



Departamento de Fisiología
FACULTAD DE MEDICINA

**EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO
MEDIADOR EN EL PROCESO DE
CONTRACCIÓN-RELAJACIÓN.
ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tesis doctoral
Abel Martín Garrido
2007

Sé esclavo del saber, si quieres ser verdaderamente libre.

(Séneca)

AGRADECIMIENTOS

Por fin se acaba el viaje que empezó hace 5 años en el laboratorio del Dr. Manuel Rodríguez-Puyol. Durante este tiempo muchas personas han ayudado de una manera u otra a finalizar este trabajo, por lo que sería imposible nombrarlas a todas.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, Manuel Rodríguez-Puyol y Diego Rodríguez-Puyol. Han sido parte fundamental del trabajo que se presenta ya que sin su apoyo total y su esfuerzo nada de esto hubiera sido posible, aunque sus nombres no figuren en esta tesis, es tan suya como mía. De Manuel Rodríguez-Puyol, destacar su confianza depositada en mí desde un principio y su carácter optimista que es necesaria para salvar todos los problemas que han aparecido. De Diego Rodríguez-Puyol, resaltar su capacidad de transmitir sus amplios conocimientos científicos así como su calidad humana que me ha ayudado a superar los momentos difíciles. Gracias a ambos por haberme aguantado durante estos 5 años y por vuestra amistad, que sin duda es el resultado más importante que me llevo de este trabajo.

A M^a Luisa Díez-Marques, que me ha enseñado la importancia del orden en el trabajo que será fundamental en el futuro trabajo.

A Menchu que ha sido parte fundamental en el trabajo del receptor de IP₃.

Mercedes Griera “Chiqui” y Matilde Alique, amigas y compañeras de departamento. Es un placer conocer a personas tan maravillosas como vosotras, gracias por vuestra paciencia conmigo. Os echaré de menos.

A Fran (el próximo en leer la tesis) por su amistad, y sus conversaciones en el camino de ida y vuelta al trabajo.

A la Dra. Kathy K. Griendling (Universidad de Emory) y a la gente de su laboratorio: Alicia Lyle, Dave Weber, Yoshihiro Taniyama... ya que parte de este trabajo se realizó en su laboratorio, así como por permitirme realizar mi etapa post doctoral en su laboratorio.

Mis compañeros que se fueron y me dejaron como el único chico del laboratorio: Sergio, Francisco, Juan Carlos.

A Isabel, Arancha, Gema, Marta, Beatriz y Patricia, mis compañeras de laboratorio.

A las post-doctorales del grupo: Maripi, Marta Saura, y Susi (que tanto me ayudó en el primer año). A Sole por sus acertados consejos en las presentaciones.

A los profesores del departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá Francisco Javier Lucio, Juan Fernando Herrero, así como al resto del departamento (Guillermo, Mar, Rima).

A la gente del departamento de Bioquímica: las dos Evas, Javi, Carmen, Emma, Laura, Irene...

A las unidades de apoyo de la Universidad de Alcalá: Isabel y Vanesa de la Unidad de Cultivos, Guillermo y Juan de la Unidad de radioactividad, y José María del Animalario.

Por supuesto a mi mamá, a mi papá, a mi hermano y a mi cuñada, por apoyarme durante estos 5 años (y durante la carrera) y por saber que pase lo que pase ellos van a estar conmigo. GRACIAS. A Elsa, por su cariño y su paciencia durante la elaboración de la tesis, y a mis amigos del barrio y del pueblo por alegrarme cuando las cosas no salían.

Por último, a la Comunidad de Madrid y la Universidad de Alcalá por haberme sustentado durante estos años gracias a los impuestos que generosamente pagan miles de madrileños.

ABREVIATURAS

A continuación se detalla las abreviaturas más utilizadas en esta tesis ordenada alfabéticamente.

ANGII: Angiotensina II.

CAT: Catalasa.

CML: Células musculares lisas.

DPI: Difeniliodonio.

Ebselen: 2-fenil-1,2- benzisosenazol-3(2H)-uno.

GCs: Guanilato ciclase soluble.

GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico.

HNE-Lys: Hidroxinonenal lisina.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R₁: Receptor de IP₃ tipo I.

IP₃R₃: Receptor de IP₃ tipo III.

L-NAME: N^g-metil L-arginina.

MADO: Metabolitos derivados del oxígeno.

NAD(P)H: Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato.

ODQ: 1 H-(1, 2,4)-oxadiazolo (4,2-a) quinoxalin-1-ona.

NO: óxido nítrico.

PKG: Proteína quinasa dependiente de GMPc; proteína quinasa G.

SNP: Nitroprusiato sódico.

TAS: Tensión arterial sistólica.

TAD: Tensión arterial diástolica.

VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

RESUMEN EN INGLÉS

The hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the most important reactive oxygen species (ROS). It is involved in multitude of intracellular process such as angiogenesis, apoptosis, cell survival, hyperplasia, atherosclerosis, cellular contraction and cellular relaxation. Some of these process, the roll of the H_2O_2 is well known however in other the effect of the H_2O_2 remains unknown. Throughout this thesis, analyzed the effect of the H_2O_2 in the contraction and relaxation process, in specify the *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) pathway and the cyclic guanilate monophosphate (cGMP) pathway respectively. As well, we studied the hydrogen peroxide in the hypertension mediated by L-NAME.

Stimulation of cell surface receptors results in the formation of the second messenger IP_3 via the activation of phospholipase C. IP_3 mobilizes intracellular calcium by binding to a family of receptors (IP_3Rs) that act as ligand-gated calcium channels. IP_3Rs are tetramers, and full-length sequences of at least three different isoforms have been identified by molecular cloning. Both homo- and heterotetramers are found in cells expressing more than one isoform. The acute regulation of IP_3Rs occurs primarily through feedback effects of cytosolic Ca^{2+} and/or by phosphorylation of the receptor. However, prolonged exposure of cells to agonists has also been shown to alter the expression of IP_3R protein levels. In the present study, we analyzed the effect of H_2O_2 in IP_3R level. Chronic stimulation of VSMC by H_2O_2 resulted in the down-regulation of both type I and type III *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs). H_2O_2 -induced down-regulation of IP_3Rs could be detected within 4 h and resulted in an inhibition of IP_3 -induced Ca^{2+} release from permeabilized cells. The proteasomal inhibitor *MG132* completely prevented H_2O_2 -mediated down-regulation of IP_3Rs . However, the stimulation with H_2O_2 did not increase the amount of IP_3R immunoprecipitated by anti-ubiquitin antibodies. On the other hand, we analyzed the roll of the H_2O_2 in the ANGII- induced down regulation of IP_3Rs . The NAD(P)H inhibitors did not block the ANGII- induced down regulation in the long-term stimulation, however the catalase prevented the down-regualtion in the acute stimulation with ANGII. We conclude that H_2O_2 stimulated IP_3R degradation involves enhanced degradation by the proteasome pathway, but independent of the ubiquitination process; and the H_2O_2 generation is necessary in the ANGII- induced down regulation.

Cardiovascular disorders are characterized by impaired vasodilatory responses after acetylcholine administration. This abnormal response has been usually termed endothelial dysfunction, and is considered to be one of the main pathogenic mechanisms

responsible for the abnormal hemodynamic status of patients with hypertension, diabetes or atherosclerosis. Acetylcholine induces the synthesis of nitric oxide (NO) by endothelial cells, and a decreased synthesis of NO or an increased inactivation of this molecule has been proposed as the main cause of endothelial dysfunction. However, alternative mechanisms may also be proposed. NO induces cell relaxation by interacting with its intracellular receptor, soluble guanylate cyclase (sGC), which leads to an increased intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) concentration. Hence a reduction in sGC content or an abnormal response of the enzyme after its interaction with NO could also be involved in the previously mentioned vascular dysfunction. Some studies have shown a decreased sGC content in the vascular walls of animals with experimental hypertension or atherosclerosis. The sGC deficiency seems to be a more generalized phenomenon, since an attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats has also been demonstrated.

In the present study, we propose that the H₂O₂ might modulate the sGC content in contractile cells. For that purpose, we tested the effect of this compound on the sGC content of cultured vascular smooth muscle cells (VSMC). We observed an increased in the β 1 subunit levels of sGC, while the α 1 subunit remained without changes. This change in the β 1 subunit was accompanied with an increased in its activity, measuring like cGMP production and phosphorylation of VASP. By other hand, the H₂O₂ stimulation did not modify the β 1 subunit expression, analyzed by luciferasa activity. This suggests the possibility H₂O₂-mediated up regulation of the β 1 subunit is involved an increased of the mRNA stability, or a decreased of the degradation rate by the 26S proteasome.

Finally, we have examined the effect of endogenously produced H₂O₂ on BP using a transgenic mouse model that overexpresses catalase. We observed that the systolic blood pressure (SBP) of the transgenic mice (CAT) is similar to that of their wild-type littermates (WT). However, *CAT* mice showed a significantly reduced pressor response to L-NAME when compared to wild-type control mice. In addition, we observed that L-NAME significantly increased oxidative damage obtained from wild-type mice but did not alter from *CAT* mice. These results suggest that induction of H₂O₂ in the arterial wall is a mechanism by which L-NAME increase blood pressure.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	14
1. Metabolitos derivados del oxígeno.	14
1.1. Mecanismo de formación de los MADO	
1.2. Antioxidantes celulares	
2. Contracción celular.	26
2.1. Inositol 1, 4,5 trifosfato	
2.2. Receptor de IP ₃ .	
2.2.1. Estructura	
2.2.2. Mecanismo de activación	
2.2.3. Regulación	
3. Relajación celular.	38
2.1. Guanilato ciclasa soluble	
3.2. Proteína quinasa dependiente de GMPc	
4. Radicales libres y contracción/relajación.	44
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Materiales.	47
1.1. Material biológico	
1.1.1. Animales de experimentación	
1.1.2. Células	
1.2. Reactivos e instrumentos	
1.2.1. Reactivos generales	
1.2.2. Soluciones y medios de cultivo	
1.2.3. Material de laboratorio y equipos	
2. Métodos in vitro.	50
2.1. Obtención, caracterización y cultivos de CML	
2.1.1. Obtención de CML	
2.1.2. Caracterización de CML	
2.1.3. Mantenimiento y propagación del cultivo celular	
2.2. Extracción, separación e identificación de las proteínas	
2.2.1. Extracción y determinación de las concentraciones de proteínas	
2.2.2. Separación e identificación de proteínas	
2.3. Determinación de los niveles del IP ₃ R ubiquitinizado	
2.4. Análisis del ARNm de los IP ₃ Rs	
2.4.1. Extracción de ARNm	
2.4.2. RT-PCR	
2.5. Cuantificación de la salida de calcio inducida por IP ₃	

2.6. Ensayos de contracción celular	
2.7. Producción celular de GMPc	
2.7.1. Extracción de nucleótidos	
2.7.2. Determinación de los niveles de GMPc	
2.8. Ensayos de transfección y análisis de la actividad del promotor de la GCs	
3. Métodos <i>in vivo</i>.	65
3.1. Mediciones de las tensiones arteriales	
3.2. Extracción de proteínas a partir del tejido cardiaco	
3.3. Análisis bioquímico de la orina y el plasma	
4. Análisis estadístico.	67
OBJETIVOS	69
RESULTADOS	73
1. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el mecanismo de contracción inducido por el inositol 1, 4,5 trifosfato.	73
2. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el mecanismo de relajación inducido por el óxido nítrico.	85
3. Papel del peróxido de hidrógeno en la hipertensión inducida por el L-NAME.	94
DISCUSIÓN	102
RESUMEN DE RESULTADOS	114
CONCLUSIONES	116
BIBLIOGRAFÍA	118

INTRODUCCIÓN

1. Metabolitos activos derivado del oxígeno (MADO).

1.1. Mecanismo de formación de los MADO.

Los MADO son moléculas derivadas del oxígeno con gran capacidad de reacción por su alta inestabilidad química. Los más importantes son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^\cdot$). Se generan durante la reducción completa del oxígeno molecular a agua, en el cual se incorporan cuatro electrones al oxígeno en diversas etapas, generándose los radicales libres como moléculas intermedias (Fig1). También en este proceso, y como consecuencia de la interacción del O_2^- con el óxido nítrico (NO) se genera el peroxinitrito.

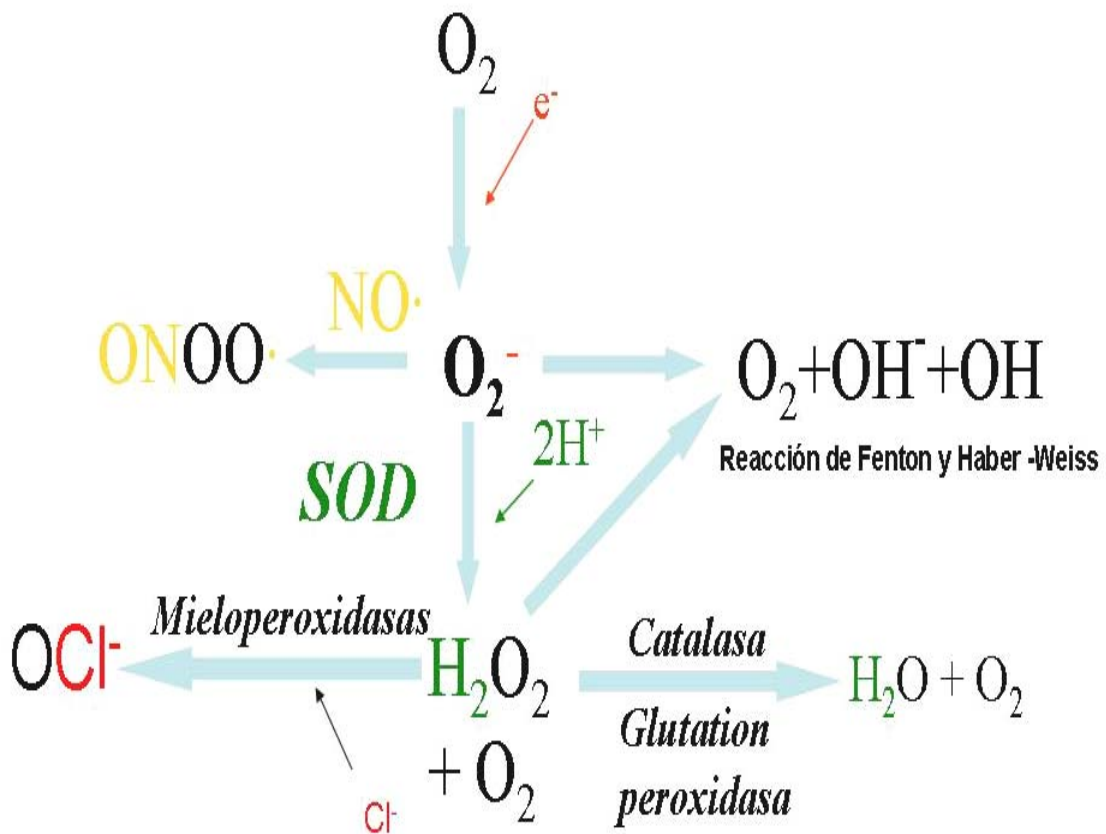
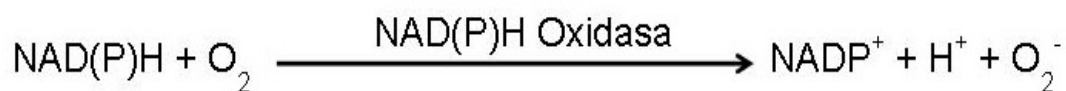


Fig. 1: Esquema de la formación de MADO.

El análisis de estas reacciones enzimáticas permite realizar tres observaciones. La primera es que los MADO sólo se generan en situaciones de aerobiosis, dado que la presencia de O₂ es una condición indispensable. La segunda, que la síntesis de superóxido es el primer acontecimiento común en todo el proceso, dando lugar posteriormente al resto de los MADO. Finalmente, tienen que existir determinados mecanismos intracelulares que generen electrones libres, que desencadenen la síntesis de superóxido. Estos mecanismos, constituido por determinadas enzimas y por la propia mitocondria, van a ser analizados a continuación.

1.1.1. NAD(P)H oxidasa.

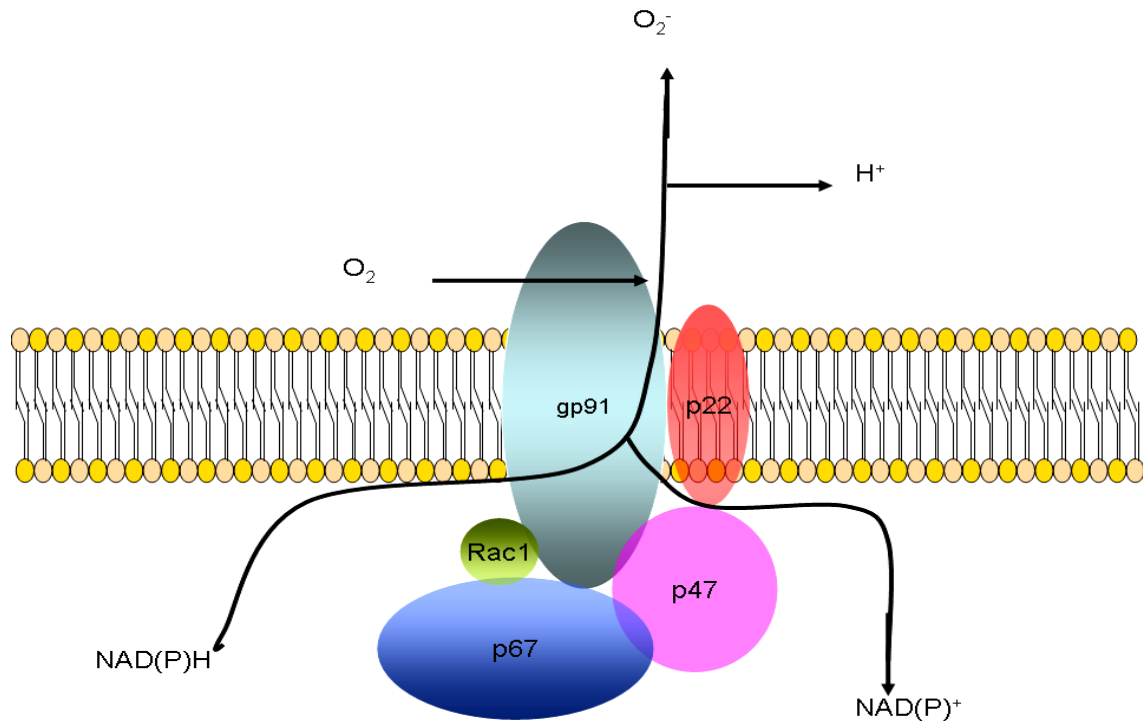
La NAD(P)H oxidasa es una enzima asociada a membrana que cataliza la reducción del oxígeno molecular utilizando NADH ó NADPH como donador de electrones.



Existen diversos tipos de NAD(P)H oxidasa, la mejor caracterizada es la que está presente en los fagocitos donde juega un papel fundamental en la actividad bactericida (Babior y col, 2002) a través de la producción de anión superóxido. En la células vasculares, la NAD(P)H es la principal fuente de producción de MADO (Rajagopalan y cols. 1996) de manera enzimática.

La NAD(P)H oxidasa se compone de distintas subunidades (Fig. 2). Así en el caso de la NAD(P)H fagocítica (Fig. 2A), estas subunidades son: la subunidad catalítica gp91phox (Nox2) y p22phox, ambas constituyen el citocromo b558, y dos subunidades citoplasmáticas que son la subunidad p47phox y la p67phox. Además se han encontrado proteínas G de bajo peso molecular, fundamentalmente de la familia Rac, que participan en el ensamblaje del complejo activo (Leusen y cols.1996). Mediante técnicas de biología molecular (ARNm) se ha demostrado que las células endoteliales poseen las mismas subunidades que la NAD(P)H fagocítica, y en el caso de las células musculares lisas la gp91phox es sustituida por otra proteína semejante, denominada Mox (Nox1) (Fig. 2B) (Jones y cols. 1995) (Ushio-Fukai y cols. 1996).

A)



B)

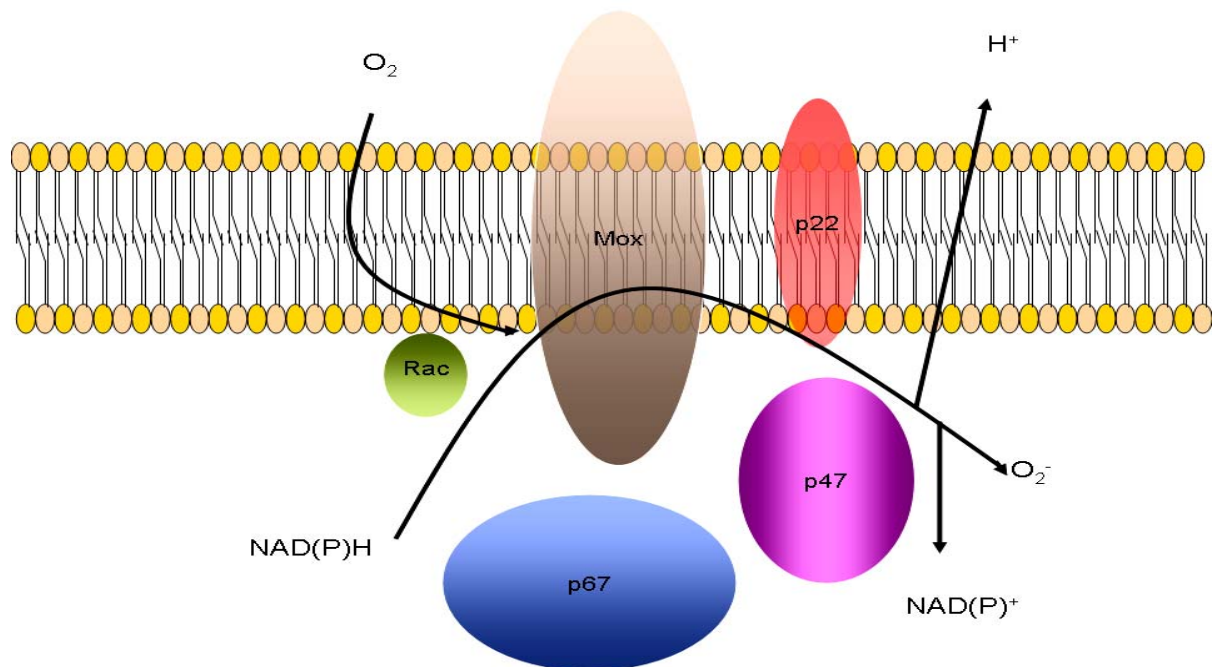


Fig. 2: Estructura de la NAD(P)H oxidasa. A) Estructura de la NADPH fagocítica y B) no fagocítica.

Introducción

La subunidad catalítica de la enzima varía según el tipo celular (Tabla1). Esta subunidad posee regiones de unión al grupo hemo y flavonoide que son las que interviene en el transporte de electrones.

Nombre	Subunidad catalítica	Nombre alternativo	Tejido/Células
NOX1	Nox1	Mox	Colón, Útero, Próstata Células musculares lisas
NOX2	Nox2	gp91phox	HL-60 y Monocitos
NOX3	Nox3		Tejido fetal
NOX4	Nox4	Renox	Riñón, Placenta Células de glioblastoma
NOX5	Nox5		Bazo, Testículos, Tejido Fetal
DuOX1	Duox1	ThOX1	Tiroides
DuOX2	Duox2	ThOX2	Tiroides

Tabla 1: *Expresión de las proteínas de la familia Nox en células y tejidos de mamíferos.*

La activación de la enzima puede ser la consecuencia de dos tipos de modificaciones celulares. En primer lugar, a través de segundos mensajeros, como es el caso de los metabolitos del ácido araquidónico generados por activación de la lipoxigenasa y que media la estimulación de la NAD(P)H oxidasa dependiente de angiotensina II (Zafari AM y cols. 1999). En segundo lugar, por un aumento en la expresión de alguna de sus subunidades dándose una mayor producción del superóxido, como lo que sucede en p22phox en ratas hipertensas por infusión de ANGII (Pagano PJ y cols. 1998).

1.1.2. Cicloxigenasas (COX).

Son enzimas que metabolizan el ácido araquidónico, dando lugar a la formación de prostanoïdes. Es durante esta síntesis cuando se generan los MADO, debido al componente peroxidasa de las COX que llevan a cabo la oxidación de la NAD(P)H generando el superóxido (Kukreja y cols., 1986).

La generación de MADO por parte de la COX, es especialmente importante en la vasculatura cerebral (Marshall y cols., 1991).

1.1.3. Xantina oxidasa (XO).

La xantina oxidasa es una molibdoflavoenzima capaz de catalizar la degradación de la hipoxantina a xantina, y esta a ácido úrico y anión superóxido (Fig. 3).

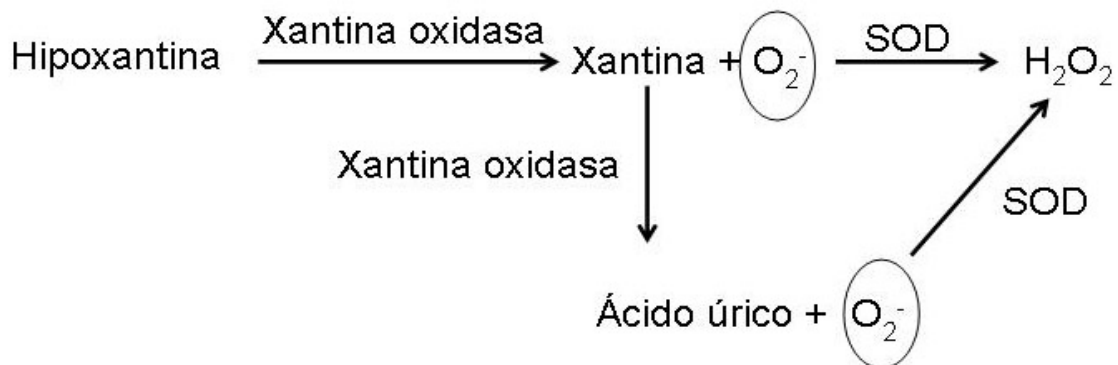


Fig. 3: Metabolismo de la hipoxantina y xantina por la xantina oxidasa (XO).

Se localiza principalmente en el hígado y en el plasma circulante. Es durante el proceso de degradación de la xantina ó de la hipoxantina, por la XO, cuando se genera el anión superóxido.

Son una importante fuente de generación de MADO en ciertas situaciones fisiopatológicas como en isquemia/repercusión (Granger DN., 1999) ó la hipercolesterolemia (Ohara y cols., 1993).

1.1.4. Mitocondria.

La mitocondria es la mayor fuente de producción de MADO en condiciones fisiológicas (Chance y cols., 1979). La mitocondria es un orgánulo que esta presente en el citoplasma, cuya principal función en la mayoría de los tejidos es la de proveer energía en forma de ATP, a partir de sustratos energéticos por parte de la cadena de transportes de electrones. Es en dos puntos, fundamentalmente, de esta cadena de transportes donde se generan los MADO, en concreto el anión superóxido. El primer punto es por autooxidación de la semiquinona del complejo III. El segundo punto, se encuentra en el complejo I aunque su localización exacta todavía es desconocida, debido al gran número de proteínas que forman parte de este complejo.

La cantidad del anión superóxido generada por la mitocondria se incrementa cuando la concentración de oxígeno aumenta (Turrens y cols., 1982), pero paradójicamente, también existe un aumento en la producción del anión superóxido por

la mitocondria en condiciones de hipoxia (Waypa & Schumacker, 2002). Estudios posteriores han relacionado este aumento en la producción de anión superóxido, en condiciones de hipoxia, con el factor inducible de hipoxia (HIF) (Chandel y cols., 2001).

1.1.5. Óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS).

La eNOS es un complejo homodimérico con actividad oxido/reductasa transportando electrones desde el dominio reductasa hacia el dominio oxidasa que contiene el grupo hemo. En ciertas condiciones, eNOS es capaz de generar anión superóxido (Vasquez-Vivar, 1998), este fenómeno es conocido como desacoplamiento de la NOS. Cuando ocurre esto los electrones durante su transporte entre ambos dominios son desviados hacia el oxígeno molecular, en lugar de hacia la L-arginina, generándose los MADO. Uno de los cofactores de esta enzima, en concreto la tetrahidrobiopterina (BH₄), parece estar implicado en el correcto acoplamiento entre los electrones y el grupo hemo, induciendo la oxidación de L-arginina, y evitando la reducción del oxígeno molecular (O₂)(Cosentino F. y cols., 1998).

1.2. Antioxidantes celulares.

La síntesis continua de MADO en el metabolismo celular sería incompatible con la viabilidad celular sino existieran unos sistemas antioxidantes celulares capaces de mantener bajas concentraciones intracelulares de MADO. Dentro de los mecanismos antioxidantes intracelulares podemos clasificarlos en enzimáticos y no enzimáticos.

Mecanismos antioxidantes intracelulares

Enzimáticos

Superóxido dismutasa (SOD)
Catalasa (CAT)
Glutathion peroxidasa (GPx)
Tiorredoxina reductasa (TrxR)

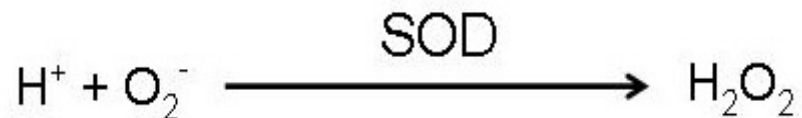
No enzimáticos

Glutathion (GSH)
Vitamina C
Vitamina E
Ácido lipoico
Ubiquinona
Metales de transición
Carotenoides
Polifenoles
Tiorredoxina

Ambos tipos de mecanismos antioxidantes son de similar importancia para el mantenimiento de bajas concentraciones de MADO, aunque sólo van a ser considerados los enzimáticos en los siguientes apartados.

1.2.1. Superóxido dismutasa (SOD).

En 1969, McCord y Fridovich identificaron la primera enzima antioxidante, la Cu-Zn superóxido dismutasa. Desde entonces se han descrito tres isoformas de la misma: la Cu,Zn-SOD ó SOD citosólica, la Mn-SOD ó SOD mitocondrial y la Cu,Zn-SOD extracelular ó ec-SOD. La tres isoformas de SOD son productos de distintos genes aunque las tres catalizan la misma reacción:



1.2.1.1. Cu,Zn-SOD.

También conocida como SOD citosólica ó SOD-1. Se encuentra en forma de homo dímero, y como su nombre indica, se localiza en el citoplasma celular y su distribución es universal. Es la forma mayoritaria en el tejido vascular, en concreto del 50-80% de la actividad total de la SOD en aorta proviene de esta isoforma.

A pesar de que está constitutivamente expresada, los niveles de ARNm pueden ser modificados por multitud de factores. Entre los que aumentan los niveles de ARNm encontramos diversos mensajeros biológicos como la proteína de shock térmico (Yoo y cols., 1999), el peróxido de hidrógeno (Yoo y cols., 1999), ozono (Rahman I. y cols., 1991) y el óxido nítrico (Franck y cols., 2000). Por contra existen diversos estímulos que disminuyen los niveles de ARNm tales como la hipoxia, ó el anticancerígeno mitomicina C (Cho G. y cols., 1997).

1.2.1.2. Mn-SOD.

También conocida como SOD mitocondrial ó SOD-2. Es un homotetrámero con un átomo de manganeso en su sitio activo. Se localiza en la mitocondria y es expresada en la mayoría de los tipos celulares. La actividad de esta enzima con respecto al total es de aproximadamente de un 10-15 %. Sin embargo se ha visto que, su presencia es

esencial para la supervivencia, ya que cuando se elimina el gen responsable de su síntesis los animales no son viables.

Al igual que ocurre con SOD-1, la expresión de la Mn-SOD, se encuentra finamente regulada por diferentes factores. Entre los estimulantes de la expresión encontramos las citoquinas, el ión manganeso (Thongphasuk J. y cols., 1999) y el factor de crecimiento plaquetar (Maehara K., 2001). Existen estímulos que actúan como represores de la expresión de la Mn-SOD, como puede ser la acetilación de los intrones del gen de la Mn-SOD (Maehara y cols. 2002), y la elevación en los niveles del factor de transcripción AP-2 (Zhu y cols., 2001).

A diferencia de la Cu,Zn-SOD, también se conoce un mecanismo de regulación post transcripcional de la Mn-SOD. Se ha comprobado que en el extremo 3' del ARNm existe una región, de 41 pares de bases, capaz de unir proteínas específicas, aún no determinadas, que aumentan la eficiencia en la translocación del ARNm (Niu CS. y cols., 1998).

1.2.1.3. ec-SOD.

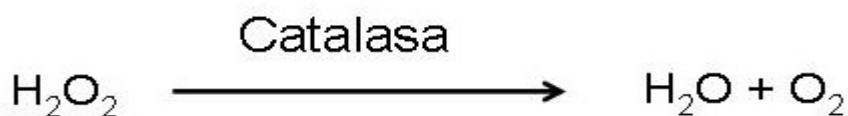
También conocida como SOD extracelular ó SOD-3. Es una glicoproteína hidrofóbica de aproximadamente 135 KDa (Marklund, 1982), conteniendo un átomo de cobre y otro de zinc en cada subunidad. Se encuentra en forma de tetrámero, aunque ocasionalmente se ha encontrado en forma de dímero (Fattman y cols., 2000). El tetrámero está compuesto de dos dímeros unidos por puentes de disulfuro. Esta isoforma se localiza fundamentalmente en corazón, pulmón, vasos sanguíneos, placenta y riñón.

La ec-SOD se encuentra, fundamentalmente, unida a la matriz extracelular, en concreto a la heparina (Adachi y cols., 1992) y al colágeno tipo I (Petersen y cols., 2004) de los tejidos (Marklund, 1984), a través de la región C-terminal de la ec-SOD, rica en aminoácidos básicos (Hjalmarsson y cols., 1987). Esta región también es conocida como la región de unión a matriz extracelular, que es eliminada proteolíticamente antes de su excreción al torrente sanguíneo. Existe un polimorfismo por una mutación en un aminoácido en esta región, en concreto al Arg 213 por Gly, que provoca un aumento en los niveles plasmáticos de 10 a 30 veces mayor, debido a que la ec-SOD es incapaz de unirse a las proteínas de matriz extracelular favoreciendo así su liberación al torrente sanguíneo. Se ha visto que este aumento es un factor de riesgo importante para desarrollar enfermedades de tipo cardíaco (Juul y cols., 2004).

Existen factores estimulantes y represores de la expresión de la ec-SOD, al igual que ocurre con las 2 isoformas anteriores. Entre los que aumentan la expresión de la ec-SOD se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Brady TC. y cols., 1997), factores vasoactivos tales como serotonina, angiotensina II, vasopresina, histamina endotelina 1, y oxitocina (Stralin & Marklund y cols., 2001). También se ha comprobado que el ejercicio aumenta la expresión de la ec-SOD en células musculares lisas, este aumento es consecuencia de un incremento en la producción de óxido nítrico en células endoteliales durante el ejercicio (Fukai T. y cols., 2000). Entre los factores que disminuyen los niveles de ARNm, se encuentran diferentes factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Marklund y cols., 2001), el factor de crecimiento plaquetar (PDGF) (Marklund y cols., 2001), ó el factor de crecimiento transformante β (TNF β) (Marklund, 1992).

