados demuestran que el CA acelera la cinética de inactivación de los LTCCs.

4.4.2.- Efecto del CA sobre la inactivación en el estado estacionario.

Además de los efectos sobre la cinética de inactivación, decidimos caracterizar el efecto del CA sobre la inactivación en el estado estacionario (H_{∞}). Para estimar la fracción de canales inactivados en el estado estacionario en función del potencial de membrana se emplea un protocolo que consta de 7 parejas de pulsos consecutivos. El primer pulso de la pareja (P_1 , prepulso) tiene una duración de 500 ms y se aplica en incrementos de 20 mV desde -100 mV a +20 mV. El segundo pulso (P_2 , pulso) tiene una duración de 30 ms y se aplica de forma constante a un valor de 0 mV (Ver sección métodos). Este protocolo se realizó tanto en ausencia como en presencia de CA 1mM. En la parte izquierda de la *Figura 17* se muestra como ejemplo los resultados obtenidos en condiciones control al aplicar dos de los pulsos del protocolo (los correspondientes a P_1 -100 mV y P_1 +20 mV). Además puede apreciarse que la duración del prepulso (P_1) es lo suficientemente larga para que el proceso de inactivación se complete y se alcance una situación de equilibrio, de forma que la corriente obtenida durante el pulso (P_2) reflejará la fracción de canales no inactivados al potencial del prepulso (P_1).

En la parte derecha de la *Figura 17* se representan los datos promedios de la amplitud de la corriente obtenidos durante el P_2 (normalizados frente al valor de corriente obtenido para la pareja de pulsos con P_2 -100 mV) frente al valor del potencial del P_1 , en situación control y en

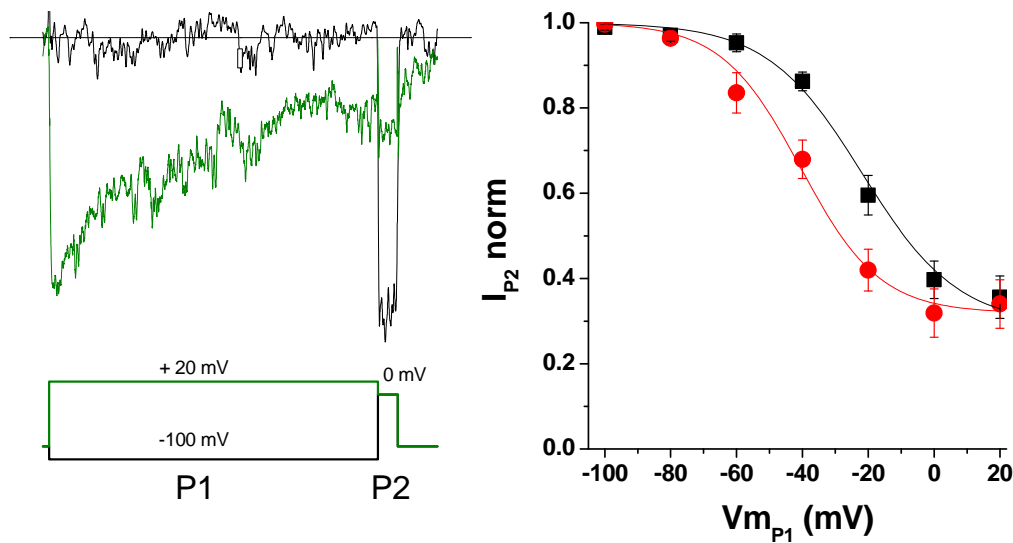


Figura 17. Izquierda Ejemplo de dos trazos del protocolo utilizado para estudiar la inactivación en el estado estacionario en situación control aplicando prepulsos a -100mV y +20mV. Derecha La corriente durante el pulso (P2) se normaliza con la corriente máxima y se representa frente al potencial del prepulso (P1), en condiciones control (■) y en presencia de 1 mM CA (●). Los trazos continuos representan el ajuste de los datos a una función de Boltzman, tal y como se describe en el texto.

presencia de CA 1 mM. En ambos casos, los datos se ajustaron a una función de Boltzman de la forma,

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1-C}{1+\exp\left(\frac{V-V_{0.5}}{dx}\right)} + C \quad \text{Ec. 5}$$

donde V es el potencial del prepulso (P_1), $V_{0.5}$ es el potencial al cual el 50% de los canales están inactivados, dx determina la pendiente de la sigmoide y C representa el porcentaje de la corriente no inactivante.

