

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



FUNCIÓN DEL RECEPTOR DE RYANODINA EN LA CONTRACCIÓN DE
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE VENAS PULMONARES PEQUEÑAS
DE RATAS

FRANCISCA ANDREA VARAS ACUÑA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna
Prof. Dra. Carol San Martín Rovirosa

2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

FRANCISCA ANDREA VARAS ACUÑA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Fisiología** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de Mayo de 2020.

Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna

Director de Tesis

Programa de Fisiología y Biofísica, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Prof. Dra. Carol San Martín Rivorosa

Co-Directora de Tesis

Centro de Biología Integrativa

Facultad de Ciencias, Universidad Mayor

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra Andrea Paula Lima

Prof. Dra. Zully Pedrozo

Prof. Dr. Victor Reyes

Prof. Dra Mariana Casas

Presidenta Comisión

A mis tutores

Por ser un ejemplo en lo
profesional y en lo personal.

*“Grandes pensadores, grandes
personas”*

AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar con palabras la gratitud que siento por cada una de las personas que conforman el equipo del “Gran Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares & Daño pulmonar”. Sin duda gracias a ustedes todo fue y será posible.

A Mauricio, por ser simplemente una persona excepcional y un modelo a seguir. Gracias por enseñarme mucho más que ciencia. Agradezco infinitamente tu sabiduría, paciencia y apoyo en cada momento, definitivamente tienes la palabra precisa para cada momento.

A Carol, por transmitirme siempre con alegría y optimismo su conocimiento y pasión por la investigación. Admiro tu nivel de organización, responsabilidad y la dedicación que colocas en cada proyecto que emprendes.

A Marcelo, por ser un gran compañero en lo personal y profesional. Me acogiste y me enseñaste con paciencia todo lo relacionado al mundo del laboratorio. Con tu visión, conversación, música y buena disposición hiciste agradables y llevaderas las largas jornadas de trabajo. Definitivamente haces posible lo que parece imposible.

A todos los integrantes del laboratorio: Andrea Méndez, Cristian Orellana, Angy Rivas, Marco Alveal, Aline García, Luz Miranda e Italo Espinoza por los aportes desinteresados al proyecto, las conversaciones, los almuerzos y por darme ánimo en cada momento. Simplemente gracias por estar siempre disponibles y saber escuchar.

A la comisión, Dra Mariana Casas, Dra Zully Pedrozo, Dra. Andrea Paula- Lima y Dr. Victor Reyes, por su exigencia y compromiso. Sus aportes y correcciones fueron esenciales para el desarrollo de la investigación.

Agradecer también enormemente a mi madre, hermano, amigos y compañeros de trabajo que me apoyaron en cada momento y tuvieron una palabra de aliento en los momentos de flaqueza. Gracias por la comprensión, por estar siempre presentes y por darme el tiempo necesario para desarrollarme en diferentes ámbitos.

Por último, quiero dar un especial reconocimiento a mi marido, mejor amigo y compañero de aventuras. Gracias por confiar en mi y darme la seguridad necesaria para enfrentar nuevos desafíos. Sin duda tu apoyo y amor incondicional me ayudan a crecer día a día.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis ha sido desarrollada en el Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar dirigido por el Dr. Mauricio Henríquez Luna, con financiamiento otorgado por:

- Enlace Universidad de Chile (ENL029/2017); Dr. Mauricio Henríquez.
- Red para el estudio de Enfermedades Cardiopulmonares (REECPAL) Universidad de Chile; (URG-035/18), Dr. Mauricio Henríquez.
- Fondecyt Inicio (11171061), Dra. Carol San Martín.
- Beca docente UDD-DDCA 2018, Francisca Varas.

ABREVIATURAS

ACh	:	Acetilcolina
ADP	:	Adenosín Di-Fosfato
AIP	:	Arterias Intrapulmonares Pequeñas
AMP	:	Adenosín Mono-Fosfato
ATP	:	Adenosín Tri-Fosfato
AUC	:	Área bajo la curva
BK	:	Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺
Ca ²⁺	:	Calcio
[Ca ²⁺] _i	:	Concentración intracelular de calcio
[Ca ²⁺] _e	:	Concentración extracelular de calcio
CaM	:	Calmodulina
CCDV	:	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
CICR	:	Liberación de calcio inducida por calcio
4-CmC	:	4-chloro-m-cresol
Cl _{ca}	:	Canales de cloruro dependientes de Ca ²⁺
CPT	:	Capacidad pulmonar total
EC50	:	Concentración efectiva media
ET-1	:	Endotelina
HBSS	:	Solución salina balanceada de Hank
5-HT	:	Serotonina
IP3	:	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP3R	:	Receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato
MLCK	:	Kinasa de la cadena liviana de la miosina
NE	:	Norepinefrina
nM	:	Nanomolar
PCLS	:	Precised cut lung slices
PLC:	:	Fosfolipasa C
RS	:	Retículo Sarcoplasmático

RyR	:	Receptor de Ryanodina
SEM	:	Error estándar de la media
SMC	:	Células musculares lisas
SOCE	:	Store-Operated Ca ²⁺ Entry
STIM	:	Moléculas de interacción estromal
TRP	:	Canales receptores de potencial transitorio
VIP	:	Venas Intrapulmonares Pequeñas

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
1.- MARCO TEÓRICO	9
1.1.- Generalidades Receptores de Ryanodina	9
1.2.- Regulación del funcionamiento de RyR.....	10
1.3.- Participación general de RyR en la contracción de músculo liso vascular	12
1.5.- RyR en estructuras intrapulmonares.....	15
1.6.- Rol de venas intrapulmonares pequeñas:.....	21
1.7.- Metodología de estudio principales estructuras pulmonares	22
2.- HIPÓTESIS	23
3.- OBJETIVO GENERAL	23
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	23
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1.- Diseño experimental	24
5.2.- Animales.....	24
5.3.- Rebanadas de pulmón de corte preciso (PCLS)	25
5.4.- Estudios funcionales de venas intrapulmonares pequeñas (VIP).....	26
5.5.- Cálculo tamaño muestral:	26
5.6.- Análisis estadístico	26
6.- RESULTADOS	28
6.1.- Agonistas de RyR inducen contracción en VIP de ratas	28
6.2.- RyR se activa por despolarización y agonistas de receptores acoplados a proteína G en VIP de ratas.....	32
a) <i>Función del receptor de Ryanodina en la contracción de VIP de ratas inducida por despolarización</i>	33
b) <i>Función del receptor de Ryanodina en la contracción de VIP de ratas inducida por agonistas de receptores acoplados a proteína G:</i>	36
7.- DISCUSIÓN	45
8.- CONCLUSIÓN	54
9.- BIBLIOGRAFÍA	55
10.- ANEXOS	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	: Diseño experimental para cada objetivo específico.....	
Figura 1	: Respuesta contráctil de VIP a la aplicación de cafeína y 4-CmC.....	27
Figura 2	: Imagen representativa de la reducción de área luminal en VIP de rata como respuesta a la aplicación de 4-CmC 2 mM.....	29
Figura 3	: Registro representativo de contracción de VIP inducida por 4-CmC en presencia y ausencia de dantroleno o ryanodina.....	31
Figura 4	: Efecto de dantroleno y ryanodina en la contracción de VIP inducida por 4-CmC.....	32
Figura 5	: Efecto de dantroleno en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por diferentes dosis de KCl.....	34
Figura 6	: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por despolarización.....	36
Figura 7	: Efecto de dantroleno en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por diferentes dosis de ATP.....	38
Figura 8	: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ATP.....	40
Figura 9	: Efecto de dantroleno en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por diferentes dosis de ADP.....	42
Figura 10	: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ADP.....	43
Figura 11	: Efecto de dantroleno y ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ADP.....	44
Figura 12	: Modelo de participación de RyR en la contracción de venas intrapulmonares de rata.....	50

ANEXOS

ANEXO 1	: Documento de autorización Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.....	63
ANEXO 2	: Descripción curva dosis-respuesta ajustada a una función sigmoidea.....	64
ANEXO 3	: Mecanismo de despolarización inducida por KCl.....	65
ANEXO 4	: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ATP: análisis sin outlier.....	70
ANEXO 5	: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ATP y ADP: evaluación por animal	71

RESUMEN

Antecedentes: Los mecanismos contráctiles que involucran regulación de Calcio (Ca^{2+}) no están del todo comprendidos en las células musculares lisas (SMC) de venas intrapulmonares pequeñas (VIP). **Problema:** Estudios de venoconstricción mediada por agonistas fisiológicos (ATP) no han logrado detectar la participación del canal receptor de Ryanodina (RyR), sin embargo, postulamos que el RyR si participa en la contracción de VIP de una manera estímulo dependiente. **Objetivo:** Evaluar la función de RyR en la contracción de células musculares lisas de VIP de ratas medida por despolarización y agonistas de receptores acoplados a proteína G. **Metodología:** Se utilizaron rebanadas de pulmón de rata Sprague-Dawley (~300g) y mediante videomicroscopía de contraste de fase se cuantificó la contracción de VIP en respuesta a dos agonistas del RyR: cafeína y 4-CmC. También, se comparó la contracción inducida por KCl, ATP y ADP en presencia y ausencia de dos antagonistas del receptor: dantroleno y ryanodina. Los datos fueron expresados en medianas y rangos intercuartílicos. Se aplicó prueba de Mann-Whitney para comparar dos grupos no pareados y test de Friedman para comparar más de dos grupos pareados. Además se usó F-test para comparar dos curvas ajustadas. En el caso de no lograr un ajuste adecuado, se utilizó el cálculo de área bajo la curva (AUC). Se consideró significativo un valor de $p \leq 0,05$. El protocolo fue aprobado por el CICUA de Universidad de Chile (CBA#1044 FMUCH). **Resultados** La estimulación de VIP con cafeína 20 mM generó una contracción de 41,4% (18,3- 48,8) sólo en el 50% de los vasos. La aplicación de cafeína 40 mM incrementó a 59% las venas que no respondieron, mientras que el 41% restante presentó contracción isotónica. La respuesta contráctil producida por 4-CmC 2 mM fue de 72% (51,9-100) en el 100% de los vasos. La aplicación de dantroleno y ryanodina, dos inhibidores del RyR, generaron inhibición completa de la respuesta generada por 4-CmC 2 mM. Respecto al mecanismo de participación del RyR, se encontró que dantroleno no modificó la respuesta contráctil inducida por despolarización ni por ATP, pero si inhibió parcialmente la contracción inducida por ADP. Por otra parte, el uso de ryanodina disminuyó tanto la respuesta contráctil generada por despolarización como por los dos agonistas de receptores acoplados a proteína G utilizados. Al comparar los efectos de dantroleno y ryanodina en la contracción inducida por 1mM ADP, se encontró que la inhibición parcial fue similar independiente del antagonista utilizado. **Conclusión:** RyR es funcional en VIP de ratas y participa contribuyendo la

contracción inducida por despolarización como por la vía asociada a proteína G. Los resultados orientan a que RyR2 sería la isoforma más importante en la contracción inducida por despolarización, mientras que RyR1 y RyR3 participarían mayormente en el mecanismo contráctil inducido por agonistas de receptores acoplados a proteína Gq.

ABSTRACT

Background: Contraction mechanisms of smooth muscle cells (SMC) of intra pulmonary veins (IPV) that involve calcium regulation (Ca^{2+}) are not fully understood. **Problem:** venoconstriction studies mediated by physiological agonists such as ATP have failed to demonstrate the participation of Ryanodine receptors (RyR), however, we postulate that RyR does participate in IPV contraction in a stimulus dependent manner. **Objective:** To assess the role of RyR in rat IPV smooth muscle cell contraction as measured by induced depolarization and G protein-coupled receptor agonists stimulation. **Methodology:** Slices of Sprague-Dawley rat lung (~ 300g) were used and IPV contraction was quantified by phase contrast video microscopy in response to two RyR agonists: caffeine and 4-CmC. Also, the contraction induced by KCl, ATP and ADP in presence and absence of two RyR receptor antagonists: dantrolene and ryanodine was compared. Data was expressed as medians and interquartile ranges. Mann-Whitney test was applied to compare two unpaired groups and Friedman test to compare more than two paired groups. Furthermore, F-test was used to compare two fitted curves. Unfitted curves were analyzed by area under the curve (AUC). A value of $p < 0.05$ was considered significant. Animal protocol was approved by the IACUC of Universidad de Chile (CBA # 1044 FMUCH). **Results:** The stimulation of IPV with 20 mM caffeine generated a contraction of 41.4% (18.3 - 48.8) only in 50% of the vessels ($n = 6$ exps. / 5 rats). The stimulation with 40mM caffeine increased the veins that did not respond to 59%, while the remaining 41% showed isotonic contraction. The contractile response induced by of 4-CmC at 2 mM was 72% (51,9-100) in 100% of the vessels. Complete inhibition of the response generated by 2 mM 4-CmC was achieved by the application of dantrolene and ryanodine. Regarding the associated mechanism of RyR, it was found that dantrolene did not modify the contractile response induced by depolarization or by ATP, but it did generate changes in the contraction induced by ADP. The use of ryanodine decreased both the contractile response generated by depolarization as by the two G protein-coupled receptor agonists used previously. When comparing the effects of dantrolene and ryanodine on 1mM ADP-induced contraction, partial inhibition was found to be similar regardless of the antagonist used. **Conclusion:** RyR is functional in rat IPV and participates by enhancing depolarization-induced contraction as well as by G protein-associated pathway. The results indicate that RyR2 would be the most

relevant isoform in IPV contraction induced by depolarization, while RyR1 and RyR3 would participate largely in the contractile mechanism induced by Gq protein-coupled receptor agonists.

1.- MARCO TEÓRICO

1.1.- Generalidades Receptores de Ryanodina

Los RyR son canales iónicos que se encuentran en la membrana plasmática del Retículo Sarcoplasmático (RS) de diferentes tipos celulares de mamíferos y otros animales. Deben su nombre al alcaloide *ryanodine*, producido por el arbusto *Ryania speciosa*, el cual se une a los RyRs con alta afinidad y especificidad. Estos canales son responsables de la liberación de Calcio (Ca^{2+}) desde el RS hacia el citosol jugando un rol clave en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) durante la contracción del músculo liso, esquelético o cardíaco (Lanner *et al.*, 2010, Van Petegem 2012, Zalk *et al.* 2015, Wherens & Marks 2005).

En relación a las características moleculares de este canal, se puede señalar que los RyR son homo-tetrámeros con un peso molecular mayor a 2 MDa (cada subunidad es 550 kDa) con un extremo amino y carboxilo terminal cortos ubicados en el lado citosólico. En micrografías electrónicas, los RyR purificados se observan formando estructuras similares a un “hongo” (visión lateral) o un trébol (visión citoplasmática), que resultan de la disposición simétrica de cuatro subunidades idénticas (5.000 aminoácidos cada una) dejando un poro central para la salida de Ca^{2+} del RS. Este poro consta de seis a ocho segmentos de transmembrana (S1-S6) con un bucle entre S5 y S6 que contiene un gran número de residuos cargados negativamente que contribuyen a tener una alta conductancia al Ca^{2+} (Zheng *et al.* 2008a, Song *et al.* 2011, Efremov *et al.* 2015).