1.2.2. Catalasa (CAT).

Es un homotetrámero formado por 4 subunidades, conteniendo en su sitio activo un grupo ferroprotoporfirina. Se localiza fundamentalmente en los peroxisomas y en el citosol. La función de la catalasa es doble: en primer lugar, catalizar la degradación del H_2O_2 a agua y oxígeno molecular en una reacción que consta de dos pasos produciendo dos compuestos intermedios con capacidad oxidante, llamados compuesto I y II. En segundo lugar, indirectamente, también detoxifica a la célula de los radicales O_2^- ya que favorece el paso del O_2^- a H_2O_2 por la SOD, por la disminución en los niveles de H_2O_2 intracelular por parte de la CAT.



La CAT juega un importante papel en condiciones de niveles bajos de glutatión, ó de baja actividad enzimática de la glutatión peroxidasa. Por otro lado, la CAT es la principal enzima implicada en la respuesta adaptativa de la célula a las condiciones de estrés oxidativo, debido fundamentalmente a la capacidad que tiene de actuar en condiciones de altas concentraciones de H_2O_2 , a diferencia de la glutatión peroxidasa.

1.2.3. Tiorredoxina reductasa (TrxRd).

Enzima que forma parte del sistema antioxidante tiorredoxina, compuesto por la tiorredoxina reductasa (TrxRd), y la tiorredoxina (Trx) (Fig. 4). Este sistema juega un papel fundamental en la regulación del estado redox intracelular por la reducción de proteínas oxidadas, y por su actividad peroxidasa.

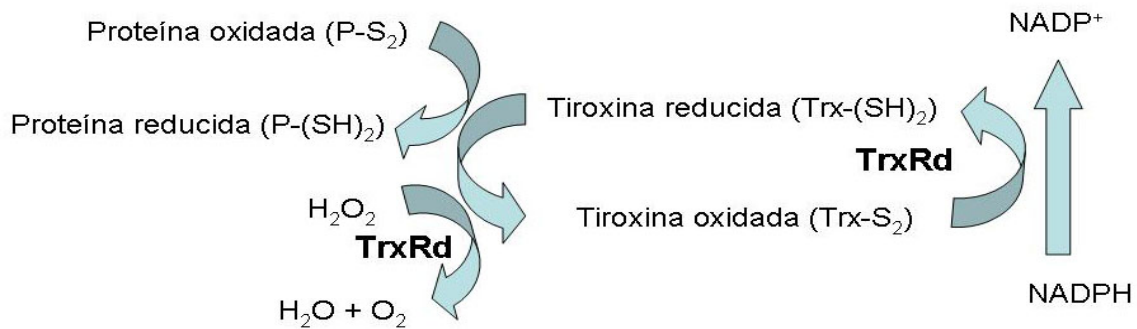


Fig 4 : Sistema tiorredoxina.

La tiorredoxina reductasa es una flavoproteína que contiene dos sitios activos por unidad. El primero se localiza entre los aminoácidos 59-64 y es el encargado de mantener la tiorredoxina en su forma reducida (Holmgren A., 1985). El segundo se localiza en el extremo C-terminal y contiene una selenocisteína en su sitio activo y es el que tiene actividad peroxidasa (Zhong L. & Holmgren A., 2000), llevando a cabo la reducción de lipoperóxidos y peróxido de hidrógeno. Se conocen tres isoformas que son la tipo I (TrxRd1), la tipo III (TrxRd3) y más recientemente la tiorredoxina/glutation reductasa (TGRd). La localización intracelular varía según la isoforma, así la TrxRd1 es la forma citosólica (Gasdaska PY. y cols., 1995), mientras que la TrxRd3 es la mitocondrial (Miranda-Vizuet A. y cols., 1999). Esta enzima, tiene importancia en condiciones patológicas, con especial interés en algunos tipos de cánceres (Berggren M. y cols., 1996) donde se ha visto que se encuentran aumentados los niveles de la TrxRd, de forma que su inhibición puede llevar a la apoptosis de las células cancerígenas por un aumento de MADO intracelulares incompatibles con la viabilidad celular. En esa línea, actualmente, se está estudiando el uso del Motexafin Gadolinium (MGd) como posible agente quimioterapéutico para el tratamiento de diversos cánceres (Miller RA. & Biaglow JE., 2005).

1.2.4. Glutathion peroxidasa (GPx).

Las GPxs son selenoproteínas, excepto la isoforma tipo V. Se conocen 5 isoformas de la GPx, cuya localización y distribución se muestra en la siguiente tabla.

Isoforma	GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5
Nombre original	c-GSH-Px	GSH-Px-GI	pGSH-Px	PHGSH-Px	Ep GSHPx MEP24
Nombre general	GPx celular	Gpx gastro intestinal	GPx plasmática	GPx fosfo hidroxiperóxido	GPx epididimal
Localización	Citosol mitocondrial	Citosol	Secretada Citosol	Membrana mitocondrial Núcleo	Secretada
Distribución	Pulmón ++++ Riñón ++++ Hígado ++ Células sanguíneas ++ Resto de tejidos +	Estómago ++++ Intestino ++++	Riñón ++++ Pulmón ++++ Vasos deferentes ++ Vesícula seminal ++ Músculo ++ Corazón ++ Placenta ++ Resto tejidos +	Testículos ++++ Espermatozoides ++++ Cerebro + Corazón +	Espermatozoides ++++ Epididimo ++++ Hígado ++ Riñón ++
Año	1957 (Mills)	1993 (Chu et col.)	1987 (Takahashi et col.)	1985 (Ursini et col.)	1990 (Ghyselincx et col.)

Tabla 2: Distribución y localización de las isoformas de la GPx.

Debido a la distinta distribución de las isoformas, cada una tiene una función específica destacando la de la GPx fosfo hidroxiperóxido (PH-GSHPx) en la fertilidad masculina, ya que se ha comprobado una relación entre un aumento de MADO en los espermatozoides y la infertilidad masculina.



Fig 5: Sistema antioxidante GPx/GR.

Forma parte del sistema antioxidante glutatión peroxidasa (GPx)/glutatión reductasa (GR) cuya acción principal es la reducción del H_2O_2 ó de lipoperóxidos (L-OOH) por la glutatión peroxidasa (GPx), usando como sustrato el glutatión (GSH) que

Introducción

pasará a su forma oxidada (GSSG), el cual es reducido de nuevo a glutatión libre por la acción de la GR (ver Fig. 5). El sistema antioxidante GPx/GR está relacionado con otros sistemas antioxidantes como por ejemplo el superóxido dismutasa/catalasa, aunque se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, ya que la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y a bajas concentraciones actúa la GPx.

2. Contracción celular.

El término contracción significa literalmente “acortar”. Así, cuando se habla de contracción celular se hace referencia a la disminución del tamaño de la célula, ó a su acortamiento. La contracción celular está implicada en multitud de procesos fisiológicos tales como la liberación de neurotransmisores, regulación del tono vascular, contracción cardiaca y la contracción muscular.

Los mecanismos de contracción celular pueden ser dependientes ó independientes de calcio. Los estímulos que inducen la contracción celular dependiente de calcio pueden ser nerviosos u hormonales. Los estímulos nerviosos que inducen contracción calcio dependiente, despolarizan en primer lugar la membrana celular mediante la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, aumentando los niveles de calcio intracelular por entrada desde el compartimiento extracelular. Este tipo de contracción es típica en los procesos de excitación-contracción como en los cardiomiocitos y en los de excitación-secreción como en las neuronas.

Entre los estímulos hormonales que inducen la contracción mediada por calcio, se encuentran distintas sustancias vasoactivas tales como la angiotensina II (ANGII), la endotelina -1 (ET-1), ó ciertas catecolaminas. Todas ellas tienen en común que poseen un receptor con 7 dominios transmembrana acoplado a una proteína G. La activación del mismo induce una estimulación de la fosfolipasa C (PLC), que actuando sobre el fosfoinositol bifosfato (PIP_2), presente en la membrana, da lugar a la formación de inositol 1,4,5, trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Berridge MJ. y cols., 1984). El IP_3 se unirá a su receptor presente en la membrana del retículo sarcoplásmico, liberando calcio desde el interior del retículo sarcoplásmico (RS) hacia el citosol (Streb y cols., 1984). El calcio presente en el citoplasma se unirá a la calmodulina, enzima con actividad quinasa, activando una cadena de fosforilaciones/desfosforilaciones que dará como resultado final la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM), y la consiguiente contracción celular (Fig. 6).

El papel del IP_3 es crítico en este proceso, y va a ser analizado cuidadosamente a continuación su mecanismo de contracción.

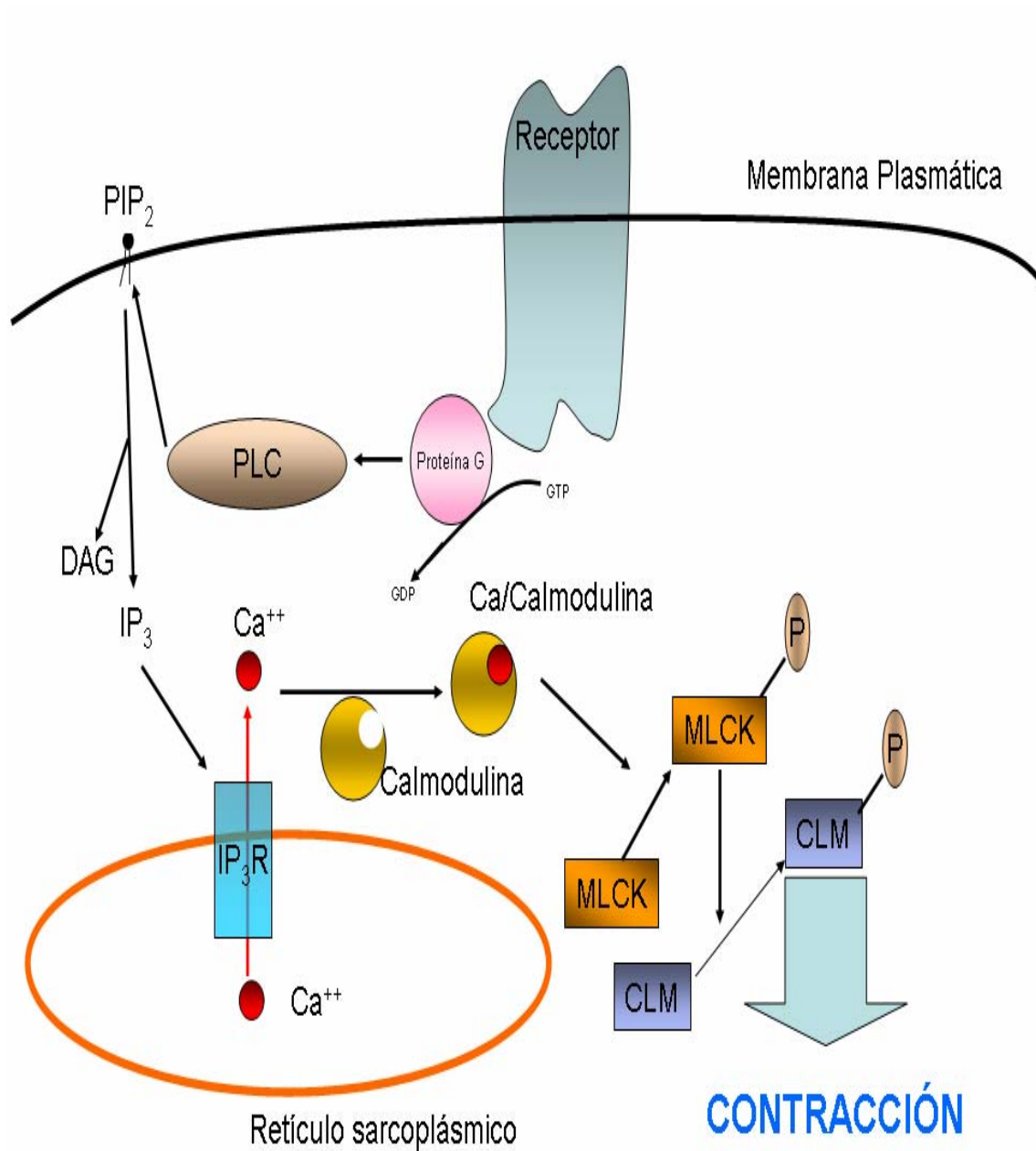


Fig. 6: Mecanismo de contracción celular inducido por IP_3 .

2.1. Inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3).

El Inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3 ó $Ins(1,4,5)P_3$) está compuesto por un anillo de inositol fosforilado en las posiciones 1, 4 y 5. Es el principal regulador de la salida de calcio desde las organelas intracelulares en células no excitables. Se genera a partir del

Introducción

fosfoinositol 4,5 bifosfato (ó PtdIns (4,5)P₂), el cual da lugar a la formación de IP₃ por acción de la fosfolipasa C (PLC). Como todos los segundos mensajeros, el IP₃ tiene una vida media en la célula muy corta, y es rápidamente metabolizado (Fig. 7) por dos caminos diferentes que son:

- 1) Eliminación del fosfato en posición 5 del anillo inositol por la inositol polifosfato - 5 fosfatasa, dando lugar al inositol 1,4 bifosfato ó Ins (1,4) P₂ que es un compuesto inactivo. Este compuesto es secuencialmente defosforilado hasta dar lugar al inositol libre, que puede ser reciclado para formar fosfoinositoles (Michell R.H., 1997) .
- 2) Fosforilación del anillo de inositol en posición 3, dando lugar al inositol 1,3,4,5 tetrafosfato (ó Ins (1,3,4,5) P₄). Esta reacción es llevada a cabo por la Ins (1,4,5)P₃ quinasa (ó IP3-3K). El Ins (1,3,4,5) P₄ es rápidamente defosforilado dando lugar al Ins (1,4,5) P₃, reacción llevada a cabo por la misma inositol polifosfato -5 fosfatasa (Downes CP. y cols., 1986). Debido a la corta vida media del Ins (1,3,4,5) P₄ se piensa que puede actuar como segundo mensajero. Esta teoría se refuerza con el descubrimiento proteínas que unen específicamente este compuesto como son los receptores GAP1^{IP4BT} y GAP1^m, localizados en las neuronas (Cullen P.J. y cols., 1995).

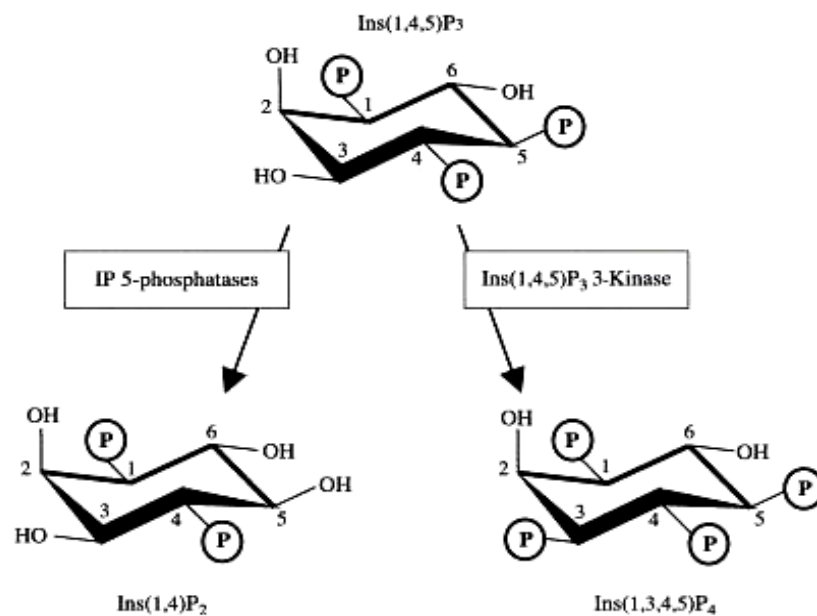


Fig. 6: *Metabolismo del IP₃* (Pattni K. & Banting G., 2004).

2.2. Receptor de IP₃ (IP₃R).

Existe tres isoformas del IP₃R, denominadas tipo I, II y III (IP₃R₁, IP₃R₂ e IP₃R₃). De IP₃R₁ se conocen distintas variantes generadas por “splicing” alternativo del gen. De las tres isoformas hasta ahora descritas, sin duda, el tipo I es la más estudiada. Según el tejido que se estudie tendrá mayor predominio una isoforma u otra (Tabla 3).

El IP₃R existe generalmente como homotetrámero, aunque si bien puede existir como heterotetrámero en aquellos tejidos en los que se encuentren más de una isoforma (Patel S. y cols., 1999).

Originariamente el IP₃R se localizó en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), no obstante también se ha localizado en el aparato de Golgi donde colocaliza con nucleobindina y responde a IP₃ liberando calcio (Lin P. y cols., 1999), en granulos secretores, en la membrana plasmática (MP) (Khan AA. y cols., 1992) y más recientemente se ha descubierto en el retículo nucleoplásmico (Echevarria y cols., 2003). Estudios de inmunofluorescencia en hepatocitos revelaron que el IP₃R₂ se localiza en el núcleo y en el RS, mientras que el IP₃R₃ sólo estaba presente en el RS.

A excepción de la localización en la MP, en el resto de organelas donde se ha localizado el IP₃R induce la salida de calcio desde el interior de la organela hacia el citoplasma. Aunque la localización en la MP data de 1992, a día de hoy no se conoce cual es la función del IP₃R en esta parte de la célula.

Isoforma	Tejido
IP ₃ R ₁	Cerebro Ampliamente distribuida en el resto de tejidos
IP ₃ R ₂	Hígado Pulmón Testículos Bazo
IP ₃ R ₃	Intestino Riñón Músculo liso vascular Pancreas

Tabla 3: Distribución de las distintas isoformas del IP₃R.

2.2.1. Estructura.

Las tres isoformas difieren en cuanto a su composición peptídica, existiendo una homología de solo el 69% para el tipo II y el 62% para el tipo III, con respecto al tipo I. Se puede dividir la estructura en tres regiones funcionales, análogos para las tres isoformas: región N-terminal, región reguladora y región C-terminal (ver Fig. 7).

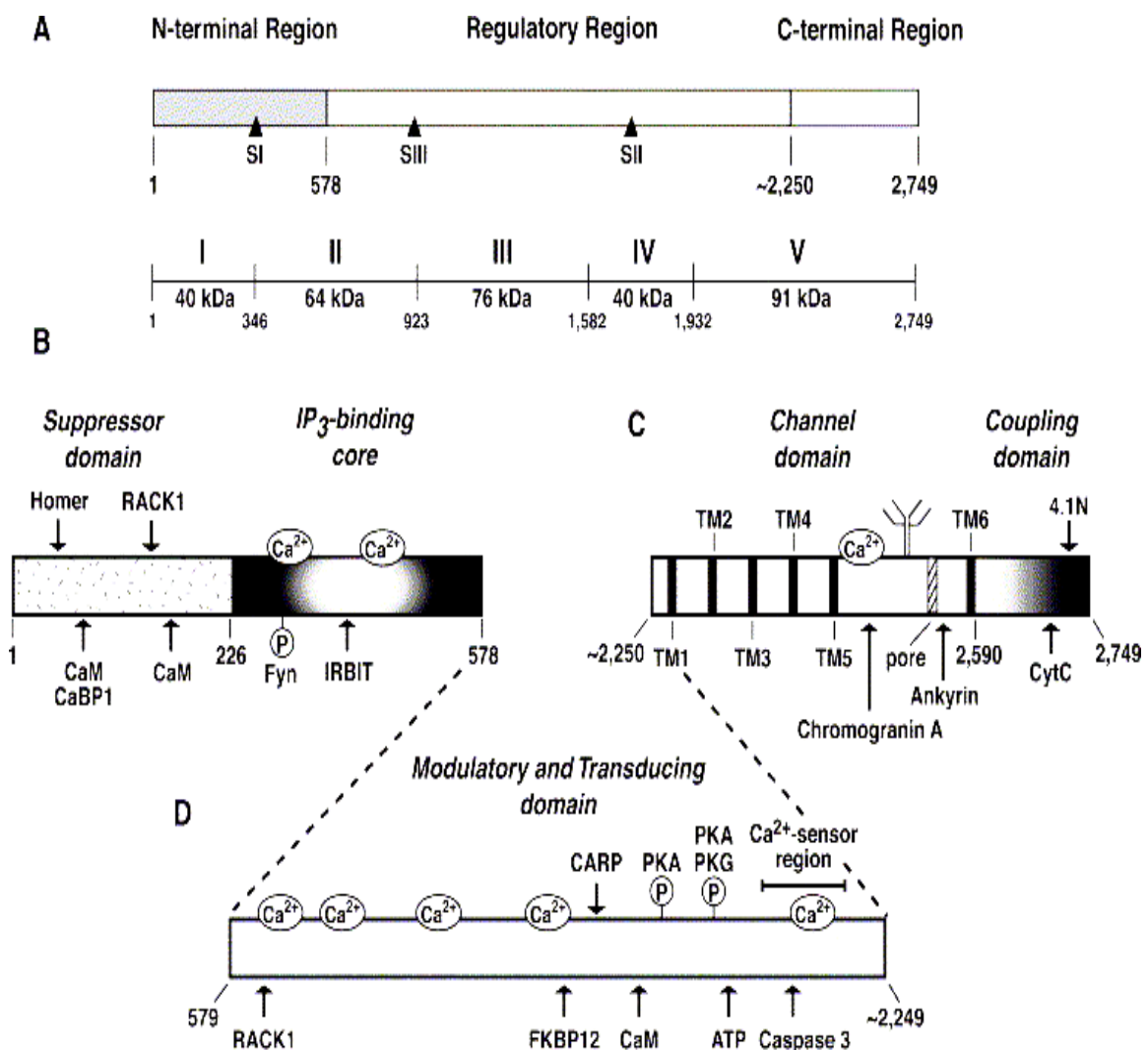


Fig. 7: Estructura del receptor de IP₃ tipo I. A) Localización de los tres regiones funcionales del IP₃R₁ y de los sitios de splicing alternativo (SI, SII y SIII). En la parte inferior se muestran los productos obtenidos cuando es sometido a una digestión con tripsina. B) Localización del dominio supresor y zona de unión al IP₃ (región N-terminal). C) Dominio del canal y de acoplamiento para formar el tetrámero (región C-terminal). Los 6 segmentos transmembrana están indicados como TM así como el segmento que forma el poro como pore. D) Dominio modulador y de transducción (región reguladora). Con las flechas, se señala el sitio de unión de distintas proteínas que modulan la actividad del IP₃R (Bosanac y cols., 2004).

En la *región N-terminal* se localiza la zona de unión al IP_3 . Por estudios de mutagénesis se ha comprobado que la región mínima necesaria para que el IP_3 se una a su receptor comprende desde el residuo 226 hasta el 578 (Yoshikawa F. y cols., 1996). En diversos estudios se ha demostrado que es necesario, para que exista esta unión, los grupos fosfatos en la posición 4 y 5 así como el grupo hidroxilo en la posición 6 del IP_3 (Wilcox R.A y cols. 1998). Otro dominio localizado en esta región es el dominio supresor (IP_3R_{SUP}), que se localiza en los residuos comprendidos entre el 1 y el 223 (Bosanac I y cols, 2005), ya que la ausencia de este dominio provoca un aumento de la afinidad del IP_3R_1 por el IP_3 (Uchida K. y cols., 2003).

En la zona central de la secuencia del IP_3R se encuentra la *región reguladora*. Se denomina también región transductora porque es la encargada de transferir la señal desde el extremo N-terminal (unión de IP_3) hasta la región C-terminal (apertura del poro). Esta región también es conocida como dominio regulador, puesto que es en esta región donde se unen un gran número de moléculas y proteínas que regulan la actividad del receptor (ver apartado de regulación).

Finalmente en la *región C-terminal* se localiza el dominio del canal. Este dominio está formado por seis regiones transmembrana y se cree que su función es anclar el receptor a la membrana del retículo sarcoplásmico. En el segmento entre la región transmembrana 5 y 6 (residuos 2463-2549) se localiza el poro del canal, y contiene dos residuos glicosilados (Asn2475 y Asn2503) (Michikawa T. y cols., 1994). La región donde se forma el canal se encuentra formando un lazo y contiene un gran número de residuos ácidos lo que le permite concentrar un gran número de iones de calcio (Yoshikawa S. y cols., 1992). El otro dominio localizado en esta región es el dominio de acoplamiento que comprende desde el residuo 2590 hasta el 2749. Existen pocos trabajos sobre el papel de esta región, aunque se ha demostrado que esta región es necesaria para el correcto funcionamiento del canal y para la oligomerización. En el caso de la oligomerización son necesarias las regiones transmembrana 5 y 6, así como el poro, para la correcta formación de la estructura tetramérica (Miyawaki A. y cols., 1991) ya que, en condiciones normales el IP_3R se presenta como un homotetrámero.

2.2.2. Mecanismo de activación del IP_3R .

Aunque nadie duda de que la función del IP_3R es permitir la salida de calcio desde el interior del retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma, el cómo se produce es

todavía una incógnita. En este apartado se describirá el mecanismo de apertura del canal más aceptado, si bien es cierto que no es el único mecanismo propuesto. Este modelo propuesto por Mikoshiba y cols. (2002) (Fig. 8) consta de dos pasos. En el primer paso, tras la unión del IP₃ a su receptor por la región N-terminal, se producen una serie de cambios conformacionales localizados en esta región del receptor y posiblemente en las regiones vecinas. Estos cambios permitirían la unión del calcio a ciertos sitios de unión denominados de alta afinidad. En un segundo paso, y tras la unión de calcio a múltiples sitios de la molécula, tiene lugar un cambio conformacional más drástico que el anterior. Como consecuencia, tendrá lugar un desplazamiento de la región de unión del IP₃ del centro del canal, dejándolo abierto. Así pues, el IP₃R actúa como integrador de dos segundos mensajeros, IP₃ y calcio, haciendo que este receptor esté implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos tan diversos como la proliferación celular, contracción celular, memoria, aprendizaje y apoptosis.

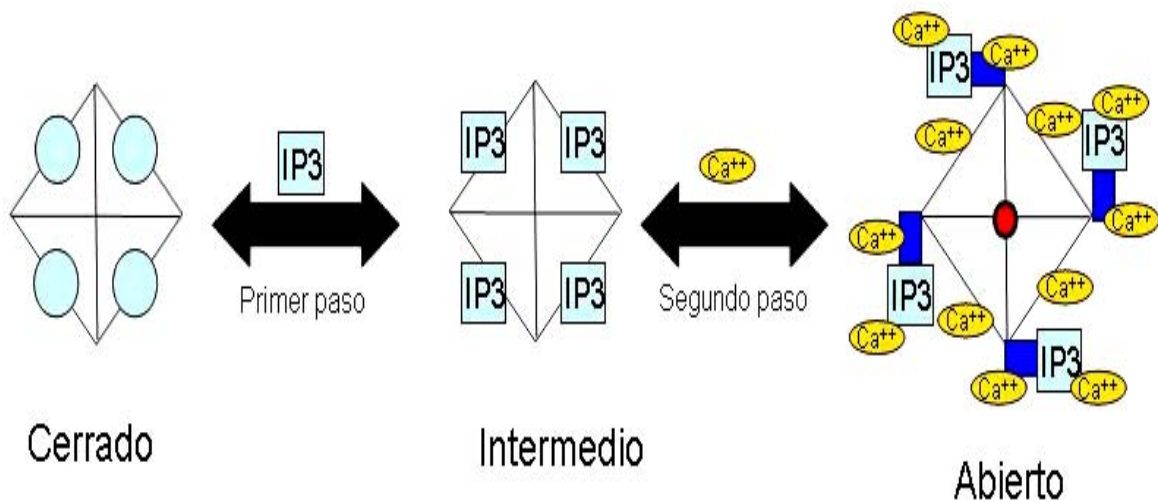


Fig. 8: Mecanismo de apertura del poro del IP₃R.

2.2.3. Regulación.

La regulación de la actividad del IP₃R es compleja. De hecho, pequeñas moléculas, como el propio calcio, la pueden modular, al igual que la interacción con otras proteínas que se sitúan en su entorno. Finalmente, un equilibrio entre su síntesis y su degradación también puede ser crítico en la regulación del contenido celular. Estos aspectos van a ser analizados someramente a continuación.

Introducción

El IP₃R es regulado bifásicamente por calcio. Estudios con el IP₃R₁ purificado, demostraron que a concentraciones fisiológicas de calcio, aumenta la probabilidad de apertura del poro, mientras que hay una inhibición marcada de este fenómeno cuando las concentraciones de calcio alcanzan niveles de 10⁻⁶M (Boehning D. y cols., 2001). En otros estudios con IP₃R purificados, no se observó esa inhibición, sugiriendo que existía una proteína mediadora de la misma, perdida durante el proceso de purificación. Mikoshiba y cols., en 1999, demostraron que esa proteína era la calmodulina. Estudios con IP₃R reconstituidos en membranas demostraron la presencia de múltiples sitios de unión al calcio. Así, el ácido aspártico -2000 (Miyakawa y cols., 2001) es necesario para el aumento de respuesta del IP₃R dependiente de calcio, puesto que cuando es reemplazado por ácido glutámico se produce una disminución de la estimulación del orden de 10 veces menor. En conclusión, aunque el mecanismo de regulación de los IP₃Rs por calcio todavía no está claro, es aceptado que el calcio liberado por IP₃ favorece la liberación de más calcio vía IP₃ (retroalimentación positivo), inhibiéndose esta liberación cuando las concentraciones de calcio son altas.

Al igual que múltiples proteínas, el IP₃R también es regulado por quinasas. Se ha demostrado que la proteína quinasa dependiente de AMPc (ó PKA) fosforila al IP₃R₁ en las serinas 1589 y 1755 (Ferris CD. y cols., 1991) estimulando así la liberación de calcio (Bruce JI. y cols., 2002). Por su parte, también se ha demostrado, que la proteína quinasa dependiente de GMPc (ó PKG) fosforila IP₃R, en los mismo residuos de serina que PKA (Komalavilas & Lincoln, 1994). En cortes cerebrales, PKG fosforila preferentemente a la serina 1589 y PKA a la 1755 (Haug LS. y cols., 1999). No se ha demostrado una regulación del IP₃R por la fosforilación de PKG. La proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa dependiente de calcio/Calmodulina (CAMK-II) fosforilan al IP₃R en distintos residuos. La fosforilación por PKC aumenta la actividad de IP₃R (Ferris CD y cols., 1991). La regulación por CAMK-II no esta muy estudiada, sin embargo He y cols. (2000) demostraron que la modulación de IP₃R por CAMK-II genera una retroalimentación positiva que influye en la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular. El IP₃R también puede ser fosforilado en residuos de tirosina. En células T activadas, la tirosin quinasa Fyn, se une y fosforila al IP₃R, aumentando la liberación de calcio vía IP₃ (Jayaraman y cols., 1996). Por último, IP₃R se encuentra también autofosforilado en los mismos residuos que actúa PKA y PKC (Ferris CD y cols., 1992). La autofosforilación es bien conocida en receptores tirosin

quinasa pero no en canales iónicos. Esta autofosforilación permitiría un mecanismo de sensibilización/desensibilización como ocurre con otras proteínas autofosforiladas.

El ATP regula bifásicamente al IP_3R (Maes K., 2000). A altas concentraciones, inhibe la liberación de calcio mediada por IP_3 , probablemente por competición directa entre el IP_3 y el ATP por el sitio de unión. A bajas concentraciones, se aumenta la probabilidad de apertura del poro. Estos efectos del ATP ocurren por unión directa del ATP al receptor. El NADH también regula al IP_3R . A altas concentraciones, como en la hipoxia, se produce un rápido aumento del calcio procedente de los almacenes sensibles a IP_3 (Kaplin y cols., 2002). Se ha demostrado que la enzima generadora de NADH se encuentra unida al IP_3R , por lo que este nucleótido puede ser generado fisiológicamente cerca del IP_3R .

Se conocen más de 25 proteínas que interactúan con el IP_3R modificando la función del mismo. A continuación se comentarán las más importantes.

En primer lugar el IP_3R interactúa con proteínas estructurales, como la ankirina, la proteína 4.1N, la miosina y la proteína Homer. Los efectos de la interacción de estas proteínas con el IP_3R son variadas:

- 1) *Compartimentalización de la molécula.* La ubicación del IP_3R en determinados localizaciones celulares depende de la interacción con otras proteínas, como es el caso de la localización en la membrana basolateral en las células renales que depende de su interacción con la proteína 4.1N (Zahng S. y cols., 2003), que es la forma neuronal de la proteína asociada al citoesqueleto 4.1R.
- 2) *Interacción con otros receptores localizados en la membrana plasmática.* El IP_3R es capaz de unirse y regular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato (Tu JC. y cols., 1998). Esta unión no es directa, sino a través de las proteínas Homer, que gracias a su estructura (Thomas U., 2002) se puede encontrar en forma de multímeros de forma que actúa como puente de unión entre ambos receptores.
- 3) *Formación de complejos.* La interacción con la proteína 4.1N es necesaria para la formación del complejo cuaternario entre la 4.1N, IP_3R , proteína CASK y Syndecan-2 en neuronas, contribuyendo a mantener la ultraestructura normal de los receptores postsinápticos (Maximov A. y cols., 2003).
- 4) *Regulación de la actividad del IP_3R .* La ankirina, proteína del citoesqueleto, cuando se une al IP_3R impide la unión del IP_3 a su receptor, bloquea la liberación de calcio mediada por IP_3 (Bourguignon LY. y cols., 1993).

Por otra parte, y siendo el IP₃R un canal encargado del transporte de calcio, no sorprende que esté regulado por proteínas que unen calcio y que interaccionan con ellas, como es el caso de la calmodulina, la caldendrina y las cromograninas. Aunque existen numerosos estudios sobre el papel regulador de estas proteínas sobre el IP₃R, no está muy claro cual es exactamente su efecto fundamental, si estimulante o inhibitorio. Así, por ejemplo, existen trabajos en los que se demuestra que es necesaria la unión de calmodulina al IP₃R para la inhibición mediada por calcio (Hirota J. y cols., 1999). Sin embargo, en otros estudios se demuestra que esta unión no es necesaria para dicha inhibición (Zhang X. y cols., 2001).

Un tercer grupo de proteínas que interaccionan con el receptor son las implicadas en el proceso de apoptosis, lo que parece razonable por la relación existente entre la homeostasis de calcio y la muerte celular programada. Existen numerosos trabajos en los que se demuestra que es necesario el aumento del calcio intracelular en la apoptosis. Así, perturbaciones en los niveles de calcio⁺ (por un aumento) activa numerosas proteínas unidas a la apoptosis. Entre las proteínas relacionadas con la apoptosis unidas al IP₃R se encuentra la caspasa 3, la calpaína y el citocromo c. Tanto en el caso de la caspasa 3 como de la calpaína, la acción que realiza es la de la degradación del IP₃R en condiciones de apoptosis, así por ejemplo la caspasa 3 es la implicada en la degradación del IP₃R en células T cuando entran en apoptosis por ligando Fas (Boehning D. y cols, 2005). Por otro lado, la calpaína es la implicada en la degradación del IP₃R cuando la apoptosis es inducida por la estimulación del IP₃R de manera crónica (Wojcikiewicz RJ. & Obendorf JA., 1996). En el caso del citocromo c, su acción es sensibilizar el IP₃R, induciendo así una mayor liberación de calcio y del propio citocromo c (retroalimentación positiva), lo que permite mantener la síntesis de ATP (Poitras M. y cols, 1995) y el desarrollo de apoptosis (Liu X. y cols., 1996) y no de necrosis.

Finalmente, se ha descrito la interacción de IP₃R con otras proteínas como la proteína G heterotrimérica β (Gβ), el receptor para la proteína quinasa C activada tipo 1 (RACK1), el sustrato para la proteína quinasa G asociado a IP₃R (IRAG), la proteína relacionada con la anhidrasa carbónica (CARP) y la proteína unida a IP₃R liberada por IP₃ (IRBIT). Patterson RL. y cols. (2004) demostraron que tanto Gβ como RACK1 se unían al IP₃R en dos distintas regiones, y que la delección de los sitios de unión tanto de Gβ como de RACK1 provocaba una disminución en la afinidad del canal por el IP₃, mientras que la sobreexpresión de RACK1 aumentaba la afinidad del receptor por el

Introducción

IP₃. Por el contrario, IRAG actúa como inhibidor de la liberación de calcio mediado por IP₃ sólo cuando hay GMPc (Schlossmann J. y cols., 2001).