Los parámetros del ajuste en condiciones control y en presencia de CA 1mM se resumen en la *Tabla 4*.

	Control	1 mM CA
$V_{0.5}$	-21,76 ± 4,5	-40,56 ± 3,4
dx	14,47 ± 2,3	12,03 ± 1,2
C	0,29 ± 0,06	0,32 ± 0,04

Tabla 4. Parámetros del análisis de la inactivación de los LTCCs en el estado estacionario. Los datos en situación control y en presencia de CA 1mM se ajustan a una función de Boltzman descrita en el texto.

Tal y como puede apreciarse en la *Figura 17* y en la *Tabla 4*, el CA desplaza el $V_{0.5}$ de la inactivación hacia potenciales más negativos, de forma que a un potencial determinado, aumenta la fracción de canales inactivados.

5.- DISCUSIÓN

En este trabajo se ha explorado el efecto que provoca el CA sobre los canales de calcio tipo L (LTCCs) presentes en las células del músculo liso vascular (VSMC) y por tanto su posible repercusión en la regulación del tono vascular (Li *et al.*, 2003). Para proporcionar una mejor visión del conjunto de los datos obtenidos, discutiremos cada punto de los resultados.

En la literatura se describe el CA como un agonista del TRPA1 (Tamura *et al.*, 2002) con un efecto bimodal sobre este canal (Gees *et al.*, 2012). Sin embargo, los datos obtenidos en animales KO para el receptor TRPA1 muestran que aunque la respuesta de vasodilatación al CA está claramente disminuída, no desaparece totalmente. Estas observaciones podrían explicarse si el CA no actuara únicamente como agonista de los canales TRPA1 sino que tuviera efectos adicionales sobre algún otro canal. De hecho, un efecto inhibitor sobre los LTCCs podría explicar el efecto vasodilatador del CA ya que se sabe desde hace tiempo que los LTCCs (en concreto el canal $Ca_v1.2$, que es la isoforma predominante en las VSMC) juegan un papel importante en determinar la presión arterial (Moosmang *et al.*, 2003), y de hecho los bloqueantes específicos de estos canales son una clase importante de fármacos anti-hipertensivos (Moosmang *et al.*, 2006). La importancia de los LTCCs, ha sido la clave de nuestra elección para su estudio en este proyecto.

Como ya se ha comentado en la introducción, los VOCCs constituyen la principal vía de entrada de calcio extracelular en las VSMC. Las VSMC expresan dos tipos funcionales de VOCCs, los canales tipo L (LTCCs) y los canales tipo T (TTCCs) (Latorre *et al.*, 1996). La elección de los LTCCs como objetivo de nuestro trabajo se ha basado en que la expresión de los TTCCs no se ha podido observar en todos los lechos vasculares, y además su contribución funcional está poco estudiada, mientras que si está claramente establecida la importancia funcional de los LTCCs. Estos canales se caracterizan por su alto umbral de activación (también se llaman **HVA**, de *high voltage activated*) y por su sensibilidad a dihidropiridinas (DHP) (Mori *et al.*, 1996; García *et al.*, 2004). Además, la despolarización de las VSMC conlleva la apertura de los LTCCs, dando lugar a la entrada de calcio que conduce al aumento en los niveles intracelulares de este ion.

Para confirmar que las corrientes de calcio analizadas en este proyecto provenían de los LTCCs comprobamos que las corrientes de entrada por estos canales se observan a partir de pequeños valores despolarizados en el potencial (-40mV), y que su amplitud máxima está en torno a un potencial de 0 mV. Además, en estudios previos del grupo, se ha explorado también su cinética y su perfil farmacológico, demostrando que eran canales tipo L (datos no mostrados). Sin embargo, no podemos descartar que exista un pequeño porcentaje de las corrientes totales que esté mediado por otros canales distintos de los canales tipo L y que no hayamos detectado en nuestro estudio por su pequeña amplitud.