En mamíferos se han descrito **tres isoformas de RyR** (RyR1, RyR2 y RyR3), las cuales son codificadas por **tres genes distintos** (*RyR1*, *RyR2* y *RyR3*), que residen en cromosomas separados. La literatura señala que el receptor **RyR1** se expresa predominantemente en el músculo esquelético y se encuentra en cantidades bajas en células de Purkinje, músculo liso gástrico y linfocitos B. En relación al receptor **RyR2**, se puede señalar que originalmente se purificó en músculo cardíaco, pero también se expresa en neuronas y músculo liso visceral y arterial. Por último, **RyR3** es el menos comprendido de las isoformas RyR y parece desempeñar

un papel más importante durante el desarrollo, aunque en células maduras RyR3 se encontraría en el diafragma, células epiteliales, cerebro y músculo liso (Lanner *et al.* 2010, Van Petegem, 2012, Wherens & Marks 2005).

La secuenciación de genes publicada por NCBI (National Center for Biotechnology) correspondiente a *Rattus norvegicus*, describe que RyR3 se encuentra altamente expresado en pulmón de ratas de 6 a 104 semanas, mientras que las isoformas RyR1 y RyR2 muestran escasa cantidad de RPKM (Reads Per Kilobase Million) en este mismo tejido (NCBI/gene: Ryr1; Ryr2; Ryr3).

Cabe destacar que las secuencias de las tres isoformas en mamíferos son 65% idénticas, con algunas regiones de diversidad en la secuencia de aminoácidos (Lanner *et al.* 2010, Van Petegem 2012, Zalk *et al.* 2015, Wherens & Marks 2005).

1.2.- Regulación del funcionamiento de RyR

En relación al funcionamiento de los RyRs, se debe mencionar que estos canales-receptores son regulados por múltiples proteínas, iones y moléculas (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP y modificaciones redox), los cuales se unen a un dominio determinado del canal para modular su función. Dentro de las proteínas más conocidas que interactúan con este receptor, se encuentran la calmodulina (CaM) y el calstabin (FKBP) por el lado citosólico, además de la triadina, junctina y calsequestrina (CSQ) por la parte luminal (Lanner *et al.*, 2010, Wherens & Marks 2005).

Se sabe que la CaM inhibe la actividad de RyR2 y produce efectos bifásicos en RyR1 (Capes *et al.*, 2011), mientras que las proteínas “Calstabin1” (FKBP12) y “Calstabin2” (FKBP12.6) estabilizan el cierre de RyR1 y RyR2 (Capes *et al.*, 2011, Santulli *et al.*, 2017), disminuyendo su conductancia. Por otra parte, el complejo ternario “triadina-junctina-calsequestrina” es el encargado de detectar el contenido de Ca^{2+} luminal del retículo y modular la actividad del RyR (Wherens & Marks 2005, Capes *et al.*, 2011, Gao, 2017).

En cuanto a los iones y moléculas que regulan el funcionamiento del canal, se puede mencionar que la actividad de RyR se modifica dependiendo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugiriendo una regulación directa o indirecta a través de los canales de Ca^{2+} tipo T o L de la membrana plasmática. En

términos generales se ha observado que el canal se activa a bajas $[Ca^{2+}]_i$ (1 μ M aprox.) que se unen a sitios específicos de alta afinidad; y se inhibe a altas $[Ca^{2+}]_i$ (≥ 1 mM) que se unen a sitios de menor afinidad (Lanner *et al.*, 2010, Rajagopal & Ponnusamy, 2017). También se ha encontrado que el aumento de la $[Ca^{2+}]$ luminal en el RS puede aumentar la sensibilidad del canal favoreciendo la liberación de Ca^{2+} en presencia de ATP y cafeína (Lanner *et al.*, 2010, Gao, 2017, Tykocki *et al.*, 2017).

Por otra parte, el Mg^{2+} participa en la regulación del canal reduciendo la probabilidad de apertura a través de la competencia con el Ca^{2+} por los sitios de activación. Se ha descrito que a altas $[Ca^{2+}]$ el Mg^{2+} provoca una inhibición potente de RyR1, no ocurriendo lo mismo para RyR2 y RyR3 (Lanner *et al.*, 2010, Wherens & Marks 2005, Gao, 2017).

También se ha determinado que proteínas kinasas y fosfatasas actúan en los dominios citoplasmáticos del RyR modulando su función en respuesta a señales extracelulares. La mayoría de los estudios están dirigidos a evaluar los efectos en músculo esquelético y cardiaco, donde se señala que la fosforilación de RyR por PKA aumenta la liberación de Ca^{2+} de RS favoreciendo el acoplamiento excitación-contracción (Meissner, 2010, Wherens & Marks 2005). Respecto a lo que se sabe en músculo liso, se puede señalar en general que los vasoconstrictores estimulan la fosfolipasa C (PLC) a través de la activación de una proteína G asociada (Gq). La PLC cataliza la hidrólisis de un fosfatidil-bisfosfato de inositol a diacilglicerol (DAG) e IP3. Cada uno de estos segundos mensajeros tiene distintos efectos en la célula. El DAG activa la proteína kinasa C (PKC), mientras que el IP3 activa los canales receptores IP3 (IP3R) en el RS lo que lleva a la liberación de Ca^{2+} . Estudios realizados en cultivos celulares de músculo liso de aorta de ratón, han reportado que PKC puede regular el Ca^{2+} intracelular por su efecto sobre los canales RyR. Los autores reportaron también que la inhibición de PKC generó apertura del canal, permitiendo salida de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol, mientras que la activación de PKC bloqueó la capacidad de la cafeína para abrir este canal (Peng *et al.*, 2010).

En relación a los nucleótidos como reguladores del canal, se ha descrito que el ATP citosólico se comportaría como un activador de los canales RyR del músculo esquelético y corazón, generando salida de Ca^{2+} del RS para favorecer la contracción (Lanner *et al.*, 2010, Van Petegem, 2012, Wherens & Marks 2005).

También se ha observado que diferentes moléculas pueden modificar la probabilidad de apertura del canal. Por ejemplo, se ha especificado que la aplicación de cafeína (Pérez & Sanderson, 2005a) y 4-CmC (Lin et al., 2016a) en SMC de arterias pulmonares pequeñas, produce liberación de Ca^{2+} del RS generando secundariamente contracción vascular (Wherens & Marks 2005, Gao, 2017, Tykocki *et al.*, 2017, Rajagopal & Ponnusamy, 2017) Por otra parte, el uso de dantroleno actuaría como antagonista del receptor, mientras que ryanodina produciría una respuesta diferenciada dependiendo de la concentración utilizada. De esta manera concentraciones nanomolares de ryanodina se unirían al canal abierto dejándolo en un estado de “subconductancia”, mientras que concentraciones mayores ($\geq 100 \mu\text{M}$) harían que el canal se cerrara completamente inhibiendo la liberación de Ca^{2+} (Lanner *et al.*, 2010, Van Petegem, 2012 Zalk *et al.*, 2015, Wherens & Marks 2005, Gao, 2017, Rajagopal & Ponnusamy, 2017, Tykocki *et al.*, 2017).

1.3.- Participación general de RyR en la contracción de músculo liso vascular

En el músculo estriado, los potenciales de acción son esenciales para iniciar la liberación de Ca^{2+} del RS que desencadena la contracción. En el músculo liso (SMC) vascular en cambio, las propiedades eléctricas y mecánicas son de importancia fundamental para determinar la respuesta. En este caso, los potenciales de acción no son indispensables para los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólicas ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) necesarios para la contracción, ya que estos niveles podrían elevarse no sólo por la activación inducida por la despolarización de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (CCDV), sino también por activación mediada por receptores acoplados a proteína G (Gq) que resulta en liberación de Ca^{2+} mediada por el canal IP3R y RyR desde el RS. Sin embargo, los cambios graduales en los potenciales de membrana regulados por Cl^- , K^+ y los canales receptores de potencial transitorio TRP (canales de cationes no selectivos, sensibles a diferentes estímulos físicos, químicos o mecánicos), además de los potenciales de acción, constituyen un mecanismo importante en la regulación de la contracción vascular (Gao, 2017, Berridge 2018, Liu & Khalil, 2018).

Existen variaciones marcadas en las concentraciones de Ca^{2+} entre el espacio intracelular y extracelular, encontrándose también diferencias en los niveles de Ca^{2+} al interior del RS. La

literatura señala que en condiciones basales la $[Ca^{2+}]_i$ en SMC vasculares es alrededor de 100-300 nM, valor 10.000 veces más bajo comparado con el espacio extracelular (2 mM). El RS por su parte, maneja concentraciones de Ca^{2+} cercanas a 200 μ M (Rajagopal & Ponnusamy, 2017, Billaud *et al.*, 2014). Durante la contracción de SMC, las $[Ca^{2+}]_i$ se elevan rápidamente más de diez veces del valor basal, lo que resulta en la activación de varias cascadas de señalización que se propagan a células vecinas como una onda sinusoidal lenta producida en respuesta a cambios de presión, estiramiento y/o a la presencia de vasoconstrictores (Gao, 2017, Rajagopal & Ponnusamy, 2017, Berridge, 2008, Billaud *et al.*, 2014).

La generación de una onda lenta de calcio, se explica por la oscilación en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, que resulta de la liberación de Ca^{2+} desde el RS a través de IP3R y RyR. El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ activa los canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} (Cl_{Ca}), lo que conduce a un aumento de la salida de Cl^- intracelular y la despolarización de la membrana, seguido de la apertura de CCDV y la entrada de Ca^{2+} extracelular. Esta entrada de Ca^{2+} , a través de un proceso conocido como “*liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* ” (CICR: Calcium- induced calcium release), genera activación de RyR, el cual también puede ser estimulado por el Ca^{2+} liberado de IP3R. Mientras que la despolarización de la membrana mediada por los canales de Cl_{Ca} contribuye al aumento de las ondas lentas, la apertura de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (BK) causa hiperpolarización y cierre de los CCDV (Gao, 2017, Rajagopal & Ponnusamy, 2017, Pérez & Sanderson, 2005a, Berridge, 2008, Billaud *et al.*, 2014, Pérez & Sanderson, 2005b, Liu & Khalil, 2018). Por último, cuando el Ca^{2+} se agota dentro del RS, el depósito se vuelve a llenar a través de un fenómeno conocido como “*store-operated Ca^{2+} entry*” (SOCE). De esta manera, la reducción del contenido de Ca^{2+} en la luz del RS es detectada por moléculas de interacción estromal (STIM), mientras que las proteínas “Orai” de la membrana plasmática actuarían como canales de Ca^{2+} que permitirían rellenar los almacenes de Ca^{2+} del RS (Gao, 2017, Rajagopal & Ponnusamy, 2017, Berridge, 2008, Wright *et al.*, 2013).

Si bien, uno de los principales iones que regula la activación del RyR es el Ca^{2+} (Gao, 2017, Meissner, 2017, Wherens & Marks 2005), el mecanismo de estimulación de este receptor vía CICR aún es controversial en lo referente a músculo liso y aún se discute si el ingreso de Ca^{2+} por CCDV y la salida de Ca^{2+} vía IP3R es suficiente para estimular RyR.

Los estudios muestran que las oscilaciones de Ca^{2+} difieren entre distintos vasos e incluso en un mismo vaso en relación a la aplicación de distintos vasoconstrictores (Pérez & Sanderson, 2005a, Henríquez *et al.*, 2018, Held *et al.*, 1999, Cortijo *et al.*, 1997), sin embargo los mecanismos implicados aún no están del todo claros y requieren de mayor investigación.

La despolarización de la membrana del músculo liso genera apertura de canales Ca^{2+} de tipo L, lo que trae como consecuencia el aumento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se ha descrito que el Ca^{2+} que entra por estos canales podría no ser suficiente para inducir la contracción debido a la capacidad de los tampones citoplasmático de Ca^{2+} presentes en la célula puede reducir la concentración del ion rápidamente (Somlyo, 1985, Itoh *et al.*, 1985). Por lo tanto, en este escenario se postula la existencia de una fuente adicional de Ca^{2+} proveniente del RS, investigándose varios mecanismos posibles para la amplificación de la señal para lograr la vasoconstricción.

Una posibilidad para la amplificación de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L podría ser la activación de RyR por el mecanismo de CICR descrito en miocitos cardíacos (Fabiato, 1985). Sin embargo, estudios realizados en husos musculares de guinea pig, sugieren que CICR no es el mecanismo fisiológico primario de liberación de Ca^{2+} en músculo liso, ya que se requieren concentraciones de Ca^{2+} más altas para activar CICR que para inducir la contracción (Iino, 1990)

Hasta el momento se ha propuesto como hipótesis que el mecanismo de CICR en el músculo liso ocurre a través de un proceso conocido como "acoplamiento flexible" (loose coupling) para indicar las características no obligatorias y que proporcionan una forma efectiva de integrar el grado de activación de los CCDV, en contraste con el "acoplamiento estrecho" que se observa en el músculo cardíaco y esquelético. Las características del "acoplamiento flexible" son: liberación focal que surge de áreas individuales de la célula; retraso de CICR (ya que la amplificación solo es evidente 50-100 ms después de la activación de CCDV en comparación con 7 ms en las células cardíacas); y acoplamiento no obligatorio, en el cual CICR dependería del flujo neto de Ca^{2+} en lugar de la probabilidad de apertura de CCDV (Wherens & Marks 2005).

1.5.- RyR en estructuras intrapulmonares

En términos generales, se puede señalar que se han publicado pocos artículos que evidencien la expresión cuantitativa y las funciones fisiológicas de las isoformas individuales de RyR en el músculo liso de estructuras intrapulmonares. La mayor cantidad de estudios se han enfocado en vía aérea (Pérez & Sanderson, 2005b, Pérez & Sanderson, 2005b, Held *et al.*, 1999, W. Du *et al.*, 2005, Bergner & Sanderson, 2002, Hiorns *et al.*, 2016, Rosner *et al.*, 2014), y arterias intrapulmonares pequeñas (AIP) (Pérez & Sanderson, 2005a, Lin *et al.*, 2016b, Held *et al.*, 1999, Cortijo *et al.*, 1997, Zheng *et al.*, 2005) sin encontrarse estudios concluyentes en VIP (Henríquez *et al.*, 2018, Cortijo *et al.*, 1997, Ding & Murray, 2005).

Los agonistas más utilizados para evaluar los diferentes canales iónicos implicados en la contracción muscular de vía aérea o vasos intrapulmonares, son acetilcolina (ACh) (Pérez & Sanderson, 2005b, Bergner & Sanderson, 2002), serotonina (5-HT) (Pérez & Sanderson, 2005a, Pérez & Sanderson, 2005b, Cortijo *et al.*, 1997, Morecroft *et al.*, 1999, Bai *et al.*, 2009), endotelina (ET-1) (Henríquez *et al.*, 2018, Held *et al.*, 1999, Tykocki *et al.*, 2015), ATP (Henríquez *et al.*, 2018, Zheng *et al.*, 2005) y cloruro de potasio (KCl) (Pérez & Sanderson, 2005a, Pérez & Sanderson, 2005b, Henríquez *et al.*, 2018, Bai *et al.*, 2009, Ratz *et al.*, 2005), estableciendo de manera general que las vías implicadas difieren según la estructura estudiada y los estímulos utilizados.

- Bronquiolos:

Diferentes publicaciones han estudiado la participación de RyR en la contracción y en la liberación de Ca^{2+} desde el RS en SMC de bronquios intrapulmonares. La metodología más utilizada es la aplicación de un agente constrictor como cafeína (agonista RyR), en conjunto con ryanodina o dantroleno (inhibidores RyR) (Pérez & Sanderson, 2005b, W. Du *et al.*, 2005, Bergner & Sanderson, 2002, Bai *et al.*, 2009).