Para finalizar el análisis de la regulación de la actividad del IP₃R, hay que comentar la importancia del proteasoma, que si bien no es un sistema que regule la actividad de los IP₃R, sí es responsable del mantenimiento de sus niveles intracelulares a través de su degradación.

El proteasoma es un gran complejo multiproteico presente en el citoplasma. Está compuesto de dos subunidades: la 20S y la 19S. Ambas ensambladas forman el proteasoma 26S. La subunidad 20S está compuesto de 4 anillos de siete unidades cada uno, con dos anillos exteriores (α) y dos más internos (β) donde se localiza el sitio activo (Grziwa A. y cols., 1991). La 20S es la parte catalítica del proteasoma, pero sólo degrada proteínas desnaturalizadas. Por su parte la subunidad 19S, está constituido por múltiples subunidades de funcionalidad diferente que le permiten reconocer selectivamente los sustratos que posteriormente serán degradados por la 20S.

Las proteínas, para poder ser degradadas por el proteasoma 26S, deben estar ubiquitinizadas, es decir, deben tener unida a su estructura ubiquitina, polipéptido de 76 aminoácidos. Este mecanismo, dependiente de ATP, es realizado por tres tipos de enzimas; E1 ó enzima activadora de ubiquitina, E2 ó enzima conjugador de ubiquitina, y E3 ó ligasa que une la ubiquitina al sustrato (ver Fig.9).

Una vez unido las cadenas de ubiquitina al sustrato (pueden ser una ó varias), es reconocido por la subunidad 19S, la cual es la encargada de llevar a cabo la desubiquitinización, la desnaturalización de las proteínas y el transporte hacia la 20S, que son requisitos necesarios para que la 20S pueda actuar y degradar el sustrato. Este complejo mecanismo de acción le permite una gran especificidad del sistema, evitando así la degradación de proteínas que no estén “marcadas”.

Más recientemente (Shringarpure R. y cols., 2003), se ha demostrado un mecanismo alternativo de degradación por el proteasoma, constituido por la subunidad 20S e independiente de la ubiquitinización de la proteína y de la hidrólisis del ATP. Aunque los estudios en esta ruta alternativa de degradación son escasos, sí que se ha demostrado su implicación en la degradación de las proteínas oxidadas (Grune T. y cols., 1995).

En el caso concreto del IP₃R, el proteasoma 26S realiza un papel central en la regulación de la misma (Bokkala S. & Joseph SK., 1997), en el contexto de un sistema regulador complejo que se conoce con el nombre de degradación de proteínas asociada

Introducción

a la membrana del retículo sarcoplásmico (ERAD). La ERAD incluye a la degradación por proteasoma 26S, salvo que requiere un proceso más que es la movilización de la proteína desde la membrana del retículo sarcoplásmico hasta el citosol donde se localiza el proteasoma y las enzimas E2 y E3 específicas de este proceso (Webster JM. y cols, 2003).

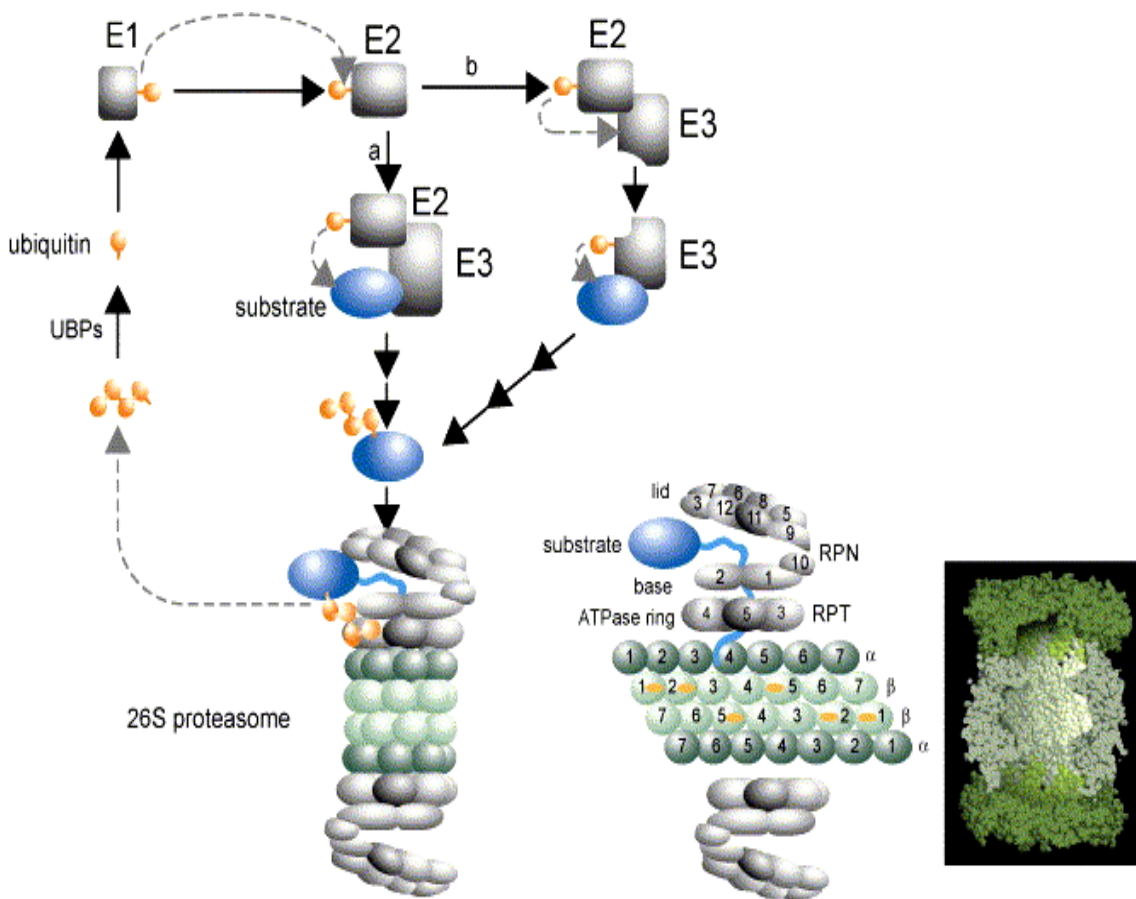


Fig. 9: Mecanismo de acción del proteasoma 26S. En la parte derecha se muestra la estructura de complejo 26S (en gris la 19S y en verde la 20S).

3. Relajación celular.

Literalmente, el término relajación significa “aflojar”. La relajación, fisiológicamente, es posterior a la contracción y su finalidad es restaurar el estado basal previo a la contracción. En el sistema cardiovascular, sus principales moduladores intracelulares son el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y el guanósín monofosfato cíclico (GMPc). El resultado final de la activación de ambas vías es la defosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM).

Por la propia naturaleza de los resultados que se muestran en esta tesis, en los apartados siguientes se analizó la relajación mediada por GMPc, clásica de la relajación del músculo liso vascular, y en particular en la interacción de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y de la proteína quinasa G (PKG).

El óxido nítrico (NO) es producido en las células endoteliales por acción de la óxido nítrico sintetasa (eNOS). Debido a su naturaleza gaseosa, es capaz de difundir a capas más internas, llegando a las células musculares lisas donde se unirá a la GCs, activándola y produciendo GMPc, que activará la PKG, la cual podrá actuar sobre distintos sustratos. Uno de los más estudiado es la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (PCLM), cuya fosforilación (P-CLMP) permite llevar a cabo la defosforilación de la CLM dando lugar a la relajación celular (ver Fig. 10).

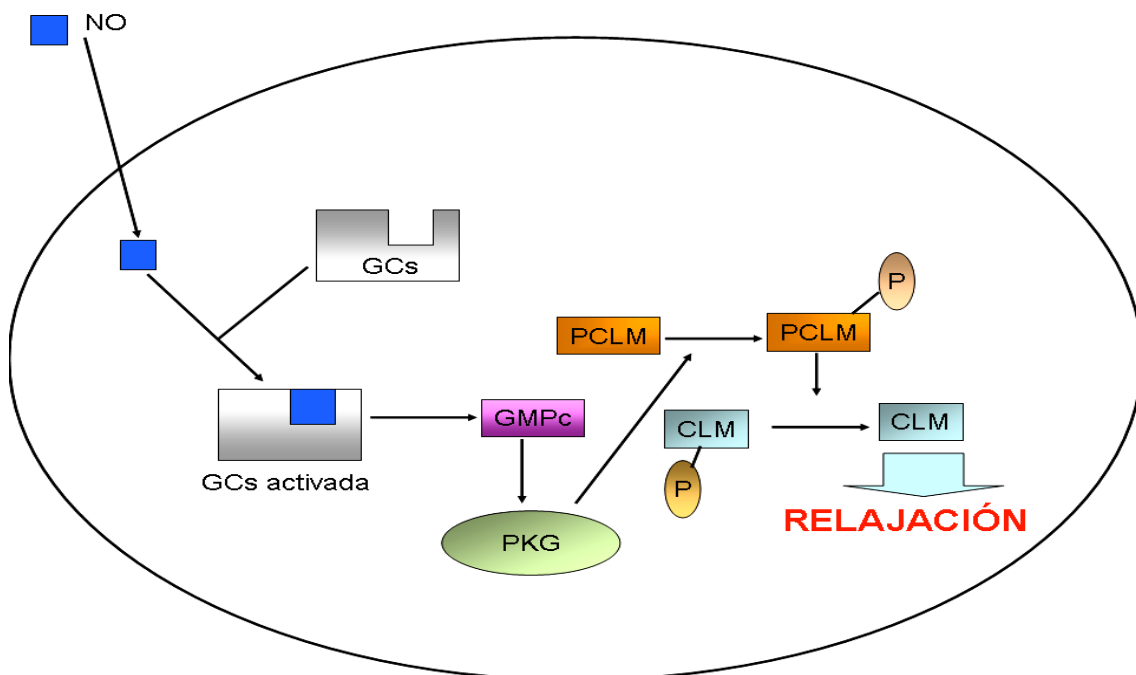


Fig. 10: Mecanismo de relajación inducido por la activación de la GCs.

3.1. Guanilato ciclasa soluble (GCs).

La GCs es una hemoproteína citosólica, ampliamente distribuida en el organismo. Está formada por 2 subunidades, α y β (Harteneck C. y cols., 1990). La estructura es heterodimérica y consta, en ambas subunidades de (ver Fig. 11):

- 1) *Extremo N-terminal*, donde se localiza el sitio de unión del ligando. Está formado por un grupo hemo, que a diferencia del resto de hemoproteínas que usan el grupo hemo para el almacenaje y transporte de oxígeno, esta se usa para la unión del NO. Es el que presenta menor homología entre las subunidades.
- 2) *La región axial*, responsable de la dimerización, requisito necesario para que la GCs sea activa.
- 3) *La región C-terminal*, que constituye el sitio catalítico. Forma GMPC a partir de GTP. Es la región con mayor homología entre las distintas subunidades (Lucas KA. y cols., 2000).

La forma mayoritaria es el heterodímero $\alpha 1/\beta 1$, aunque también existen combinaciones con la $\alpha 2$ y la $\beta 2$ y variantes de estas. La subunidad $\alpha 2$ tiene una característica especial, que es la presencia de la región PDZ, que le permite unir la GCs $\alpha 2/\beta 1$ a la membrana sináptica (Russwurm M. y cols., 2001).

El principal agonista de la GCs es el NO, aunque también puede ser activada por el monóxido de carbono (CO). La afinidad del NO por la GCs es bastante alta (4 nM). No se conoce con exactitud el modo de unión del NO a la GCs, aunque sí se sabe que es necesario el desplazamiento del enlace de la histidina 105 de la subunidad β con el grupo hemo por el NO. Lawson DM. y cols. (2000) han propuesto un modelo de unión del NO al grupo hemo que consta de 2 pasos. En el primero, el NO se une a la parte distal del grupo hemo, de este modo se debilita el enlace de la His105 con el grupo hemo. En el segundo paso, se produce la ruptura de este enlace y la formación de un segundo enlace del NO con el Fe^{++} en la cara proximal seguido de la ruptura del enlace inicial del NO con el Fe^{++} en la cara distal (ver Fig. 11).

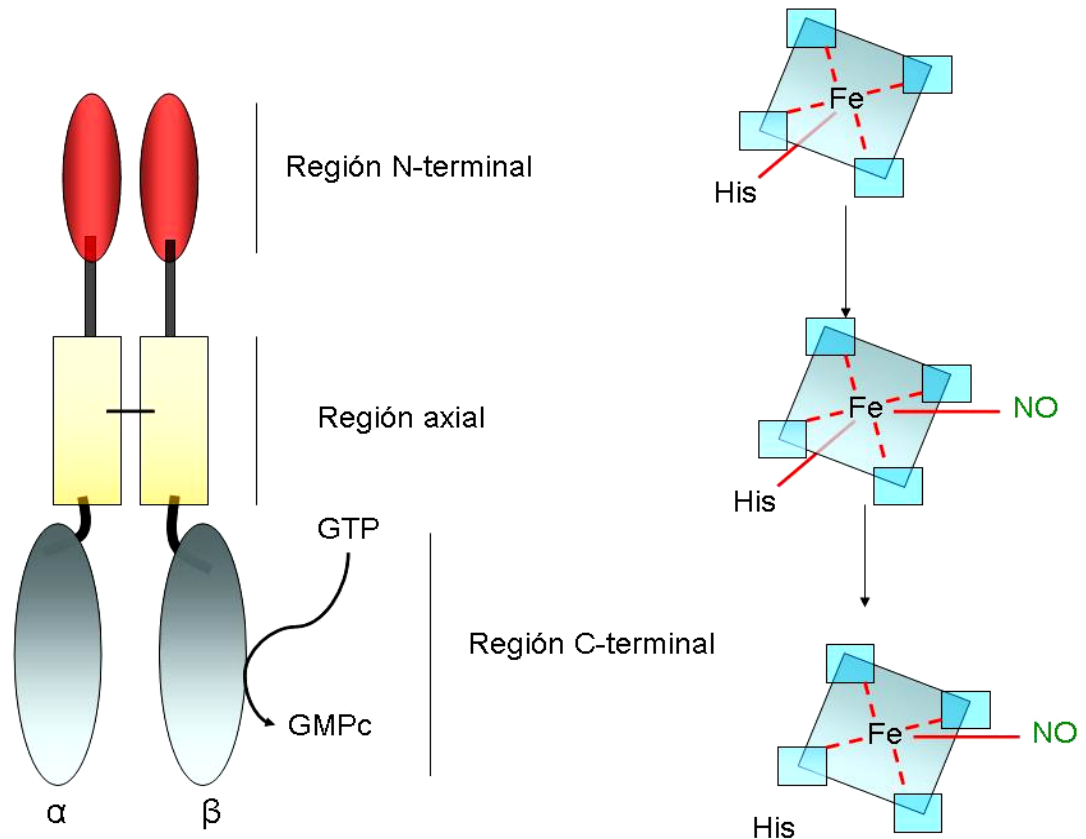


Fig. 11: Estructura y detalle de activación de la GCs.

Las acciones que realiza la GCs tienen lugar a través de su producto que es el GMPc. El GMPc es un segundo mensajero que interviene en una gran cantidad de procesos biológicos. La especificidad de la respuesta depende de muchos factores tales como el ligando, la isoforma de la GCs ó el tejido donde se encuentre. Hasta el momento se conocen tres dianas: Proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), canales iónicos dependiente de nucleótidos monofosfato (canales CNG) y fosfodiesterasas (PDE).

La activación de los canales CNG es importante en los procesos de fototransducción y neurotransmisión retinal (Lucas KA. y cols., 2000). La activación de las PDE induce la degradación del GMPc, así como del AMPc, actuando como un mecanismo regulador de la propia actividad de la enzima (Murthy KS., 2001). La PKG es una quinasa activada por el nucleótido cíclico, y a ella se hará referencia posteriormente.

Introducción

La regulación de la GCs tiene lugar a distintos niveles. En primer lugar, se ha demostrado que ciertas citoquinas, factores de crecimiento, y segundos mensajeros regulan la expresión de las subunidades de la GCs. Así, por ejemplo, los niveles del ARNm de la subunidad $\alpha 1$ y la $\beta 1$ son reducidos por estrógenos (Krumenacker JS. y cols., 2001), donadores de NO (Filippov G. y cols., 1997), AMPc (Papapetropoulos A. y cols., 1995), factor de crecimiento nervioso (Liu H. y cols., 1997), e interleukina-1 β (Papapetropoulos A. y cols., 1996). Además, los niveles de expresión de la subunidades varían durante el desarrollo y en el curso de diversas enfermedades, como la hipertensión (Ruetten H. y cols., 1999).

En segundo lugar, la actividad de la GCs se regula también por fosforilaciones. Tanto la subunidad $\alpha 1$ como la $\beta 1$ contienen en su secuencia múltiples sitios de fosforilación para diversas quinasas, aunque el efecto y el sitio exacto de estas fosforilaciones no se conocen claramente. Zwiller J. y cols. (1981) demostraron que la GCs purificada es fosforilada por la PKA aumentando su actividad, aunque Murthy KS. (2001) no observó esta fosforilación. Otros estudios han demostrado que PKC es capaz de fosforilar la GCs y de incrementar su actividad en células PC-12 (Zwiller J. y cols., 1985). Dos estudios independientes han demostrado que el incremento de GMPc lleva a la disminución de la actividad de la GCs, aunque el mecanismo propuesto es completamente opuesto. Así Ferrero R. y cols. (2000) observaron que la estimulación de PKG, por GMPc, reduce la fosforilación en los residuos de serina, por el contrario, Murthy KS. (2001) demostró que el SNP incrementa la fosforilación de la GCs mediada por PKG, disminuyendo su actividad.

Finalmente, las interacciones con otras proteínas afectan a la GCs en dos importantes propiedades, como son su actividad y su localización subcelular. Russwurm M. y cols. (2001) demostraron que la subunidad $\alpha 2$ de la GCs interacciona en la brecha sináptica y con ciertas proteínas relacionadas como PSD-93, SAP97 y SAP102 en cerebro de ratón a través del extremo C-terminal de la GCs. Esto permite que la GCs se localice en la membrana neuronal. La GCs también interacciona con la proteína de shock térmico 90 (HSP90) en células del endotelio vascular y en células de músculo liso (Venema RC. y cols., 2003) permitiendo que cuando las células endoteliales son tratadas con VEGF ó bradiquina se forme el complejo entre eNOS/HSP90 con la GCs. Esto facilitaría la transferencia del NO, procedente de la eNOS, hacia la GCs aumentando así su actividad y evitaría la inactivación del NO por el anión superóxido.

3.2. Proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG).

Las PKG representan el principal mediador intracelular del GMPc. Su forma activa es homodimérica. Se activan por la unión del GMPc y pertenece a la familia de las serina/treonina quinasa, igual que la PKA. Transfieren el γ fosfato de un ATP a un residuo serina/treonina de la proteína sobre la que actúan.

Se conocen dos subtipos de PKG, codificados por dos genes distintos localizados en diferentes cromosomas: PKG I y PKG II. Dentro de la PKG I existen dos isoformas que provienen del mismo gen y son la PKG I α y PKG I β . Ambas isoformas están ampliamente distribuidas y su localización intracelular es citoplasmática. En cambio, PKG II es un homodímero unido a membrana por su extremo amino terminal. Su expresión es más restringida que la PKG I, estando ausente en el sistema vascular.

En la molécula de PKG se distinguen las siguientes regiones:

- 1) *Región N terminal*: es la responsable de la dimerización. Contiene sitios de autofosforilación, lo cual le confiere la capacidad de autorregular la actividad enzimática. Es en esta región donde la proteína sufre cambios post-transduccionales que determinarán diferentes localizaciones subcelulares.
- 2) *Región central*: donde se localiza el dominio de unión a GMPc, en concreto contiene dos por cada monómero. Cuando ambos sitios son ocupados se producen un cambio conformacional que le permitirá adoptar su forma activa.
- 3) *Región C terminal*: se localiza el dominio catalítico, que es el encargado de transferir el fosfato a la proteína diana (Pfeifer A. y cols., 1999)

La principal acción de la PKG es la regulación del tono vascular. La PKG I es fundamental en la relajación vascular mediada por NO. El efecto vasorrelajante de la PKG I se realiza a cuatro niveles. Primero, disminuyendo los niveles de calcio intracelular por fosforilación de los canales maxi-K activados por calcio (BK_{Ca}) (Alioua A. y cols., 1998). Segundo, modulando la liberación de calcio mediada por IP₃. El IP₃R₁ interacciona con IRAG (Schlossmann J. y cols., 2000), que se expresa proteína junto a PKG I β en plaquetas, músculo liso y neuronas (Geiselhoringer A. y cols., 2004). Cuando IRAG es fosforilada por PKG I β se inhibe la liberación de calcio mediada por IP₃ (Ammendola A. y cols., 2001). Tercero, inhibiendo, fundamentalmente por PKG I α , la síntesis de IP₃ por inactivación de la proteína G (Tang M. y cols., 2003). Cuarto, a

Introducción

través de la defosforilación de la CLM, Surks HK. y cols. (1999) demostraron que PKG I α es capaz de fosforilar a la fosfatasa de la CLM, activándola de forma que defosforilará a la CLM y por tanto inhibirá la contracción.

Además de estas acciones, sobre el tono vascular, muchos grupos han demostrado que el NO inhibe la proliferación, migración y desdiferenciación de las células musculares lisas. Recientes estudios muestran que estos efectos están mediados por la PKG I a través de la vía de las MAP quinasas (Pilz RB. & Casteel DE., 2003) ó a través de la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) (Chen L. y cols., 2004). Otros efectos de la PKG son la inhibición de la agregación plaquetar, la modulación de la secreción mediada por guanilina ó por somatostaina (ST) (Pfeifer A., y cols., 1996), la regulación de crecimiento óseo (Miyazawa T. y cols., 2002), y la correcta formación de los axones durante el desarrollo embrionario (Schmidt H. y cols., 2002).

4. Radicales libres y contracción/relajación celular.

El papel de los MADO en los fenómenos de contracción y relajación celular es controvertido, existiendo evidencias que apoyan su papel vasoactivo, bien sea como vasoconstrictores ó como vasorelajantes. Entre todos los MADO, sin duda el H_2O_2 es el más estudiado porque es el más estable, ocupa un papel central en el complejo metabolismo de estas moléculas (Hehner SP. y cols., 2001), difunde fácilmente por la membrana (Bergendi L. y cols., 1999) y actúa en muchas rutas de señalización en los vasos sanguíneos (Paravicini TM. & Sobey, 2003).

En diversos tipos celulares, tales como musculares lisas (Tabet F. y cols., 2004), endoteliales (López-Ongil S. y cols., 1999) y mesangiales (Iglesias de la Cruz MC. y cols., 2000), se ha demostrado que el H_2O_2 actúa como agente contráctil. No obstante, el mecanismo responsable de esta contracción no está claro. Diversos trabajos han demostrado que el tromboxano A_2 , producto de las cicloxigenasas, puede estar implicado en la contracción inducida por H_2O_2 (Leffler CW. y cols., 1990; Katusic ZS. y cols., 1993; Barlow RS. & White RE., 1998; Rodríguez-Martínez MA. y col, 1998; Gao YJ. y cols., 1993). La activación directa ó indirecta de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) que sería la responsable de la formación de prostanoides, como por ejemplo el tromboxano A_2 , inducida por H_2O_2 (Chakraborti S. y cols., 1992; Boyer CS. y cols., 1995). Otros mecanismos sugeridos para explicar el fenómeno vasoconstrictor implicarían la activación de la fosfolipasa C (Sheehan DW. y cols., 1993), tirosin quinasas (Jin N. & Roadhes RA., 1997), proteín quinasa C (Zhang J. y cols., 1998; Boyer CS. y cols., 1995; Yang ZW. y cols., 1998), receptores ATP (Shen JZ. y cols., 2000), purinoreceptores (Shen JZ. y cols., 2000) ó radicales hidroxilo (Yang ZW. y cols., 1998).

Por otra parte, existen estudios en los que se demuestra el papel del H_2O_2 en la respuesta de las células musculares lisas vascular a agentes contráctiles. Nuestro grupo demostró que es necesario la presencia de H_2O_2 para la contracción inducida por ANGII (Torrecillas G. y cols., 2001), proceso en el que podría estar implicada la fosforilación de p38 (Meloche S. y cols. 2000). Yang H. y cols. (2003) observaron que los ratones que sobreexpresan catalasa presentan una menor respuesta presora que los normales frente a norepinefrina (NE) y ANGII. Por su parte, Kanie N. y cols. (2000) describieron que el anión superóxido favorece la vasoconstricción en ratones diabéticos tratados con

Introducción

NE, mientras que Rey FE. y cols. (2001) demostraron que el incorrecto ensamblaje de la NADP(H) oxidasa provoca una disminución en la presión sistólica de los ratones.

La capacidad relajante de los MADO no ha sido descrita en células pero sí en segmentos aislado de aorta, y tampoco existe un mecanismo claramente descrito para explicar el fenómeno. En algunos estudios se ha demostrado la implicación de la activación de diferentes subtipos de canales de potasio, como los canales de potasio activados por calcio (Barlow RS.y cols., 1998 y 2000; Iida Y. & Katusic, 2000; Gao Y. y cols., 2003), los canales de potasio dependientes de ATP (Wei EP.y cols., 1996), y los canales de potasio dependientes de voltaje (Iida Y. & Katusic, 2000) en la relajación dependiente de H_2O_2 . Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar esta activación incluyendo la síntesis de metabolitos de la lipoxigenasa (Barlow RS. y cols., 2000), de la cicloxigenasas (Hattori T. y cols., 2003) ó del citocromo P450 monoxigenasa (Yang Z. y cols., 1999). También se han propuesto otros mecanismos independientes de los canales de potasio, fundamentalmente dependientes de endotelio (Zembowicz A. y cols., 1993; Tengchaisri N. & Kuo L., 2003), a través de la producción de GMPc (Fujimoto S. y cols., 2001; Burke TM. & Wolin MS., 1987).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales.

1.1. Material biológico.

1.1.1. Animales de experimentación.

Para la realización de la tesis se utilizaron dos tipos de animales:

A) Ratas (*Rattus norvegicus*): estos animales se utilizaron para la obtención de células musculares lisas de la aorta (CML) para todos los trabajos realizados “*in vitro*”. Se usaron ratas de la cepa Wistar, indistintamente machos ó hembras, de unos 3 meses y de 150-200 gramos de peso.

B) Ratones (*Mus musculus*): se usaron ratones genéticamente modificados que sobreexpresan catalasa, del fondo genético C57/BL6 y se utilizaron como controles los ratones C57/BL6 sin modificar ó “Wild Type” (WT). Estos animales se usaron para los experimento *in vivo* , así como para los trabajos en tejidos. Se trabajo sólo con ratones machos de 3 meses de edad. Los ratones C57/BL6 que sobreexpresan catalasa fueron generosamente cedidos por el Dr. A. Richardson (Universidad de Texas, TX, USA).

Todos los animales fueron mantenidos en el animalario de la Universidad de Alcalá en condiciones estándar de temperatura (22 ± 2 °C), ciclos de 12 horas de luz, de humedad (54%) y alimentación y bebida *ad limitum*.

1.1.2. Células.

Todos los experimentos *in vitro* se realizaron en CML procedentes de la aorta. Se utilizaron CML transfectadas con catalasa y sin transfectar. Las CML transfectadas fueron cedidas generosamente por la Dra. Kathy K. Griendling (Universidad de Emory, Atlanta, GA, USA). Las CML sin transfectar fueron obtenidas según se detalla en métodos.

1.2. Reactivos e instrumentos.

1.2.1. Reactivos generales.

Se enumera a continuación en orden alfabético, los reactivos utilizados, así como la procedencia de los mismos:

Acetato sódico anhidro (Carlo Erba), ácido clorhídrico (Fluka), acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 40% (Nacional Diagnostic), agarosa D-2 (Pronadisa), albúmina sérica (Sigma), persulfato de amonio (Sigma), aprotinina (Sigma), ATP (Sigma), azida sódica (Sigma), azul de bromofenol (Sigma), cloruro calcico (Sigma), cloruro magnésico (Sigma), cloruro sódico (Panreac), cloruro potásico (Panreac), colagenasa tipo II (Worthington), DEPEC (Sigma), fosfato monopotásico (Merck), fosfato disódico (Carlo Erba), D-Glucosa anhidra (Scharlau), dodecil sulfato sódico (Fluka), EDTA-disódico (Serva), EGTA (Sigma), elastasa (Worthington), etanol (Panreac), glicerol (Sigma), glicina (Sigma), HEPES (Sigma), hidróxido sódico anhidro (Carlo Erba), imidazol (Sigma), leche en polvo (Bio-Rad), leupeptina (Sigma), β - Mercaptoetanol (Sigma), metanol (Panreac), ortovanadato sódico (Sigma), pirofosfato sódico (Sigma), PMSF (Sigma), revelador de películas fotográficas (Kodak), saponina (Sigma), sódio hidrógeno carbonato (Panreac), sulfato magnésico anhidro (Panreac), Trizma[®] base (Sigma), triton X-100 al 10% (Pierce) y Tween[®] 20 (Sigma).

1.2.2. Soluciones y medios de cultivos.

∞ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 4500 mg de glucosa/L, piridoxina, 25mM HEPES y NaHCO₃. Referencia: D6171 (Sigma).

Suplementado con:

- Penicilina/Estreptomicina (Gibco), siempre.
- L-Glutamina (BioWhitaker), siempre.
- Suero bovino fetal (Gibco), sólo cuando se indica.
- Suero Bovino (Gibco), sólo cuando se indica.
- Sulfato de gentamicina (Calbiochem), en CML transfectadas (Weber DS. y cols., 2004).

∞ Solución estéril de Hank's, constituida por 2 gr. de KCl, 0,3 gr de KH₂PO₄, 40 gr de NaCl, 5 gr de Na₂HPO₄, 0,05 gr de rojo fenol, 1,750 gr de CO₃HNa y 5 gr de D-Glucosa (pHh: 7,2).

☞ Solución tamponada de fosfatos (PBS) estéril cuya composición es: NaCl 17 mM, KCl 0.3 mM, Na₂HPO₄ 1.01 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM (pH: 7.,4).

1.2.3. Material de laboratorio y equipos.

Para la realización de este trabajo se utilizaron los materiales y equipos estandares de un laboratorio de biología celular y molecular. Este incluye material de vidrio, plástico, acero inoxidable así como pipetas automáticas, y placas de cultivo de distinto tamaño y número de pocillos. Entre el equipo utilizado destacamos los contadores de radioactividad β y γ (Becton-Dickinson), equipo para la detección y cuantificación de la RT-PCR a tiempo real (Modelo 7300, Applied Biosystem), esfignomanómetro de cola (Modelo LE5007, PanLab).

Parte del trabajo se apoyo en distintos programas informáticos como por ejemplo el Scion Image (Scion) para la cuantificación de las densitometrías, el Statgraphics, para los estudios estadísticos, el Windows XP (Microsoft), para las presentaciones de los datos ó el System Software (Applied Biosystem), para la determinación del ciclo umbral (Ct) de la RT-PCR a tiempo real.

2. Métodos *in vitro*.

2.1. Obtención, caracterización y cultivos de células musculares lisas de aorta de rata.

2.1.1. Obtención de las células musculares lisas de aorta de rata.

Como se ha comentado anteriormente, todo el trabajo *in vitro* se realizó en células musculares lisas de aorta de rata (CML). Para su obtención se usaron ratas de la cepa Wistar jóvenes, debido a la mayor capacidad mitótica de las mismas, tanto machos como hembras. La elección de estos animales fue doble: por un lado por la facilidad de obtención de dichos animales, y por otro la experiencia de nuestro laboratorio en el cultivo de CML a partir de aortas de rata, utilizando el método originariamente descrito por Chamley JH. y cols. en 1977, con ligeras modificaciones.

Tras sacrificar a los animales anestesiados por exanguinación en condiciones de mayor asepsia posible, se abrió todo el tórax de la rata, casi hasta el cuello, cortando por el esternón. Se retiraron los distintos tejidos y órganos hasta ver la arteria en todo su recorrido, desde el corazón hasta la bifurcación aorto-iliaca, con el objeto de proceder a su separación de la columna vertebral con la ayuda de unas tijeras de punta fina. A continuación, se procedió a seccionar la aorta, primero en su parte inferior, lo más cerca posible de la bifurcación aorto-iliaca, y después por el extremo superior, a la altura del cayado. Una vez extraída la aorta, esta se depositó en un tubo de 50 ml que contenía solución de Hank's estéril y en hielo.

A partir de este momento se trabajó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. La aorta se colocó en una placa P-100 que contenía solución de Hank's estéril y se eliminó con cuidado la capa de grasa que la recubre, intentando producir el menor estrés mecánico posible. Una vez eliminado este tejido adiposo, se traspasó a una placa y se realizó la primera digestión (compuesto por colagenasa tipo II disuelto en DMEM y esterilizado por filtración) durante 30 minutos a 37 °C. Bajo la lupa óptica, se eliminó la capa adventicia utilizando unas pinzas Dumont #5. Es importante asegurarse que la capa adventicia se elimina completamente para evitar contaminación con otros tipos celulares distintas a las musculares lisas.

Se cortó el vaso longitudinalmente y la capa interna de la aorta fue raspada suavemente con un bisturí estéril para eliminar la capa de células endoteliales que se localizan en la capa interna. Se lavó la aorta con solución de Hank's y se dejó toda la noche en una placa con medio DMEM con suero bovino fetal al 10%. A continuación, previo a la segunda digestión, se eliminó cualquier traza de suero presente mediante una serie de lavados con solución de Hank's estéril, y posteriormente se realizó la digestión, con una solución que contiene colagenasa tipo II y elastasa, incubándola 90 minutos a 37 °C.

Finalizada la segunda incubación se hizo pasar el producto de la digestión por una jeringuilla de 1 mL, varias veces para facilitar la disgregación del tejido. La digestión fue detenida añadiendo DMEM con suero bovino fetal al 20%. Se centrifugó la suspensión a 150g durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en DMEM al 10% de suero bovino fetal. Se agitó la suspensión y contamos las células en una cámara de Neubauer.

Se sembró aproximadamente 1 millón de células por frasco de cultivo utilizando medio DMEM al 10% de suero bovino fetal. Se esperó, al menos 2 días, para poder cambiar el medio, que es el tiempo mínimo necesario para que las células viables pudieran adherirse al frasco.

2.1.2. Caracterización de las células musculares lisas.

Debido a la posibilidad de poder obtener cultivos celulares contaminados con otros tipos celulares, como por ejemplo fibroblastos y células endoteliales, las células obtenidas se caracterizaron utilizando un anticuerpo específico de las células musculares lisas como es la α -actina muscular lisa (Skalli, O. y cols., 1986), por criterios morfológicos y funcionales (Chamley-Campbell J. y cols., 1979).