Respecto los efectos del CA sobre el TRPA1 descritos en la literatura (Gees *et al.*, 2012; Sadofsky *et al.*, 2010) se ha demostrado que una concentración extracelular de CA 100 μ M estimula fuertemente las corrientes a través de este canal, tal y como se muestra en la gráfica izquierda de la *Figura 18*, en la que se muestra el aumento de la concentración de calcio por entrada de calcio a través de canales TRPA1 activados por diversos agonistas, entre ellos CA. En ese experimento, la IC_{50} para el efecto del CA fue de 0.09mM. Los resultados obtenidos en

nuestros experimentos muestran una IC_{50} muy superior con un valor de 0.86 ± 0.02 mM (Figura 13, figura 18 derecha). Sin embargo, en un rango de concentraciones de CA a partir de 0.1 mM, hemos comprobado que este fármaco no solo afecta a los canales TRPA1, sino que muestra un efecto adicional sobre los LTCCs, tal y como se muestra en la Figura 18 (derecha), en la que se representan la curva dosis-respuesta de la inhibición por CA de los LTCCs obtenida en este trabajo y superpuesta (en rojo) la curva de activación por CA de los canales TRPA1 obtenida del trabajo de Sadofsky *et al.* representado en la parte izquierda. La zona sombreada en gris refleja el rango de concentraciones dentro del cual ambos canales estarían afectados por el CA. Estos resultados permiten explicar algunas controversias en la literatura, como la persistencia de una respuesta de vasodilatación en respuesta a CA en los ratones TRPA1 -/-.

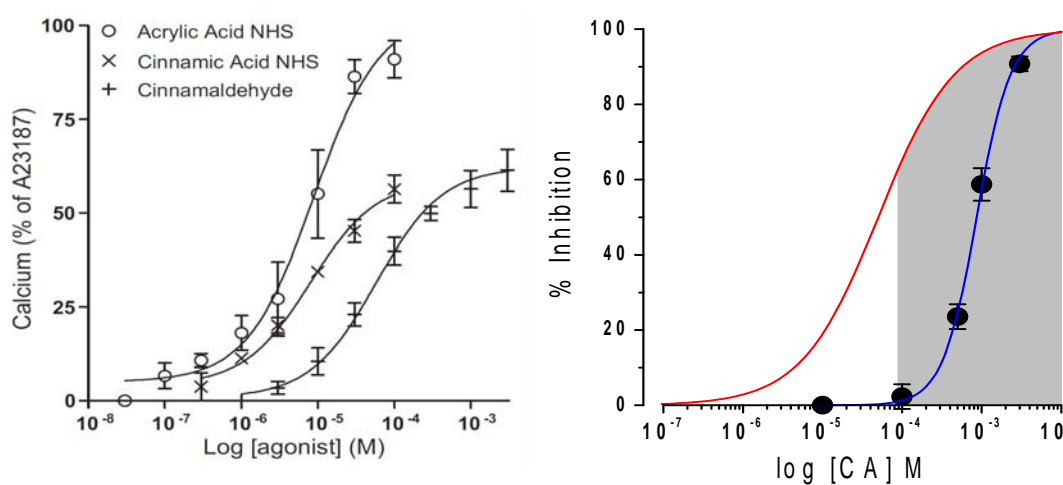


Figura 18. Izquierda. Experimento que representa el % de calcio intracelular frente al log de la concentración de agonistas como el ácido acrílico, cinámico y el cinamaldehído (Sadofsky *et al.*, 2010) **Derecha.** Representación de nuestros datos del % de inhibición de las corrientes de calcio frente al log de la concentración de CA, combinado con los datos de la izquierda. La zona sombreada representa el rango de concentración del CA en el que hay efecto sobre los LTCCs y los canales TRPA1.

Además, tal y como hemos comentado, nuestros resultados del efecto inhibitor del CA sobre los LTCCs en las VSMC demuestran que en base a la concentración de CA presente en el medio, el efecto bloqueante varía (Figura 13). Esta dependencia con la dosis del fármaco se ajusta a una ecuación de Hill (Hill, 1910; *Ec. 4*) con una IC_{50} de 0.86 ± 0.02 mM y un n de 2.02 ± 0.11 . El coeficiente de Hill proporciona información del grado de cooperatividad en la unión de un ligando a su receptor, y representa una estimación del número mínimo de sitios de unión presentes en el receptor (Weiss *et al.*, 2006). Se conocen bastantes detalles sobre la arquitectura molecular de los dominios del canal de calcio tipo L donde se unen los fármacos y las implicaciones para la farmacología del canal. Se sabe que los LTCCs poseen dominios de unión de alta afinidad dentro de su subunidad α_1 para la interacción con diferentes tipos de fármacos. Esta alta afinidad de unión induce el bloqueo de las corrientes de calcio por acción de sus antagonistas en las VSMC resultando efectos antihipertensivos (Striessnig *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta la estructura de los LTCCs (ver introducción) y los parámetros obtenidos con el ajuste a la ecuación de Hill, es razonable especular que puedan existir cuatro sitios de

unión de baja afinidad, uno en cada dominio I-IV, con un alto grado de cooperatividad en la unión del CA.