Respecto a lo anterior, estudios funcionales realizados en rebanadas de pulmón de ratón, encontraron que la perfusión con cafeína (20 mM) generó un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y broncoconstricción, indicando de esta manera que RyR es funcional al ser evaluado bajo estas condiciones (Pérez & Sanderson, 2005b).

Con el objetivo de evaluar la participación de RyR en el proceso contráctil y en las oscilaciones de Ca^{2+} , Pérez y Sanderson (2005) realizaron experimentos en rebanadas de pulmón de ratón perfundidas con 5-HT, ACh y KCl en presencia y ausencia de cafeína (Pérez & Sanderson, 2005b). Respecto a este punto, es importante señalar que los dos agonistas mencionados en primer lugar (5-HT y ACh) generan broncoconstricción vía proteína G (Gq), mientras que el tercero (KCl) lo hace vía despolarización, activando los canales de Ca^{2+} tipo L (Gao, 2017, Pérez & Sanderson, 2005b).

Algunos de los resultados encontrados por los autores, muestran que la perfusión de 5-HT y ACh en bronquiolos, generaron una reducción luminal cercana al 60% mantenida por más de dos minutos, la cual incluso podía iniciarse pero no mantenerse en ausencia de Ca^{2+} extracelular o en presencia de Nifedipino (antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo L). Por otra parte, el uso 100 mM de KCl provocó una contracción irregular y espasmódica del 14% en estas mismas estructuras (siguiendo el mismo modelo) (Pérez & Sanderson, 2005b).

En relación a las mediciones de Ca^{2+} intracelular, se puede señalar que la aplicación de $1\mu\text{M}$ de 5-HT o ACh en la vía aérea pequeña produjo un aumento inicial de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguido rápidamente de oscilaciones. Estas oscilaciones de Ca^{2+} ocurrieron de forma asincrónica acompañadas de una contracción sostenida que generaron acortamiento y desplazamiento de las SMC hacia el lumen. Resultados diferentes se encontraron al evaluar la respuesta de KCl, donde se observaron oscilaciones de menor frecuencia acompañadas de contracciones transitorias locales de células múltiples o individuales (Pérez & Sanderson, 2005b).

El mecanismo más probable para la generación de oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por 5-HT o ACh, es la activación de fosfolipasa C (PLC) a través de un receptor acoplado a proteína G, el cual genera IP3 que se une a los receptores de IP3R en el RS iniciando los ciclos repetitivos de liberación y recaptación de Ca^{2+} (Bergner & Sanderson, 2002, Roux *et al.*, 1997, Pabelick *et al.*, 2001, Janssen, 2002). La inhibición de la respuesta contráctil en presencia de cafeína, sugiere parcialmente que el RyR contribuyen a los flujos de Ca^{2+} que ocurren durante las oscilaciones, sin embargo se requieren otros experimentos que permitan determinar con certeza la participación de RyR en la contracción de la vía aérea intrapulmonar. En este caso la aplicación de cafeína previo a la perfusión con 5-HT o ACH no sólo significa que RyR se encuentra

inhabilitado de participar en el proceso por permanecer en estado abierto, sino que también implica vaciamiento del RS lo que impide liberación de Ca^{2+} por parte de IP3R, inhibiendo de igual manera la contracción. Por último, es importante mencionar que la mantención de la contracción sólo es posible en presencia de Ca^{2+} extracelular, de esta manera se puede llevar a cabo el relleno de los almacenes de Ca^{2+} de RS, situación que explicaría la disminución del tiempo contráctil en los bronquios estudiados en ausencia de Ca^{2+} externo (W. Du *et al.*, 2005).

Respecto a los efectos del KCl, se hipotetiza que la depolarización causada por este compuesto iniciaría un influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo T, que sería compensado por la actividad de SERCA en la membrana del RS. Una vez que el RS alcanza una carga crítica de Ca^{2+} , se desencadenaría una fase extendida de CICR a través de RyR, generándose una onda de Ca^{2+} y una contracción transitoria de SMC antes de iniciar nuevamente el ciclo (Pérez & Sanderson, 2005b, W. Du *et al.*, 2005).

Estudios realizados en rebanadas de pulmón de ratón utilizando ryanodina como bloqueador del RyR en tres dosis diferentes (1 μM , 10 μM y 50 μM), encontraron que ni la contracción de las vías respiratorias ni las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por dos agonistas acoplados a proteína G (5-HT y Metacolina) fueron inhibidas en estas condiciones. Por el contrario, ryanodina (50 μM) bloqueó completamente las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por KCl (50 mM). Estos resultados indican que en SMC de vía aérea pequeña de ratón, las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por dos agonistas acoplados a proteína G están mediadas principalmente a través de IP3R, mientras que RyR se encontraría participando en la liberación de Ca^{2+} desde el RS en la contracción inducida por KCl (Bai *et al.*, 2009). Sin embargo, experimentos realizados por Bergner *et al* utilizando el mismo modelo (rebanadas de pulmón murino), dieron como resultado que la incubación ryanodina (200 μM) inhibió la señalización de Ca^{2+} inducida por ACh (10 μM), indicando de esta manera que las oscilaciones de Ca^{2+} necesarias para mantener la contracción de bronquios, son generadas por la liberación de Ca^{2+} del RS a través de IP3R y RyR (Bergner & Sanderson, 2002).

Du *et al*, realizando experimento en anillos bronquiales de ratón, encontró que tanto ryanodina (200 y 300 μM) como dantroleno (25 μM) disminuyeron la respuesta contractil y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por carbacol, sin embargo es importante considerar que ryanodina atenúa la respuesta

del carbacol en todo el rango de concentraciones evaluadas (50 nM a 3 μ M), a diferencia de lo que ocurrió con dantroleno, el cual inhibió el efecto sólo concentraciones mayores o iguales a 500 nM, sin observarse diferencias a concentraciones bajas del agonista (W. Du *et al.*, 2005). Respecto a los resultados encontrados, se ha descrito que ryanodina inhibe las tres isoformas de RyR, mientras que dantroleno sólo inhibe RyR1 y RyR3 (Zhao *et al.*, 2001, Fruen *et al.*, 1997), lo que podría explicar las diferencias encontradas al utilizar ambos antagonistas con un mismo broncoconstrictor.

También se han utilizado otros métodos para estudiar la presencia de RyR en bronquios. De esta manera, Du *et al* utilizando RT-PCR, encontró expresión de los mRNA de las tres isoformas de RyR en vía aérea de ratón, siendo RyR2 más abundantes en bronquios y RyR1 en células musculares lisas aisladas obtenidas de cultivo primario (W. Du *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios realizados en SMC bronquiales humanas identificaron mayor expresión de RyR3 en relación a las otras dos isoformas (Hyvelin *et al.*, 2000).

Respecto al uso de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se ha descrito que RyR1 se encuentra distribuido mayormente hacia la periferia celular (cerca de la membrana celular), mientras que RyR3 estaría ubicado principalmente alrededor del núcleo. Aunque la expresión de RyR2 en SMC de bronquiolo de ratón se demostró mediante RT-PCR, no ha logrado detectarse por IFI posiblemente debido a falta de eficacia del anticuerpo utilizado.(W. Du *et al.*, 2005)

- *Arterias intrapulmonares (AIP)*

Diferentes estudios han investigado la expresión, localización y función del RyR en arterias intrapulmonares (AIP).

Desde el punto de vista funcional, experimentos realizados en rebanadas de pulmón de ratón perfundidos con cafeína (20 mM), mostraron como resultado contracción y liberación de Ca^{2+} en AIP, concluyendo que RyR es funcional bajo estas condiciones en los vasos estudiados (Pérez & Sanderson, 2005a). Resultados similares fueron encontrados por Zheng *et al* en vasos de resistencia pulmonar aislados y desnudos de endotelio, al aplicar cafeína (10 mM) y 4-CmC (0,3 y 3 mM) como agonistas del RyR (Zheng *et al.*, 2008b, Zheng *et al.*, 2005).

Para determinar si los canales RyR del RS estaban implicados en la contracción de AIP por despolarización, Pérez y Sanderson, utilizando la técnica de rebanada de pulmón en ratones, evaluaron los efectos de la cafeína (para bloquear el RyR en estado abierto, depletando de esta manera el RS) en la respuesta inducida por KCl (100 mM). Los resultados encontrados, muestran que la contracción fue inhibida completamente bajo estas condiciones. Posteriormente realizaron experimentos en ausencia de $[Ca^{2+}]_e$ y bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L (nifedipino), observando igualmente que la contracción fue abolida en estas circunstancias. También observaron que en condiciones de aplicación de cafeína en ausencia de $[Ca^{2+}]_e$ la contracción igualmente se producía, pero desaparecía rápidamente, y volvía a aparecer al volver a aumentar la $[Ca^{2+}]$ en el medio externo. Ante estos resultados, los autores concluyeron que RyR es funcional en AIP de ratas participando en la despolarización. De esta manera, la vía propuesta para la contracción inducida por KCl implicaría apertura de los CCDV, aumento de los niveles de Ca^{2+} en el citosol y estimulación del RyR vía CICR. Eso explicaría la inhibición completa de contracción en ausencia de Ca^{2+} externo y del RS (Pérez & Sanderson, 2005a).

Experimentos similares se realizaron utilizando 5-HT como agonista de receptores acoplados a proteína G para estimular la contracción. En este caso encontraron que la ausencia de Ca^{2+} del medio externo no inhibió ni disminuyó la contracción de AIP, a diferencia de lo observado al depletar el RS, donde la respuesta contráctil fue inhibida completamente. En este caso, ellos concluyen que el Ca^{2+} del RS es indispensable para generar la contracción. Sin embargo estos experimentos no permiten discriminar si efectivamente RyR participa en el proceso.

Estudios realizados con cuatro diferentes antagonistas del RyR (dantroleno, ryanodina, ruthenium red y tetracaína), encontraron disminución en la contracción inducida por norepinefrina (NE) en anillos vasculares de AIP de rata (Zheng *et al.*, 2005). Estos resultados indican que RyR juega un rol importante en la liberación de Ca^{2+} y en la contracción inducida por NE en arterias pulmonares de rata. Se requieren más estudios para determinar participación de RyR en la estimulación con ATP.

Respecto a la expresión de RyR en este tipo de vasos pulmonares, Yang *et al.* encontraron presencia de las tres isoformas de RyR con mayor predominio de RyR2 en arterias intralobares de ratas (Western blot, RT-PCR, qPCR e inmunofluorescencia). Además determinó que los

RyRs se localizan generalmente en las zonas sub-endoplásmicas y perinucleares, existiendo diferencias en la distribución de varios subtipos RyR en estas regiones. Los experimentos de inmunotinción y las imágenes confocales de alta resolución, muestran que RyR1 está presente tanto en los sitios periféricos como perinucleares; RyR2 se encuentra principalmente en los sitios periféricos, mientras que RyR3 reside difusamente en la región perinuclear y citosol (Yang *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2005)

- *Venas intrapulmonares (VIP)*

Estudios sobre la contractilidad realizado en venas pulmonares, han encontrado una importante contracción local al estimular con catecolaminas, 5-HT, angiotensina II, histamina, endotelina y vasopresinas, además de hipoxia y alcalosis (Henríquez *et al.*, 2018, Michelakis *et al.*, 2001, Gao & Raj, 2005). Sin embargo, se han encontrado algunas diferencias en los mecanismos que regulan la contracción de VIP comparado con AIP.

Experimentos realizados en rebanadas de pulmón de rata, han demostrado que al estimular con ATP se genera una respuesta contráctil dependiente de PLC que se relaciona con oscilaciones de Ca^{2+} intracelular. Las señales de Ca^{2+} fueron caracterizadas por un incremento inicial seguida inmediatamente de oscilaciones que persistieron con frecuencia y amplitud constante en presencia de ATP y cedían bruscamente después de que el ATP fuera removido (Henríquez *et al.*, 2018). Estos resultados difieren con los encontrados en AIP donde la aplicación de ATP (100 μ M, 30 s) indujo tres a cuatro aumentos cíclicos de $[Ca^{2+}]_i$ de amplitud decreciente (Guibert *et al.*, 1996)

Al evaluar la contracción pulmonar inducida por ATP en VIP en ausencia de $[Ca^{2+}]_e$, se encontró que en estas condiciones se producía un incremento inicial de $[Ca^{2+}]_i$ seguido de una disminución rápida de las oscilaciones de Ca^{2+} en relación al basal (Henríquez *et al.*, 2018). Aunque estos resultados indican que $[Ca^{2+}]_e$ no se requiere para iniciar la contracción, efectivamente sería importante para mantenerla, consistente con lo encontrado en arterias pulmonares (Pérez & Sanderson, 2005a). En este contexto, la función del $[Ca^{2+}]_e$ podría estar relacionado con el llenado de los almacenes de Ca^{2+} intracelular a través de SOCE (*Store-Operated Ca^{2+} Entry*) (Gao, 2017, Kuo & Ehrlich, 2015, Levitan, 2016).

En relación al rol de IP3R y RyR en VIP, se sabe que en circunstancias donde el IP3R está bloqueado la contracción inducida por ATP se inhibe completamente. Sin embargo, al aplicar ATP en presencia de un bloqueador de canales RyR (Ryanodina 50 μM), se encontró que no hubo cambios en las oscilaciones de Ca^{2+} comparados con aplicación de ATP en ausencia de ryanodina. Por otra parte, para confirmar que el receptor de ATP involucrado en las respuestas de VIP pertenecía a la familia P2Y, se realizaron experimentos en ausencia de Ca^{2+} extracelular, encontrándose que tanto la contracción como las oscilaciones de Ca^{2+} se mantenían en estas condiciones. Estos resultados sugieren la contracción de VIP inducida por ATP depende de la estimulación de los receptores metabotrópicos P2Y2, la activación de PCL- β , la liberación de Ca^{2+} intracelular y la generación de oscilaciones de Ca^{2+} mediadas por IP3R en el RS de las SMC de VIP (Henríquez *et al.*, 2018).

Respecto a la expresión y localización de RyR en venas pulmonares, no se ha encontrado información publicada.

1.6.- Rol de venas intrapulmonares pequeñas:

Históricamente el estudio de patologías que comprometen el flujo sanguíneo pulmonar se ha enfocado principalmente en arterias, sin embargo desde el año 1973 se tiene evidencia sobre la presencia de músculo liso en la pared de venas intrapulmonares, lo que confiere la posibilidad de que las VIP puedan participar activa y dinámicamente en la regulación de la resistencia pulmonar total como respuesta a distintos estímulos (Hislop & Reid, 1973). En relación a esto último, se plantea la existencia de una fuerte relación inversa entre el diámetro externo de las venas y el grosor de su pared, lo que implicaría que el grosor de la pared de las venas de menor tamaño (diámetro $\leq 300 \mu\text{m}$) incrementaría conforme disminuye el diámetro externo. Considerando que más del 57% de los vasos venosos intrapulmonares tienen un diámetro menor a $500 \mu\text{m}$ (Counter *et al.*, 2013), la contribución que la red venosa pulmonar puede generar en el aumento de la resistencia y presión vascular pulmonar puede ser considerable, sin embargo ha sido escasamente discutida. Considerando estos antecedentes, se hace necesario investigar a fondo los mecanismos implicados en la liberación de Ca^{+2} y la participación de RyR en la contracción de VIP.