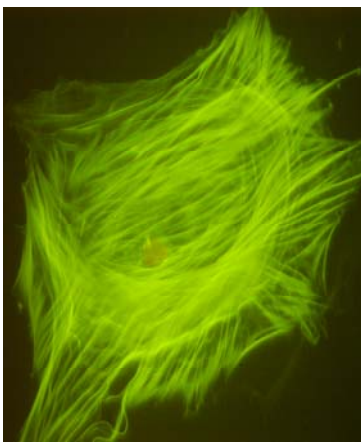
Para la caracterización mediante el uso de anticuerpo específico, las células se cultivaron en "cover slip" estéril a baja densidad, para poder visualizar mejor la fluorescencia emitida por el anticuerpo. Al día siguiente, tras dos lavados con PBS estéril, se fijaron las células con metanol a -20°C durante diez minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS, 5 minutos cada vez, y se incubó con el anticuerpo anti α actina específica de las CML unida a IsoTioCianato de Fluoresceína (ó FITC) a una dilución 1:50 en PBS al 3% BSA durante una hora a temperatura ambiente.

Materiales y Métodos

Transcurrido ese tiempo se lavó 3 veces con PBS estéril, 5 minutos cada vez, en oscuridad y secamos el “cover slip”.

Para poder visualizar el anticuerpo se aprovechó la capacidad de emitir luz a 530 nm de la fluoresceína (ó FITC) cuando es excitada a una longitud de onda de 480 nm. Para ello se usó un microscopio de fluorescencia que contiene un láser de argón. Se utilizó como control negativo las células de neuroblastoma SH-5YHY, ya que estas células carecen de α actina muscular lisa.

A)



B)

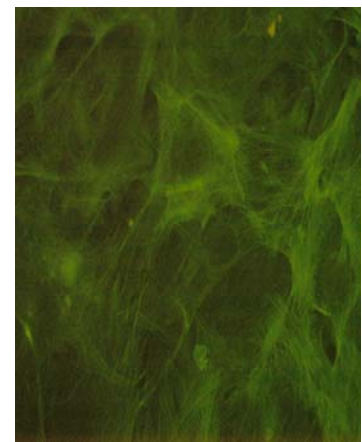
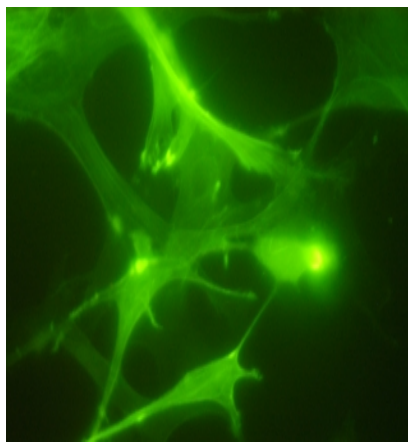


Fig. 12: Caracterización de las células musculares lisas de aorta de rata con el anticuerpo de anti- α actina muscular lisa unido a FITC, que aparece de color verde fluorescente. A) Células musculares lisas de aorta de rata. B) Células de neuroblastoma SH-5YHY.

2.1.3. Mantenimiento y propagación del cultivo celular.

Para su crecimiento el medio utilizado fue DMEM complementándose con el suero bovino fetal al 10% para el caso de las CML sin transfectar, ó con el suero bovino al 10% para las CML transfectadas. Una vez alcanzada la confluencia las células, se lavaron 3 veces con solución de Hank's y se incubó con tripsina-EDTA durante 1 minuto a 37 °C. Posteriormente, se añadió medio completo, según el tipo celular, con el fin de neutralizar la acción de la tripsina.

Para amplificar el número de células, centrifugamos a 1500 rpm durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en medio completo y se distribuyó en las distintas placas de forma homogénea. El grado de amplificación fue de 1:3. En cualquier caso, nunca se utilizó CML en un pase superior a 5, ya que empiezan a perder la capacidad contráctil de las mismas.

2.2. Extracción, separación e identificación de las proteínas.

2.2.1. Extracción y determinación de las concentraciones de proteínas.

Tras el correspondiente tratamiento, las CML se lavaron 3 veces con PBS a 4° C, y se incubaron con un buffer de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, pirofosfato sódico 10 mM, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 1 mM, y justo antes de añadirlo a las células se incorporó inhibidores de proteasas: aprotinina y leupeptina a 10 µg/mL, PMSF 1 mM y Triton X-100 al 1%, como detergente) durante 30 minutos a 4 °C y a continuación las células se rasparon. El homogenizado obtenido se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, que contiene el conjunto de proteínas solubilizadas.

Seguidamente, se determinó la concentración de proteínas obtenidas por el método de Lowry (Lowry OH y cols., 1951), utilizando un conjunto de reactivos comercialmente disponible (Bio Rad Detergen Compatible protein assay). Para ello, se tomaron 5 µl de la muestra y se le añadió 25 µl de la solución A (980 µl del compuesto A y 20 µl del S) y 200 µl de la solución B. La mezcla se dejó incubando durante 15 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se realizó la lectura de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 720 nm (modelo Sunrise, Tecan). En cada lectura, se incluyó una curva estándar que se realizó con BSA con concentraciones crecientes desde 0 mg/ml a 2,5 mg/ml. Las concentraciones de las muestras debían quedar entre ambos límites para poder extrapolar los resultados en la curva estándar.

2.2.2. Separación e identificación de proteínas.

Utilizamos la técnica de *Western blot*. Esta técnica nos permite la separación de las proteínas según su peso molecular por electroforesis en geles de SDS/PAGE (Western), y su posterior identificación por la utilización de anticuerpos específicos para nuestra proteína, inmovilizada en una membrana (Blot).

Tras la determinación de la concentración de proteínas, se tomó una cantidad de las mismas y se mezcló con un tampon (Trizma 0,05 M, pH: 6,8, 2 gr de SDS, 10 mL de glicerol, β-mercaptoetanol al 2% y 5 mg de azul bromofenol y se llevó a un volumen

Materiales y Métodos

final 100 mL) calentándose a 95°C durante 5 minutos, fase crítica para la desnaturalización de las proteínas. Una vez desnaturalizadas, se depositaron en un gel de SDS/PAGE a distintas concentraciones de acrilamida/bisacrilamida, según el peso molecular de la proteína, a mayor peso menor porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, y se separaron por electroforesis según su peso molecular. Se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno ó PVDF (Perkin Elmer) de 0,45 µm de poro, mediante transferencia semi-seca a 16 voltios durante 60 minutos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se bloquearon con una solución de T-PBS (Tween 20 al 0,1% en PBS) con 3% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo, se añadió el anticuerpo primario (ver Tabla) durante toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 minutos con T-PBS, y se incubaron las membranas con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron las membranas durante 15 minutos dos veces con T-PBS. La detección del anticuerpo primario se realizó por quimioluminiscencia (Isacson y col, 1974), utilizando un conjunto de reactivos disponibles comercialmente (ECL Plus, Amershan), impresionándose en una película fotosensible. Los niveles de expresión de las proteínas se evaluaron por densitometría, usando el ScionImage, y corrigiéndose la carga con los niveles de α actina y β tubulina presentes en la muestra.

Anticuerpo primario	Casa Comercial	Dilución	% Aciamida/Bisacrilamida
α -actina	Sigma	1/2000	-
β -tubulina	Sigma	1/3000	-
Catalasa	Sigma	1/8000	7,5
GCs α 1/ β 1	Calbiochem	1/1000	7,5
GCs β 1	Sigma	1/1000	7,5
HNE-Lys	Alexis	1/1000	7,5
IP ₃ R ₁	Chemicon	1/1000	6
IP3R3	BD	1/1000	6
PKG I β	Stressgene	1/1500	7,5
VASP-P	Cell Signalling	1/1000	7,5

Tabla 3.: Anticuerpos utilizados en la tesis.

2.3. Determinación de los niveles de IP₃R ubiquitinizados.

Se realizó por la técnica de inmunoprecipitación (IP), descrita por Wojcikiewicz RJ. (2000). La IP es una técnica que permite determinar la interacción entre proteínas ó proteínas-ADN, mediante la precipitación de inmunocomplejos (antígeno-anticuerpo) y su posterior análisis generalmente por la técnica de western blot. En nuestro caso, se utilizó para determinar los niveles de ubiquitinización del IP₃R.

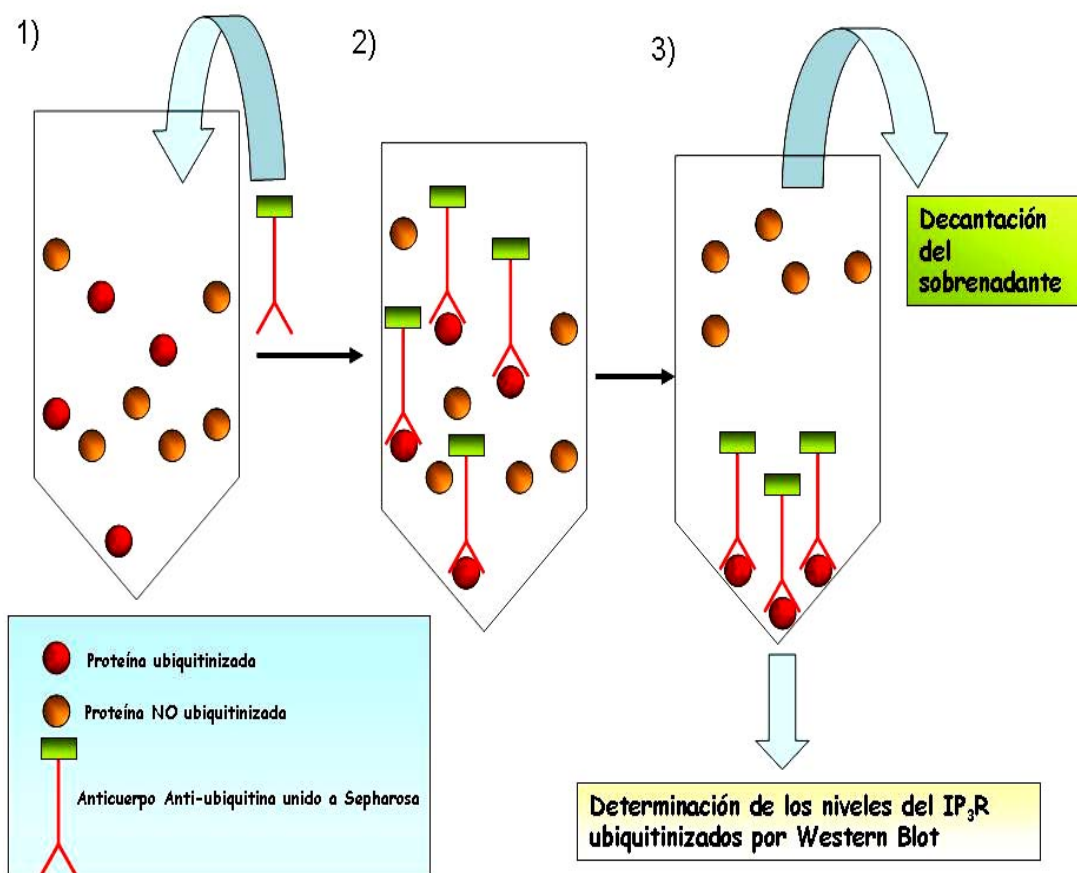


Fig. 13: Esquema de la determinación de los niveles de los IP₃Rs por inmunoprecipitación.

Para realizarla, una vez extraída y determinadas las proteínas tal y como se ha descrito, se utilizó 1 mg de proteínas, y se llevó a un volumen final de 1 mL de buffer de lisis. A continuación, se añadió el anticuerpo anti ubiquitina unido a bolas de Sepharosa (Santa Cruz), que hace que el complejo anticuerpo-proteína sea insoluble permitiendo su precipitación, a una concentración de 3 mg de anticuerpo/mg de

proteína. Se incubó la mezcla en un rotor durante toda la noche a 4°C para favorecer la formación de inmunocomplejos. Finalizada la incubación, se centrifugó la mezcla a 15000 rpm durante 3 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante y el pellet obtenido fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de lisis. Esta misma operación se realizó 4 veces, con el fin de eliminar posibles restos de otras proteínas que pudieran interferir en el resultado final. Tras la última aspiración, se añadió 20-30 µl del tampon de muestra en lugar de buffer de lisis, mezclándolo bien con el pellet y calentando las muestras durante 10 minutos a 100°C, lo que nos permite romper la unión del anticuerpo a las bolas de agarosa. Tras una centrifugación adicional se siguió el mismo protocolo que en el western blot, utilizando como anticuerpo primario los anticuerpos anti IP₃R₁ e IP₃R₃.

2.4. Análisis de los niveles de ARNm de los IP3R.

2.4.1. Extracción de ARNm.

La obtención de ARN total se realizó usando una técnica basada en la extracción con fenol/isotiocianato de guanidina y cloroformo (Chomczynski P. & Sacchi N., 1987), con Trizol (Invitrogen).

Las células confluentes y quiescentes se lavaron dos veces con solución de Hank's a 4°C. Seguidamente, se añadió 1ml de la solución de Trizol en la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido este tiempo, se recogió la solución en un tubo de 1,5 ml y se añadió 200 µl de cloroformo. Rápidamente, se agitaron los tubos por inversión durante 15 segundos y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se centrifugaron las muestras a 11000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa. Esta fase se mezcló con 1 mL de isopropanol, con el fin de precipitar el ARN, incubándose 15 minutos a temperatura ambiente tras lo cual se centrifugó la muestra a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1ml de etanol frío al 75%, asegurándose de que se mezclará bien, y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El precipitado obtenido fue resuspendido con agua DEPEC.

La concentración de ARN se determinó en un espectrofotómetro, usando como blanco el agua con DEPEC.

2.4.2. RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*).

Esta técnica permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de ARN (tanto ARNm como ARN total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a ADNc, y posterior amplificación, durante la PCR.

Para el desarrollo de este trabajo se realizaron dos tipos de RT-PCR: la RT-PCR y la RT-PCR a tiempo real. Aunque ambas técnicas tienen el mismo fundamento, la RT-PCR a tiempo real nos permite visualizar la PCR en todo momento y es más sensible que la RT-PCR normal, debido a la utilización de un fluorocromo (SYBR Green I) que es capaz de emitir fluorescencia, previa excitación, cuando se encuentra unido al ADN de doble hélice, unas 1000 veces más que cuando se encuentra sin unirse.

La RT PCR se utilizó para comprobar la especificidad de nuestros cebadores, mientras que la RT PCR a tiempo real se realizó para analizar los cambios en los niveles de ARNm cuando las CML eran tratadas.

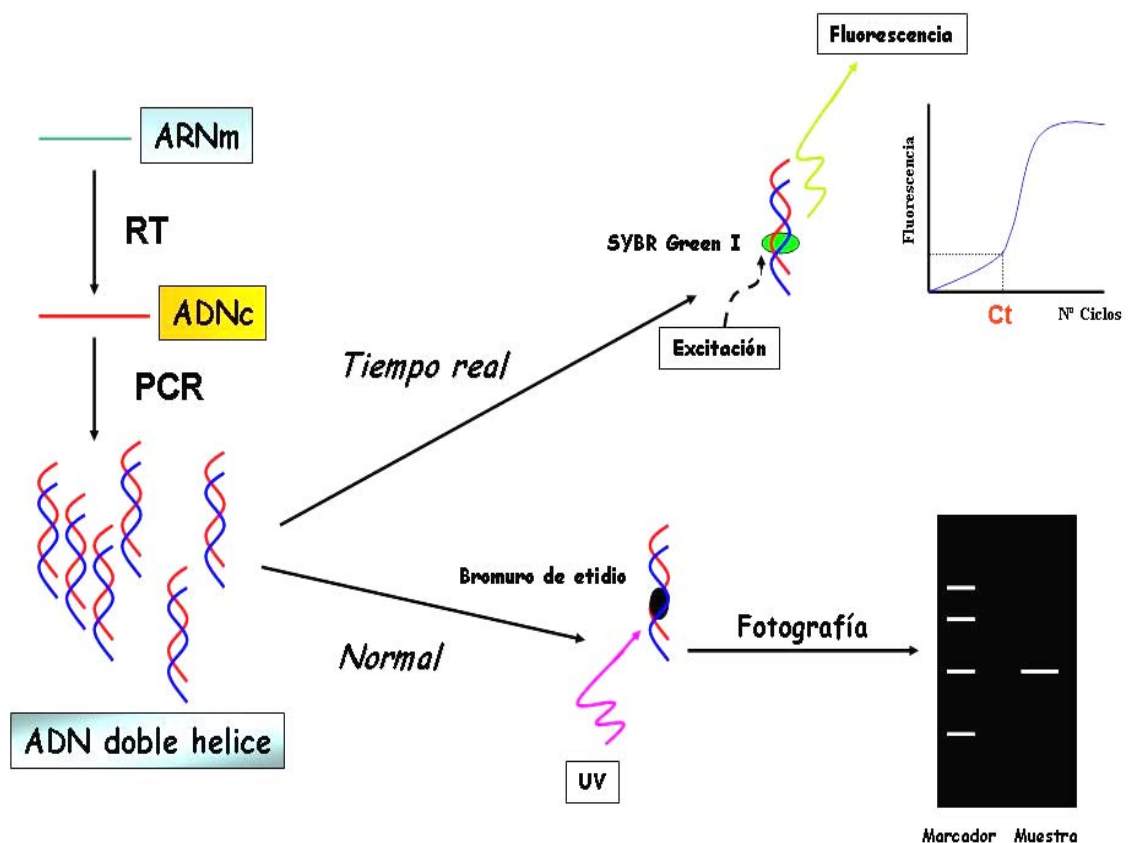


Fig. 14: Esquema de la RT-PCR a tiempo real y normal.

Materiales y Métodos

Para realizar la RT-PCR a tiempo real, una vez determinada la concentración de ARN, resuspendemos la solución para alcanzar una concentración de 75 ng de ARN/ μl de muestra. La prueba se realizó en placas de 96 pocillos. En cada pocillo: 25 μl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) que contiene todos los componentes necesarios para realizar la PCR incluido el SYBR Green I Dye, 2 μl de los cebadores (1 μl del forward y otro del reverse a una concentración 150 μM), 0,25 μl de la enzima RT, 1 μl de ARNasa y por último 1 μl del ARN extraído previamente, a una concentración 75 ng/ μl .

Las condiciones de la reacción se detallan a continuación (Lee B. y cols., 1999):

Fase RT

48 °C —————> 45 minutos

94 °C —————> 2 minutos

Fase PCR: número de ciclos 40.

94 °C —————> 1 minuto (PCR)- Fase de desnaturalización del DNA

55 °C —————> 2 minutos (PCR)- Fase de anillamiento del DNA

72 °C —————> 3 minutos (PCR)- Fase de extensión del DNA

Fase de disociación.

60 °C hasta 95 °C en 20 minutos

Los cebadores usados para llevar a cabo la RT-PCR fueron:

Receptor de IP₃ tipo I (Lee B. y cols., 1999):

Forward	5' GAG AGA AAG CGC ACG CCG AGA GGA G 3'
Reverse	5' GGA CAT AGC TTA AAG AGG CAG TCT C 3'

Receptor de IP₃ tipo III (Lee B. y cols., 1999):

Forward	5' GTC AAA GGC ATC CTG GAG AG 3'
Reverse	5' CAA GTC CAC CAG GGA GAT GT 3'

Receptor de GAPDH (Lee B. y cols., 1999):

Forward	5' CTC CCC ACA CAC ATG CAC TTA 3'
Reverse	5' CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT 3'

Materiales y Métodos

Los resultados representados en al RT-PCR a tiempo real son el cociente entre el ciclo umbral (Ct ó Cycle Threshold) del IP₃R y de su control GAPDH (gen de referencia), que es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. De manera práctica, el Ct es el ciclo en la que la fluorescencia emitida empieza a crecer exponencialmente según aumentan el número de ciclos y es obtenido por el programa utilizado para la RT-PCR a tiempo real.

Para realizar la RT-PCR se utilizó como mezcla de reacción (por tubo): 1 µg de ARN, 1 µL del cebador “reverse” (concentración 150 µM), 1 µL del cebador “forward” (concentración 150 µM) y el kit de RT-PCR (que consta de 1 µL de Taq polimerasa, 1 µL de Transcriptasa inversa (RT), 10 µL de buffer 5X, 5 µL MgSO₄, 1 µL de dNTP y agua libre de ARNasa hasta 50 µL; Promega). Las condiciones de RT-PCR fueron idénticas a las descritas anteriormente siendo el número de ciclos fue de 40. Para visualizar el producto formado durante la PCR, lo que asegura la especificidad de los cebadores, se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 3% (6 gramos de agarosa D-2; 200 mL de TAE y 1,5 µL de bromuro de etidio). Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron los productos mediante un trans-iluminador de luz UV, que permite ver el producto formado gracias al bromuro de etidio que se intercala en el ADN, y se realizó una foto del gel.

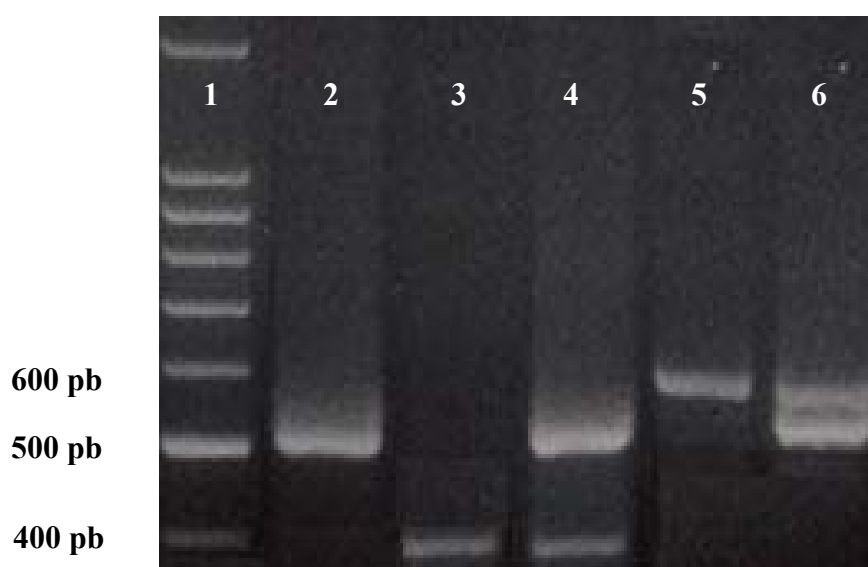


Fig. 15: Ensayo de especificidad de los cebadores utilizados, el producto de la PCR se separó según su tamaño en un gel al 3% de agarosa Carril 1: Marcador de 100 pares de bases (pb) 2: GAPDH (523 pb), 3: IP₃R₁ (420 pb), 4 GAPDH/IP₃R₁, 5: IP₃R₃ (599pb), 6: GAPDH/IP₃R₃.

2.5. Cuantificación de la salida de calcio inducida por IP₃.

Se realizaron ensayos de liberación de Ca⁴⁵, según técnica descrita por Missiaen L. (1995). Esta técnica nos permite determinar los movimientos de calcio debidos exclusivamente a la estimulación de los IP₃R tras la adición de IP₃ a las células previamente permeabilizadas, ya que por su naturaleza hidrofílica, el IP₃ es incapaz de atravesar la membrana plasmática intacta.

En primer lugar las CML fueron permeabilizadas con una solución que contiene saponina (concentración en mM: 120 KCl, 30 imidazol, 2 MgCl₂, 1 ATP, 1 EGTA, pH: 6,8 y saponina 50 µg/µl) durante 10 minutos a 25°C. Finalizada la incubación, se lavaron 2 veces con la solución A (KCl 120 mM, imidazol 30 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 5 mM, EGTA 0,44 mM y NaN₃ 10 mM, pH: 6,8) para eliminar cualquier resto de saponina. Posteriormente las CML fueron cargadas, entre 45 minutos y 1 hora a 25 °C, con la solución A que contiene el Ca⁴⁵ (23 µCu/ml). Terminada la incubación, se lavaron 3 veces con la solución B (120 mM KCl, 30 mM imidazol, 1 mM EGTA, pH=6.8), para permitir la eliminación del exceso de Ca⁴⁵ que no se localice en el interior de los depósitos intracelulares. Tras los lavados, comenzó el experimento recolectando y reemplazando la solución B cada 2 minutos. Una vez transcurridos 10 minutos se añadió una única dosis de IP₃ a una concentración de 5 µM en solución B, continuando recolectando el sobrenadante cada 2 minutos. Finalizado el experimento y para recolectar el calcio remanente de las organelas, las CML fueron incubadas con una solución de SDS al 2% durante 30 minutos.

Las fracciones recolectadas se mezclaron con líquido de centelleo biodegradable (Beckton Dickinson) y se determinaron el número de cuentas por minuto (cpm) en un contador β de radioactividad. Los resultados se expresaron como cpm de Ca⁴⁵ /2 minutos con respecto al total presente en la célula.

2.6. Ensayos de contracción celular.

Una de las funciones principales de las CML es su capacidad de contraerse, lo que induce cambios en su morfología, disminuyendo el área de sección celular (ASC). Basándonos en esta capacidad, se analizó la función contráctil de las CML frente a ANGII en distintas condiciones experimentales. Para analizar estos cambios, se

realizaron microfotografías, usando una cámara digital acoplada al microscopio, y midiendo posteriormente el ASC según técnica descrita por Medina J.(1993)

Para la realización de estos ensayos, 2 días antes del experimento las CML se sembraron a un grado de confluencia bastante bajo para que se pudiera analizar de manera nítida el contorno de al menos 8 células independientes por campo en el momento del ensayo. Tras el tratamiento correspondiente, se lavaron dos veces con tampón glucosa atemperado (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 16,5 mM acetato sódico anhidro, 5 mM D-glucosa y 20 mM de Trizma[®] base, pH=7,45), y se añadió tampón glucosa con CaCl₂ (2,5 mM). Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se buscó un campo en el que estuvieran presentes al menos 8 células. En ese instante se realizó la primera foto (Tiempo 0 minutos) y se adicionó la ANGII (10⁻⁶M), salvo en los controles. Transcurridos 30 minutos, se volvió a realizar otra foto del mismo campo de células (Tiempo 30 minutos).

Para analizar los datos se midió el ASC, sólo de las células cuyo contorno se ve de forma nítida en la fotografía, antes y después del tratamiento con ANGII y se representa la diferencia entre el ASC a tiempo 0, que recibe un valor del 100%, y 30 minutos para cada uno de los tratamientos.

2.7. Producción celular de GMPc.

2.7.1. Extracción de nucleótidos.

Se realizó por extracción etílica, ya que por su naturaleza orgánica del GMPc es soluble en etanol. Una vez acabado el tratamiento correspondiente, se aspiró el medio y se añadió 300 µL de etanol absoluto durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se rasparon los pocillos y se recogió en un eppendorf de 1,5 mL., centrifugándose las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Terminada la centrifugación, se decantó el sobrenadante y, el pellet obtenido fue liofilizado y guardado a -20 °C, para su posterior análisis.

2.7.2. Determinación de los niveles de GMPc.

Se realizó por radioinmunoensayo (RIA), que se basa en la competencia que se establece, para unirse a anticuerpos específicos, entre la sustancia a cuantificar (GMPc) y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo (GMPcI¹²⁵). Al

establecerse esta competición, resulta que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une al anticuerpo y viceversa. El ensayo se realizó según descripción previa del laboratorio (De Frutos S. y cols., 2005).

En primer lugar, se realizó una curva de desplazamiento, para ello se prepararon distintas concentraciones de GMPc frío acetilado (128 fentomoles- 2 fentomoles) que posteriormente fueron incubadas con una cantidad fija de GMPc marcada con I^{125} . Paralelamente, se prepararon las muestras a analizar. El liofilizado previamente obtenido se resuspendió en el buffer RIA, que evita la hidrólisis del GMPc en disolución. Posteriormente se añadió una solución de ácido acético y TEA con el fin de acetilar el GMPc, aumentando así la afinidad del nucleótido por el anticuerpo.

Posteriormente, tanto a las muestras como a la curva de desplazamiento, se les añadió el anticuerpo primario durante 45 minutos a temperatura ambiente que se unirá al GMPc presente en cada tubo de muestra. Seguidamente se adicionó el GMPc marcado radiactivamente con I^{125} durante toda la noche a 4°C , que competirá con el GMPc frío para unirse al anticuerpo. Por último, se añadió el anticuerpo secundario unido a bolas magnéticas, cuyo objetivo es permitir la precipitación del complejo anticuerpo primario-GMPc frío ó marcado, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalizadas las incubaciones, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 15 minutos, recolectando el pellet, que se dejó secar, midiéndose la radiactividad en un contador γ tanto de las muestras como de la curva de desplazamiento. Los datos obtenidos en la muestra fueron extrapolados a la curva, para la determinación de las concentraciones de GMPc presente en la muestra. Estos datos fueron corregidos en función del volumen y de la cantidad de proteínas, expresándose en fentomol de GMPc/miligramos de proteínas.

2.8. Ensayos de transfección y análisis de la actividad del promotor de la GCs.

El primer paso para poder medir la actividad de nuestro promotor fue transfectar las células con el promotor completo, ó sus delecciones (Fig. 16), unido al gen reportador de luciferasa. Además, paralelamente se cotransfectó con el promotor de la *Renilla* que actuó como control de la transfección, ya que sus niveles de expresión no se ven modificados por nuestros tratamientos. La transfección del promotor se realizó

Materiales y Métodos

mediante el método de lipofección que se basa en la facilidad que tiene los liposomas para penetrar la membrana plasmática. Los liposomas son complejos formados por lípidos catiónicos sintéticos (Lipofectamina, Invitrogen) y el ADN (promotor). Para ello, las CML se sembraron en placas de 6 pocillos a una confluencia del 70-80%. Se lavaron dos veces con solución de Hank's, y se añadió 400 μ L de medio de cultivo especial para transfección optiMEM (Gibco). Por otro lado, se prepararon las fase A (49 μ L de optiMEM+1 μ L de lipofectamina / pocillo) y fase B (40 μ L optiMEM + 5 μ L del promotor a una concentración de 0.1 μ g/ mL + 5 μ L del plásmido de la *Renilla* a una concentración de 0.01 μ g /mL). Se añadió la fase A sobre la B y se mezcló bien, dejándola durante 15 minutos a 37°C, para facilitar la formación de los liposomas. A continuación se añadió 100 μ L de la mezcla a cada pocillo incubándose durante 4 horas a 37°C. Seguidamente, se reemplazó el medio de transfección por DMEM con suero bovino fetal al 10% durante 16 horas mínimo, para se recuperaran las células.

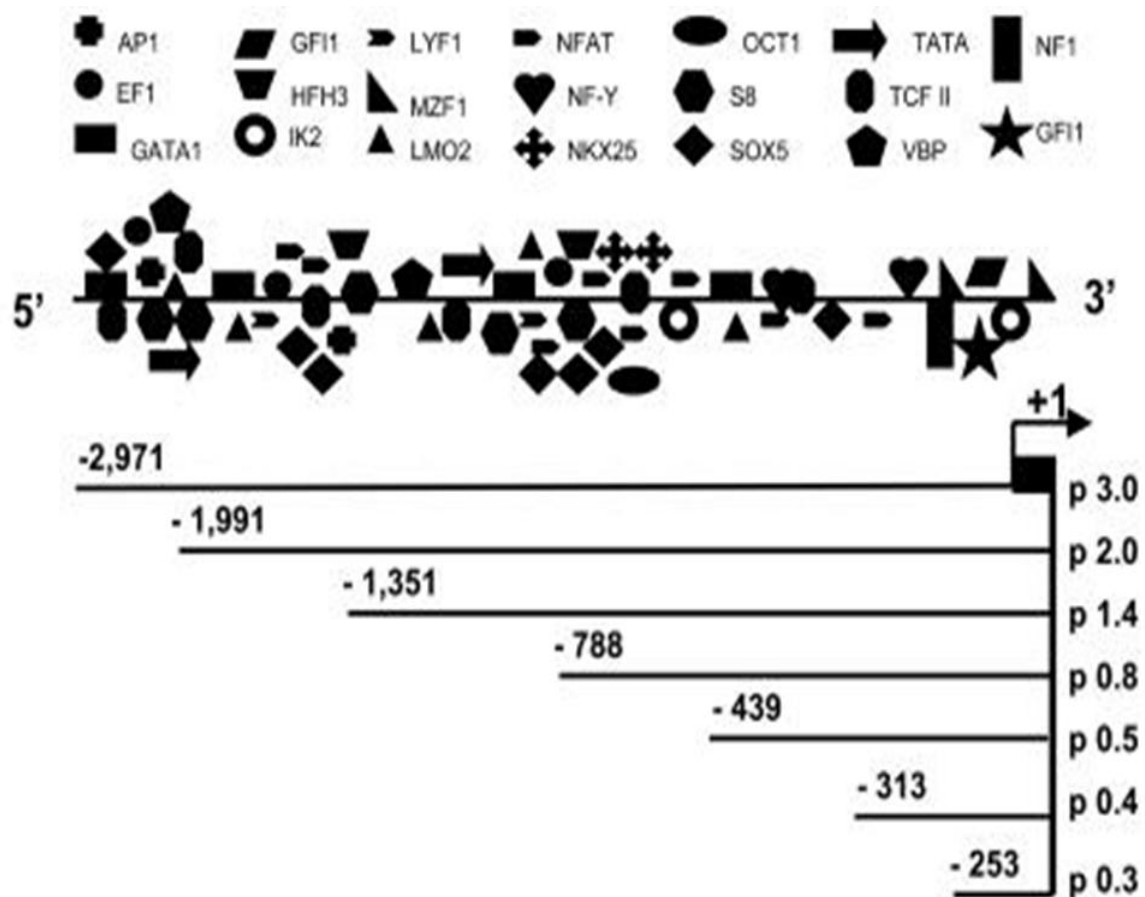


Fig.16: Tamaño del promotor completo de la subunidad $\beta 1$ (p3.0), así como distintas delecciones del mismo. En la parte superior se muestra los distintos factores de transcripción cuya secuencia ha sido localizada en la región promotora. (Sharina IG. y cols., 2003).

Como ya se ha indicado anteriormente, el promotor de la isoforma $\beta 1$ de la GCs se encuentra unido al gen de la luciferasa, que actúa de reportero, de forma que si en las condiciones experimentales seleccionadas se modificará la actividad del promotor esto se reflejaría en cambios en la actividad de la luciferasa, que es fácilmente cuantificable por quimioluminiscencia. Para analizar la actividad de la luciferasa se siguió la técnica descrita por Sherf BA. (1996), que permite detectar tanto la actividad de la luciferasa de forma independiente de la de la *Renilla*. Para ello una vez finalizados los tratamientos, las placas se lavaron con PBS a 4°C, dos veces, y se incubaron con 250 μ L del buffer de lisis (Passive Buffer Lysis, Promega) durante 30 minutos a 4°C. A continuación se rasparon los pocillos y se recogió la suspensión en tubos de 1,5 mL. Tras una centrifugación a 11000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante. 10 μ L del sobrenadante se mezclaron con 50 μ L del reactivo LAR[®] (Promega) leyéndose la actividad de la luciferasa, posteriormente se añadió 50 μ L del reactivo STOP AND GO[®] (Promega), que permitió medir la actividad de la *Renilla*. Los parámetros de lectura que se usó en todos los experimentos fueron de 5 segundos de retardo y 10 segundos de lectura de las actividades. Los resultados se expresaron como el cociente entre la actividad de la luciferasa y la de la *Renilla*.

3. Métodos in vivo.

3.1. Mediciones de tensiones arteriales.

Se realizó mediante una técnica no invasiva. Para ello se utilizó un esfigmomanómetro de cola (Modelo 5007, Panlab), que nos permitió la medida de las presiones sistólicas y diastólicas de los roedores.

Los animales despiertos se inmovilizaron mediante el uso de un cepo. Posteriormente, se dejaron en reposo durante 15 minutos en oscuridad y en ausencia de ruido a 32 °C. Una vez estabilizados, se realizó la medición de las tensiones arteriales sistólicas (TAS) y diastólicas (TAD), así como el número de pulsaciones por minuto (PPM). Se realizaron distintas mediciones durante 3 días consecutivos y a la misma hora. La media representada corresponde a la del último día de medición.