En relación con una posible dependencia del voltaje de la unión del CA a los canales de calcio, los resultados obtenidos muestran que no existe ninguna dependencia con el voltaje, puesto que el efecto no se ve alterado cuando se aplican diferentes valores del potencial. El CA podría actuar como un bloqueante del poro de conducción o podría interactuar con el canal desde la bicapa lipídica (Herbette *et al.*, 2004). La ausencia de carga en la molécula de CA, su carácter lipofílico y la ausencia de dependencia de voltaje en la interacción sugieren que el CA interactúa con el canal desde la bicapa lipídica.

Además del efecto bloqueante del CA sobre los LTCCs, hemos logrado describir el curso temporal de inactivación de estos canales en presencia de este fármaco. En condiciones control los canales inactivan siguiendo una cinética monoexponencial. El mecanismo de inactivación de los LTCCs presenta dos componentes según la literatura: uno dependiente de voltaje, y otro, más lento, que parece deberse a la propia entrada de calcio y a su acumulación en el citosol (Parnas *et al.*, 2011), aunque el componente mediado por calcio está minimizado en nuestras condiciones de registro, ya que utilizamos Ba^{2+} como *charge-carrier*. En presencia de CA los canales inactivan más deprisa, con un curso temporal biexponencial. Este hecho puede ser debido a que el CA interfiere con los mecanismos implicados en la inactivación o a que el CA es un bloqueante de "canal abierto", en cuyo caso la aparente aceleración de la inactivación estaría reflejando la cinética de interacción del CA con el canal en estado abierto. Sin embargo, los cambios observados al analizar la inactivación en el estado estacionario y el hecho de que el CA sea una molécula muy lipofílica favorecen la hipótesis de que el CA está en realidad modificando la inactivación de los LTCCs.

Por último, la fracción de canales inactivados en función del potencial de membrana durante despolarizaciones mantenidas (estado estacionario) se ha determinado mediante el protocolo de doble pulso. La amplitud de la corriente durante el segundo pulso de voltaje constante disminuye en función de la fracción de canales inactivados durante el primer pulso de voltaje variable tal y como se muestra en la *Figura 17*. La representación gráfica de la amplitud normalizada se ajustó a una función de Boltzmann descrita anteriormente. Con este protocolo, hemos podido observar que el CA produce un desplazamiento hacia valores más hiperpolarizados de la $V_{0.5}$ de forma que a cualquier valor de potencial entre -70 y 0 mV la fracción de canales inactivados en el estado estacionario es mayor en presencia de CA. El CA no modifica sin embargo los otros parámetros de ajuste (la fracción de canales que no inactivan y la pendiente de la dependencia de voltaje).

En definitiva, con este proyecto hemos logrado demostrar que el CA es capaz de ejercer un efecto bloqueante sobre los LTCCs siendo significativo a concentraciones superiores a $100\mu M$. Además hemos demostrado que este efecto no depende del voltaje, pero que produce cambios en la cinética del canal porque determina una aceleración de la inactivación, así como un incremento en el número de canales inactivados.