1.7.- Metodología de estudio principales estructuras pulmonares

Existen inconvenientes técnicos que dificultan el acceso a vasos pulmonares pequeños. La mayoría de los estudios publicados utilizan miografía de anillos vasculares y células musculares aisladas, para evaluar la contracción de SMC (Lin *et al.*, 2016b, Cortijo *et al.*, 1997, W. Du *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2005), sin embargo esta metodología implica separar la musculatura lisa del tejido circundante, dificultando de esta manera la interpretación fisiológica de los datos. Por esta razón la técnica de rebanadas de pulmón desarrollada en la última década (Precision Cut Lung Slices; PCLS) presenta una ventaja clave al preservar las interacciones funcionales entre vía aérea, arteriolas y venas dentro del parénquima alveolar (Hiorns *et al.*, 2016, Sanderson, 2011). Estas rebanadas de pulmón se mantienen viables por alrededor de 3 a 6 días, conservando muchos aspectos de la organización estructural y funcionalidad celular de las porciones de vasos y vía aérea dentro del parénquima alveolar (Sanderson, 2011) e incluso hay registros de que pueden mantener sus propiedades funcionales, viabilidad celular y reactividad de la vía aérea tras dos semanas de crio preservación (Rosner *et al.*, 2014).

El hecho de que el PCLS permita observar a través de un microscopio convencional de forma inmediata los cambios dinámicos de contracción y relajación de los distintos componentes de la rebanada en su conjunto y en relación con el microambiente que lo rodea, permite hacer un análisis que considera las fuerzas de retracción de las fibras elásticas, la rigidez del tejido conectivo y las fuerzas estresoras involucradas (Sanderson, 2011).

2.- HIPÓTESIS

El receptor de Ryanodina es funcional en venas intrapulmonares pequeñas de ratas, participando en la contracción de células musculares lisas.

3.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función del receptor de Ryanodina en la contracción de células musculares lisas de venas pulmonares pequeñas de ratas mediada por despolarización y por agonistas de receptores acoplados a proteína G.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.1.- Objetivo específico 1

Evaluar la función del receptor de Ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas de ratas, inducida a través de dos agonistas del receptor.

4.2.- Objetivo específico 2

Evaluar la función del receptor de Ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas de ratas, inducida por despolarización y principales agonistas asociados a proteína G.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Diseño experimental

En la **tabla 1** se muestra el diseño experimental para cada objetivo específico planteado.

OBJETIVO	EXPERIMENTOS	CONDICION EXPERIMENTAL	
Evaluar la función del receptor de Ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas (VIP) de ratas, inducida a través de dos agonistas del receptor.	Se midió la contracción de VIP inducida por cafeína y 4-CmC mediante estudios funcionales realizados en rebanadas de pulmón de corte preciso (PCLS) de ratas sanas.	Cafeína	Medición de la contracción (expresada en mediana y rangos intercuartiles).
		4-CmC	
Evaluar la función del receptor de Ryanodina en la contracción de VIP de ratas, inducida por depolarización y dos agonistas asociados a proteína G.	Se midió la contracción de VIP inducida por KCl, ATP y ADP mediante estudios funcionales realizados en PCLS de ratas sanas en presencia y ausencia de un antagonista de RyR: dantroleno o ryanodina.	KCl vs KCl+ dantroleno	Realización de curvas dosis respuesta (cálculo de EC50 o Área bajo la curva)
		ATP vs ATP+ dantroleno	
		ADP vs ADP+ dantroleno	
		KCl vs KCl + ryanodina	Medición de la contracción (expresada en mediana y rangos intercuartiles).
		ATP vs ATP+ ryanodina	
		ADP vs ADP+ ryanodina	

Tabla 1: Diseño experimental para cada objetivo específico

5.2.- Animales

Todos los procedimientos fueron realizados en concordancia con las guías nacionales de manejo de animales y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Protocolo CBA#1044 FMUCH) (Anexo 1). Se utilizaron 28 ratas macho, especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague – Dawley de edad mayor a 42 – 45 días con pesos entre 250 – 300 grs. Los animales se mantuvieron en el bioterio central de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile con temperatura ambiental entre 18 y 23°C controlada de acuerdo a las normas de *housing* del bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con alimentación y agua *ad libitum*, hasta su traslado al laboratorio de dinámicas broncovasculares y daño pulmonar para su eutanasia. Los animales fueron eutanasiados a través de una inyección anestésica de ketamina 180 mg/kg (Centrovit) – xilazina 18 mg/kg (Ilium),

vía intraperitoneal, la que fue administrada con el fin de generar narcosis previo al método físico de eutanasia correspondiente a la apertura torácica bajo anestesia profunda.

5.3.- Rebanadas de pulmón de corte preciso (PCLS)

Las ratas eutanasiadas fueron posteriormente transferidas al panel de disección quirúrgica en condiciones de asepsia de acuerdo al protocolo de bioética. Se aplicó etanol al 100% desde cuello hasta abdomen con el fin de evitar contaminación y se realizó una toracotomía media anterior, desde la escotadura yugular hasta el apéndice xifoideas. El corte torácico fue ampliado en la base del tórax hacia cada lado, para obtener acceso amplio a ambos pulmones.

Luego se canuló la tráquea con un tubo de catéter intravenoso (NIPRO) el que se fijó en la posición óptima con cinta adhesiva. Por esta vía, los pulmones colapsados fueron reclutados a capacidad pulmonar total (CPT) con una infusión de agarosa (Axygen) al 2% en HBSS (mantenida a 37°C) mediante una jeringa. Posteriormente se perfundieron los vasos intrapulmonares con solución de gelatina al 6% (Becton, Dickinson) mantenida a 37°C, a través de la arteria pulmonar, por inyección en el ventrículo derecho por medio de un catéter intravenoso (NIPRO). Se solidificó la agarosa y la gelatina manteniendo el cuerpo de la rata a 4°C durante 30 a 40 minutos.

Pasado este tiempo, se removieron los pulmones y el corazón y se mantuvieron en HBSS frío. Se cortaron y separaron los lóbulos pulmonares, y se transfirió cada segmento pulmonar a un vibrátomo (Compresstome VF-300), con la base del lóbulo situado en la base de un émbolo del equipo. El segmento pulmonar fue adherido y cubierto con gelatina 6%.

Una vez que la gelatina se solidificó en frío, el bloque se cortó en secciones seriadas de 150 µm, las que fueron almacenadas por un período breve en HBSS frío. Por último, se mantuvieron las rebanadas en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado con penicilina (CALBIOCHEM) y estreptomina (SIGMA) a 37°C y CO₂ 5% en incubadora de cultivo celular hasta por 24 horas. En estas condiciones de temperatura la gelatina contenida en los vasos sanguíneos se disuelve dejando libre el lumen para su posterior estudio funcional en microscopio invertido.

5.4.- Estudios funcionales de venas intrapulmonares pequeñas (VIP)

Las venas pulmonares pequeñas menores a 200 μm obtenidas de las rebanadas, se observaron bajo un microscopio invertido de contraste de fase modelo DXS-2 trinocular a 25x. Las rebanadas de pulmón de corte preciso (PCLS) fueron expuestas a diferentes agonistas y antagonistas bajo el microscopio mediante perfusión automatizada. Los registros se realizaron a través de un sistema de fotocaptura con el software S-Viewer que permitió obtener las imágenes desde una cámara digital de alta resolución 0,45x modelo SXY – I30 de 3.0M píxeles acoplada al microscopio, capturando fotografías a 0,5 Hz durante todo el proceso de perfusión del sistema. Los registros fueron analizados en el programa de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ, el cual permitió determinar el cambio en el área de la vena para cada tiempo del experimento (en base a los píxeles de cada fotografía). Con los valores obtenidos de área por segundo, se construyeron gráficos de registros (área vs tiempo), desde los cuales se obtuvieron los valores de la máxima reducción de área lograda por cada agonista utilizado en cada experimento.

5.5.- Cálculo tamaño muestral:

Considerando un nivel de confianza de 95%, precisión de 60%, proporción de 40%, y un 15% de pérdidas, se estimó el uso de 4 animales por grupo (de acuerdo a condición experimental correspondiente a tabla 1) , lo que da un total de 28 ratas.

5.6.- Análisis estadístico

En cada experimento se realizó un mínimo de 1 y máximo de 6 registros. Los resultados de contracción son mostrados como mediana y rango intercuartílico o como la media \pm S.E.M. (standard error of the mean) para el caso de las curvas dosis - respuesta. La comparación de respuesta entre grupos se realizó utilizando los valores de contracción del agonista normalizada por la contracción máxima lograda por 50 mM de K^+ . Para los análisis se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 8.0 y la significancia estadística se analizó con prueba de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos independientes y test de Friedman para comparaciones en más de dos grupos pareados, aplicando test de Dunns para comparar entre columnas. Las curvas dosis- respuesta fueron ajustadas a una sigmoidea de acuerdo a la fórmula

($Y = \text{Valor mínimo} + (\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{pendiente de Hill}))}$), que permitió el cálculo de EC50 (Anexo 2); se utilizó F-Test para comparar dos curvas. En caso de no lograr un ajuste correcto, se calculó y comparó el área bajo la curva (AUC) para determinar diferencias. Para todas las comparaciones se consideró significativo un valor de $p \leq 0,05$.

6.- RESULTADOS

6.1.- Agonistas de RyR inducen contracción en VIP de ratas

Con el objetivo de activar a los RyRs, se decidió utilizar en primera instancia cafeína como agonista del receptor. Este compuesto ha mostrado tener buenos resultados en la liberación de Ca^{2+} del RS y en la contracción de músculo liso de bronquiolos y arterias pulmonares de ratón (Wherens & Marks 2005, Zheng *et al.*, 2008a, Pérez & Sanderson, 2005a, Meissner, 2017, Echeverri *et al.*, 2010, Kong *et al.*, 2008).

Nuestros resultados muestran que el 50% de las VIP estimuladas con cafeína 20 mM (*figura 1a*) presentaron contracción concéntrica (que implica reducción del área luminal) con una mediana y rango intercuartílico equivalente a 41,4% (18,3% - 48,8%) (n = 6 exps./ 5 ratas) (*figura 1b*). El aumento de la concentración de cafeína a 40 mM no logró reclutar más venas sensibles, sino que se incrementó a un 59% las venas que no respondieron, mientras que el 41% restante sólo presentó contracción isotónica, es decir, sin cambios en el área del lumen vascular (n= 17 exps. / 6 ratas) (*figura 1a*).

Considerando que los resultados con cafeína parcialmente demuestran que el RyR es funcional en VIP, se realizaron experimentos con 4-CmC, otro agonista del receptor (Zheng *et al.*, 2008a, Zorzato, 1993, Al-Mousa & Michelangeli, 2009) que ha demostrado incrementar las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en arterias pulmonares de rata (Zheng *et al.*, 2008a).

El estímulo con 1 mM de 4-CmC produjo una contracción de 22,1% (12,4% - 31,8%; n= 4 exps./ 3 ratas) en el 50% de las venas estudiadas (*figura 1a y 1b*). Considerando que la respuesta observada no fue consistente, se aumentó la concentración de 4-CmC a 2 mM, obteniéndose una contracción de 72% (51,9% - 100%) en el 100% de los vasos estudiados (n= 14 exps./ 6 ratas) (*figura 1a y 1b*). De acuerdo a que los resultados obtenidos mostraron que sólo 4-CmC 2 mM generó una respuesta cuantificable y consistente en todas las VIP estudiadas, se decidió utilizar este compuesto en la concentración señalada para continuar con la investigación. En la *figura 2*, se muestran imágenes de una VIP en condiciones basales (a) y luego de la aplicación de 4-CmC 2 mM (b-h), observándose una reducción sucesiva del área luminal la VIP de rata como respuesta a la aplicación de 4-CmC.

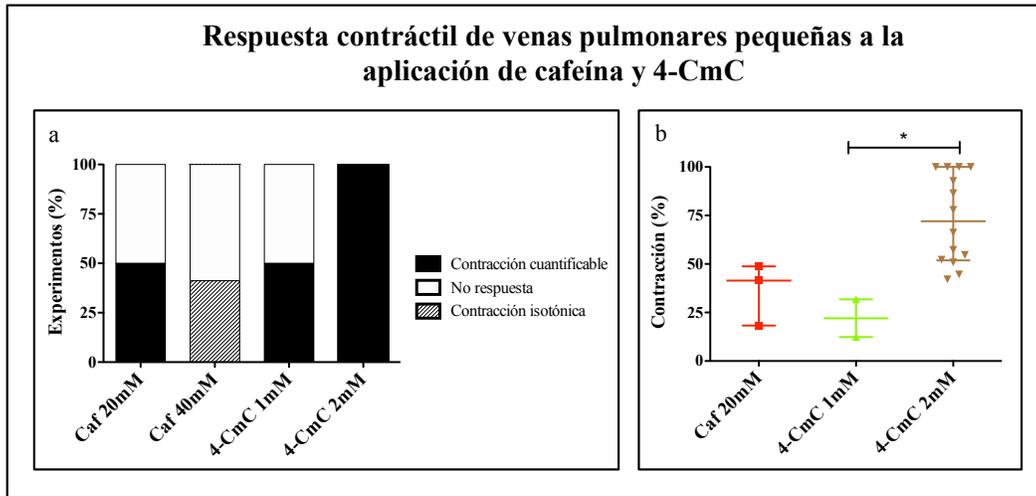


Figura 1: Respuesta contráctil de VIP a la aplicación de cafeína y 4-CmC.
a: Porcentaje y respuesta de venas pulmonares a diferentes dosis de cafeína y 4-CmC. **b:** Cuantificación de la contracción de venas pulmonares respondedoras en relación al uso de cafeína y 4-CmC expresada en mediana y rangos intercuartiles. Cafeína 20 mM (n=3 exps. / 2 ratas); cafeína 40 mM (n= 17 exps./ 6 ratas); 4-CmC 1 mM (n= 2 exps./ 2 ratas.); 4-CmC 2 mM (n= 14 exps./ 6 ratas). Perfusión de 5 minutos para cada agonista. Análisis estadístico en base a test de Kruskal-Wallis * $p \leq 0,5$

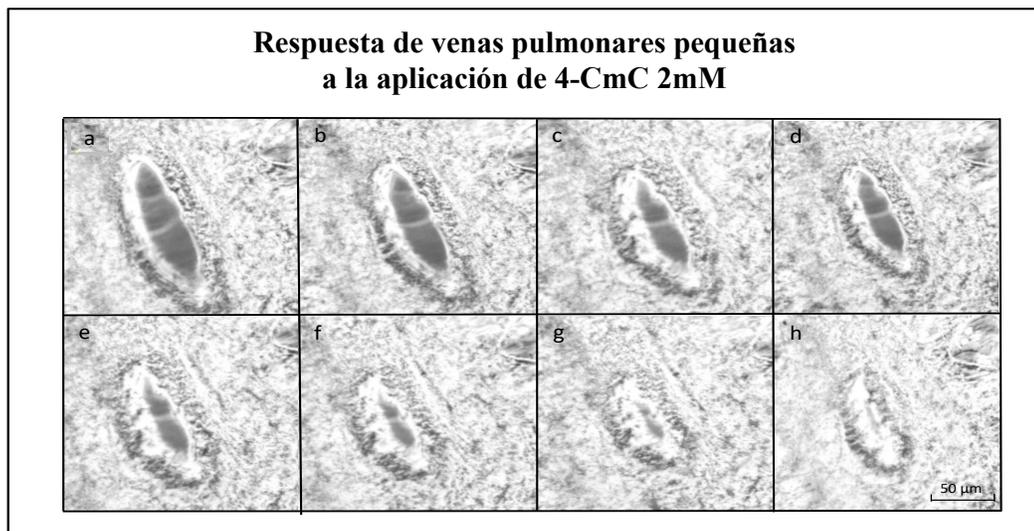


Figura 2: Imagen de la reducción de área luminal en VIP de rata como respuesta a la aplicación de 4-CmC 2 mM. **a:** Condición basal. **b-h:** Contracción de VIP inducida por 4-CmC 2mM. Imágenes obtenidas cada 10 segundos. **h:** Contracción máxima obtenida de 100% posterior a 60 segundos de perfusión con 4-CmC. En la imagen el diámetro de la VIP estudiada corresponde a 120 µm.