3.2. Extracción de proteínas a partir del tejido cardiaco.

Una vez sacrificados los ratones tras el tratamiento, se aisló el corazón del animal. Seguidamente, con cuidado, se lavó bien con solución de Hank's estéril para eliminar la sangre, y se troceó con unas microtijeras almacenándose en nitrógeno líquido hasta su posterior procesamiento para la extracción de proteínas que se realizó utilizándose el mismo tampón de lisis que para la extracción de proteínas en células. Para favorecer la disgregación del tejido y mejorar el rendimiento nos ayudamos de un homogenizador (Ultra Turrax T25, IkarLabortechnik). Se dejó en reposo durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó el homogenizado a 11000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se determinaron las proteínas por Lowry. Si la concentración de proteínas obtenidas fue superior al límite superior de la curva patrón, las muestras se diluyeron en buffer lisis hasta que su concentración entró en los límites de la curva.

3.3. Análisis bioquímico de la orina y el plasma.

Se analizó la orina obtenida de 24 horas. Para ello los animales se alojaron de forma individual en jaulas metabólicas, que por su morfología permiten recolectar la orina de forma independiente a las heces. La orina obtenida se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. En el sobrenadante obtenido se analizó los distintos parámetros bioquímicos, en concreto los niveles de proteínas, creatinina y Na⁺.

Posteriormente los ratones fueron sacrificados por exanguinación, recogiendo la sangre en tubos con heparina y manteniéndose en todo momento a 4°C. Se separó el plasma de la sangre por centrifugación de la muestra a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez obtenido el plasma se realizaron las mediciones de creatinina y sodio en plasma.

A continuación se analizó la función renal de los ratones utilizando como parámetros de la misma el aclaramiento renal de creatinina, la excreción fraccional de sodio y la proteinuria.

$$\text{Aclaramiento renal de creatinina} = \frac{\text{Creatinina en orina} \times \text{Diuresis}}{\text{Creatinina en plasma}}$$

$$\text{Excreción fraccional de sodio} = \frac{[\text{Na}^+]_{\text{orina}} \times \text{Creatinina en plasma}}{[\text{Na}^+]_{\text{plasma}} \times \text{Creatinina en orina}}$$

4. Análisis estadístico.

Todos los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media ($x \pm$ e.e.m.) y en cada figura se muestra el número de datos independientes considerados (n), que fue siempre superior a cinco. En los experimentos con $n \geq 10$, se evaluó en primer lugar la normalidad de la distribución de valores (Kolmogorov-Smirnov). En caso de confirmarse la normalidad, se utilizará técnicas estadísticas paramétricas, a saber:

- 1) Comparación de 2 grupos de valores: t de Student para datos pareados ó no pareados (en función de la existencia o no de una relación entre los valores obtenidos).
- 2) Comparación de más de 2 grupos de valores: ANOVA, para datos relacionados ó no, seguido de una prueba de comparación múltiple de medias.

En los experimentos con $n < 10$, y en los que no siguiera una distribución normal, se utilizará pruebas no paramétricas, a saber:

- 1) Comparación de 2 grupos de valores: prueba de Wilcoxon (datos pareados) ó de Mann-Whitney (datos no pareados).
- 2) Comparación de más de 2 grupos de valores: prueba de Friedman (datos pareados) ó de Kruskal-Wallis (datos no pareados), seguido de una prueba de comparación múltiple de medias.

OBJETIVOS

Objetivos

Como ya se ha explicado los MADO son generados de forma fisiológica en el interior celular, principalmente en la mitocondria durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria. Por otro lado, las células tienen diferentes mecanismos antioxidantes que eliminan de forma rápida los MADO generados. No obstante, a pesar de que la semivida de los MADO es corta, regulan diferentes procesos celulares, deletéreos ó no. Así, nuestro grupo ha comprobado que el H_2O_2 es esencial en la contracción celular inducida por ANGII, también demostró que el H_2O_2 es capaz por si mismo de inducir la contracción celular a través de diferentes mediadores tales como el tromboxano A_2 . Otros trabajos han demostrado como el H_2O_2 regula los procesos de proliferación, migración y apoptosis. Por contra los MADO, en ciertas situaciones, contribuyen a la progresión y desarrollo de ciertas patologías como es la arteriosclerosis, donde se ha comprobado que la generación de estas sustancias juegan un papel esencial mediante la disfunción endotelial, proliferación y apoptosis de las CML, que son esenciales para la instauración y la progresión de la enfermedad. Otros estudios han demostrado una relación entre el incremento de los MADO y la hipertensión, así como en la hiperplasia cardiaca.

A pesar de que existen diversos estudios para analizar el papel del H_2O_2 en la contracción-relajación celular, existen pocos trabajos que contemplen la participación del H_2O_2 en determinados aspectos de este proceso, más allá de la fases híncales del mismo. Para profundizar en el conocimiento del papel regulador del H_2O_2 en el mecanismo de contracción-relajación, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar la regulación del receptor de IP_3 (IP_3R) por H_2O_2 , analizándose los cambios a nivel proteico y funcional de dicho receptor en CML incubadas con H_2O_2 , así como los mecanismos implicados.

2. Estudiar la regulación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) por H_2O_2 , analizándose los cambios a nivel proteico y funcional de dicha enzima en CML incubadas con H_2O_2 , así como los mecanismos implicados.

3. Estudiar el papel del H₂O₂ en un modelo de hipertensión inducida por L-NAME, analizando, en ratones que sobreexpresan catalasa, la modificación de la tensión arterial, así como los cambios en la función renal y en el daño oxidativo.

RESULTADOS

PARTE I

1. Efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre el receptor de IP₃ tipo I (IP₃R₁) y el tipo III (IP₃R₃) en CML.

Con el objetivo de demostrar una posible regulación del IP₃R₁ y el IP₃R₃ en CML, por el H₂O₂ se trataron estas células con este compuesto, y se midieron los niveles de ambos receptores mediante western blot.

El contenido celular del IP₃R₁ e IP₃R₃ disminuyó de manera dosis y tiempo dependiente (Fig.1 y 2), alcanzando su máximo efecto a las 6 horas de tratamiento y a una dosis de 10⁻⁴M.

Para analizar las consecuencias funcionales de esta disminución de los IP₃R tras el tratamiento con H₂O₂, se midió en primer lugar la liberación de Ca⁴⁵ estimulada por IP₃. Los resultados obtenidos nos muestran una disminución, aproximadamente de un 50%, en la liberación de calcio por IP₃ (Fig.3) en CML preincubadas con H₂O₂ durante 6 horas con respecto al control. Con el fin de confirmar los resultados, se utilizó la angiotensina II (ANGII) como control positivo, ya que también induce disminución en el contenido celular de los IP₃R, observándose una inhibición aún más marcada que con H₂O₂ en la liberación de calcio inducida por IP₃ en CML incubadas con ANGIO durante 6 horas (10⁻⁶M) (Fig. 3).

Por otro lado, una de las acciones principales del aumento de calcio en el citosol de las CML, es la contracción celular. Por lo tanto, una disminución en la liberación de calcio debería ir acompañada con una disminución en la contracción. Su estudio se realizó analizando las variaciones en el área de sección celular (ASC) tras la incubación con ANGIO en CML preincubadas con H₂O₂. Los resultados (Fig. 4) nos muestran una disminución en la contracción celular mediada por ANGIO (10⁻⁶M) en CML preincubadas con H₂O₂ durante 6 horas a una dosis de 10⁻⁴M con respecto a CML incubadas sólo con ANGIO.

2. Mecanismo implicado en la disminución de los niveles de los IP₃R.

Para estudiar la posibilidad de que los cambios en la cantidad celular de los IP₃R fueran la consecuencia de modificaciones en la expresión de su ARNm, se analizaron

los cambios que tenían lugar en el contenido celular del mismo tras el tratamiento con H_2O_2 ($10^{-4}M$), a tiempos variables en CML. En los niveles de expresión tanto del IP_3R_1 como del IP_3R_3 evaluados mediante la RT-PCR semicuantitativa a tiempo real no se observaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas (Fig. 5). Descartada la implicación de los mecanismos transcripcionales, se analizó el papel de los mecanismos post transcripcionales en la disminución observada. Es bien conocido el papel del proteasoma en la disminución de los niveles de IP_3R en diversos tipos celulares. Para estudiar el efecto del proteasoma en la disminución de los IP_3R_1 e IP_3R_3 por H_2O_2 , se utilizó un inhibidor farmacológico de la actividad del proteasoma, el MG132. Los resultados nos muestran una reversión en la disminución del IP_3R cuando las CML eran preincubadas con MG132 (Fig. 6).

Como la ubiquitinización es requisito fundamental para que una proteína pueda ser degradada por el proteasoma 26S. Se evaluó la ubiquitinización del IP_3R_1 e IP_3R_3 en presencia de una inhibición de la actividad del proteasoma. Los resultados obtenidos nos muestran que no existe un aumento en la ubiquitinización del IP_3R tras el tratamiento de las CML con H_2O_2 (Fig. 7).

3. Papel de los MADO en la disminución del IP_3R inducida por ANGII.

Para analizar el papel del H_2O_2 en la degradación del IP_3R por ANGII, se incubaron las CML transfectadas con catalasa, con ANGII a diferentes tiempos. Los resultados muestran una reversión completa en la disminución del contenido del IP_3R inducida por ANGII en CML transfectadas con catalasa con respecto a sus controles a tiempos cortos de incubación, desapareciendo a las 8 horas de tratamiento (Fig. 8).

Con el objetivo de confirmar que los MADO no intervienen en la degradación del IP_3R inducida por ANGII a tiempos largos de incubación, se preincubaron las CML con diferentes agentes antioxidantes como el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, DPI ($10^{-6}M$, 10 minutos), ó el mimético de la glutatión peroxidasa, Ebselen ($10^{-6}M$, 30 minutos), y posteriormente se trataron con ANGII ($10^{-6}M$) durante 8 horas. Los resultados (Fig. 9) nos muestran que ambas sustancias no revirtieron la disminución de los IP_3R inducida por ANGII.

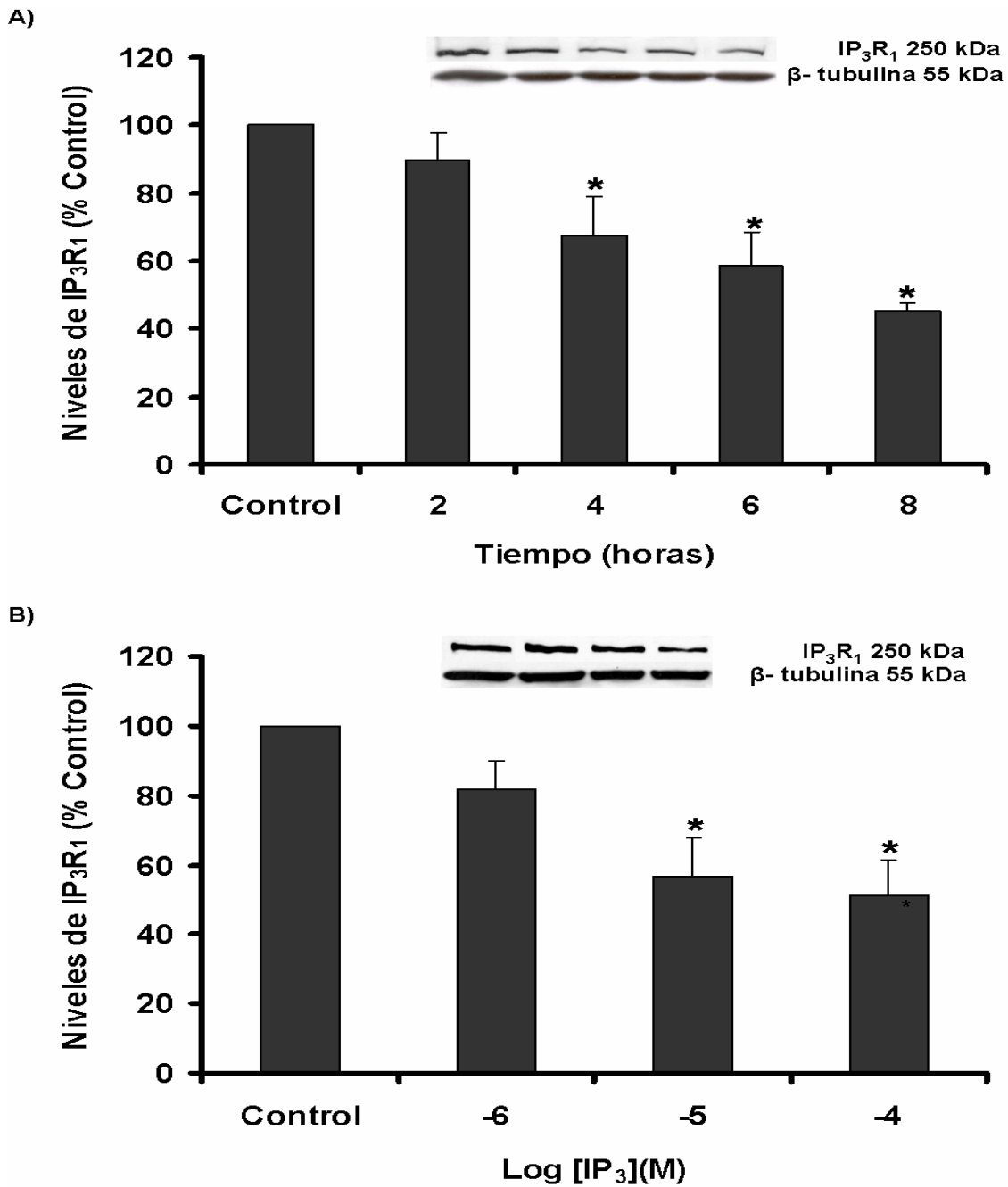


Fig.1: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre los niveles de los receptores de inositol trifostato tipo I (IP_3R_1). A) Niveles de IP_3R_1 en células musculares lisas incubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante tiempos variables. B) Niveles de IP_3R_1 en células musculares lisas incubadas con H_2O_2 , durante 6 horas a concentraciones variables. En la parte superior del panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar, del análisis densitométrico (IP_3R_1/β tubulina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

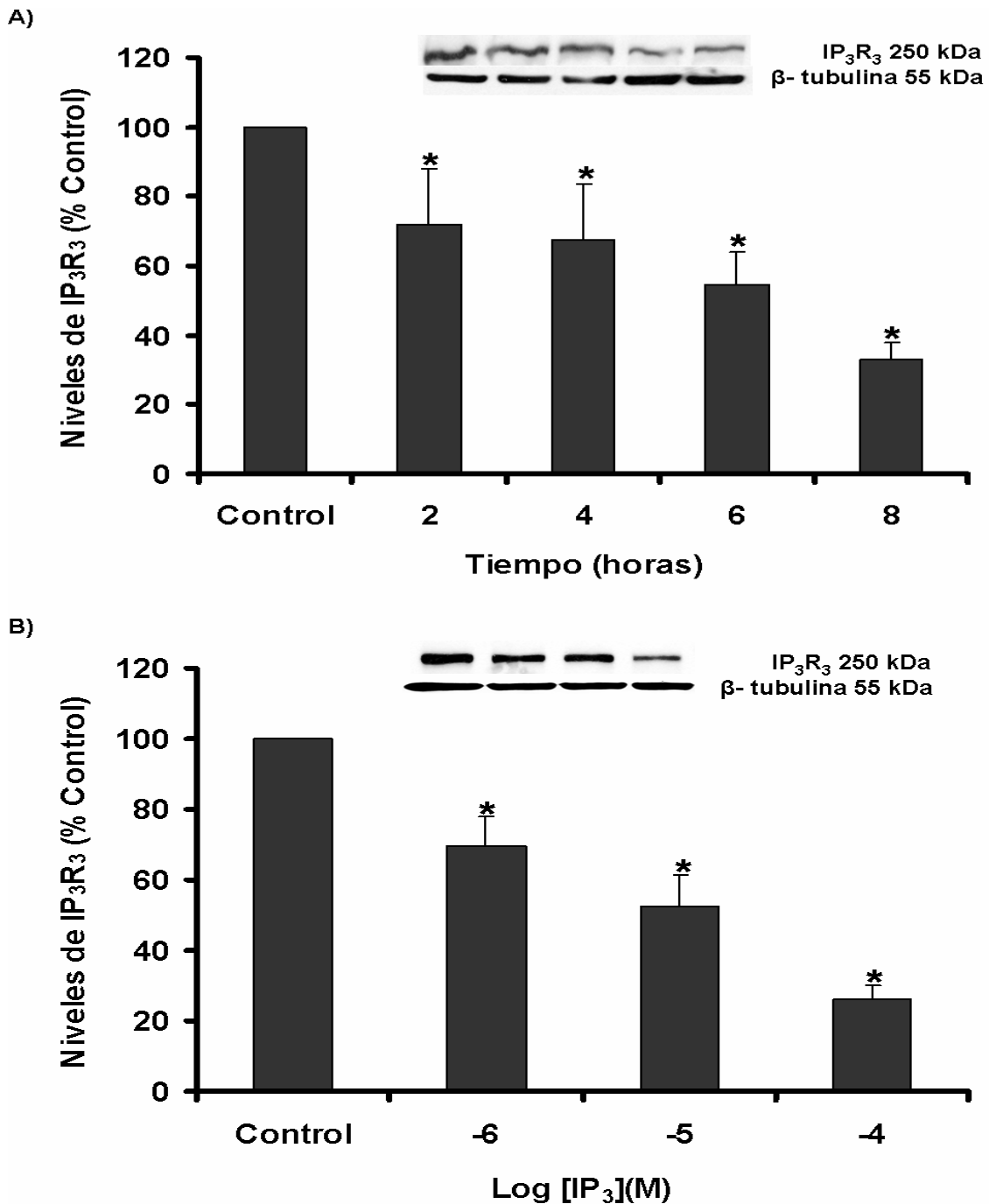


Fig.2: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre los niveles de los receptores de inositol trifostato tipo III (IP_3R_3). A) Niveles de IP_3R_3 en células musculares lisas incubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante tiempos variables. B) Niveles de IP_3R_3 en células musculares lisas incubadas con H_2O_2 durante 6 horas a concentraciones variables. En la parte superior de cada panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar, del análisis densitométrico (IP_3R_1/β tubulina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

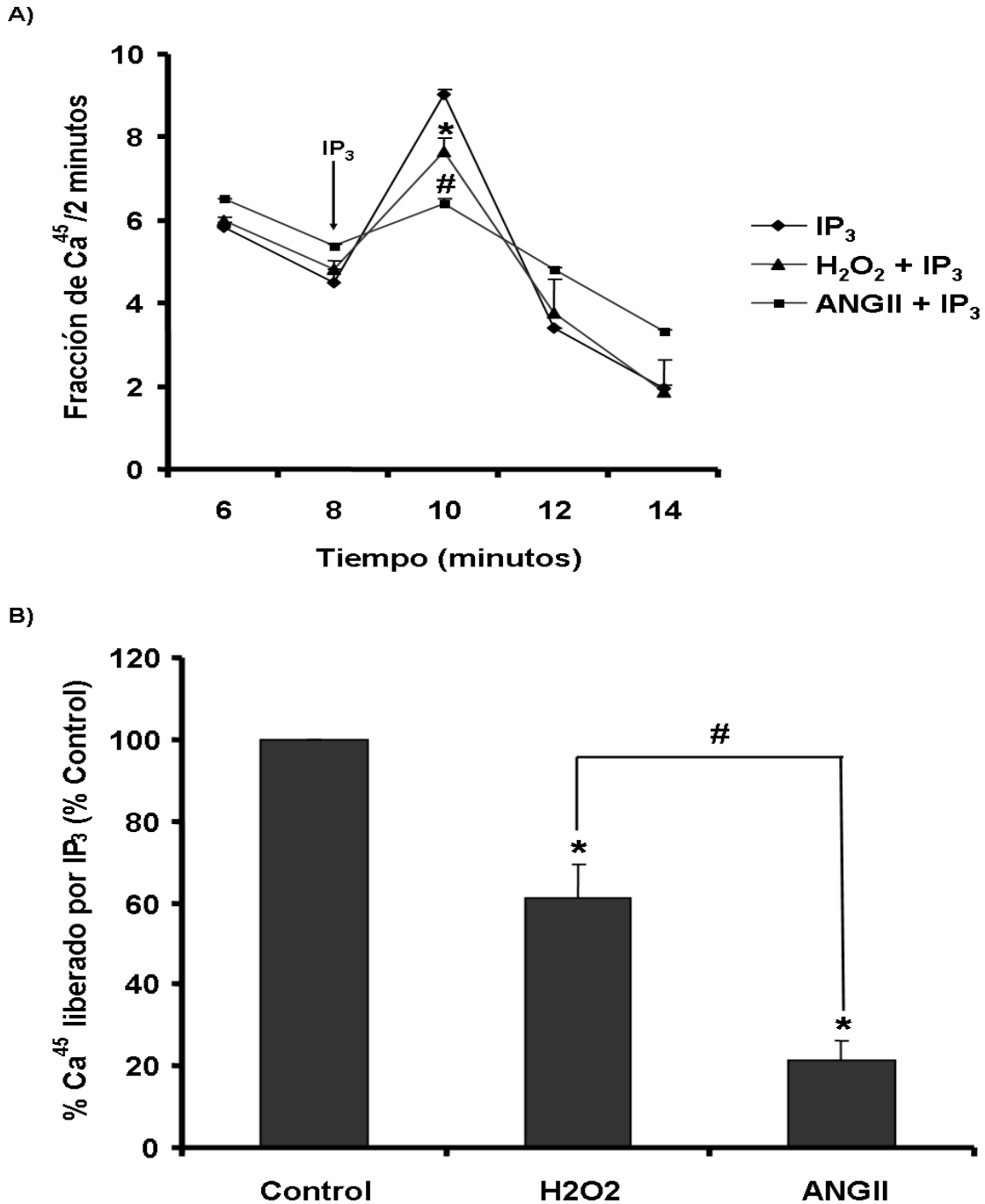


Fig. 3: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la liberación de calcio mediada por inositol trifosfato (IP_3) en las células musculares lisas (CML). Las CML fueron preincubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$ y 6 horas) ó con ANG II ($10^{-6}M$ y 6 horas) y posteriormente tratadas con IP_3 ($5 \mu M$), analizándose la liberación de calcio⁴⁵. En el panel A) se muestra un experimento típico, representándose la fracción de Ca^{45} liberado con respecto al calcio total presente en ese momento en el interior celular. En el panel B) se representa la media \pm error estándar de la liberación de calcio a los dos minutos de adición del IP_3 de tres experimentos independientes y expresados con respecto al control. (* $p < 0.05$ vs Control y # $p < 0.05$ vs CML preincubadas con H_2O_2).

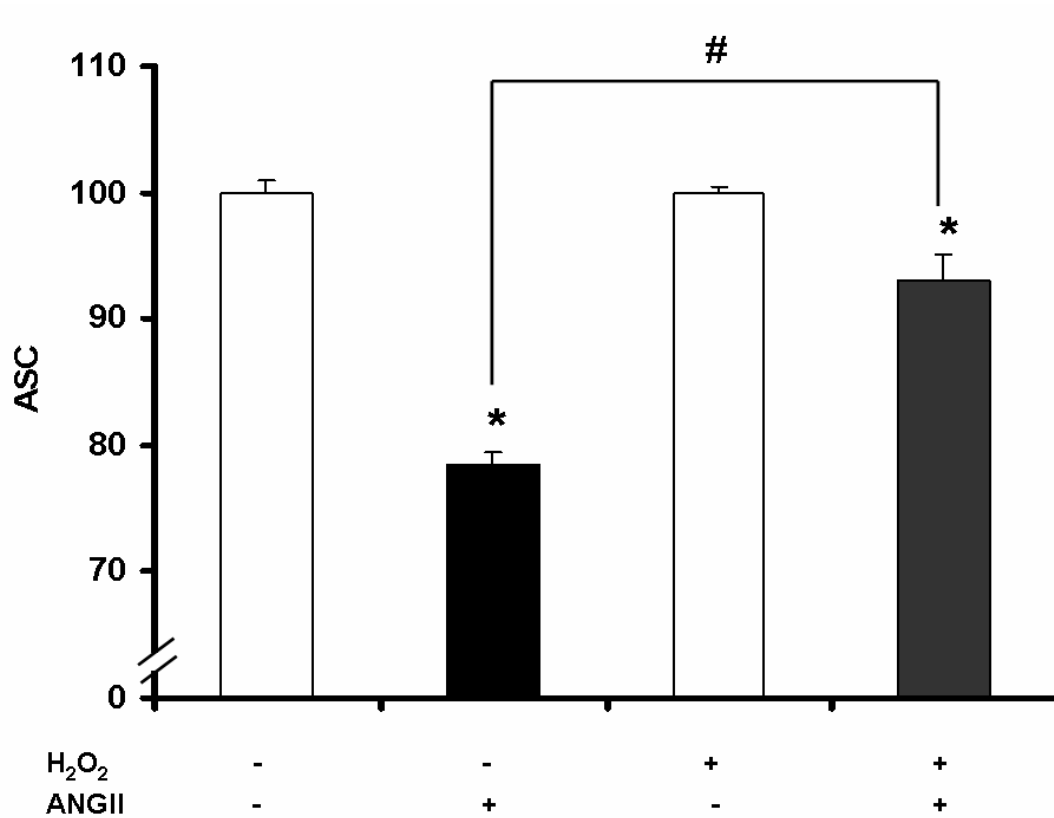


Fig. 4: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la contracción celular mediada por angiotensina II (ANGII) en células musculares lisas (CML). Las CML fueron preincubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante 6 horas y posteriormente tratadas con ANG II ($10^{-6}M$) durante 30 minutos (barras en negro). Se realizaron microfotografías a tiempos 0 y 30 minutos de incubación con ANGII, y se analizó el área de sección celular (ASC). Se representa la media \pm error estándar de la variación del ASC de 4 experimentos independientes. (* $p < 0.05$ vs Control y # $p < 0.05$ vs CML tratadas con ANGII).

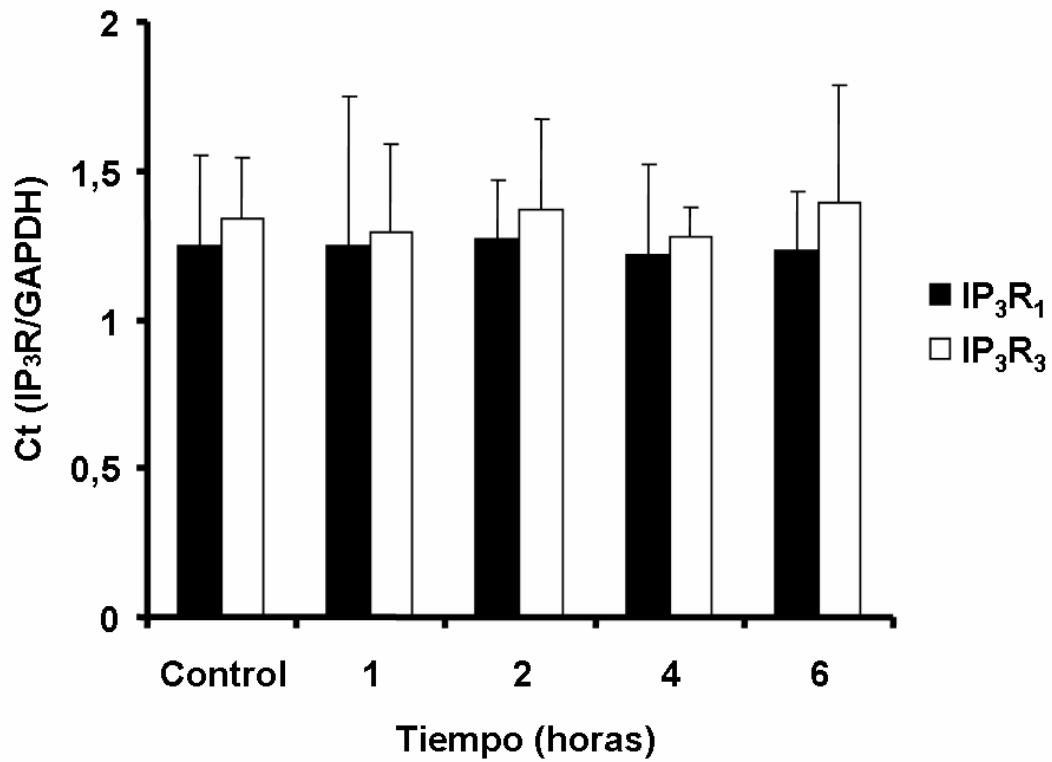


Fig. 5: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre los niveles de ARNm del receptor de IP_3 tipo I (IP_3R_1) y tipo III (IP_3R_3) en células musculares lisas (CML). Las CML fueron incubadas con H_2O_2 , ($10^{-4}M$) a diversos tiempos y se analizó los niveles de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real. En la figura se representa la media \pm error estándar del cociente del número de ciclos umbral (Ct) de IP_3R_1 ó IP_3R_3 con respecto a los de la GAPDH de 3 experimentos independientes.

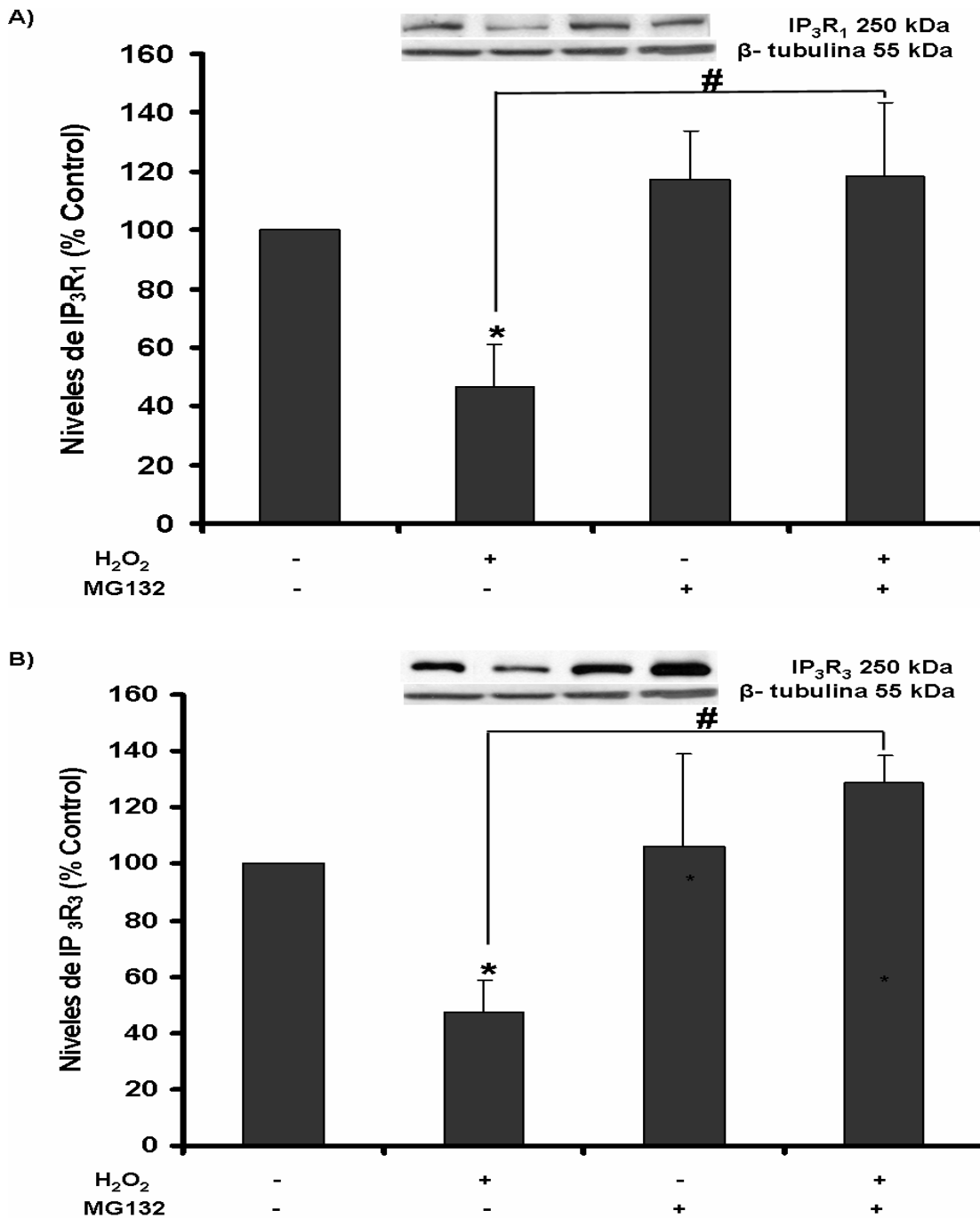


Fig.6: Efecto de la actividad del proteasoma sobre la disminución de los niveles de los receptores de inositol trifostato (IP₃) tipo I (IP₃R₁) y III (IP₃R₃) mediada por peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las células musculares lisas (CML) fueron preincubadas el inhibidor farmacológico del proteasoma MG132 (10⁻⁶M) durante 90 minutos, posteriormente tratadas con H₂O₂ durante 6 horas (10⁻⁴M). A) Niveles de IP₃R₁. B) Niveles de IP₃R₃. En la parte superior de cada panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media ± error estándar de la media del análisis densitométrico (IP₃R₁/α tubulina ó IP₃R₃/α tubulina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (*p < 0.05 vs Control y #p < 0.05 vs CML tratadas con H₂O₂).

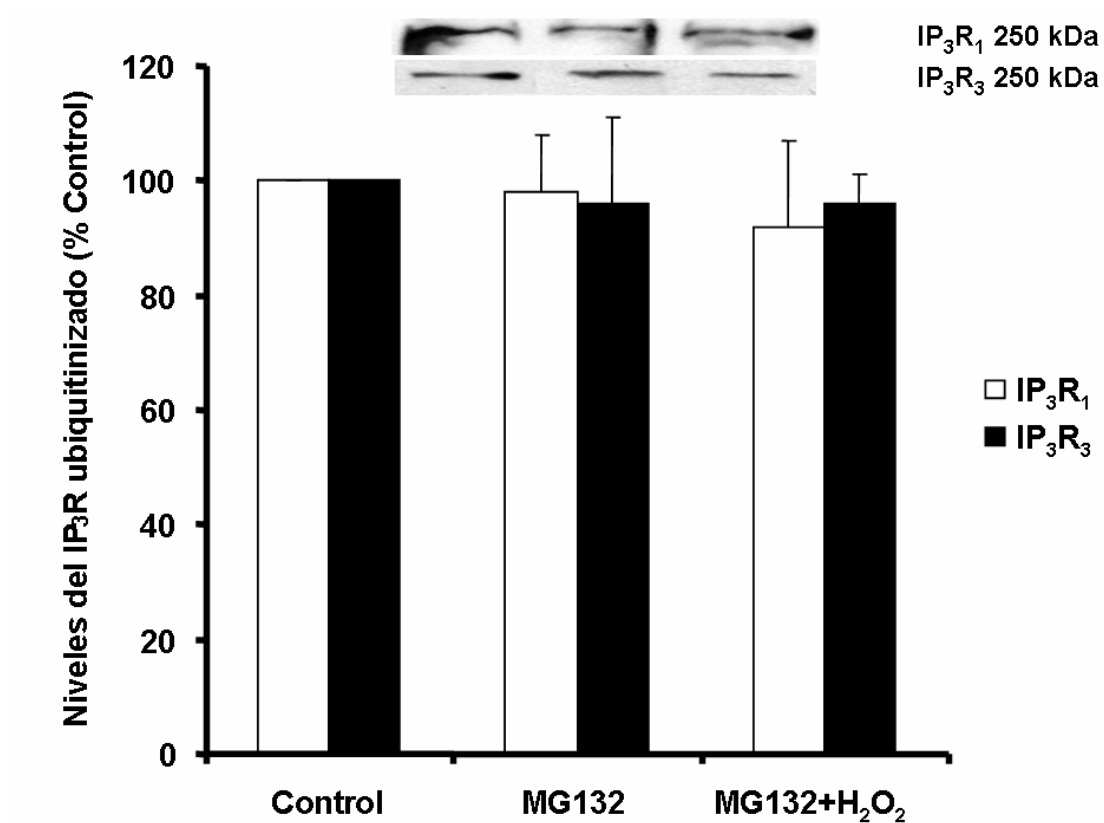


Fig. 7: Cambios en la ubiquitinización del receptor de IP₃ tipo I (IP₃R₁) y III (IP₃R₃) inducida por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en las células musculares lisas (CML). Las CML, preincubadas con MG (10⁻⁶M) ó con el vehículo, fueron tratadas con H₂O₂ (10⁻⁴M) durante 6 horas. Ambos tipos de receptores fueron inmunoprecipitados con anti ubiquitina (3 µg/ mg de proteína) y posteriormente se analizó os niveles del IP₃R₁ e IP₃R₃. En la parte superior un experimento de Western Blot representativo para cada tipo de receptor, mientras que en la parte inferior se representa la media ± error estándar del análisis densitométrico de 3 experimento independientes y expresados como % del control.