6.- CONCLUSIONES

1. El CA ejerce un efecto inhibitor sobre los canales de calcio operados por voltaje tipo L que se hace significativo a partir de una concentración de CA 100 μ M.
2. La curva dosis-respuesta del efecto del CA se ajusta a una ecuación de Hill con una IC_{50} de 0.86 ± 0.02 mM y un n de 2.02 ± 0.11 .
3. No existe dependencia del efecto del CA con el voltaje, ya que en un rango de potencial entre -10 mV y +30 mV, el porcentaje de inhibición no varía en presencia del fármaco.
4. El CA modula la inactivación de los LTCCs, acelerando el curso temporal de la inactivación y aumentando la fracción de canales inactivados en el estado estacionario.
5. El CA puede ser considerado un bloqueante específico del TRPA1 a concentraciones inferiores a 100 μ M.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, P.I. and Ward, J.P.T.; "The Cardiovascular System.", Oxford, 2004.
- Andersson, D. A.; Gentry, C.; Moss, S. and Bevan, S.; "Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress.", *J. Neuroscience* 28, 2485-94, 2008.
- Andre, E. et al.; "Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha, beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents.", *J Clin Invest* 118, 2574-82, 2008.
- Aubdool A., Fernandes E.S., Bevan S. et al.; "Neurovascular effects of Cinnamaldehyde through activation of TRPA1: mechanism underlying TRPA1-induced vasodilatation in the peripheral vasculature.", *E- journal of the British Pharmacological Society*, London, UK, 2011.
- Bandell, M.; Story, G.M.; Viswanath, V.; Petrus, M.J. et al.; "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin.", *Neuron* 41:849-857, 2004.
- Bezánilla, F.; "Voltage Sensor Movements.", *J Gen Physiol.*, 120:465-473, 2002.
- Cabello, C.M.; Bair, W.B.; Lamore, S.D. et al.; "The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth.", *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2): 220–231, 2009.
- Capasso, R.; Aviello, G.; Romano, B. et al.; "Modulation of mouse gastrointestinal motility by allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables (Brassicaceae): evidence for TRPA1-independent effects.", *J Pharmacol.*, 165(6):1966-77, Italy, 2012.
- Catterall, W.A.; Perez-Reyes, E.; Snutch, T.P. and Striessnig, J.; "Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels.", *Pharmacol Rev.*, 57:411-425, 2005.
- Clapham, D.E.; "TRP channels as cellular sensors.", *Nature* 426: 517–524, 2003.
- Damann, N.; Voets, T. and Nilius, B.; "TRPs in our senses.", *Curr Biol* 18, R880-9, 2008.
- Everaerts, W.; Gees, M.; Alpizar, Y. A.; Talavera, K. et al.; "The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil.", *Curr Biol.*; 21(4):316-21, Belgium, 2011.
- Fahlbusch, K.; Hammerschmidt, F.; Panten, J. et al.; "Flavors and Fragrances", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, 2002.
- García, A.G.; Michelena P. y Gandía L.; "Fármacos antagonistas del calcio", 2004.
- Gees M.; Sanchez A.; Apetrei A.; Voets T. et al.; "ION CHANNELS, RECEPTORS AND TRANSPORTERS: Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1.", 2012.
- Gu, Q. and Lin, R. L.; "Heavy metals zinc, cadmium, and copper stimulate pulmonary sensory neurons via direct activation of TRPA1.", *J Appl Physiol* 108, 891-7, 2010.
- Guimaraes, M. and Jordt, S.E.; "TRPA1: A Sensory Channel of Many Talents. TRPA1 Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signalling Cascades.", pp 151-163. London, 2007.
- Hamill, O.P.; Neher, E. et al.; "Improved patch clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches.", *Journal of Phys.*, 391:85-100, 1981.
- Helander, I.M.; Alakomi, H.L. et al.; "Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria.", *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590–3595, 1998.

Herbette, L.; *"Membrane pathways for drug/ion channel interactions: Molecular basis for pharmacokinetic properties."*, 2004.

Hill, A.V.; *"The combination of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide."*, I.J. Physiol.40, IV-VII, 1910.

Hockerman, G. H.; Blaise Z. P.; Barry D. J. and Catterall, W. A.; *"Molecular determinants of drug binding and action on l-type calcium channels."* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Washington 98195-7280, 1997.

Jaquemar, D.; Schenker, T. and Trueb, B.; *"An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts."*, J Biol Chem 274:7325-7333, 1999.

Kaneez, F.; *"Patch Clamp Technique."*, 356 pages, 2012.

Klabunde, R. E.; *"Cardiovascular Physiology concepts."*, Baltimore, Maryland, 2005.

Komatsu, T.; Uchida, K.; Fujita, F. et al.; *"Primary alcohols activate human TRPA1 channel in a carbon chain length-dependent manner."* Pflugers Arch, 2012.

Latorre, R.; Lopez-Barneo J. et al., *"Biología y fisiología general"*, Universidad de Sevilla, 1996.