Con el fin de confirmar que la contracción generada por 4-CmC 2 mM ocurría vía RyR, se utilizó dantroleno y ryanodina como antagonistas del receptor. Para esto, se evaluó la respuesta contráctil inducida por 4-CmC inmediatamente después de la perfusión por 10 minutos con el inhibidor. Posteriormente, con el objetivo de determinar la reversibilidad de la contracción, se perfundió el tejido con HBSS por 10 minutos (lavado), con el fin de remover tanto el agonista como el antagonista, y se volvió a estimular con 4-CmC. Finalmente, se aplicó KCl 75mM por 3 minutos, permitiendo de esta manera evaluar la viabilidad del tejido dada por la mantención de la actividad contráctil de la VIP.

En la **figura 3**, se muestra un registro representativo de los experimentos realizados con 4-CmC en presencia y ausencia de dantroleno (**figura 3a**) y ryanodina (**figura 3b**), utilizando KCl como estímulo final.

Respecto a la aplicación de dantroleno, la perfusión de 10 μ M del compuesto durante 10 minutos previo al estímulo de 4-CmC (2 mM) inhibió completamente la contracción inducida por 4-CmC la cual no revirtió posterior a 10 minutos de lavado (n= 8-10 exps./ 4 ratas; $p \leq 0,001$) (**figura 4a**). En el caso de la ryanodina (50 μ M), esta fue incubada durante 30 minutos previo a la perfusión de 4-CmC (2mM). Al igual que dantroleno, se encontró inhibición completa que no revirtió después de 10 minutos de lavado (12 exps. / 4 ratas; $p \leq 0,001$) (**figura 4b**)

De acuerdo a estos resultados, se puede señalar que RyR está presente en VIP de ratas y es funcional al estimularlo con agonistas del receptor. La inhibición generada por dantroleno y ryanodina en la contracción inducida por 4-CmC confirma que efectivamente RyR participa en la liberación de Ca^{2+} del RS generando contracción en las venas estudiadas.

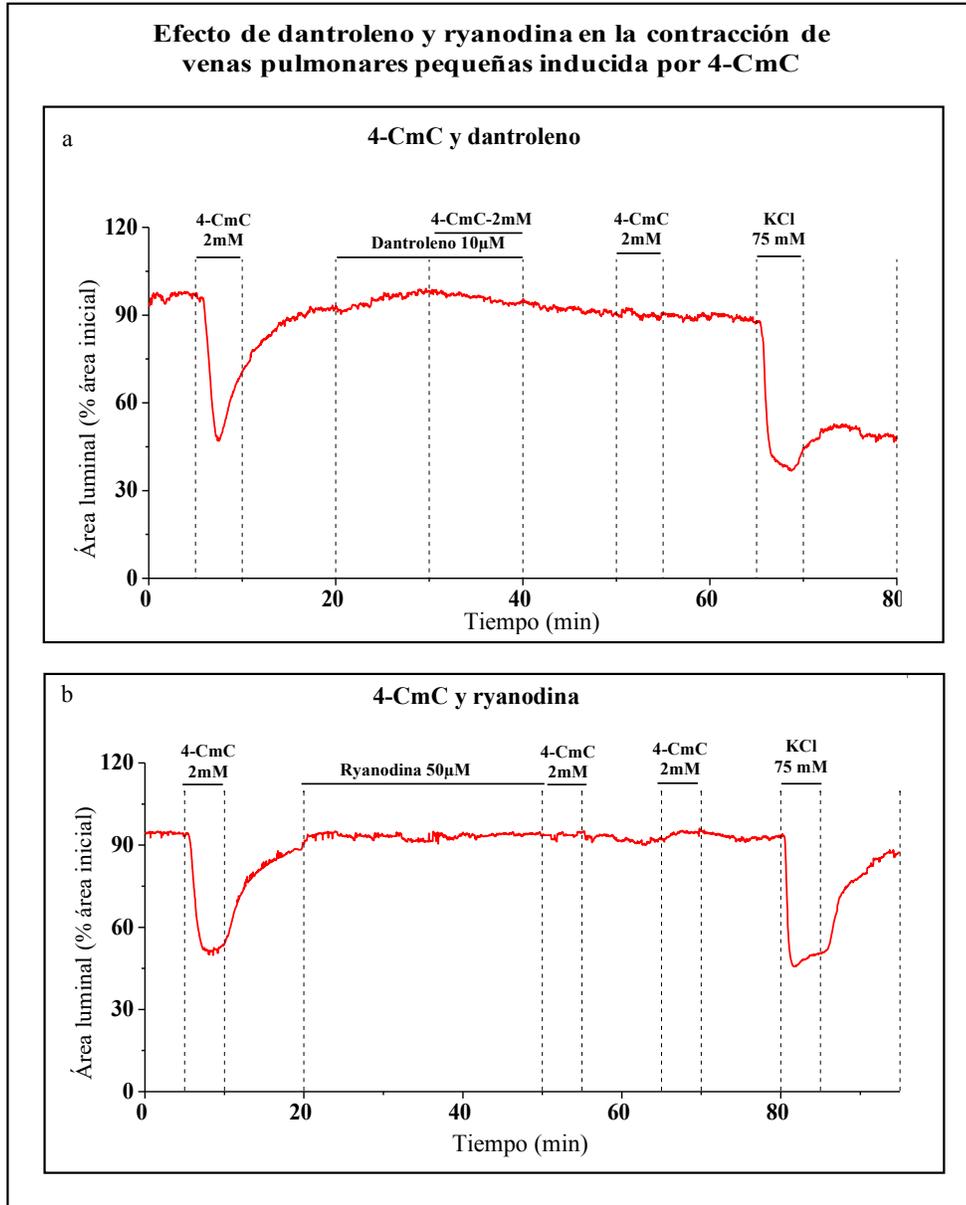


Figura 3: Registro representativo de contracción de VIP inducida por 4-CmC en presencia y ausencia de dantroleno o ryanodina. a: Variación del área luminal en relación a la aplicación de 4-CmC 2 mM en ausencia y presencia de dantroleno 10 µM **b:** Variación del área luminal en relación a la aplicación de 4-CmC 2 mM en ausencia y presencia de ryanodina 50 µM. En ambos casos se utilizó KCl 75 mM como estímulo final para evaluar viabilidad del tejido. Se aplicó lavado con HBSS por 10 minutos entre los diferentes compuestos.

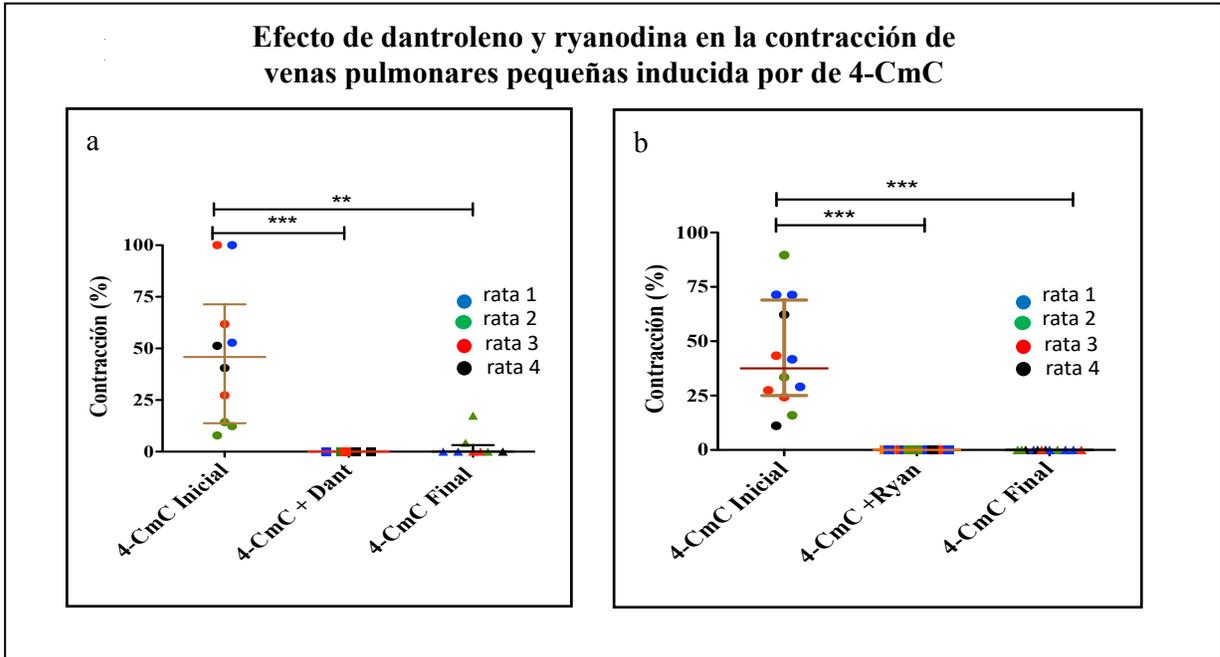


Figura 4: Efecto de dantroleno y ryanodina en la contracción de VIP inducida por 4-CmC.
a: Se muestra la contracción inducida por 4-CmC 2mM en ausencia (círculos) o presencia de dantroleno 10μM (cuadrados) y perfusión de 4-CmC 2mM posterior al lavado por 10 minutos con HBSS (triángulos) n= 8-10 exps. /4 ratas **b:** Contracción inducida por 4-CmC 2mM en ausencia (círculos) o presencia de ryanodina 50μM (cuadrados) y posterior al lavado por 10 minutos con HBSS (triángulos) n= 12 exps./ 4 ratas. Cada color representa un animal distinto. En todos los casos la perfusión de 4-CmC fue de 5 minutos. Resultados expresados en medianas y rangos intercuartílicos. Análisis estadístico en base a test de Friedman **p < 0,01/ *** p ≤ 0,001

6.2.- RyR se activa por despolarización y agonistas de receptores acoplados a proteína G en VIP de ratas

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual el RyR participa en la contracción, se realizaron experimentos con KCl para inducir la contracción por despolarización, y con ATP y ADP para activar receptores purinérgicos asociados a proteína Gq en presencia y ausencia de dos antagonistas del RyR: dantroleno y ryanodina. El mecanismo por el cual el KCl induce despolarización se observa en el Anexo 3.

a) *Función del receptor de Ryanodina en la contracción de VIP de ratas inducida por despolarización*

- *KCl y dantroleno*

Para determinar la participación del RyR en la contracción inducida por despolarización, se realizaron en primera instancia curvas dosis - respuesta de KCl en presencia y ausencia de dantroleno (10 μ M), el cual ha demostrado ser inhibidor de RyR1 y RyR3. (Zhao *et al.*, 2001, Fruen *et al.*, 1997).

La **figura 5a** muestra un registro representativo de un vaso y el cambio en el porcentaje de área luminal a distintas concentraciones de KCl con y sin dantroleno (negro y rojo respectivamente). En la imagen se observa que en ambos casos la disminución del lumen se inició a concentraciones de 50 μ M de KCl, y que esta disminución se hizo más evidente al aumentar progresivamente la concentración de KCl, encontrándose valores similares en presencia y ausencia del inhibidor. La cuantificación de la contracción para cada caso se realizó en base a las curvas dosis- respuesta representadas en la **figura 5b**.

Respecto al análisis de las curvas ajustadas, se encontró que dantroleno no modificó la contracción inducida por despolarización, obteniéndose un valor EC_{50} de $47,5 \pm 1,22$ mM para KCl (n= 9-12 exps. / 4 ratas) y $41,3 \pm 1,16$ mM para KCl + dantroleno (n= 6 -13 exps./ 4 ratas), sin diferencias significativas entre las curvas al aplicar F-test ($p = 0,83$) (**figura 5b-i y 5b-ii**). Los valores de la curva para cada condición fueron: valores máximos de contracción KCl= $84,28 \pm 18,55$ y KCl + dantroleno = $76,42 \pm 9,43$ ($p = 0,87$) (**figura 5b-iii**) ; pendiente de Hill KCl= $2,82 \pm 1,53$ y KCl + dantroleno= $3,89 \pm 1,88$ ($p = 0,61$) (**figura 5b-iv**). El valor mínimo en ambos casos fue de 0% (no graficado). Estos resultados sugieren que RyR1 y RyR3 no estarían participando en la contracción inducida por despolarización, pero no descartan la posibilidad de que RyR2 pueda activarse en el proceso.

- KCl y ryanodina

En segunda instancia, se realizaron experimentos con ryanodina como inhibidor de las tres isoformas del receptor (Gao, 2017, Laporte, 2004, Sutko *et al.*, 1997).

En el caso de la ryanodina, la concentración utilizada para generar la inhibición fue de 50 μ M. El alto costo del compuesto, impidieron la realización de curvas dosis- respuesta. Por este motivo, se decidió incubar el compuesto por 30 minutos previo a la perfusión con 4-CmC, garantizando de esta manera que el antagonista se uniera a los sitios de unión ubicados en el poro del canal (Meissner, 2017).

En esta oportunidad, se comparó la contracción inicial de 75 mM de KCl (en ausencia del antagonista) con la contracción obtenida posterior a la incubación de 50 μ M de ryanodina por 30 minutos, obteniéndose como resultado una inhibición parcial de la respuesta contráctil de KCl posterior a la aplicación de ryanodina ($p \leq 0,01$), la cual se mantuvo posterior al lavado de 10 minutos de HBSS ($p \leq 0,05$) (n= 12 exps./ 5 ratas). Los valores de contracción obtenidos y expresados en mediana y rangos intercuartílicos fueron: KCl inicial= 68,2% (52,9- 90,3), KCl+ ryanodina = 33,3% (23,8 -57,8), KCl final (post lavado) = 41,5% (32,3- 59,2) (**figura 6**). Estos resultados apuntan fuertemente a que RyR participa en la contracción inducida por despolarización y que probablemente la isoforma RyR2 sea la más importante.