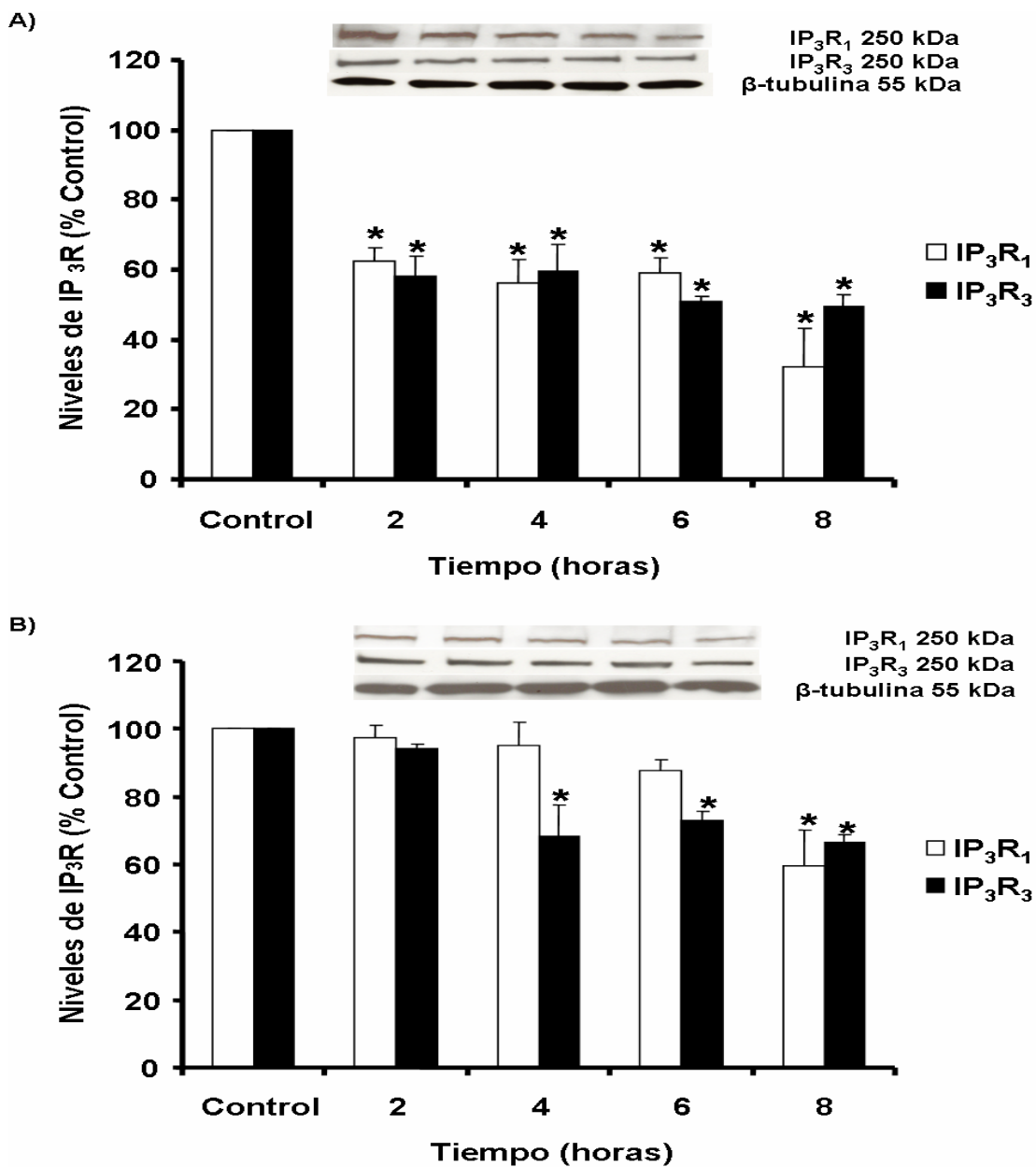


Fig. 8: Papel del peróxido de hidrógeno en la disminución de los receptores de IP₃ tipo I (IP₃R₁) y tipo III (IP₃R₃) inducido por angiotensina II, en las células musculares (CML). Se utilizaron dos líneas de CML, unas transfectadas con catalasa (2C2) y otra con el vector vacío (VEC4). Las células fueron incubadas con ANGII a distintos tiempos y se analizaron los niveles de los IP₃R₁ e IP₃R₃ por western blotting. A) Niveles de IP₃R₁ e IP₃R₃ en VEC4 incubadas con ANGII (10⁻⁶M) durante tiempos variables. B) Niveles de IP₃R₁ e IP₃R₃ en 2C2 incubadas con ANGII (10⁻⁶M) durante tiempos variables. En la parte superior de cada panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media ± error estándar, de la media del análisis densitométrico (IP₃R₁/β tubulina ó IP₃R₃/β tubulina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (*p < 0.05 vs Control).

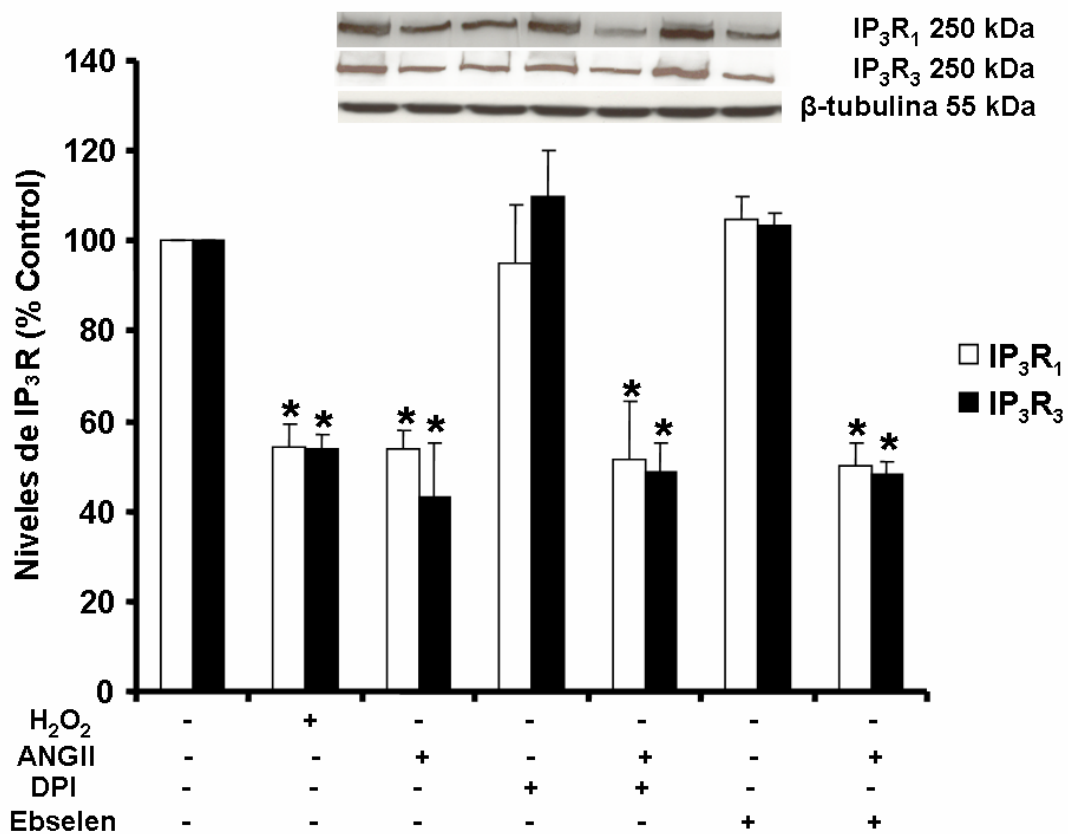


Fig. 9: Papel de los metabolitos derivados del oxígeno en la disminución de los receptores tipo I (IP_3R_1) y tipo III (IP_3R_3) inducido por angiotensina II (ANGII) en células musculares lisas (CML) Las CML fueron preincubadas con el DPI ($10^{-6}M$, 10 minutos) y con Ebselen ($10^{-6}M$, 10 minutos), ambos inhibidores de la NADPH oxidasa, posteriormente tratadas con ANGII ($10^{-6}M$, 6 horas) ó con H_2O_2 ($10^{-4}M$, 6 horas). En la parte superior del panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar del análisis densitométrico (IP_3R_1/β tubulina ó IP_3R_3/β tubulina), de 3 experimentos independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

PARTE II

1. Efecto del H₂O₂ sobre la GCs en CML.

Se analizaron los niveles de la subunidad $\alpha 1$ y $\beta 1$ en CML tratadas con H₂O₂ a concentraciones y tiempos variables, mediante western blot. La cantidad intracelular de la subunidad $\beta 1$ de la GCs aumentó en las CML tratadas con H₂O₂ con respecto a los controles de forma tiempo (Fig. 10) y dosis (Fig. 11) dependiente, alcanzándose el máximo de aumento a un tiempo de 4 horas de tratamiento (10⁻⁴M) y recuperándose a las 8 horas de tratamiento. En contra, la subunidad $\alpha 1$ no presentó cambios estadísticamente significativos.

Para estudiar los cambios en la actividad de la GCs, se analizaron los niveles de GMPc, mediante radioinmunoensayo, en condiciones basales y tras la estimulación con óxido nítrico, en CML preincubadas con H₂O₂. Los resultados nos muestran un aumento en la producción de GMPc en las CML preincubadas con H₂O₂ (10⁻⁴M) durante 4 horas y estimuladas con NO con respecto a sus controles (Fig. 12). Estos estudios fueron completados con la determinación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) en CML preincubadas con H₂O₂ y estimuladas con NO, en forma de nitroprusiato sódico (SNP). Los resultados nos muestran un aumento en los niveles de VASP en las CML tratadas con H₂O₂ alcanzándose el máximo a las 4 horas de tratamiento con H₂O₂ (10⁻⁴M) y revirtiéndose cuando las CML se trataron durante 10 minutos (10⁻⁴M) con un inhibidor de la GCs, el ODQ (Fig. 13).

2. Mecanismo implicado en el aumento de la cantidad de la subunidad $\beta 1$ de la GCs por H₂O₂ en CML.

Para tratar de explicar el incremento producido por el H₂O₂ sobre la GCs, se analizaron los cambios en la expresión del gen de la subunidad $\beta 1$ de la GCs en CML preincubadas con H₂O₂ (10⁻⁴M) durante 2 horas, mediante ensayos de la actividad luciferasa. Para ello se utilizaron tanto la secuencia del promotor completa, así como distintas deleciones del mismo. Los resultados obtenidos demuestran que no existen cambios en la expresión del gen cuando las CML fueron tratadas con H₂O₂ con respecto a sus controles (Fig. 14).

3. Efecto H₂O₂ sobre los niveles de la proteína quinasa G Iβ (PKG Iβ) en CML.

Como ya se ha explicado en la Introducción, la activación de PKG por GMPc es fundamental en el proceso de relajación mediado por NO. Con el objetivo de estudiar si el H₂O₂ era capaz de actuar a diferentes niveles en el mecanismo de relajación inducido por NO, se analizaron los niveles de la PKG Iβ en CML incubadas con H₂O₂ (10⁻⁴M), a tiempos variables. Este estudio se realizó mediante Western blot. Los resultados muestran un aumento de la PKG Iβ en las CML tratadas con H₂O₂ con respecto al control, siendo estadísticamente significativo a las 2 horas del tratamiento y alcanzándose el máximo a las 8 horas de tratamiento (Fig.15).

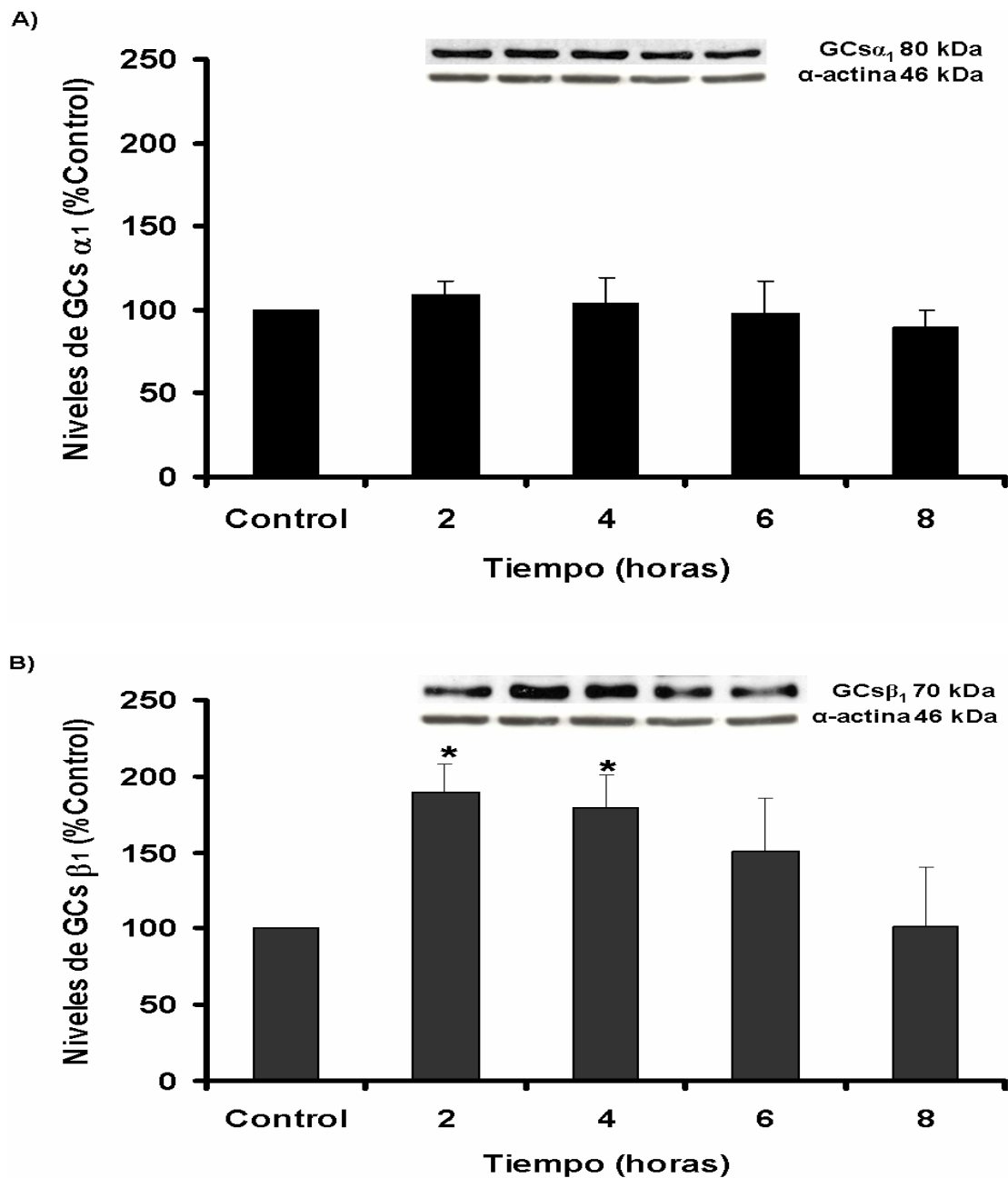


Fig.10: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre los niveles de las subunidades α_1 y β_1 de la guanilato ciclasa soluble (GCs) en células musculares lisas (CML). A) Niveles de la subunidad α_1 de la GCs en CML incubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante tiempos variables. B) Niveles de la subunidad β_1 de la GCs en CML incubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante tiempos variables. En la parte superior de cada panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar, de la media del análisis densitométrico ($GCs\alpha_1/\alpha$ -actina ó $GCs\beta_1/\alpha$ -actina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

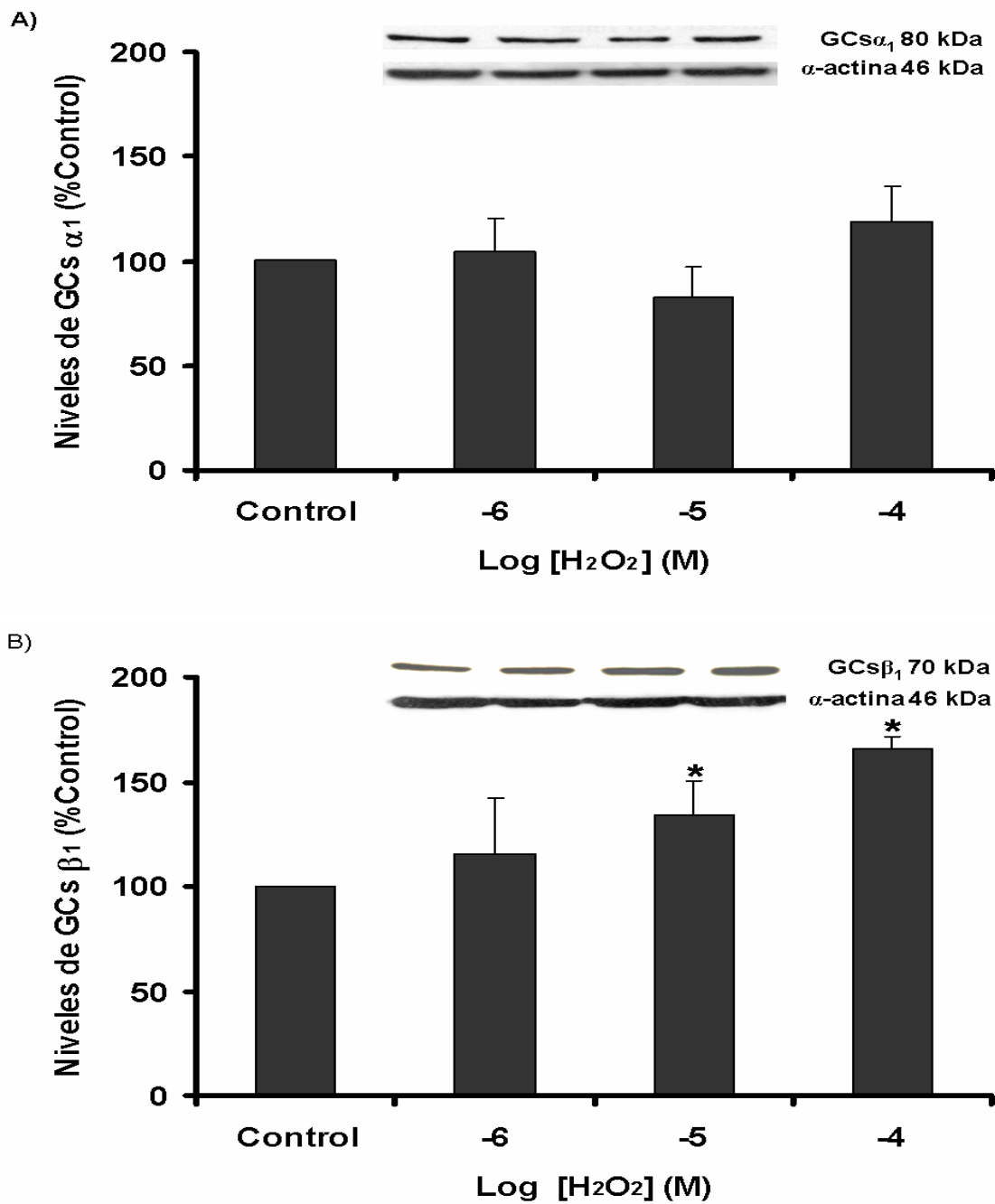


Fig. 11: Efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre los niveles de las subunidades α1 y β1 de la guanilato ciclasa soluble (GCs) en células musculares lisas (CML). A) Niveles de la subunidad α1 de la GCs (GCsα₁) en células musculares lisas incubadas con H₂O₂ durante 4 horas a concentraciones variables. B) Niveles de la subunidad β1 de la GCs (GCsβ₁) en células musculares lisas incubadas con H₂O₂ durante 4 horas a concentraciones variables. En la parte superior de cada panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media ± error estándar, de la media del análisis densitométrico (GCsα₁/α-actina ó GCsβ₁/α-actina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (*p < 0.05 vs Control).

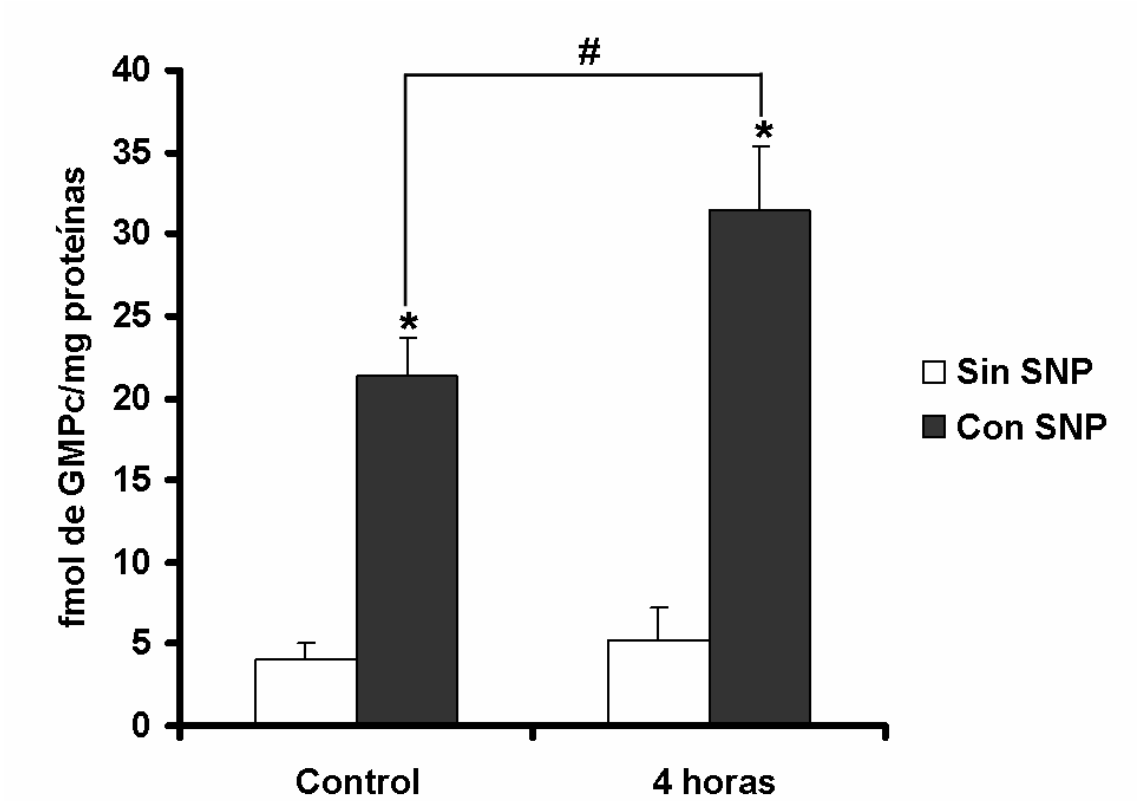


Fig. 12: Producción de GMPc en células musculares lisas (CML) incubadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las CML fueron tratadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante 4 horas, y posteriormente se adicionó IBMX ($10^{-4}M$) durante 30 minutos. A continuación se incubaron con nitroprusiato sódico (SNP) ($10^{-6}M$, en negro) ó con el vehículo (en blanco) durante 15 minutos. Finalizado la última incubación, se midieron los niveles del GMPc. Los resultados se expresan como la cantidad de GMPc generado por microgramo de proteína, y se representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs Control sin SNP, # $p < 0.05$ vs Control con SNP).

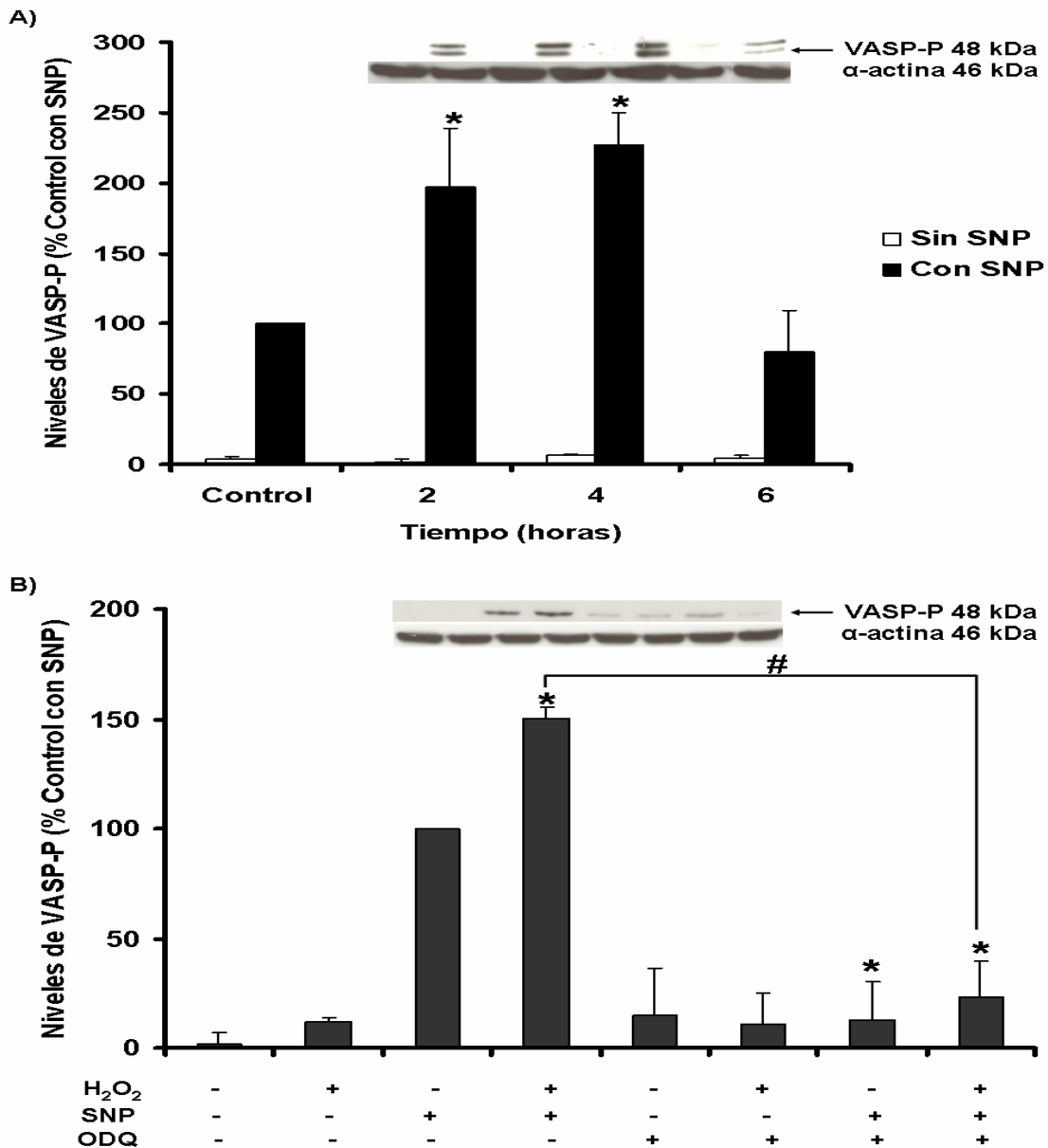


Fig. 13: Efecto del tratamiento con peróxido del hidrógeno (H₂O₂) sobre los niveles de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores fosforilada (VASP-P), en células musculares lisa (CML) estimuladas con nitroprusiato sódico (SNP). A) Las CML fueron tratadas a tiempos variables con H₂O₂ (10⁻⁴M), posteriormente fueron incubadas con un donador de óxido nítrico (SNP), ó con el vehículo sólo, durante 15 minutos y se analizaron los niveles de VASP-P. B) Las CML fueron tratadas con H₂O₂ (10⁻⁴M) durante 4 horas, posteriormente se incubaron con un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (ODQ) durante 15 minutos a una dosis de 10⁻⁴M, ó con el vehículo sólo. Seguidamente se adicionó SNP, ó el vehículo sólo, durante 15 minutos y se analizaron los niveles de VASP-P. En la parte superior del panel se muestra un experimento de Western Blot representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media ± error estándar, de la media del análisis densitométrico (VASP-P/α-actina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del Control con SNP (*p < 0.05 vs SNP y #p < 0.05 vs CML tratadas con H₂O₂ durante 4 horas y SNP).

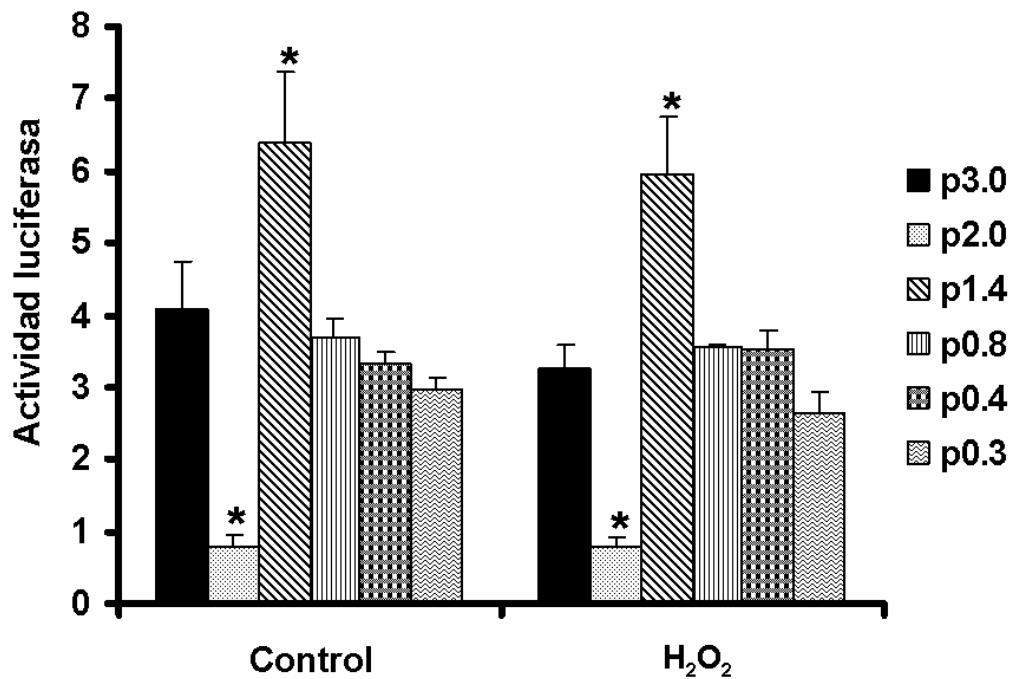


Fig. 14: Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad del promotor de la subunidad β_1 de la guanilato ciclasa soluble ($GCs\beta_1$) en células musculares lisas (CML). Las CML fueron transfectadas con el promotor entero (p3.0) y distintas deleciones (p2.0, p1.4, p0.8, p0.4 y p0.5). Posteriormente fueron tratadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante 2 horas. Se representa, la media \pm error estándar de la actividad luciferasa de 4 experimento independientes (* $p < 0,05$ vs p 3.0 control).

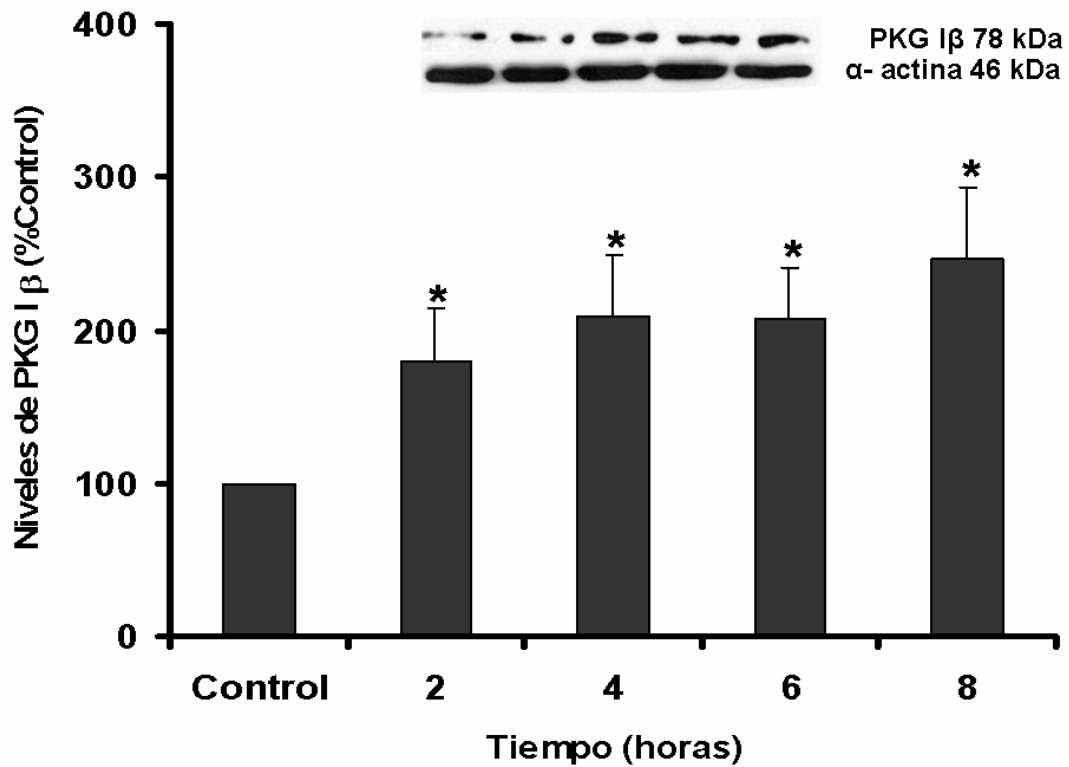


Fig. 15: Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre los niveles de PKG Iβ en células musculares lisas (CML). Niveles de PKG Iβ en CML incubadas con H_2O_2 ($10^{-4}M$) durante tiempos variables. En la parte superior del panel se muestra un experimento de Western Blotting representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar de la media del análisis densitométrico (PKG Iβ / α -actina), de 4 experimentos independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

PARTE III

1. Efecto de la catalasa sobre el aumento de la tensión arterial inducida por el N^g-metil L-arginina (L-NAME) en ratones.