Levick, J.R.; *"An Introduction to Cardiovascular Physiology."*, 2003.

Levy, M.N. and Pappano, A.J.; *"Cardiovascular Physiology."*, Philadelphia, 2007.

Li, P.Y.; Zeng, X.R. et al. *"Rhynchophylline-induced vasodilation in human mesenteric artery is mainly due to blockage of L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells."*, China, 2003.

Macpherson, L.J.; Dubin, A.E.; Evans, M.J. et al.; *"Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines."*, Nature; 445:541-5, 2007.

Minke, B.; *"TRP channels and Ca²⁺ signaling."*, Cell Calcium, Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel, 2006.

Moosmang, S.; Haider, N.; Bruderl, B. et al.; *"Antihypertensive effects of the putative T-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2."*, Circ Res., 98:105-110, 2006.

Moosmang, S.; Schulla, V.; Welling, A. et al.; *"Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation."*, EMBO J., 22:6027-6034, 2003.

Moreno, D.H.; *"Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels."*, Ann N Y Acad Sci., 868:102-117, 1999.

Mori, Y.; Gabor, M.; Varadil, G. et al.; *"Molecular Pharmacology of Voltage-Dependent Calcium Channels."*, Ohio, USA, 1996.

Mosavi, L.K.; Cammett, T.J.; Desrosiers, D.C. and Peng, Z.Y.; *"The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition."*, Protein Sci 13:1435-1448, 2004.

Nagata, K.; Duggan, A.; Kumar, G. and Garcia-Anoveros, J.; *"Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing."*, J Neurosci 25:4052-4061, 2005.

- Nilius, B.; Owsianik, G.; Voets, T. and Peters, J.A.; *"Transient receptor potential cation channels in disease."*, *Physiol. Rev.* 87, 165-217, 2007.
- Nishida, M.; Hara, Y.; Yoshida, T.; Inoue, R. and Mori, Y.; *"TRP Channels: Molecular Diversity and Physiological Function."*, *Microcirculation*, 13: 535–550, Japan, 2006.
- Owens, GK.; *"Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells."*, *Physiol Rev.* 75:487-517, 1995.
- Parnas, M.; Peters, M. and Minke, B.; *"Biophysics of TRP Channels."*, Hebrew University, Jerusalem, Israel, 2011
- Porras, G.; Calvo, M.; Esquivel, M. et al.; *"Quitosano n-acilado con cinamaldehído: un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola."*, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(3): 197-206 pp., 2009.
- Pozsgai, G. et al. *"Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo."*, *Cardiovasc Res* 87, 760-8, 2010.
- Sadofsky, L.; Boa, A. and Maher, S.; *"TRPA1 is activated by direct addition of cysteine residues to the N-hydroxysuccinyl esters of acrylic and cinnamic acids."*, *Respiratory Pharmacology Group, UK*, 2008.
- Sonkusare, S.; Palade, P. T. et al.; *"Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications."*, *Vascular Pharmacology*, 44:131-142, 2006.
- Stine Falsig, P.; Grzegorz, O. and Bernd, N. *"TRP Channels: An overview."* Cell calcium, Belgium and Denmark, 2005.
- Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R. et al.; *"ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures."*, *Cell* 112:819-829, 2003.
- Striessniga, J.; Grabner, M.; Mitterdorfer, J. et al.; *"Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels"*, Austria, 2007.
- Takahashi, N. et al.; *"TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂."*, *Nat Chem Biol* 7, 701-11, 2012.
- Talavera, K. et al. *"Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1."*, *Natu Neuroscience* 12, 1293-9, 2009.
- Tamura, Y., Iwasaki, Y. et al.; *"Ingestion of cinnamaldehyde, a TRPA1 agonist, reduces visceral fats in mice fed a high-fat and high-sucrose diet."*, Japan, 2002.
- Venkatachalam, K. and Montell, C.; *"TRP channels."*, *Annu Rev Biochem* 76, 387-417, 2007.
- Weiss, J.; *"The hill equation revisited: uses and misuses."*, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California, USA, 2006.
- Wellman, G. C. and Nelson, M. T.; *"Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels."*, *Cell Calcium*, 34:211-229, 2003.
- Xu, H.; Blair, N.T. and Clapham, D.E.; *"Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism."*, *J Neurosci.*, 25:8924-8937, 2005.