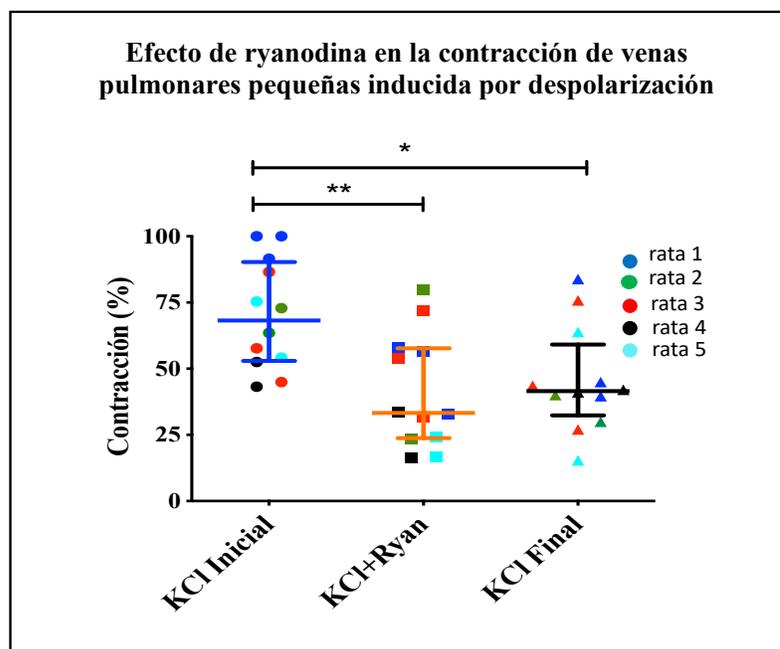


Figura 6: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por despolarización. Contracción inducida por KCl 75 mM en ausencia (círculos) o presencia de ryanodina 50 μ M (cuadrados) y posterior al lavado por 10 minutos con HBSS (triángulos) (n= 12 exps./ 5 ratas). Cada color representa un animal distinto. Resultados expresados en medianas y rangos intercuartílicos. Análisis estadístico en base a Test de Friedman. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Dant: Dantroleno (10 μ M); Ryan: ryanodina (50 μ M)

b) *Función del receptor de Ryanodina en la contracción de VIP de ratas inducida por agonistas de receptores acoplados a proteína G:*

El ATP y el ADP son nucleótidos que activan diferentes subtipos de receptores purinérgicos correspondiente a la familia de P2Y que se encuentran acoplados a proteína Gq (Burnstock, 2006, Burnstock, 2017). Con el fin de evaluar si el RyR es funcional y también participa a través de esta vía, se realizaron experimentos con ambos compuestos en presencia y ausencia de dos antagonistas del RyR: dantroleno y ryanodina.

- ATP y dantroleno

El ATP es un nucleótido que activa diferentes subtipos de receptores P2Y acoplados a proteína Gq (Burnstock, 2006, Burnstock, 2017). Con el fin de evaluar si RyR es funcional y participa a través de esta vía, se realizaron experimentos utilizando diferentes concentraciones de ATP en presencia y ausencia de dantroleno, considerando una dosis máxima de 1000 μM de ATP simulando condiciones fisiológicas.

La **figura 7a** muestra un registro representativo de un vaso y el cambio en el porcentaje de área luminal a distintas concentraciones de ATP con y sin dantroleno (negro y rojo respectivamente). En la imagen se observa que en ambos casos la reducción del área luminal se inició a concentraciones de 100 μM de ATP, y que esta disminución se hizo más evidente al aumentar la concentración de ATP a 1000 μM . Sin embargo, es importante notar que el registro de ATP + dantroleno generó menor reducción del lumen en relación a la VIP estimulada sólo con ATP. Para cuantificar la contracción, se realizaron en primera instancia curvas dosis- respuesta en presencia y ausencia del inhibidor (**Figura 7b-i**). En este punto, es importante mencionar que en ambos casos no se logró obtener un ajuste adecuado de las curvas, lo que probablemente se explique por la ausencia de *plateau* evidenciado en los registros. Considerando este antecedente, se decidió utilizar el “Área Bajo la Curva” (AUC) para poder analizar y determinar los efectos de dantroleno en la contracción inducida por ATP, encontrándose que no hay diferencias significativas al comparar los dos grupos. Los valores encontrados fueron: AUC ATP = 162,2 (123,4- 241,3) y AUC ATP+Dant = 161,6 (66,2- 181,9) con un valor $p= 0,4$ (**Figura 7b-ii**). Estos resultados sugieren que RyR1 y RyR3 no participarían en la contracción inducida por ATP, pero no descartan la participación de RyR2.

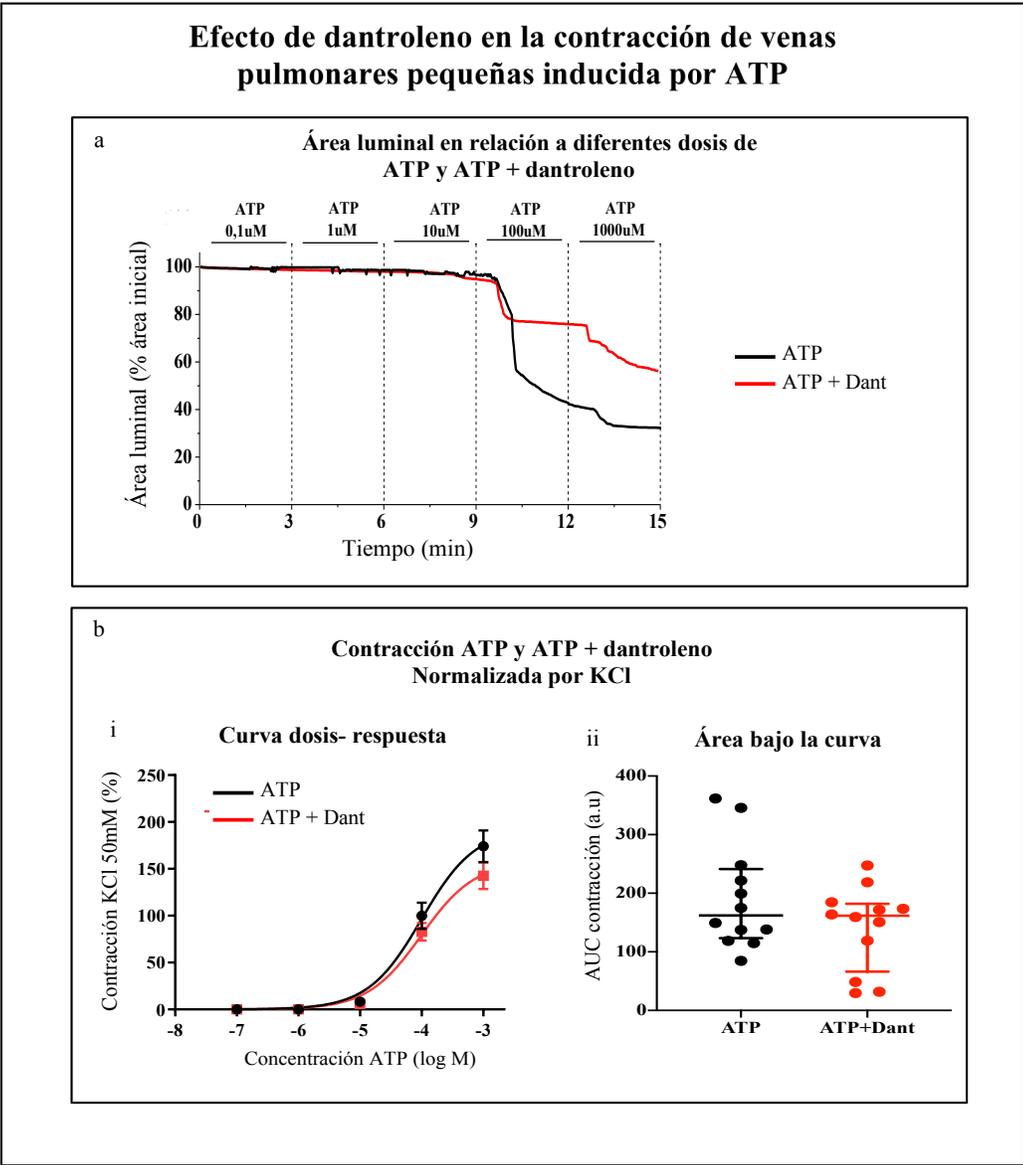


Figura 7: Efecto de dantroleno en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por diferentes dosis de ATP. a: Registro representativo del efecto de diferentes dosis de ATP en la reducción del área luminal vascular en presencia y ausencia de 10 μ M de dantroleno. **b:** (i) Curva dosis/respuesta de la contracción inducida por ATP en ausencia (n= 12-13 exps./ 5 ratas) y presencia (n= 10 -13 exps./ 4 ratas) de 10 μ M. Se muestran los promedios +/- S.E.M y el ajuste sigmoideo de los datos; (ii) representación de área bajo la curva (AUC) para cada curva dosis/ respuesta encontrándose un valor p= 0,4 según Test de Mann-Whitney. Líneas negras: ausencia del inhibidor; líneas rojas: presencia de dantroleno 10 μ M como inhibidor RyR.

- ATP y ryanodina:

Posterior al uso de dantroleno, se utilizó ryanodina para evaluar los efectos de un segundo antagonista de RyR. Para esto se incubó con ryanodina (50 μ M) por 30 minutos para luego perfundir inmediatamente ATP 1 mM por 5 minutos. La respuesta obtenida fue comparada con la contracción de ATP 1 mM previa a la aplicación de ryanodina y con la respuesta de ATP 1 mM final (posterior al lavado de 10 minutos con HBSS). Los resultados muestran que ryanodina disminuyó significativamente la contracción de ATP y que esta disminución se mantuvo aún posterior al lavado (n= 14 exps./ 5 ratas). En la **figura 8** se muestran los valores de contracción normalizados por 50 mM de KCl expresados en mediana y rangos intercuartiles: ATP inicial= 167, 6% (103,1- 272,3); ATP + Ryan= 112,2% (72,52- 223,9); ATP final= 94,8% (46,9 -119,5). El análisis estadístico utilizando Test de Friedman arrojó diferencias al comparar ATP inicial v/s ATP+ Ryan ($p \leq 0,5$) y ATP inicial vs ATP final ($p \leq 0,001$), lo que indicaría que RyR participa en la contracción inducida por ATP y que probablemente la isoforma RyR2 sea la más importante. Es importante destacar que el análisis de ROUT identificó sólo un valor como outlier, el cual se decidió mantener para mostrar la variabilidad real de los datos y evitar la pérdida de un experimento completo en el análisis estadístico. Por otra parte, los datos obtenidos de ese experimento fueron coherentes presentando los valores máximos en el gráfico de la figura 9 tanto en ATP inicial como en ATP + ryanodina. Por último, la exclusión del experimento en cuestión, no modifica los resultados (Anexo 4). Para mayor detalle se presentan también los datos analizados por rata Anexo 5- Figura A.

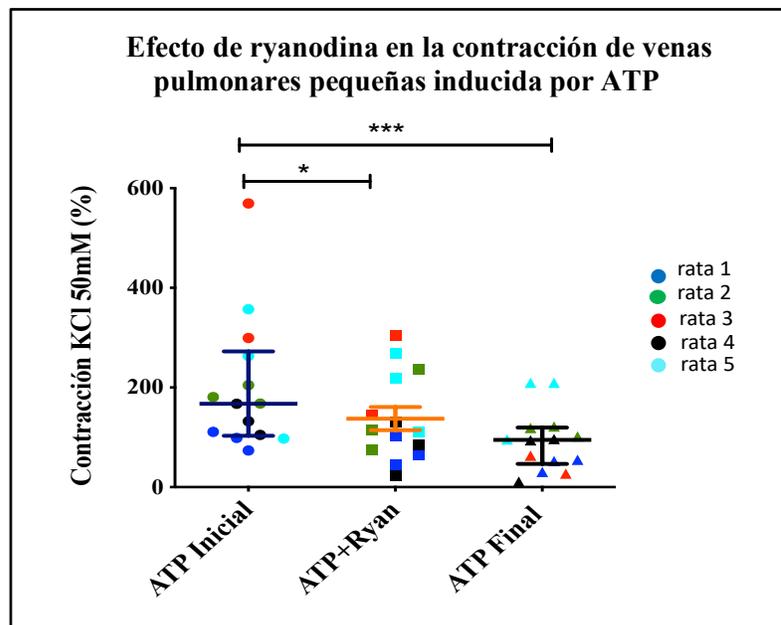


Figura 8: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ATP. Contracción inducida por ATP 1 mM en ausencia (círculos) o presencia de ryanodina 50 μ M (cuadrados) y posterior al lavado por 10 minutos con HBSS (triángulos) (n= 14 exps./ 5 ratas). Cada color representa un animal distinto. Resultados expresados en medianas y rangos intercuartílicos. Análisis estadístico en base a Test de Friedman.* $p \leq 0,05$ / *** $p \leq 0,001$. Ryan: Ryanodina.

- ADP y dantroleno:

Con el fin de confirmar que RyR es funcional y participa a través de la vía Gq, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando diferentes dosis de ADP (1-10-100-500-1000 μ M) en presencia y ausencia de 10 μ M dantroleno.

En la **figura 9a** se muestra un registro representativo de un vaso y el cambio en el porcentaje de área luminal a distintas concentraciones de ADP con y sin dantroleno. En el gráfico se puede observar que ambas líneas comienzan a separarse a partir de concentraciones iguales a 100 μ M de ADP, sugiriendo de esta manera que dantroleno reduce el efecto del ADP utilizado en dosis altas (considerando que la concentración fisiológica es de 1mM). La curva dosis-respuesta de ADP y ADP más dantroleno, (**Figura 9b-i**) no logró alcanzar un *plateau* en ninguno de los dos

casos, lo que dificulta la realización de un F-test y la interpretación del EC50. Para poder determinar el efecto del inhibidor, se decidió comparar el área bajo la curva (AUC) de los dos grupos obteniéndose de esta manera una mediana para AUC ADP = 71,07 (54,41-105,6) y AUC ADP+Dant = 38,14 (34,41- 76,47) con un valor $p= 0,02$ (**Figura 9b-ii**). Estos resultados sugieren que RyR1 y Ryr3 participan en el proceso contráctil inducido por ADP.

- ADP y ryanodina

Posterior al estudio con dantroleno, se realizaron experimentos con ryanodina como bloqueador de las tres isorformas de RyR. Para esto se incubó ryanodina (50 μ M) por 30 minutos para luego perfundir inmediatamente ADP 1 mM por 5 minutos. La respuesta obtenida fue comparada con la contracción de ADP 1 mM previa a la aplicación de ryanodina y con la respuesta de ADP 1 mM final (posterior al lavado de 10 minutos con HBSS). Los resultados (**figura 10**) muestran que ryanodina inhibe parcialmente la contracción de ADP y que esta disminución se mantiene aún posterior al lavado (n= 12 exps./ 5 ratas). Los valores de contracción normalizados por 50 mM de KCl son: ADP inicial= 210,6 % (100,5 - 286,7); ADP + Ryan = 99,6% (56,2 - 175,8); ADP final= 52,3% (34,7 - 101,2). El análisis estadístico realizado utilizando Test de Friedman, arrojó diferencias significativas al comparar ADP inicial *v/s* ADP+ Ryan ($p \leq 0,5$) y ADP inicial *vs* ADP final ($p \leq 0,001$), sugiriendo que RyR participa en la contracción inducida por ADP. Para mayor detalle, en el Anexo 5- Figura B se presentan los datos analizados por rata.