Para realizar los experimentos se usaron 2 tipos de ratones: unos modificados genéticamente, que sobreexpresan catalasa (CAT) y sus controles del mismo fondo genético sin modificar (WT). Ambos tipos de ratones fueron machos de la cepa C57/BL6 y 3 meses de edad, y se subdividieron en 2 grupos: unos tratados con L-NAME y otros sin tratar. El registro de las tensiones arteriales se realizó en animales conscientes y usando un esfigmomanómetro de cola. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la tensión arterial sistólica (TAS) y diastólica (TAD) en ambos tipos de ratones tratados con L-NAME (20 mg /Kg. /día) con respecto a sus controles. Este aumento se observó a las 3 semanas de tratamiento, manteniéndose a las 8 (Fig. 16 y 17). Estos aumentos fueron más marcados en los ratones WT (137 mmHg para la TAS y 110 mmHg para la TAD) que en los CAT (119 mmHg para la TAS y 83 mmHg para la TAD).

2. Efecto de la catalasa sobre los cambios en la función renal inducida por el N^g-metil L-arginina (L-NAME) en ratones.

Con el objetivo de estudiar la función renal de los ratones tras la administración de L-NAME, se analizaron diferentes parámetros bioquímicos en orina y en sangre de los ratones, tanto tratados con L-NAME como de sus controles. Los parámetros estudiados fueron el aclaramiento renal de creatinina, la excreción fraccional de sodio y la proteinuria (Tabla 1).

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la función renal entre ambos tipos de ratones, ni entre los tratados y sus controles.

3. Efecto de la catalasa sobre el daño oxidativo inducido por el N^g-metil L-arginina (L-NAME) en ratones.

Para explorar la posibilidad de que la administración de L-NAME provoque daño oxidativo en los tejidos, se analizaron los niveles del 4-hidroxinonenal lisina

(HNE-Lys), mediante Western blot, que es un marcador de peroxidación lipídica que aparece cuando existe daño oxidativo en los tejidos. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de la HNE-Lys en ratones WT tratados con L-NAME, revirtiéndose en los ratones CAT (Fig. 19).

4. Efecto de la catalasa sobre el aumento de los niveles de la guanilato ciclasa soluble (GCs) inducido por el N^g-metil L-arginina (L-NAME) en ratones.

Se analizaron los niveles de la subunidad $\beta 1$ de la GCs en ambos tipos de ratones tanto en los tratados con L-NAME durante 8 semanas como en los controles. Los resultados muestran un incremento en los niveles de la subunidad $\beta 1$ de la GCs en ratones WT tratados con L-NAME, que fue completamente revertido en ratones CAT (Fig. 20).

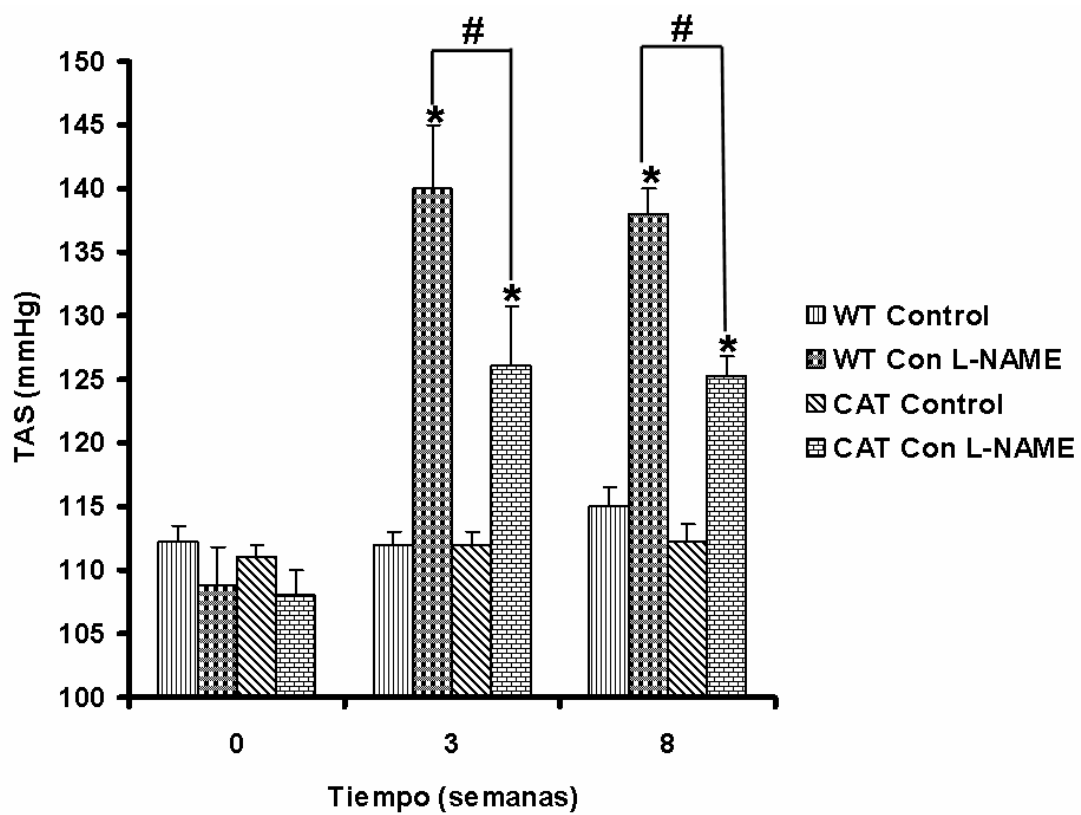


Fig. 16: Efecto de la sobreexpresión de catalasa en los cambios de la presión arterial sistólica (TAS) inducidas por el *N^G-nitro metil L-arginina (L-NAME)*. Se utilizaron 2 tipos de ratones, unos que sobreexpresan catalasa (CAT) y otros controles del mismo fondo genético (WT). Las TAS se evaluaron con un esfigomanómetro de cola antes (semana 0), y a las 3 y 8 semanas después de recibir L-NAME (20mg/kg/día). Se representa la media \pm error estándar de las TAS de 5 ratones independientes. (* $p < 0.05$ vs semana 0, # $p < 0.05$ vs WT tratados con L-NAME).

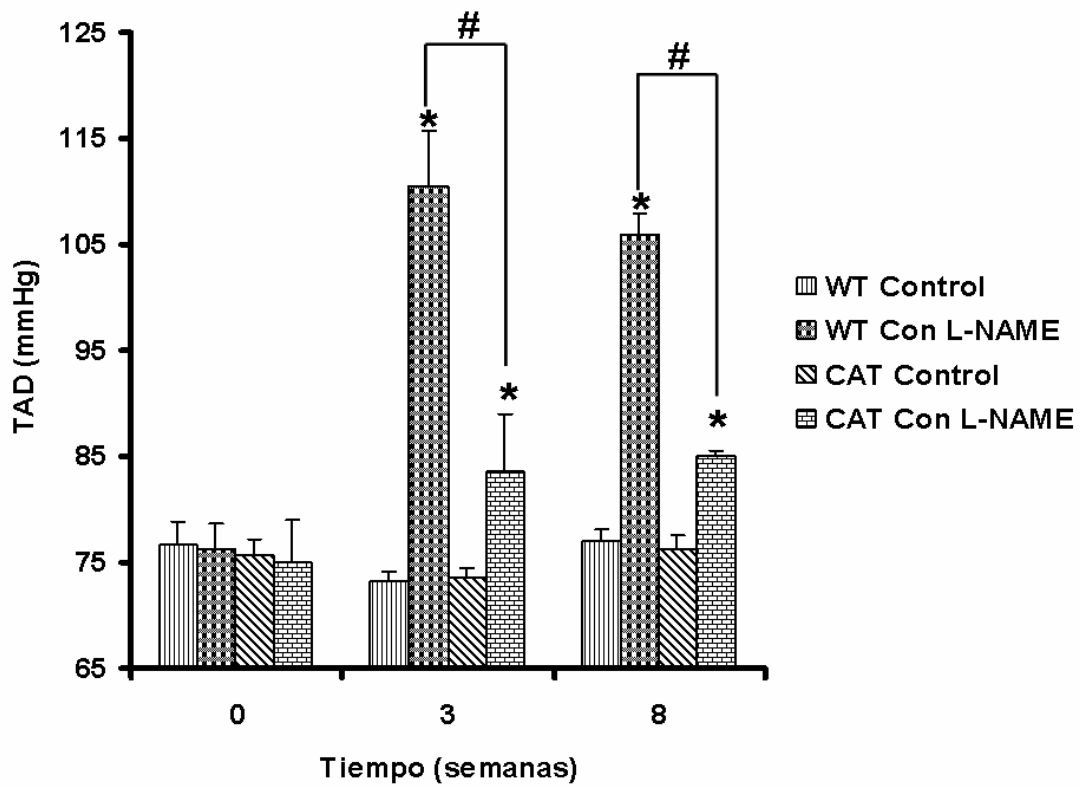


Fig. 17: Efecto de la sobreexpresión de catalasa en los cambios de la presión arterial diastólica (TAD) inducidas por el N^G -nitro metil L-arginina (L-NAME). Se utilizaron 2 tipos de ratones, unos que sobreexpresan catalasa (CAT) y otros controles del mismo fondo genético (WT). Las TAD se evaluaron con un esfigmomanómetro de cola antes (semana 0), y a las 3 y 8 semanas después de recibir L-NAME (20mg/kg/día). Se representa la media \pm error estándar de las TAD de 5 ratones independientes. (* $p < 0.05$ vs semana 0, # $p < 0.05$ vs WT tratadas con L-NAME).

	WT Control	WT L-NAME	CAT Control	CAT L-NAME
Aclaramiento de creatinina	14.08 ± 5.6	11.86 ± 1.41	14.67 ± 2.5	18.61 ± 6
Excrección fraccional de sodio	0.0041 ± 0.002	0.0033 ± 0.0001	0.003 ± 0.001	0.0022 ± 0.0010
Proteinuria (mg/dL)	33.75 ± 20	40.54 ± 25	32.33 ± 20.16	100 ± 60

Tabla 1: Efecto de la sobreexpresión de catalasa en los cambios de aclaramiento de creatinina, excrección fraccional de sodio y proteinuria inducida por el N^G-nitro metil L-arginina (L-NAME) en ratones. Se utilizaron 2 tipos de ratones, unos modificados genéticamente que sobreexpresan catalasa (CAT) y otros sin modificar (WT). Las determinaciones se realizaron a las 8 semanas después del tratamiento con L-NAME (20mg/kg/día). Se representa la media ± error estándar del aclaramiento de creatinina, excrección fraccional de sodio y proteinuria de 5 ratones independientes.

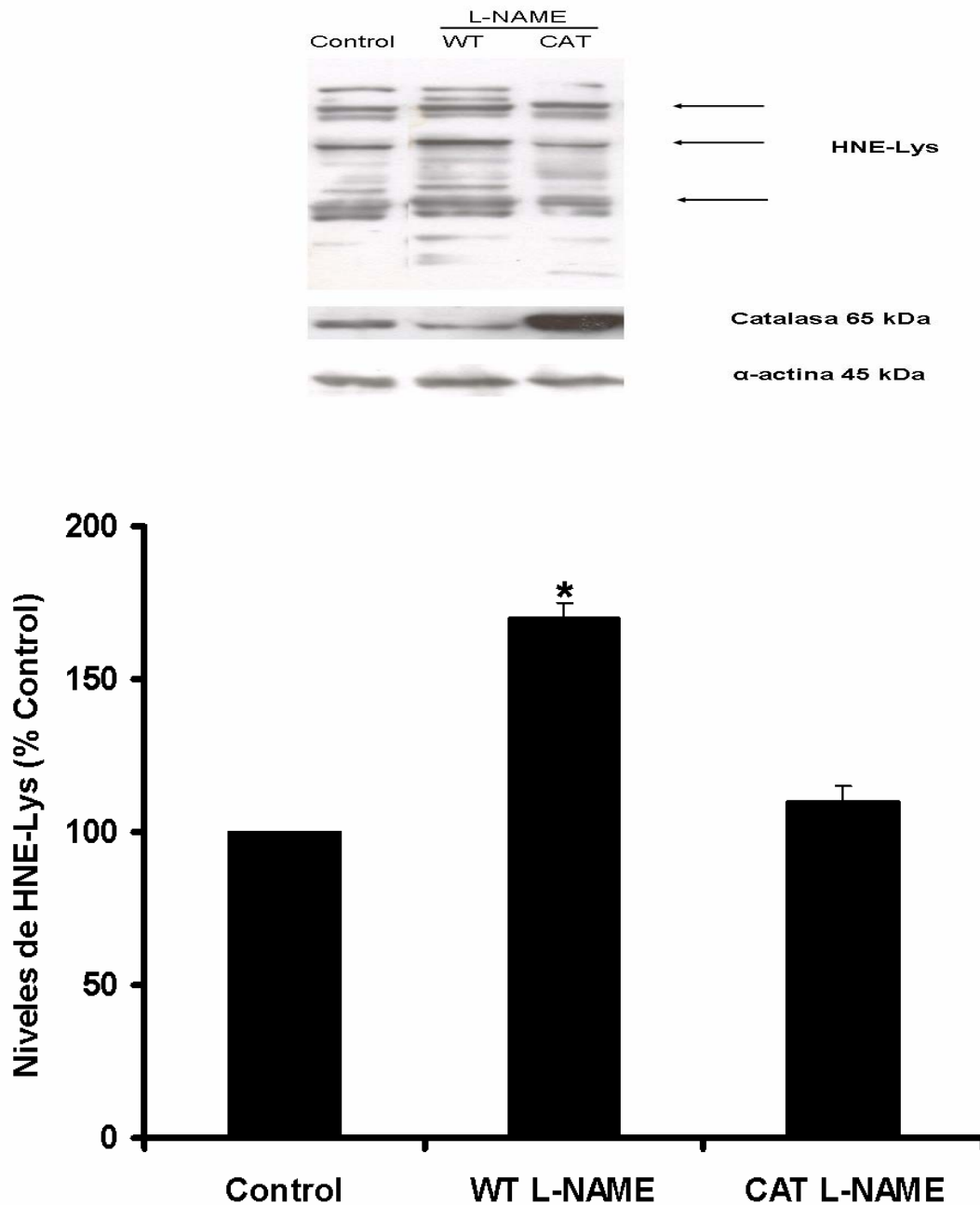


Fig. 19: Efecto de la sobreexpresión de catalasa en los niveles de 4-hidroxinonenal lisina (HNE-Lys) inducida por el N^G -nitro metil arginina (L-NAME) en ratones. Se utilizaron 2 tipos de ratones, unos modificados genéticamente que sobreexpresan catalasa (CAT) y otros sin modificar (WT). Una vez finalizado el tratamiento con L-NAME (20mg/kg/día), se determinaron los niveles de HNE-Lys en tejido cardiaco. En la parte superior del panel se muestra un experimento de Western Blot representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar del análisis densitométrico (HNE-Lys/ α -actina) de 5 ratones independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

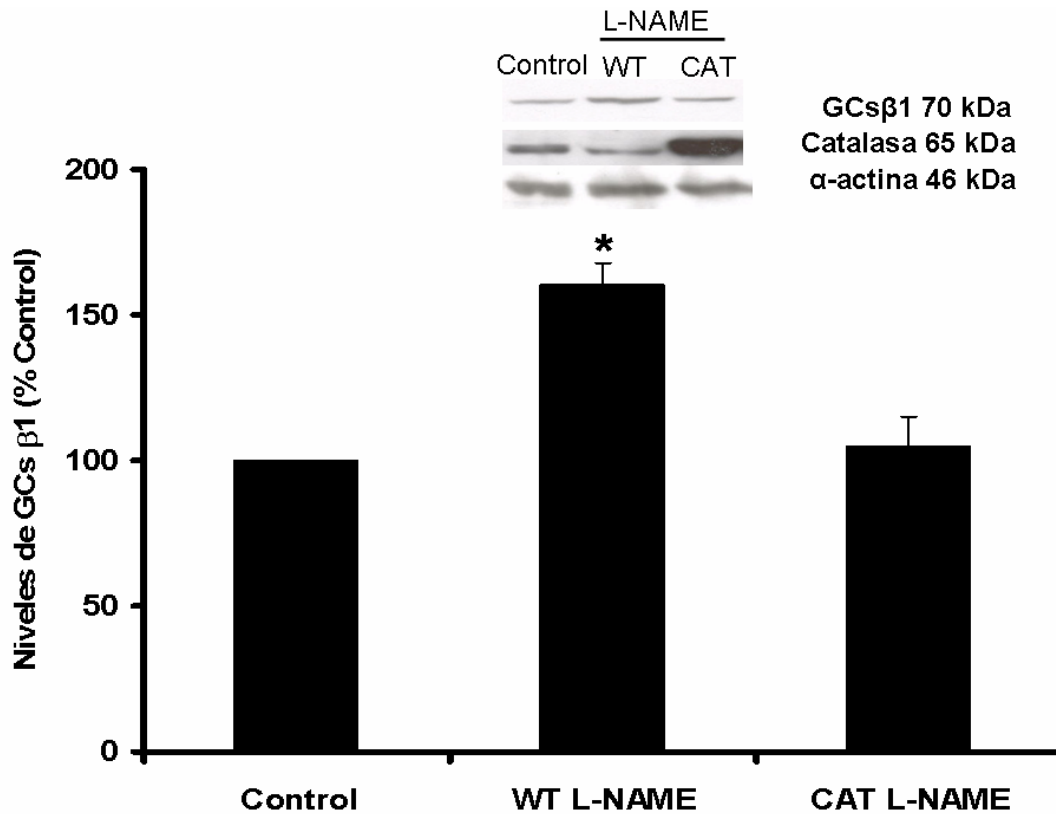


Fig. 20: Efecto de la sobreexpresión de catalasa en los niveles de la subunidad $\beta 1$ de la guanilato ciclasa soluble ($GCs\beta 1$) inducida por el N^G -nitro metil L-arginina (L-NAME) en ratones. Se utilizaron 2 tipos de ratones, unos modificados genéticamente que sobreexpresan catalasa (CAT) y otros sin modificar (WT). Una vez finalizado el tratamiento con L-NAME (20mg/kg/día), se determinaron los niveles de $GCs\beta 1$ en tejido cardiaco. En la parte superior del panel se muestra un experimento de Western Blot representativo, mientras que en la parte inferior se representa la media \pm error estándar del análisis densitométrico ($GCs\beta 1/\alpha$ -actina) de 5 ratones independientes y expresados como % del control (* $p < 0.05$ vs Control).

DISCUSIÓN

Hasta hace 10 años, la generación de peróxido de hidrógeno se relacionaba con daño oxidativo y lesión a nivel de ADN. En la actualidad, se está demostrando paulativamente el papel esencial del H_2O_2 en la regulación de numerosos procesos fisiológicos/fisopatológicos, destacando su papel en la apoptosis/proliferación celular, hiperplasia, angiogénesis y contracción/relajación celular. En algunas de estas situaciones se conoce perfectamente el rol del peróxido de hidrógeno, en otros no está claro como el peróxido de hidrógeno interviene en dichos procesos, pero los distintos autores interesados en el tema coinciden en el papel esencial de la generación de H_2O_2 . Como ya se ha indicado, una de las principales acciones del H_2O_2 es su papel en la regulación del tono vascular, fenómeno regulado por los procesos de contracción/relajación. La información al respecto en la literatura es amplia, como ya se ha comentado en la Introducción. No obstante, existen todavía múltiples interrogantes sobre todo en lo referente al papel del H_2O_2 sobre ciertos mecanismos intracelulares cuya importancia en la homeostasis celular ha sido recientemente descrito. En consecuencia el objetivo de la tesis fue analizar el papel del H_2O_2 en la regulación de los determinados mecanismos contráctiles y relajantes, limitada en estudios previos, mediante una aproximación “*in vitro*” e “*in vivo*”.

1. Papel del peróxido de hidrógeno sobre el contenido y la actividad del receptor de IP_3 en las CML.

Es un hecho bien documentado que diversas sustancias contráctiles, cuyo mecanismo de acción es a través de la formación de IP_3 , disminuyen los niveles del IP_3R . Así, Bokkala & Joseph, en 1997, demostraron que la ANGII disminuye los niveles del IP_3R en hepatocitos. Posteriormente, diversos grupos han observado dicho efecto utilizando otras sustancias tales como la vasopresina ó el carbacol. Por otro lado, existe numerosa bibliografía que le otorga al H_2O_2 un efecto contráctil por un aumento de calcio intracelular. En ese sentido, nuestro grupo publicó el papel esencial del H_2O_2 en la acción contráctil de diversos vasopectidos tales como el factor activador de plaquetas (PAF) ó la ANGII en células mesangiales humanas (Torrecillas G. y

Discusión

cols.,2001), a la par que su capacidad directa para contraer esta misma célula o las endoteliales (Lopez-Ongil S. y cols., 1999).

Así nuestro primer objetivo fue analizar el efecto del H_2O_2 sobre el receptor de IP_3 tipo I (IP_3R_1) y III (IP_3R_3) en las CML, basándonos en los antecedentes anteriormente descritos. Los resultados obtenidos nos muestran una disminución en la cantidad del IP_3R_1 y el IP_3R_3 en CML tratadas con H_2O_2 . Esta disminución fue dosis y tiempo dependiente, alcanzándose el máximo a las 6 horas de tratamiento con H_2O_2 a una dosis de $10^{-4}M$. Para asegurarnos que la dosis máxima utilizada ($10^{-4}M$) no resultaba tóxica para la célula, se realizaron ensayos de la viabilidad celular por citometría de flujo (datos no mostrados) y los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de las CML con H_2O_2 a una dosis de $10^{-4}M$ durante 8 horas no resultaba tóxica según la experiencia previa de nuestro grupo, confirmado además por otros autores (Nickening G. y cols., 2002; Lee KH. y cols, 2004). Este resultado no es sorprendente, ya que la disminución se puede interpretar como un mecanismo de defensa celular frente a un estímulo contráctil.

Como ya se indicó, el papel contráctil del H_2O_2 es mediado por un aumento de calcio intracelular. Aunque la procedencia del calcio no está claramente establecido, así por ejemplo algunos autores lo atribuyen a una activación de los receptores de IP_3 (Zheng Y. & Shen X., 2005) y otros muestran que su procedencia es mitocondrial (Granado PM y cols., 2006), los distintos estudios coinciden en la ausencia de la elevación de los niveles de IP_3 intracelulares. Este dato es importante, ya que muestran por primera vez una disminución en el IP_3R independiente de la generación de IP_3 , de forma que los cambios conformacionales producidos por la unión del IP_3 a su receptor no parece ser esenciales para la degradación del receptor por el H_2O_2 , a diferencia de lo descrito hasta la fecha (Zhu CC & Wojcikiewicz RJ., 2000).

Como ya se explicó en la introducción, el IP_3R actúa como canales de calcio permitiendo el movimiento de calcio desde los almacenes intracelulares hacia el citosol. Así, una vez observada la disminución del contenido celular del IP_3R , se evaluó la importancia funcional de esta disminución, analizando la respuesta celular al tratamiento con IP_3 . Para realizar dichos experimentos, se utilizaron ensayos de liberación de Ca^{45} , que es un isótopo radioactivo del calcio. Esta técnica nos permite analizar los movimientos del calcio producido exclusivamente por la unión del IP_3 a su receptor. Para ello es necesario que las células, antes de la estimulación del receptor, se encuentren previamente permeabilizadas, ya que por la naturaleza hidrofóbica del IP_3 es

Discusión

incapaz de atravesar la membrana citoplasmática, y cargadas con el Ca^{45} . Los resultados obtenidos nos muestran una inhibición en la liberación de calcio por IP_3 en CML tratadas con H_2O_2 , con respecto a sus controles, similar a la obtenida en los niveles de proteína.

Un paso más en la confirmación de la importancia funcional de la disminución del contenido celular del IP_3R inducido por H_2O_2 fue el análisis de la respuesta contráctil de las células en presencia de un agonista como la ANGI. Se observó una disminución en la contracción cuando las CML eran preincubadas con H_2O_2 , siendo esta disminución proporcional a la observada en la liberación de calcio por IP_3 .

Una vez confirmada la disminución del IP_3R inducida por H_2O_2 , se analizó el mecanismo implicado en dicha regulación. La disminución en el contenido celular de una proteína puede ocurrir por cambios en la expresión ó por un aumento en la degradación de la misma. En primer lugar se estudió los cambios en la expresión génica del IP_3R en CML incubadas con H_2O_2 , mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real. Esta técnica nos permite analizar los cambios en la expresión del IP_3R_1 y del IP_3R_3 de una manera más precisa que la RT-PCR normal. Los datos obtenidos muestran que la expresión de ambos genes se mantiene inalterada cuando las CML son incubadas con el H_2O_2 . Descartada esta vía, se analizó la posibilidad de que los cambios fueran por un aumento en la degradación del IP_3R . Para explorar está vía se utilizó un inhibidor farmacológico de la actividad del proteasoma, el MG132. Los resultados nos muestran una reversión total en la disminución del IP_3R inducida por H_2O_2 cuando las CML eran preincubadas con el MG132. Como ya se indicó en la Introducción, es necesaria la ubiquitinización previa de la proteína para que esta pueda ser reconocida y degradada por el proteasoma 26S. Para analizar si existían cambios en los niveles de ubiquitinización del IP_3R se realizaron mediante la técnica de inmunoprecipitación (IP), ya que permite observar cambios en la interacción entre dos proteínas, como son la ubiquitina y el IP_3R . Los resultados nos muestran que los niveles de ubiquitinización del IP_3R no se modificó cuando las CML son tratadas con H_2O_2 , cuando la actividad del proteasoma esta inhibida. Este dato es interesante, ya que indica la participación del proteasoma 20S en la disminución del IP_3R inducida por H_2O_2 . En 2003, Shingarpure et col. demostraron que existen dos vías de degradación de proteínas por el proteasoma, una “clásica” en la que está implicado el complejo 26S y otra en la que la encargada de la degradación es la subunidad 20S independiente. Esta última, es la principal responsable de la degradación de las proteínas oxidadas y es independiente de la ubiquitinización y

de la hidrólisis de ATP. Nuestros datos indican que la degradación observada en el IP₃R es dependiente de la 20S y no de la 26S, como hasta ahora se había descrito para otras sustancias (Oberdorf J. y cols., 1999; Bokkala & Joseph, 1996; Wojcikiewicz RJ. y cols., 1994; Sipma H y cols., 1998; Lee B. y cols., 2001), ya que no se observa un aumento ni en los niveles de ubiquitinización de el IP₃R ni en la actividad de la 26S (datos no mostrados), y se apoyan en estudios previos en los que se demuestra que la actividad 26S es inhibida en condiciones de estrés oxidativo (Reinheckel T. y cols, 1998), así como en la degradación de las proteínas oxidadas por el proteasoma 20S.

Es un hecho bien conocido que la ANGII, a través de la unión al receptor AT1, es capaz de generar metabolitos derivados del oxígeno (MADO) principalmente por la activación de la NAD(P)H oxidasa (Rajagopalan y cols., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que la estimulación crónica de células en cultivo con ANGII induce una disminución en el contenido del IP₃R (Bokkala & Joseph K., 1997). Con estos antecedentes se estudió el papel de la generación de MADO en la disminución del IP₃R inducida por ANGII. Para explorar esta interacción, se utilizaron CML transfectadas con catalasa, de forma que los niveles intracelulares de esta enzima son superiores a la de sus controles. En nuestros estudios observamos una reversión total del efecto en las primeras 4 horas de tratamiento con ANGII en las células transfectadas con respecto a sus controles, desapareciendo esta diferencia a las 8 horas de incubación con ANGII. Para confirmar que la generación de MADO no es necesario en la disminución en los niveles del IP₃R inducida por la incubación crónica con ANGII, las CML fueron preincubadas con un mimético de la glutation peroxidasa (Ebselen) ó con un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (DPI) y posteriormente tratadas con ANGII durante 8 horas. Los resultados nos muestran una disminución en los niveles del IP₃R inducida por ANGII independiente de la generación de MADO, confirmando los resultados anteriormente obtenidos. Esto resulta interesante, ya que indica la posibilidad de que el mecanismo de degradación del IP₃R inducida por ANGII sea en una primera fase dependiente de la actividad del proteasoma 20S y por tanto de la generación de H₂O₂ y una segunda, que empezaría a partir de las 6 horas de tratamiento, dependiente de la actividad del proteasoma 26S e independiente de la generación de H₂O₂. Esto resultaría novedoso ya que hasta ahora se ha demostrado la degradación de las proteínas por la activación de uno de los mecanismos del proteasoma pero nunca una posible complementariedad de ambos mecanismos, lo que resaltaría la importancia de mantener unos niveles adecuados del IP₃R en la biología celular.

Discusión

En conclusión, los datos presentados muestran una disminución en el contenido y actividad del IP_3R_1 y IP_3R_3 en CML de aortas tratadas con H_2O_2 , independiente de cambios en su expresión génica y dependiente de una mayor actividad del proteasoma. Este efecto va acompañado de una menor respuesta contráctil de las CML a ANGII. Por otro lado, se demuestra el papel esencial de la generación de H_2O_2 en las disminuciones del IP_3R_1 y del IP_3R_3 en CML tratadas con ANGII.

2. Papel del peróxido de hidrógeno sobre la GCs en las CML.

Como se explicó en la introducción, la GCs actúa como un heterodímero formado por dos subunidades, la alfa y la beta. Los primeros datos obtenidos en este capítulo fueron encaminados a analizar el efecto del H_2O_2 sobre el contenido de GCs en CML. Los resultados nos muestran un aumento de la subunidad β_1 , alcanzándose el máximo a las 4 horas de tratamiento y revirtiéndose a las 6 horas a los niveles basales, mientras que la α_1 permanece inalterada. Esto no resulta sorprendente, pues es conocida que el NO y el H_2O_2 lleva a cabo acciones totalmente opuestas en las CML, como por ejemplo la proliferación celular por H_2O_2 (Shin M. y cols., 2004; Nickening y cols., 2002; Rao GN & Berck BC. 1992) y el mecanismo antiproliferativo del NO (Sinnaeve P. y cols., 2001; Janssens S. y cols., 1998; Etienne P. y cols., 1996) y por otro lado es bien conocido el efecto inhibitorio del NO sobre los niveles de la GCs (Filippov G y cols., 1997). No obstante este dato es interesante, ya que se observa un efecto agudo y pasajero en los niveles de la GCs por el H_2O_2 .

Una proteína puede aumentar su contenido sin que se vaya acompañado de un incremento en su actividad como ocurre en la situación de hipercolesteronemia crónica en la que existe un aumento en los niveles de la GCs pero la actividad no se ve modificada. Cuando la GCs es activada por óxido nítrico (NO), se aumenta la síntesis de GMPc por parte de la GCs. Así la actividad de la GCs se midió mediante la síntesis de GMPc, observándose un incremento en CML tratadas con H_2O_2 y estimuladas con NO con respecto a los controles. Estos datos apoyarían la hipótesis que el aumento en el contenido de la subunidad β_1 de la GCs es suficiente para incrementar la actividad de dicha enzima (Diez-Marqués ML. y cols., 2006).

Por otro lado, se observó que en condiciones basales no existen diferencias entre los controles y los tratados con H_2O_2 , estos resultados están en la línea del trabajo publicado por Yang M. y cols. (2003), que demostraron que el aumento en la actividad de la GCs inducido por NO en CML incubadas con insulina era debido a la generación de H_2O_2 , pero que la incubación sólo de H_2O_2 no era suficiente para incrementar la actividad de la enzima.

Discusión

Como ya se explicó en la Introducción, en el proceso de relajación por NO es indispensable la activación de la proteína quinasa G (PKG). Esta quinasa es capaz de fosforilar diferentes proteínas, entre ellas se encuentra la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) que pertenece a la familia ENA/VASP y cuya función es la regulación del citoesqueleto de actina. Hoy en día es aceptado, que la fosforilación de VASP en el residuo de serina 239 (VASP-P) es un marcador de la actividad de la PKG (Oelze y cols, 2000). Nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de VASP-P en CML tratadas con H₂O₂ y estimuladas con NO con respecto a los controles, el aumento fue estadísticamente significativo a las 2 horas de tratamiento alcanzándose el máximo a las 4 horas. El efecto fue revertido a sus niveles basales a las 6 horas de tratamiento, ó cuando las CML fueron preincubados con un inhibidor de la actividad de la GCS, el ODQ. Estos datos coinciden con los obtenidos en el contenido y actividad de la GCs en CML incubadas con H₂O₂.

Otro aspecto que se estudia es el mecanismo implicado. Una proteína puede aumentar su contenido celular por un aumento en la expresión génica de la misma, ó por una disminución en la degradación. Se analizó los cambios en la expresión de la subunidad β_1 en CML incubadas con H₂O₂ por actividad de la luciferasa de su promotor completo así como de diferentes delecciones. Los resultados nos muestran que no existen cambios entre las CML incubadas con H₂O₂ y sus controles, descartando modificaciones en la expresión del gen β_1 por H₂O₂. En la actualidad se esta estudiando la posibilidad de que el aumento sea por una mayor estabilidad de ARNm como ocurre en el aumento en los niveles de eNOS por H₂O₂ (Drummond GR. y cols., 2000) ó por una inhibición en el mecanismo de degradación de la GCs madura, ya que nuestro grupo ha publicado la implicación del proteasoma 26S en la degradación de la GCs por la activación de la GC particulada (De Frutos S. y cols., 2003).

Por otro lado, observamos que la expresión basal de la β_1 se ve disminuida cuando es eliminada la región de unos 100 aminoácidos comprendida entre el promotor entero (p3.0) y el promotor 2.0 (p2.0) implicando que en esta región se localizan factores de transcripción activadores de la expresión de β_1 . Sorprendentemente la región entre el promotor entero y el p2.0 se ha demostrado que actúa como inhibitoria de la expresión de la β_1 en las células de neuroblastoma (Sharina IG. y cols, 2003). Esto es interesante ya que explicaría las diferencias en los niveles basales de la GCs según el tipo celular.

Discusión

Una de las dianas más importante del GMPc es la PKG, cuya activación es fundamental para el proceso de relajación inducido por NO. Existen diversas isoformas de la proteína siendo la PKG I β la mayoritaria en las CML. Los resultados muestran un incremento en la cantidad celular de en CML tratadas con H₂O₂, que fue estadísticamente significativo a las 2 horas de tratamiento de forma similar al obtenido en la GCs, aunque a diferencia de esta el máximo en el contenido celular de PKG se alcanzó a las 8 horas de tratamiento. Esto resulta interesante, ya que como se demostró anteriormente el aumento de los niveles de la GCs fueron revertidos a las 6 horas de tratamiento, de forma que el incremento de la PKG I β sugiere un efecto a largo plazo en la regulación del mecanismo de relajación inducido por NO por parte del H₂O₂. Por otro lado, la PKG I regula otros procesos celulares de vital importancia como la la apoptosis, demostrándose su papel como inhibidor en la apoptosis inducida por H₂O₂ en astrocitos (Takuma K., y cols. 2001) ya que evita la disfunción mitocondrial típica de dicho proceso. Este resultado podría ayudar a comprender porque el H₂O₂ es capaz de desencadenar procesos opuestos como es la proliferación y la apoptosis de gran importancia en el desarrollo de la arteriosclerosis (Cai H., 2005).

En conclusión, los datos presentados muestran un aumento en el contenido de la subunidad β 1 de la GCs y en la actividad de la misma en CML de aortas tratadas con H₂O₂ y estimuladas con NO, independiente de cambios en su expresión génica. Este efecto fue revertido a las 6 horas de tratamiento. Por otro lado, se muestra un aumento en los niveles de la PKG I β en CML incubadas con H₂O₂.