Efecto de dantroleno en la contracción de venas pulmonares pequeñas inducida por ADP

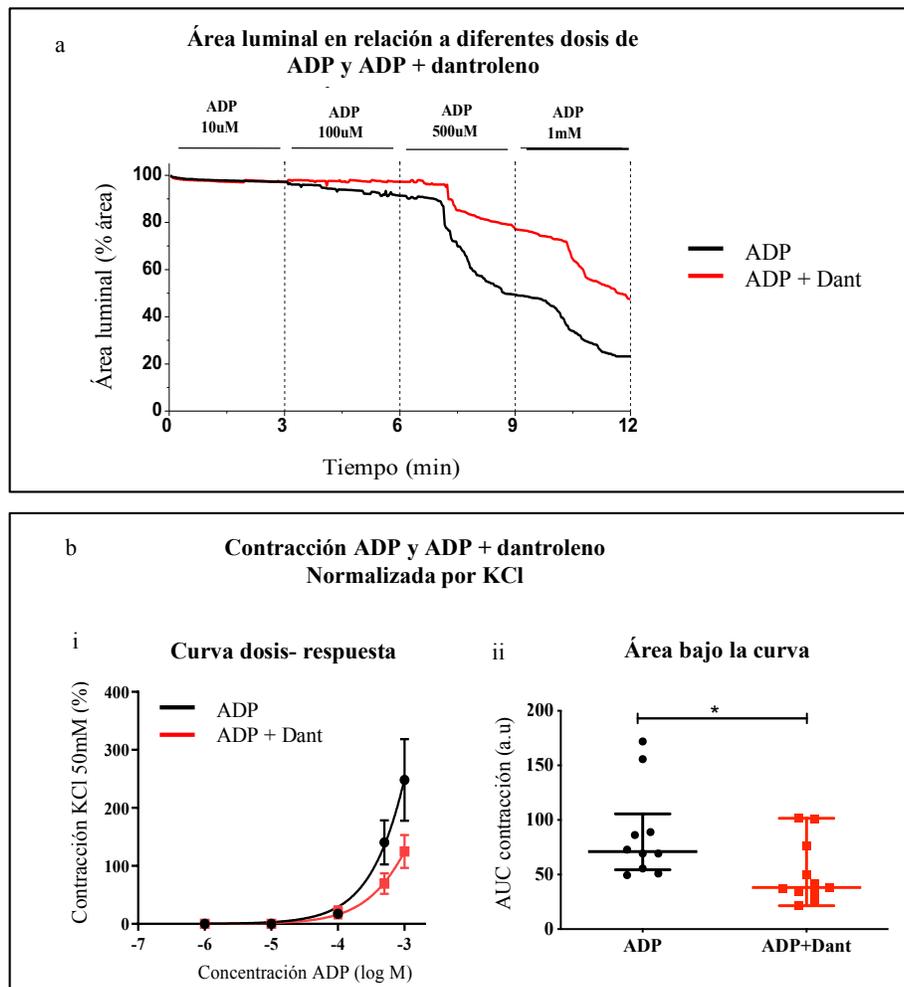


Figura 9: Efecto de dantroleno en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por diferentes dosis de ADP. **a:** Registro representativo del efecto de diferentes dosis de ADP en la reducción del área luminal vascular en presencia y ausencia de 10 μ M de dantroleno. **b:** (i) Curva dosis/respuesta de la contracción inducida por ADP en ausencia (n= 10-13 exps./ 3 ratas) y presencia (n= 11-14 exps./ 4 ratas) de 10 μ M dantroleno. Se muestran los promedios \pm S.E.M y el ajuste exponencial de los datos para cada condición; (ii) representación de área bajo la curva (AUC) para cada curva dosis/ respuesta encontrándose un valor $p= 0,02$ según Test de Mann-Whitney. Líneas negras: ausencia del inhibidor; líneas rojas: presencia de dantroleno 10 μ M como inhibidor RyR.

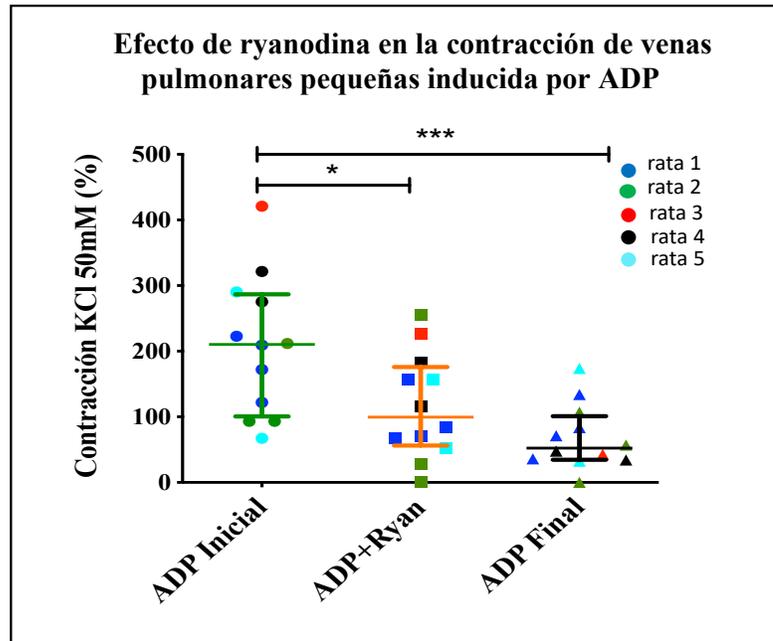


Figura 10: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ADP. Contracción inducida por ADP 1 mM en ausencia (círculos) o presencia de ryanodina 50 μ M (cuadrados) y posterior al lavado por 10 minutos con HBSS (triángulos) (n= 12 exps./ 5 ratas). Cada color representa un animal distinto. Resultados expresados en medianas y rangos intercuartílicos. Análisis estadístico en base a Test de Friedman. * $p \leq 0,05$ / *** $p \leq 0,001$

- Comparación de la contracción ADP -dantroleno v/s ADP - ryanodina

Considerando que ambos antagonistas inhibieron parcialmente la respuesta inducida por ADP, se realizó una comparación de la contracción obtenida con ADP 1 mM en presencia de 10 μ M dantroleno y 50 μ M ryanodina. En la **figura 11** se muestra una gráfica con los resultados obtenidos, donde se observa que la contracción es similar independiente del antagonista utilizado. Los valores de contracción normalizados por 50 mM de KCl expresados en mediana y rangos intercuartílicos son: ADP + dantroleno 83,1% (69,2 -118,7) v/s ADP + ryanodina= 99,6% (56,2 - 175,8) ($p= 0,6$). Estos resultados sugieren que RyR1 y RyR3 serían las isoformas más importantes en la contracción inducida por ADP.

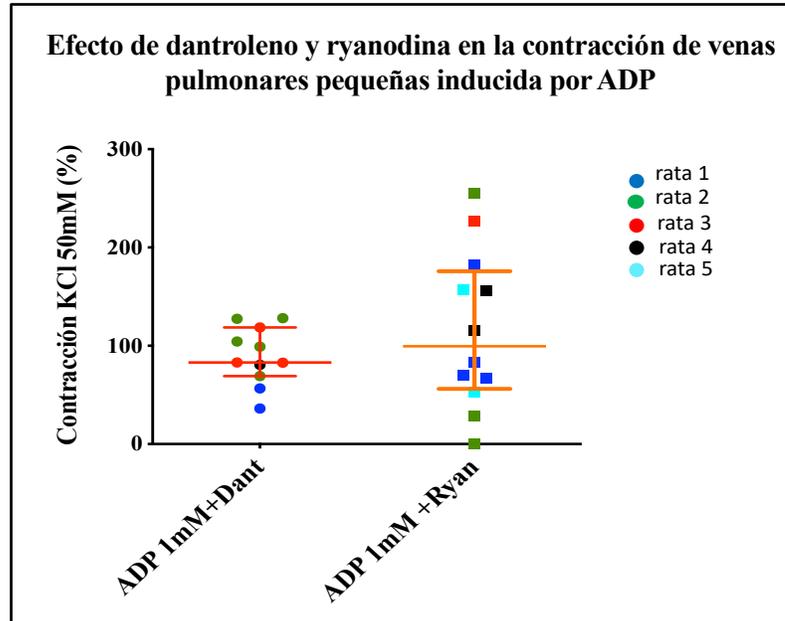


Figura 11: Efecto de dantroleno y ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ADP. Comparación de la contracción inducida por 1mM de ADP en presencia de dantroleno (círculos; n = 11 exps. / 4 ratas) y ryanodina (cuadrados; n = 12 exps./ 5 ratas). Cada color representa un animal distinto. Resultados expresados en medianas y rangos intercuartílicos. Análisis estadístico en base a Test de Mann Whitney, sin diferencias significativas ($p= 0,6$). Dant: Dantroleno (10 μ M); Ryan: ryanodina (50 μ M).

7.- DISCUSIÓN

Hasta el momento existen pocas evidencias sobre la función fisiológica de las isoformas del RyR en el músculo liso de vasos intrapulmonares, mientras que en la vía área se ha demostrado de mejor manera su localización y función. Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren que los RyRs son funcionales en VIP y que participan tanto en la vasoconstricción inducida por despolarización como por la vía acoplada a proteína G.

La aplicación de dos agonistas del RyR, 4-CmC y cafeína de manera independiente, generó contracción en las venas estudiadas, mientras que el uso de dos antagonistas del receptor, dantroleno y ryanodina, inhibieron completamente la respuesta contráctil inducida por 4-CmC comprobando además la efectividad de los inhibidores utilizados. Estos resultados, demuestran por primera vez que la activación del RyR participa en la contracción de VIP de ratas, probablemente mediada por la liberación de Ca^{2+} desde el RS.

El 4-CmC induce liberación de Ca^{2+} mediado por RyR. Aunque se sabe que este compuesto tiene afinidad por las tres isoformas del RyR, es mucho más efectivo en activar a RyR1 y RyR2 que RyR3, el EC_{50} para RyR3 es 1,5 mM, comparado con 0,2 mM – 0,4 mM para RyR1 y RyR2 respectivamente (Al-Mousa & Michelangeli, 2009, George *et al.*, 2003, Fessenden *et al.*, 2000). Algunos estudios han demostrado que se requieren concentraciones de aproximadamente 1 mM para generar liberación de Ca^{2+} en arterias de conductancia y resistencia pulmonar y arterias mesentéricas (Zheng *et al.*, 2008a). Nuestros resultados mostraron que una concentración de 1 mM de 4-CmC generó contracción en la mitad de las venas examinadas, por lo que se decidió aumentar la dosis a 2 mM encontrándose una respuesta en el 100% de los vasos estudiados.

Investigaciones realizadas en miotubos han encontrado que 4-CmC puede inducir liberación de $[Ca^{2+}]_i$ al estimular al RyR en concentraciones aproximadamente 10 veces más bajas que la cafeína (A. R. Jacobson, 2006), incluso en este mismo estudio se señala que 4-CmC es 25 veces más potente en la activación de RyR1 en comparación con la cafeína (Fessenden *et al.*, 2006). Si bien ambos compuestos son conocidos como agonistas RyRs, presentan distintos perfiles de activación dependientes de la isoforma, encontrándose que la cafeína es mucho más potente en la activación de RyR2 y RyR3 en comparación con RyR1 (Fessenden *et al.*, 2000, G. G. Du *et*

al., 2000).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, mostraron que cafeína 20 mM generó contracción concéntrica sólo en el 50% de las venas y que el aumento a 40 mM disminuyó este porcentaje provocando sólo contracción isotónica (**figura 1**). Si bien la cafeína se ha usado ampliamente como una herramienta farmacológica para aumentar la probabilidad de apertura de RyR, es importante mencionar que también actúa en una amplia gama de blancos moleculares interviniendo como antagonista de los receptores de adenosina e inhibidor de las enzimas fosfodiesterasas. También participa en el aumento de AMPc favoreciendo la síntesis de óxido nítrico (Echeverri *et al.*, 2010, Echeverri *et al.*, 2008). Remboldt *et al.*, observó que al agregar 20 mM de cafeína a arterias carótidas porcinas pre- contraídas, hubo un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ sin cambios significativos en el tono, concluyendo de esta manera que la cafeína efectivamente incrementa $[Ca^{2+}]_i$ pero en una región alejada del aparato contráctil, lo que no da lugar a una contracción (Rembold *et al.*, 1995).

Una posible hipótesis que podría explicar los resultados encontrados con cafeína 40 mM, es el efecto que tiene este compuesto tanto en el endotelio como en el tejido muscular. La mayoría de los estudios evalúan la contracción en anillos vasculares desnudos y células musculares aisladas (Lin *et al.*, 2016b, Cortijo *et al.*, 1997, W. Du *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2005), sin embargo la metodología utilizada en nuestros experimentos (Precision Cut Lung Slices; PCLS) preserva las interacciones funcionales de las estructuras pulmonares analizadas (Hiorns *et al.*, 2016, Sanderson, 2011). De esta manera, concentraciones mayores de cafeína podrían estimular células endoteliales, generándose de esta manera fuerzas opuestas y simultáneas dadas por el endotelio (dilatación) y músculo liso (contracción) dando como resultado una contracción isotónica. Otra posible teoría, es que tal como está descrito en ratones (Kramer & Marks, 1965), las VIP de ratas puedan presentar células musculares cardíacas en su estructura de pared, sin embargo estas se encuentran en VIP de diámetros mayores a los utilizados en este estudio. Se requiere seguir investigando para determinar posibles mecanismos de acción de la cafeína que permitan explicar la respuesta diferenciada (ausencia de contracción, contracción concéntrica y contracción isotónica) obtenida en nuestros registros de VIP. Por otra parte, es importante tratar de comprender las diferencias existentes con arterias intrapulmonares pequeñas, en donde se reporta que la cafeína utilizada en concentraciones de 20 mM generó contracción concéntrica

en PCLS de ratón (Pérez & Sanderson, 2005a). Respecto a esto, se puede señalar que tal vez los resultados difieran no sólo entre los vasos intrapulmonares estudiados, sino que también exista la posibilidad de que la respuesta varíe entre las distintas especies.

Una vez comprobado que RyR es funcional por estimulación directa con dos agonistas, el siguiente paso fue estudiar la vía por la cual RyR participa en la contracción de VIP. Para esto, se realizaron experimentos con KCl para inducir la despolarización, además de ATP y ADP para generar contracción vía receptor acoplado a proteína Gq, en presencia y ausencia de dantroleno y ryanodina.

El dantroleno es un relajante muscular esquelético que se une al receptor RyR1, reduciendo su probabilidad de estado abierto y bloqueando la liberación de Ca^{2+} del RS (Zhao *et al.*, 2001, Krause *et al.*, 2004). Estudios realizados en miocitos, han determinado que dantroleno inhibe RyR1 y RyR3 pero no RyR2 (Zhao *et al.*, 2001, Fruen *et al.*, 1997). Sin embargo, otros investigadores han encontrado sitios de unión en RyR1 (residuos 590–609) y RyR₂ (residuos 601–620) (Paul-Pletzer *et al.*, 2002) en RS de músculo estriado de conejo, argumentando que este compuesto sí podría actuar en las tres isoformas.

Respecto a la ryanodina, se sabe que tiene efectos complejos sobre la conductancia y la activación de canales de RyR que dependen de la concentración, de esta manera concentraciones sub-micromolares, hacen que el canal muestre estados parcialmente conductores o de subconductancia, mientras que a concentraciones micromolares o mayores, la ryanodina produce un estado cerrado del canal (Wherens & Marks 2005, Gao, 2017, Laporte, 2004). Existe consenso en que ryanodina actúa en las tres isoformas de RyR. Experimentos realizados con [3H] ryanodina, señalan que se une a sitios de alta afinidad ($KD \sim 1\text{--}10\text{ nM}$) y de baja afinidad ($KD \sim 1\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$) en el canal RyR, probablemente localizado en el poro del receptor (Gao, 2017, Laporte, 2004, Sutko *et al.*, 1997).