3. Papel del peróxido de hidrógeno en el aumento de la tensión arterial inducida por el N^g-metil L-arginina (L-NAME) en ratones.

El incremento de los MADO, con el subsiguiente estrés oxidativo influye en la progresión de enfermedades como la hipertensión o en la disfunción del sistema inmunitario (Alvarado C. y cols., 2005). En esta parte de la tesis, se estudió como el H₂O₂ participa en el aumento de la tensión arterial inducida por el L-NAME que es un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Para ello, se utilizaron 2 tipos de ratones de la cepa C57/BL6, unos transgénicos que sobreexpresan catalasa (CAT) y sus controles del mismo fondo genético sin modificar (WT).

Como bien es sabido, las CML se encuentran generalmente en un estado de equilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasorelajantes. Este equilibrio puede verse afectado por un aumento o por una disminución en uno de estos factores. Cuando se administra L-NAME, se disminuye la cantidad de óxido nítrico (NO) disponible en las CML, por lo que el equilibrio se ve desplazado hacia la contracción por una disminución en los factores vasorelajantes, potenciándose las acciones de los vasoconstrictores, entre los que destaca la ANGII. Nuestro grupo demostró que la generación de H₂O₂ era necesaria en la contracción celular inducida por ANGII en CML (Torrecillas G. y cols., 2001), confirmándose posteriormente en estudios in vivo donde se observó que la administración directa de ANGII ó de norepinefrina (NE) produce un menor aumento en la tensión arterial en ratones transgénicos que sobreexpresan catalasa con respecto a sus controles (Yang H. y cols., 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo están en la línea de lo anteriormente publicado ya que cuando se administró L-NAME se observó un menor aumento en la tensión arterial en ratones transgénicos que sobreexpresan catalasa con respecto a sus controles. No obstante, Zhang Y. y cols. (2005) demostraron que la sobreexpresión de catalasa no influye en el aumento de la tensión arterial inducida por ANGII. En este trabajo se utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresaban catalasa en la aorta, a diferencia de los utilizados en nuestro trabajo cuya sobreexpresión es homogénea por todo el organismo (Chen X. y cols., 2003). Esto es interesante, ya que plantea la posibilidad de que la regulación de la tensión arterial por el H₂O₂ sea multiorgánica.

Discusión

Para la realización de este trabajo, se utilizaron exclusivamente animales machos, ya que son bien conocidas las diferencias sexuales en el desarrollo de la hipertensión. En este sentido, se ha observado en la población general, que la incidencia y la gravedad de la hipertensión es mayor en hombres que en mujeres (Dubey RK y cols., 2002; Kotchen JM y cols., 1982). También, esta diferencia entre sexos se ha demostrado en diferentes modelos animales de inducción de hipertensión (Crofton JT y cols., 1993; Crofton JT & Share L., 1997; Chen YF & Meng QM. 1991). Además Xue B. y cols. (2005) demostraron una relación directa entre el sexo y el aumento de la tensión arterial inducido por la ANGII, observando un menor aumento en las hembras tratadas con ANGII con respecto a los machos.

El aumento de la tensión arterial influye en numerosas funciones del organismo, siendo una de las más afectadas la renal, que es un marcador fiable de daño tisular de forma que en etapas avanzadas de la hipertensión la filtración glomerular disminuye frecuentemente. Así, se ha observado que en pacientes hipertensos con la función renal comprometida, las expectativas de vida no superan los 7 años de vida (Perera GA, 1995). Para analizar la función renal se determinaron parámetros como la excreción fraccional de sodio, el aclaramiento de creatinina y los niveles de proteinuria. Nuestros resultados no muestran modificaciones en la función renal en los ratones sometidos a tratamiento, lo que nos indica que se encuentran posiblemente en una fase inicial en la progresión de la hipertensión.

Es un hecho bien contrastado la relación entre el aumento en la generación de MADO y la aparición y desarrollo de la hipertensión. Así, por ejemplo, se ha relacionado el incremento del anión superóxido inducido por NAD(P)H oxidasa y la aparición o desarrollo de la hipertensión en diferentes modelos genéticos como son las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Rodríguez-Iturbe B. y cols., 2003; Kishi T. K. y cols., 2004; Park JB. y cols., 2002), o la administración de antioxidantes con la atenuación en la progresión de la hipertensión (Rodríguez-Iturbe B. y cols., 2003; Shokoji T. y cols., 2003) . También existen estudios clínicos en los que se ha demostrado esta relación (Higasi Y. y cols., 2002; Lip GY. y cols. 2002). Por otro lado, este incremento en el estrés oxidativo se traduce en un aumento del daño oxidativo tisular, existiendo diferentes marcadores, destacando el 4-hidroxinonenal lisina (HNE-Lys) que es un aducto entre el hidroxinonenal, procedente de la peroxidación lipídica, y los residuos de lisina de las proteínas (Uchida K., 2003). Los resultados muestran un aumento en los niveles de HNE-Lys en los ratones WT tratados con L-NAME

Discusión

revirtiéndose en los que sobreexpresan catalasa. Este efecto sólo fue observado en tejido cardiaco, y no en tejido renal ni en vaso (datos no mostrados), posiblemente porque el tejido cardiaco es el más afectado por el estrés oxidativo (Benderdour M. y cols., 2004) o porque los mecanismos antioxidantes en el vaso y en el tejido renal son mayores en la cepa utilizada.

Por último, se analizaron los cambios en los niveles de la GCs inducido por L-NAME. Esta bien establecido que la administración de NO disminuye los niveles de GCs (Filippov G. y cols., 1997) a través de una mayor inestabilidad del ARNm, y por otro lado en la Parte II se demostró que el H_2O_2 es capaz de aumentar los niveles de la subunidad $\beta 1$ de la GCs en CML. Nuestros resultados in vivo están en la línea de lo previamente descrito en cultivo ya que se observa un aumento en los niveles de la GCs $\beta 1$ en los ratones WT tratados con L-NAME, que es revertido en los CAT. Este dato es interesante ya que se ha observado que el efecto antiproliferativo del GMPc evita el desarrollo de la hipertrofia cardiaca (Barouch LA. y cols., 2002; Silberbach M. & Roberts CT., 2001), de forma que un aumento en los niveles de la misma puede ayudar a reducir la progresión de la enfermedad.

Existe una aparente contradicción entre los estudios in vitro mostrados anteriormente y estos estudios in vivo. La capacidad del H_2O_2 para bloquear los IP_3R y estimular la GCs podría hacer pensar que se trata de un mediador con una cierta capacidad relajante. En este contexto, sería esperado que la sobreexpresión de catalasa agravara la hipertensión arterial. No obstante, no hay que olvidar que el H_2O_2 tiene un efecto contráctil intrínseco (López-Ongil S. y cols., 1999), actuando además como segundo mensajero intracelular de la ANGII (Torrecillas G. y cols., 2001). Del equilibrio de estos dos procesos dependerá la capacidad del H_2O_2 para contraer o relajar la célula. A la vista de los resultados en ratones, lo que parece prevalecer es el efecto contráctil del H_2O_2 . La infreregulación de los IP_3R y la sobreexpresión de la GCs podrían considerarse como mecanismos adaptadores, capaces de modular una excesiva respuesta contráctil ante un exceso de H_2O_2 .

En conclusión, los datos muestran que el aumento en la producción de H_2O_2 es crucial en las etapas iniciales del aumento de tensión arterial inducida por L-NAME, así como en el daño oxidativo en el tejido cardiaco. Por otro lado, el aumento de la subunidad $\beta 1$ de la GCs inducida por L-NAME es dependiente de la generación de H_2O_2 .

RESUMEN DE RESULTADOS

1. El H₂O₂ disminuye la cantidad del IP₃R₁ e IP₃R₃ en CML. Este efecto se acompañó de una menor liberación de calcio inducida por IP₃, así como de una menor respuesta contráctil frente a ANGII.
2. El H₂O₂ es esencial en la degradación del receptor del IP₃ inducida por ANGII en sus etapas iniciales, siendo posteriormente independiente de la generación de MADO.
3. Los efectos anteriormente descritos pueden ser debidos a un aumento en la actividad del proteasoma independiente de la ubiquitinización de los receptores, lo que sugiere una posible implicación del proteasoma 20S.
4. El H₂O₂ aumenta los niveles de la subunidad β1 de la GCs en CML, mientras que la α1 permanece inalterada. Además, el H₂O₂ aumenta la cantidad de PKG Iβ en CML.
5. El aumento de la subunidad β1 de la GCs inducido por H₂O₂ en CML se acompañó de un incremento en la actividad de la enzima cuando es estimulada con NO.
6. El aumento de la subunidad β1 de la GCs inducido por H₂O₂ en CML es independiente de los cambios en la expresión génica.
7. El aumento de tensión arterial inducido por L-NAME fue menor en los ratones que sobreexpresan catalasa.
8. El incremento en el daño oxidativo inducido a nivel cardiaco por el tratamiento con L-NAME, no se observó en los ratones que sobreexpresan catalasa.
9. El incremento en los niveles de la subunidad β1 de la GCs inducido a nivel cardiaco por el tratamiento con L-NAME, no se observó en los ratones que sobreexpresan catalasa.

CONCLUSIONES

- 1. El H_2O_2 regula dos mecanismos celulares críticos en el proceso de contracción-relajación, los sistemas de respuesta al IP_3 y al NO .**
- 2. Esto puede tener contrapartidas funcionales importantes en situaciones que cursen con un incremento en la síntesis de H_2O_2 .**
- 3. En el caso de la hipertensión arterial, la eliminación de H_2O_2 mediante la sobreexpresión de catalasa condicionó una menor respuesta presora en un determinado modelo de hipertensión.**

BIBLIOGRAFÍA

Adachi T, Kodera T, Ohta H, Hayashi K, Hirano K.: The heparin binding site of human extracellular-superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Aug 15;297(1):155-61.

Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L.: The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32950-6.

Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M.: Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1203-10.

Ammendola A, Geiselhoringer A, Hofmann F, Schlossmann J.: Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):24153-9.

Babior BM.: The leukocyte NADPH oxidase. *Isr. Med Assoc J*. 2002 Nov;4(11):1023-4.

Barlow RS, White RE.: Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 2):H1283-9.

Barlow RS, El-Mowafy AM, White RE.: H₂O₂ opens BK(Ca) channels via the PLA(2)-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Aug;279(2):H475-83.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999;65(18-19):1865-74.

Benderdour M, Charron G, Comte B, Ayoub R, Beaudry D, Foisy S, Deblois D, Des Rosiers C.: Decreased cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Nov;287(5):H2122-31.

Berggren M, Gallegos A, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Warneke J, Powis G.: Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*. 1996 Nov-Dec;16(6B):3459-66.

Berridge MJ, Heslop JP, Irvine RF, Brown KD.: Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J*. 1984 Aug 15;222(1):195-201.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM.: NO regulates the heart by spatial confinement of NO synthase isoforms. *Nature*. 2002; 416: 337-339.

Biaglow JE, Miller RA.: The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2005 Jan;4(1):6-13.

Boehning D, van Rossum DB, Patterson RL, Snyder SH.: A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1466-71.

Boehning D, Joseph SK, Mak DO, Foscett JK.: Single-channel recordings of recombinant inositol trisphosphate receptors in mammalian nuclear envelope. *Biophys J*. 2001 Jul;81(1):117-24.

Bokkala S, Joseph SK.: Angiotensin II-induced down-regulation of inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. Evidence for involvement of the proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12454-61.

- Bosanac I, Michikawa T, Mikoshiba K, Ikura M.**: Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6;1742(1-3):89-102.
- Bosanac I, Yamazaki H, Matsu-Ura T, Michikawa T, Mikoshiba K, Ikura M.**: Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Mol Cell*. 2005 Jan 21;17(2):193-203.
- Bourguignon LY, Jin H, Iida N, Brandt NR, Zhang SH.**: The involvement of ankyrin in the regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated internal Ca²⁺ release from Ca²⁺ storage vesicles in mouse T-lymphoma cells. *J Biol Chem*. 1993 Apr 5;268(10):7290-7.
- Boyer CS, Bannenberg GL, Neve EP, Ryrfeldt A, Moldeus P.**: Evidence for the activation of the signal-responsive phospholipase A2 by exogenous hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol*. 1995 Sep 7;50(6):753-61.
- Brady TC, Chang LY, Day BJ, Crapo JD.**: Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):L1002-6.
- Bruce JI, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, Yule DI.**: Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1340-8.
- Burke TM, Wolin MS.**: Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol*. 1987 Apr;252(4 Pt 2):H721-32.
- Cai H.**: NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):818-22.
- Chakraborti S, Batabyal SK, Dutta G, Michael JR.**: Role of serine esterase in hydrogen peroxide-mediated activation of phospholipase A2 in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Indian J Biochem Biophys*. 1992 Dec;29(6):477-81.
- Chamley JH, Groschel-Stewart U, Campbell GR, Burnstock G.**: Distinction between smooth muscle, fibroblasts and endothelial cells in culture by the use of fluoresceinated antibodies against smooth muscle actin. *Cell Tissue Res*. 1977 Feb 14;177(4):445-57.
- Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R.**: The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*. 1979 Jan;59(1):1-61.
- Chandel NS, Waypa GB, Schumacker PT.**: Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res*. 2001 Jun 22;88(12):1259-66.
- Chen L, Daum G, Chitale K, Coats SA, Bowen-Pope DF, Eigenthaler M, Thumati NR, Walter U, Clowes AW.**: Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1403-8.
- Chen YF, Meng QC.**: Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci*. 1991;48(1):85-96.
- Chen X, Mele J, Giese H, Van Remmen H, Dolle ME, Steinhilber M, Richardson A, Vijg J.**: A strategy for the ubiquitous overexpression of human catalase and CuZn superoxide dismutase genes in transgenic mice. *Mech Ageing Dev*. 2003 Feb;124(2):219-27.
- Cho G, Kang S, Seo SJ, Kim Y, Jung G.**: The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase(sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C(MMC). *Biochem Mol Biol Int*. 1997 Aug;42(5):949-56.

Bibliografía

- Chomczynski P, Sacchi N.**: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- Cosentino F., Patton S., d'Uscio LV., Werner ER., Werner-Felmayer G., Moreau P.**: BH4 alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 1998;101;1530-1537.
- Crofton JT, Ota M, Share L.**: Role of vasopressin, the renin-angiotensin system and sex in Dahl salt-sensitive hypertension. *J Hypertens.* 1993 Oct;11(10):1031-8.
- Crofton JT, Share L.**: Gonadal hormones modulate deoxycorticosterone-salt hypertension in male and female rats. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1 Pt 2):494-9.
- Cullen PJ, Hsuan JJ, Truong O, Letcher AJ, Jackson TR, Dawson AP, Irvine RF.** : Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature.* 1995 Aug 10;376(6540):527-30.
- Diez-Marques ML, Ruiz-Torres MP, Griera M, Lopez-Ongil S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M.**: Arg-Gly-Asp (RGD)-containing peptides increase soluble guanylate cyclase in contractile cells. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 1;69(2):359-69.
- Downes CP, Hawkins PT, Irvine RF.** : Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate is the probable precursor of inositol 1,3,4-trisphosphate in agonist-stimulated parotid gland. *Biochem J.* 1986 Sep 1;238(2):501-6.
- Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG.**: Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res.* 2000 Feb 18;86(3):347-54.
- Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK.**: Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res.* 2002 Feb 15;53(3):688-708.
- Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH.**: Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.* 2003 May;5(5):440-6.
- Etienne P, Pares-Herbute N, Monnier L.**: Enhanced antiproliferative effect of nitric oxide in cultured smooth muscle cells from diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996 Jan;27(1):140-6.
- Fattman CL, Enghild JJ, Crapo JD, Schaefer LM, Valnickova Z, Oury TD.**: Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug 28;275(2):542-8.
- Ferrero R, Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT, Torres M.**: Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic GMP-dependent dephosphorylation. *J Neurochem.* 2000 Nov;75(5):2029-39.
- Ferris CD, Cameron AM, Brecht DS, Haganir RL, Snyder SH.**: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Feb 28;175(1):192-8.
- Ferris CD, Haganir RL, Brecht DS, Cameron AM, Snyder SH.**: Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15;88(6):2232-5.
- Ferris CD, Cameron AM, Brecht DS, Haganir RL, Snyder SH.**: Autophosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):7036-41.
- Filippov G, Bloch DB, Bloch KD.**: Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1997 Aug 15;100(4):942-8.

Bibliografía

Frank S, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J.* 2000 Mar 15;346 Pt 3:719-28.

de Frutos S, Saura M, Grier M, Rivero-Vilches FJ, Zaragoza C, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Differential regulation of soluble guanylyl cyclase expression and signaling by collagens: involvement of integrin-linked kinase. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Sep;16(9):2626-35.

Fujimoto S, Asano T, Sakai M, Sakurai K, Takagi D, Yoshimoto N, Itoh T. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *Eur J Pharmacol.* 2001 Feb 2;412(3):291-300.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000 Jun;105(11):1631-9.

Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2003 Mar;138(6):1085-92.

Gao Y, Vanhoutte PM. Products of cyclooxygenase mediate the responses of the guinea pig trachea to hydrogen peroxide. *J Appl Physiol.* 1993 May;74(5):2105-11.

Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 1995 Oct 2;373(1):5-9.

Geiselhoringer A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, Schlossmann J. IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J.* 2004 Oct 27;23(21):4222-31.

Granados MP, Salido GM, Gonzalez A, Pariente JA. Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem Cell Biol.* 2006 Feb;84(1):39-48.

Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation.* 1999 Sep;6(3):167-78.

Grziwa A, Baumeister W, Dahlmann B, Kopp F. Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* 1991 Sep 23;290(1-2):186-90.

Hamada K, Miyata T, Mayanagi K, Hirota J, Mikoshiba K. Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulated by calcium. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21115-8.

Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 1990 Oct 15;272(1-2):221-3.

Hattori T, Kajikuri J, Katsuya H, Itoh T. Effects of H₂O₂ on membrane potential of smooth muscle cells in rabbit mesenteric resistance artery. *Eur J Pharmacol.* 2003 Mar 19;464(2-3):101-9.

Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI, Ostvold AC. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):7467-73.

He X, Yang F, Xie Z, Lu B. Intracellular Ca²⁺ and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *J Cell Biol.* 2000 May 15;149(4):783-92.

Bibliografía

Hehner SP, Breitzkreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, Droge W.: Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4319-28.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K.: Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1954-62.

Hirota J, Michikawa T, Natsume T, Furuichi T, Mikoshiba K.: Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Lett*. 1999 Aug 6;456(2):322-6.

Hjalmarsson K, Marklund SL, Engstrom A, Edlund T.: Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Sep;84(18):6340-4.

Holmgren A.: Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:237-71.

Iglesias-De La Cruz MC, Ruiz-Torres MP, De Lucio-Cazana FJ, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D.: Phenotypic modifications of human mesangial cells by extracellular matrix: the importance of matrix in the contractile response to reactive oxygen species. *Exp Nephrol*. 2000 Mar-Apr;8(2):97-103.

Iida Y, Katusic ZS.: Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke*. 2000 Sep;31(9):2224-30.

Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D.: Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation*. 1998 Apr 7;97(13):1274-81.

Jayaraman T, Ondrias K, Ondriasova E, Marks AR.: Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science*. 1996 Jun 7;272(5267):1492-4.

Jin N, Rhoades RA.: Activation of tyrosine kinases in H₂O₂-induced contraction in pulmonary artery. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 2):H2686-92.

Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N.: The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol*. 1995 Jan;5(7):1483-91.

Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Heegaard NH, Steffensen R, Sillesen H, Jensen G, Nordestgaard BG.: Genetically reduced antioxidative protection and increased ischemic heart disease risk: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation*. 2004 Jan 6;109(1):59-65.

Kanie N, Kamata K.: Contractile responses in spontaneously diabetic mice. I. Involvement of superoxide anion in enhanced contractile response of aorta to norepinephrine in C57BL/KsJ(db/db) mice. *Gen Pharmacol*. 2000 Dec;35(6):311-8.

Kaplin AI, Snyder SH, Linden DJ.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-selective stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediates hypoxic mobilization of calcium. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2002-11.

Katusic ZS, Schugel J, Cosentino F, Vanhoutte PM.: Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am J Physiol*. 1993 Mar;264(3 Pt 2):H859-64.

Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A.: Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2004 May 18;109(19):2357-62.

Bibliografía

- Komalavilas P, Lincoln TM.** Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1994 Mar 25;269(12):8701-7.
- Krumenacker JS, Hyder SM, Murad F.** Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):717-22.
- Lawson DM, Stevenson CE, Andrew CR, Eady RR.** Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5661-71.
- Lee B, Jonas JC, Weir GC, Laychock SG.** Glucose regulates expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology.* 1999 May;140(5):2173-82.
- Lee B, Gai W, Laychock SG.** Proteasomal activation mediates down-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calcium mobilization in rat pancreatic islets. *Endocrinology.* 2001 May;142(5):1744-51.
- Lee KH, Lim S, Kang SM, Kim DH, Cho HK, Chung JH, Kwon HM, Chung H, Lee H, Jang Y, Hwang KC.** Antiproliferative mechanisms of raxofelast (IRFI-016) in H₂O₂-stimulated rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 26;484(2-3):119-25.
- Leffler CW, Busija DW, Armstead WM, Mirro R.** H₂O₂ effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets. *Am J Physiol.* 1990 May;258(5 Pt 2):H1382-7.
- Leusen JH, de Klein A, Hilarius PM, Ahlin A, Palmblad J, Smith CI, Diekmann D, Hall A, Verhoeven AJ, Roos D.** Disturbed interaction of p21-rac with mutated p67-phox causes chronic granulomatous disease. *J Exp Med.* 1996 Oct 1;184(4):1243-9.
- Lin P, Yao Y, Hofmeister R, Tsien RY, Farquhar MG.** Overexpression of CALNUC (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *J Cell Biol.* 1999 Apr 19;145(2):279-89.
- Lip GY, Edmunds E, Nuttall SL, Landray MJ, Blann AD, Beevers DG.** Oxidative stress in malignant and non-malignant phase hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002 May;16(5):333-6.
- Liu H, Force T, Bloch KD.** Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem.* 1997 Feb 28;272(9):6038-43.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 Jul 12;86(1):147-57.
- Lopez-Ongil S, Torrecillas G, Perez-Sala D, Gonzalez-Santiago L, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D.** Mechanisms involved in the contraction of endothelial cells by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1999 Mar;26(5-6):501-10.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA.** Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):375-414.
- Khan AA, Steiner JP, Klein MG, Schneider MF, Snyder SH.** IP₃ receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science.* 1992 Aug 7;257(5071):815-8.
- Kotchen JM, McKean HE, Kotchen TA.** Blood pressure trends with aging. *Hypertension.* 1982 Sep-Oct;4(5 Pt 2):III128-34.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF.** PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* 1986 Dec;59(6):612-9.

Bibliografía

- Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe KI.** Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J.* 2001 Sep;15(11):2025-6.
- Maehara K, Uekawa N, Isobe K.** Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jul 5;295(1):187-92.
- Maes K, Missiaen L, De Smet P, Vanlingen S, Callewaert G, Parys JB, De Smedt H.** Differential modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 and type 3 by ATP. *Cell Calcium.* 2000 May;27(5):257-67.
- Marklund SL.** Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(24):7634-8.
- Marklund SL.** Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.* 1984 Oct;74(4):1398-403.
- Marklund SL.** Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6696-701.
- Maximov A, Tang TS, Bezprozvanny I.** Association of the type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor with 4.1N protein in neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Feb;22(2):271-83.
- McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocypreïn). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
- Medina J, Baud L, Garcia Escribano C, Gila JA, Rodriguez Puyol D, Rodriguez Puyol M.** Tumor necrosis factor-induced contraction of cultured rat mesangial cells: interaction with angiotensin II. *J Lab Clin Med.* 1993 Aug;122(2):164-72.
- Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E.** p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Aug;279(2):H741-51.
- Michell RH.** The multiplying roles of inositol lipids and phosphates in cell control processes. *Essays Biochem.* 1997;32:31-47.
- Michikawa T, Hamanaka H, Otsu H, Yamamoto A, Miyawaki A, Furuichi T, Tashiro Y, Mikoshiba K.** Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1994 Mar 25;269(12):9184-9.
- Mikoshiba K, Hirota J, Michikawa T, Natsume T, Furuichi T.** Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Lett.* 1999 Aug 6;456(2):322-6.
- Miranda-Vizueté A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G.** Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem.* 1999 Apr;261(2):405-12.
- Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Sienaert I, Henning RH, Casteels R.** Opening up Ca²⁺ stores with InsP₃. *Nature.* 1995 Jul 27;376(6538):299-300.
- Miyawaki A, Furuichi T, Ryou Y, Yoshikawa S, Nakagawa T, Saitoh T, Mikoshiba K.** Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):4911-5.
- Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T, Iino M.** Ca²⁺-sensor region of IP₃ receptor controls intracellular Ca²⁺ signaling. *EMBO J.* 2001 Apr 2;20(7):1674-80.

Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y, Pfeifer A, Hofmann F, Nakao K. Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology*. 2002 Sep;143(9):3604-10.

Murthy KS. Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochem J*. 2001 Nov 15;360(Pt 1):199-208.

Nickenig G, Baudler S, Muller C, Werner C, Werner N, Welzel H, Strehlow K, Bohm M. Redox-sensitive vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by GSK3 and Id3 in vitro and in vivo. *FASEB J*. 2002 Jul;16(9):1077-86.

Niu CS, Chang CK, Lin LS, Jou SB, Kuo DH, Liao SS, Cheng JT. Modification of superoxide dismutase (SOD) mRNA and activity by a transient hypoxic stress in cultured glial cells. *Neurosci Lett*. 1998 Jul 31;251(3):145-8.

Oberdorf J, Webster JM, Zhu CC, Luo SG, Wojcikiewicz RJ. Down-regulation of types I, II and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors is mediated by the ubiquitin/proteasome pathway. *Biochem J*. 1999 Apr 15;339 (Pt 2):453-61.

Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Munzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2000 Nov 24;87(11):999-1005.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2546-51.

Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*. 1998 Aug;32(2):331-7.

Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milici A, Murad F, Catravas JD. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension*. 1995 Oct;26(4):696-704.

Papapetropoulos A, Abou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Caldwell RW, Catravas JD. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. *Br J Pharmacol*. 1996 Jul;118(6):1359-66.

Paravicini TM, Sobey CG. Cerebral vascular effects of reactive oxygen species: recent evidence for a role of NADPH-oxidase. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 Nov;30(11):855-9.

Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2002 Jan;15(1 Pt 1):78-84.

Patel S, Joseph SK, Thomas AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 1999 Mar;25(3):247-64.

Patterson RL, van Rossum DB, Barrow RK, Snyder SH. RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca²⁺ release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2328-32.

Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thogersen IB, Jacobsen C, Bowler RP, Fattman CL, Crapo JD, Enghild JJ. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem*. 2004 Apr 2;279(14):13705-10. Epub 2004 Jan 21.

Bibliografía

Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R.: Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*. 1996 Dec 20;274(5295):2082-6.

Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F.: Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;135:105-49.

Pilz RB, Casteel DE.: Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res*. 2003 Nov 28;93(11):1034-46.

Poitras M, Ribeiro-Do-Valle RM, Poirier SN, Guillemette G.: Bidirectional activity of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase of bovine adrenal cortex. *Biochemistry*. 1995 Aug 1;34(30):9755-61.

Rahman I, Clerch LB, Massaro D.: Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am J Physiol*. 1991 Jun;260(6 Pt 1):L412-8.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1916-23.

Rao GN, Berk BC.: Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 1992 Mar;70(3):593-9.

Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T.: Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J*. 1998 Nov 1;335 (Pt 3):637-42.

Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ.: Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*. 2001 Aug 31;89(5):408-14.

Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salices M, Marin J.: Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol*. 1998 Nov;125(6):1329-35.

Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND.: Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003 Feb;41(2):341-6.

Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH.: Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1999 Sep 17;85(6):534-41.

Russwurm M, Wittau N, Koesling D.: Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44647-52.

Sherf BA.: Dual-Luciferase[®] reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays. *Promega Notes* 57, 2-9.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P.: Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):197-201.

Schmidt H, Werner M, Heppenstall PA, Henning M, More MI, Kuhbandner S, Lewin GR, Hofmann F, Feil R, Rathjen FG.: cGMP-mediated signaling via cGKIalpha is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol*. 2002 Nov 11;159(3):489-98.

Bibliografía

- Sharina IG, Martin E, Thomas A, Uray KL, Murad F.:** CCAAT-binding factor regulates expression of the beta1 subunit of soluble guanylyl cyclase gene in the BE2 human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100(20):11523-8.
- Sheehan DW, Giese EC, Gugino SF, Russell JA.:** Characterization and mechanisms of H₂O₂-induced contractions of pulmonary arteries. *Am J Physiol.* 1993 May;264(5 Pt 2):H1542-7.
- Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY.:** Evidence for P(2)-purinoceptors contribution in H(2)O(2)-induced contraction of rat aorta in the absence of endothelium. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):574-85.
- Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY.:** Differential contractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H₂O₂. *Life Sci.* 2000 Apr 14;66(21):PL291-6.
- Shi M, Yang H, Motley ED, Guo Z.:** Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am J Hypertens.* 2004 May;17(5 Pt 1):450-6.
- Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ.:** Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):311-8.
- Silberbach M, Roberts CT.:** Natriuretic peptide signaling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal.* 2001; 13: 221-231. [↓](#)
- Sinnaeve P, Chiche JD, Nong Z, Varenne O, Van Pelt N, Gillijns H, Collen D, Bloch KD, Janssens S.:** Soluble guanylate cyclase alpha(1) and beta(1) gene transfer increases NO responsiveness and reduces neointima formation after balloon injury in rats via antiproliferative and antimigratory effects. *Circ Res.* 2001 Jan 19;88(1):103-9.
- Sipma H, Deelman L, Smedt HD, Missiaen L, Parys JB, Vanlingen S, Henning RH, Casteels R.:** Agonist-induced down-regulation of type 1 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in A7r5 and DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Cell Calcium.* 1998 Jan;23(1):11-21.
- Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Hitomi H, Kiyomoto H, Takahashi N, Kimura S, Kohno M, Abe Y.:** Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003 Feb;41(2):266-73.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G.:** A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 2):2787-96.
- Stralin P, Marklund SL.:** Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Oct;281(4):H1621-9.
- Streb H, Bayerdorffer E, Haase W, Irvine RF, Schulz I.:** Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J Membr Biol.* 1984;81(3):241-53.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME.:** Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science.* 1999 Nov 19;286(5444):1583-7.
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM.:** Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Aug;44(2):200-8.
- Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME.:** Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med.* 2003 Dec;9(12):1506-12.

Bibliografía

- Takuma K, Phuagphong P, Lee E, Mori K, Baba A, Matsuda T.**: Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J Biol Chem*. 2001 Dec 21;276(51):48093-9.
- Thengchaisri N, Kuo L.**: Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Dec;285(6):H2255-63.
- Thomas U.**: Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem*. 2002 May;81(3):407-13.
- Thongphasuk J, Oberley LW, Oberley TD.**: Induction of superoxide dismutase and cytotoxicity by manganese in human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys*. 1999 May 15;365(2):317-27.
- Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Griera M, Lopez-Ongil S, Arilla E, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D.**: The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001 Jan;59(1):104-12.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Loeffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF.**: Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron*. 1998 Oct;21(4):717-26.
- Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD.**: The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*. 1982 Sep;217(2):401-10.
- Uchida K.**: 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2003 Jul;42(4):318-43.
- Uchida K, Miyauchi H, Furuichi T, Michikawa T, Mikoshiba K.**: Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):16551-60.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK.**: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996 Sep 20;271(38):23317-21.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr.**: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9220-5.
- Venema RC, Venema VJ, Ju H, Harris MB, Snead C, Jilling T, Dimitropoulou C, Maragoudakis ME, Catravas JD.**: Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H669-78.
- Waypa GB, Schumacker PT.**: O₂ sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Respir Physiol Neurobiol*. 2002 Aug 22;132(1):81-91.
- Webster JM, Tiwari S, Weissman AM, Wojcikiewicz RJ.**: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination is mediated by mammalian Ubc7, a component of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway, and is inhibited by chelation of intracellular Zn²⁺. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):38238-46.
- Wei EP, Kontos HA, Beckman JS.**: Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol*. 1996 Sep;271(3 Pt 2):H1262-6.
- Wilcox RA, Primrose WU, Nahorski SR, Challiss RA.**: New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 1998 Nov;19(11):467-75.

Bibliografía

- Wojcikiewicz RJ, Oberdorf JA.**: Degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during cell stimulation is a specific process mediated by cysteine protease activity. *J Biol Chem.* 1996 Jul 12;271(28):16652-5.
- Wojcikiewicz RJ., Zhu CC**: Ligand binding directly stimulates ubiquitination of the inositol 1, 4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J.* 2000 Jun 15;348 Pt 3:551-6.
- Yang H, Shi M, VanRemmen H, Chen X, Vijg J, Richardson A, Guo Z.**: Reduction of pressor response to vasoconstrictor agents by overexpression of catalase in mice. *Am J Hypertens.* 2003 Jan;16(1):1-5.
- Xue B, Pamidimukkala J, Hay M.**: Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 May;288(5):H2177-84.
- Yang M, Yang Y, Zhang S, Kahn AM.**: Insulin-stimulated hydrogen peroxide increases guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 2003 Oct;42(4):569-73.
- Yang ZW, Zheng T, Zhang A, Altura BT, Altura BM.**: Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 1998 Mar 5;344(2-3):169-81.
- Yang ZW, Zhang A, Altura BT, Altura BM.**: Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca²⁺ and other cellular metabolites. *Gen Pharmacol.* 1999 Oct;33(4):325-36.
- Yoo HY, Chang MS, Rho HM.**: The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):23887-92.
- Yoshikawa S, Tanimura T, Miyawaki A, Nakamura M, Yuzaki M, Furuichi T, Mikoshiba K.**: Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 1992 Aug 15;267(23):16613-9.
- Yoshikawa F, Morita M, Monkawa T, Michikawa T, Furuichi T, Mikoshiba K.**: Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1996 Aug 26;271(30):18277-84.
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B, Griendling KK.** : Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal.* 1999 Summer;1(2):167-79.
- Zembowicz A, Hatchett RJ, Jakubowski AM, Gryglewski RJ.**: Involvement of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation induced by hydrogen peroxide in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep;110(1):151-8.
- Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades RA.**: Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Aug;19(2):324-32.
- Zhang S, Mizutani A, Hisatsune C, Higo T, Bannai H, Nakayama T, Hattori M, Mikoshiba K.**: Protein 4.1N is required for translocation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 to the basolateral membrane domain in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):4048-56.
- Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Taylor WR.**: Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. *Hypertension.* 2005 Oct;46(4):732-7.
- Zhang X, Joseph SK.**: Effect of mutation of a calmodulin binding site on Ca²⁺ regulation of inositol trisphosphate receptors. *Biochem J.* 2001 Dec 1;360(Pt 2):395-400.

Bibliografía

Zheng Y, Shen X.: H₂O₂ directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells. *Redox Rep.* 2005;10(1):29-36.

Zhu CH, Huang Y, Oberley LW, Domann FE.: A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J Biol Chem.* 2001 Apr 27;276(17):14407-13. Epub 2001 Jan 26.

Zhong L, Holmgren A. : Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J Biol Chem.* 2000 Jun 16;275(24):18121-8.

Zwiller J, Revel MO, Basset P.: Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981 Aug 31;101(4):1381-7.

Zwiller J, Revel MO, Malviya AN.: Protein kinase C catalyzes phosphorylation of guanylate cyclase in vitro. *J Biol Chem.* 1985 Feb 10;260(3):1350-3.