Diferentes estudios han encontrado que tanto dantroleno como ryanodina inhiben la contracción inducida por norepinefrina en arteria pulmonar de rata (Zheng *et al.*, 2005) y la contracción inducida por carbacol en bronquios intrapulmonares de rata (W. Du *et al.*, 2005), sin embargo, no hay antecedentes del uso de dantroleno en VIP.

Para la contracción inducida por KCl, no se encontraron diferencias entre las curvas dosis - respuesta de KCl en presencia y ausencia de dantroleno (*figura 5*), sugiriendo que las isoformas RyR1 y RyR3 no estarían participando en la contracción inducida por KCl. Sin embargo los experimentos realizados con ryanodina mostraron que este antagonista inhibió de manera parcial la respuesta contráctil de VIP inducida por despolarización (*figura 6*), sugiriendo de esta manera que RyR2 sería la principal isoforma que estaría participando a través de esta vía.

Respecto a la contracción inducida vía receptores acoplados a proteína Gq, se debe hacer la diferencia entre los resultados obtenidos con ATP y ADP. En el caso del ATP, el análisis de datos no arrojó diferencias significativas al comparar los valores de AUC entre ATP y ATP+ dantroleno (*figura 7*), sin embargo el uso de ryanodina inhibió parcialmente la contracción inducida por 1 mM de ATP (*figura 8*), lo que probablemente indica mayor participación de RyR2 en el proceso. Para ADP, los resultados muestran que tanto dantroleno (*figura 9*) como ryanodina (*figura 10*), inhibieron parcialmente la contracción inducida por este agonista y que la inhibición fue similar independiente del antagonista utilizado, lo que sugiere que RyR1 y RyR3 sean probablemente las isoformas que participan al utilizar ADP como agonista de la contracción. De esta manera, los resultados encontrados permiten sugerir que RyR también participa en la vía de receptores acoplados a proteína Gq.

Nuestros resultados están en concordancia con lo publicado por Henríquez *et al*, donde la contracción inducida por 50 μ M de ATP no fue modificada por 50 μ M de ryanodina (Henríquez *et al.*, 2018), lo que no descarta la posibilidad de que pueda inhibir la contracción al utilizar dosis mayores de ATP. En nuestro caso, la inhibición generada por este antagonista se encontró al inducir la contracción con 1 mM de ATP

Si bien, se sabe que la respuesta inducida por ATP y otros nucleótidos, se inicia mediante la activación de dos familias de receptores purinérgicos: los receptores P2X (ionotrópicos), que corresponden a canales catiónicos de membrana que permiten el influjo de Ca^{2+} , y los receptores P2Y (metabotrópicos), que actúan a través de receptores acoplados a proteína Gq promoviendo la liberación de Ca^{2+} del RS (Burnstock, 2006, Burnstock, 2017, K. A. Jacobson *et al.*, 2002), Henríquez *et. al.* encontró que la contracción de VIP inducida por ATP fue acompañada por oscilaciones de Ca^{2+} mediadas por el receptor de IP_3 , las que se mantenían presentes aún en

ausencia de Ca^{2+} extracelular (Henríquez et al., 2018). Este hallazgo sugiere que los receptores P2X no participan como mediadores de la contracción en este tipo de vasos, siempre que se utilicen concentraciones bajas de ATP ($< 50 \mu\text{M}$). Los resultados presentados en esta tesis no permiten descartar por ahora la participación de receptores P2X con las concentraciones utilizadas. De esta manera, existe la posibilidad de que ATP además de actuar sobre receptores P2Y, podría estimular receptores P2X generando entrada de Ca^{2+} a través de él, produciendo el proceso de despolarización. La evaluación de la contracción de VIP utilizando dosis altas de ATP ($100\text{-}1000 \mu\text{M}$) en ausencia de Ca^{2+} extracelular permitirían comprobar o rechazar esta hipótesis.

En relación a los resultados obtenidos y a los antecedentes anteriormente expuestos, el modelo propuesto implicaría que RyR participaría tanto en la contracción inducida por despolarización como por la vía acoplada a proteína G activando isoformas diferentes (*Figura 12*).

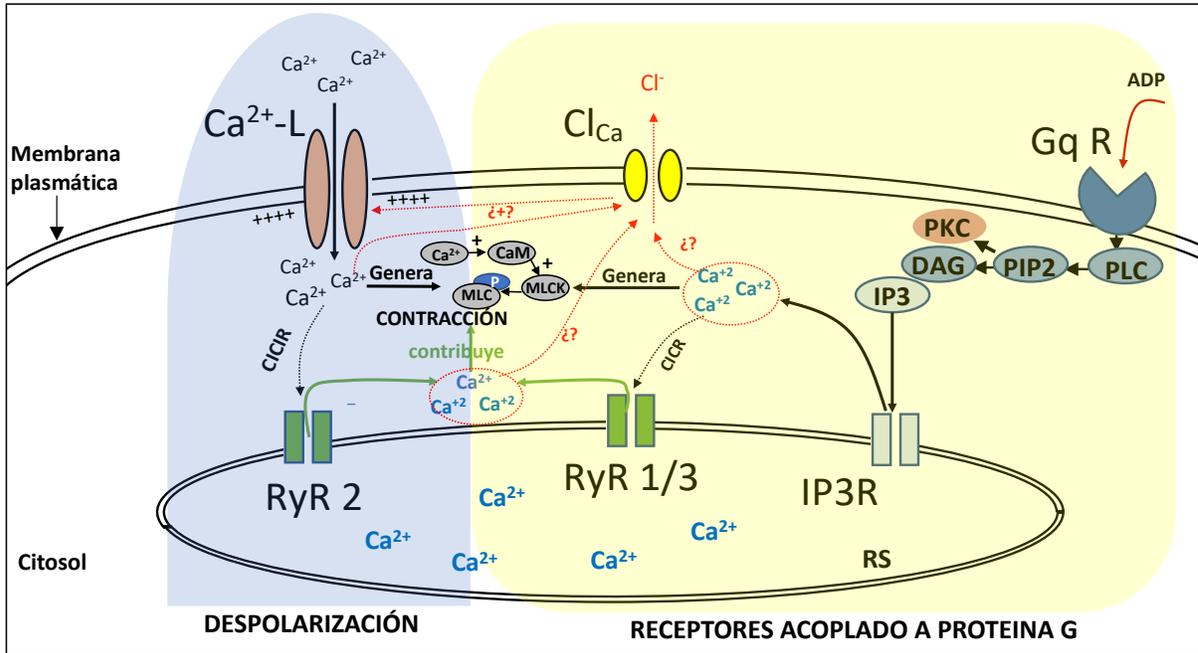


Figura 12: Modelo de participación de RyR en la contracción de venas intrapulmonares de rata. En el proceso de despolarización inducida por KCl (representado en la parte azul de la figura) se produciría apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) generando entrada de Ca^{2+} que se uniría a la calmodulina para activar la proteína quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK) generando la contracción. El ingreso de Ca^{2+} vía CCDV, también activaría RyR2 vía “Calcium- induced Calcium released” (CICR) lo que promovería la salida de Ca^{2+} desde el RS contribuyendo de esta manera a la respuesta contráctil. Aún se desconoce si el ingreso de Ca^{2+} por CCDV y la liberación de Ca^{2+} de RyR pueden activar los canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} (Cl_{Ca}), favoreciendo la salida de Cl^- y dando retroalimentación positiva para la activación de CCDV. En el caso de la contracción inducida por ADP (color amarillo de la figura), este agonista se uniría a sus receptores P2Y acoplados a proteína Gq, estimulando la actividad de la fosfolipasa C (PLC), la que a su vez cataliza la formación de IP3 a partir de DAG. La unión del IP3 al receptor IP3 (IP3R) resulta en la liberación de Ca^{2+} al citosol, lo cual genera la contracción muscular. El Ca^{2+} liberado vía IP3R, activaría por CICR las isoformas RyR1 y RyR3, lo que produciría mayor salida de Ca^{2+} desde el RS contribuyendo a la respuesta contráctil. La metodología utilizada en este estudio no permite determinar la participación de los Cl_{Ca} , lo cuales podrían estimular el proceso despolarización activando CCDV (por salida de Cl^-). Flecha punteada roja: mecanismo probable. CCDV: Canales de Calcio Dependientes de Voltaje; CICR: Calcium Induced Calcium Released; GqR: receptor acoplado a proteína Gq; PLC: Fosfolipasa C; DAG: Diacilglicerol; PKC: Proteína Kinasa C; IP3R: Receptor de IP3; RS: Retículo Sarcoplasmático; Cl_{Ca} : Canales de Cloruro Dependientes de Ca^{2+} ; CaM: Calmodulina; MLCK: Kinasa de la Cadena Liviana de Miosina; Ca^{2+} : Calcio; Cl^- : Cloruro.

Respecto a la despolarización, al encontrar que dantroleno no modificó la respuesta contráctil de KCl, mientras ryanodina inhibió parcialmente la respuesta, el mecanismo propuesto implica que principalmente RyR2 contribuye en la contracción por despolarización en VIP de ratas. En este caso, la despolarización inducida por KCl (**Figura 12, color azul**) produciría apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) generando entrada de Ca^{2+} . El Ca^{2+} que ingresa al citosol se une a la calmodulina formando el complejo “calcio- calmodulina” que activa la proteína kinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK) aumentando su actividad de ATPasa, lo que determina finalmente su capacidad para unir miosina y generar la contracción. El ingreso de Ca^{2+} vía CCDV, también activaría RyR2 vía “Calcium- induced Calcium released” (CICR) lo que promovería la salida de Ca^{2+} desde el RS contribuyendo de esta manera a la respuesta contráctil. Existe también la posibilidad de que la liberación de Ca^{2+} de RyR pueda activar los canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} (Cl_{Ca}), favoreciendo la salida de Cl^- y dando retroalimentación positiva para la activación de CCDV, sin embargo este mecanismo no se puede concluir con el modelo experimental aplicado en este estudio. Una forma de probar esta hipótesis podría ser la medición de la corriente de Cl^- durante la estimulación directa de RyR.

En el caso de la contracción inducida por ADP (**Figura 12, color amarillo**), los resultados obtenidos, muestran inhibición parcial de la respuesta contráctil tanto en presencia de dantroleno como de ryanodina, encontrándose un porcentaje de contracción similar, independiente del antagonista utilizado. En este caso, el ADP se unirían a sus receptores P2Y acoplados a proteína Gq, estimulando la actividad de la fosfolipasa C (PLC), la que a su vez cataliza la formación de IP3 a partir de DAG. La unión del IP3 al receptor IP3 (IP3R) del RS resulta en la liberación de Ca^{2+} al citosol, lo cual genera la contracción muscular. El Ca^{2+} liberado vía IP3R, activaría por CICR las isoformas RyR1 y RyR3, lo que produciría mayor salida de Ca^{2+} desde el RS contribuyendo a la respuesta contráctil. La metodología utilizada en este estudio no permite determinar la participación de los Cl_{Ca} , lo cuales podrían estimular el proceso despolarización activando CCDV (por salida de Cl^-). La medición de la corriente de Cl^- o el uso de inhibidores de los canales de Cl_{Ca} en presencia de agonistas acoplados a proteína G podrían ser una forma de comprobar esta hipótesis.

Para el ATP (no representado en el esquema), el mecanismo es controversial y requiere mayor estudio para generar una conclusión. Los resultados son similares a los encontrados con KCl, donde dantroleno no modificó la contracción (lo que descartaría la participación de RyR1 y RyR3), mientras que ryanodina inhibió parcialmente la respuesta contráctil (sugiriendo participación de RyR2). La vía probable implicaría que la liberación de Ca^{2+} por activación del IP3R inicia la contracción, sin embargo es posible que este Ca^{2+} también pueda estimular los canales de Cl_{Ca} produciéndose salida de Cl^- , lo que despolarizaría la célula y activaría los CCDV. Luego, el ingreso de Ca^{2+} por esta vía podría estimular RyR2 vía CICR contribuyendo a la contracción. Por otra parte, existe la posibilidad de que ATP en dosis altas también pueda activar receptores P2X (ionotrópicos) generando ingreso de Ca^{2+} al citosol lo que iniciaría el proceso de despolarización vía CCDV, dando inicio a la cascada de señalización ya descrita.

La participación de los canales de Cl_{Ca} en el proceso de contracción acoplado a proteína Gq se ha descrito principalmente en arterias pulmonares, (Helliwell et al., 1994, Weid et al., 1993). La activación de este canal por el Ca^{2+} liberado vía IP3R, puede generar salida de Cl^- estimulando el proceso de despolarización con la consiguiente activación de los canales de Ca^{2+} tipo L (Leblanc *et al.*, 2005, Large & Wang, 1996). La activación de los canales de Cl_{Ca} por liberación de Ca^{2+} del RS inducida por agonistas es una característica común en el músculo liso, aunque parece que los efectos dependen de la especie y el tejido analizado. Por ejemplo, utilizando patch-clamp se ha determinado que ATP genera liberación de Ca^{2+} del RS que activa canales de Cl_{Ca} en células musculares lisas de arteria pulmonar de conejo (Helliwell *et al.*, 1994) y cultivos celulares de aorta de rata (Weid *et al.*, 1993), pero no se ha observado el mismo mecanismo en arteria de oreja de conejo (Benham, 1989). Experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la contracción inducida por ATP (50 μM) en VIP de ratas, se reduce levemente al inhibir el canal de Ca^{2+} tipo L con dihidropiridinas, lo cual permite dar cuenta que ATP se relaciona de alguna manera con este canal, sin ser el mecanismo principal que inicia la contracción. Una hipótesis que podría explicar la disminución en la contracción por ATP en presencia de nifedipino, es la probable participación de receptores tipo P2X, los cuales al ser activados por ATP, podrían generar ingreso de Ca^{2+} estimulando la despolarización por activación de los canales de Cl_{Ca} y CCDV.

En base al modelo propuesto de participación de RyR en la contracción de VIP, se abre la

posibilidad de que exista cierto grado de “compartimentalización celular” o formación de diferentes microdominios, en los cuales RyR2 se encuentre más cercano a los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje, mientras que RyR1 y RyR3 estén más próximos a los IP3R. El concepto de compartimentalización se relaciona directamente con la coordinación de la comunicación intercelular e intracelular con sus correspondientes microdominios de señalización (Billaud *et al.*, 2014). Los microdominios de señalización de Ca^{2+} son un ejemplo de cómo las células concentran diferentes proteínas para regular eficientemente las funciones celulares. Estudios realizados en células del músculo liso arterial pulmonar de ratas han propuesto segregación funcional del RS. Uno de los modelos propuestos, sugiere que una parte del RS puede estar en una posición más cercana a la membrana plasmática, donde RyR1 podría estar en comunicación con los canales BK, mientras que la otra porción pudiera estar ubicada en el centro de la célula liberando Ca^{2+} a través de RyR3, el cual mediante CICR puede reclutar RyR2 provocando una onda global de Ca^{2+} que permite generar la constricción de la arteria pulmonar (Clark *et al.*, 2010, Evans *et al.*, 2005).

La realización de diferentes técnicas como qPCR, Western blot e inmunofluorescencia indirecta (IFI) y permitirían comprobar la existencia, distribución y probable co-localización de las diferentes isoformas de RyR en VIP. Por último, la medición de señales intracelulares de Ca^{2+} en presencia de antagonistas RyR serían una técnica útil para comprobar el mecanismo de CICR en estos vasos pulmonares y contribuir a los hallazgos de esta tesis.

Es necesario seguir investigando para comprobar si efectivamente las isoformas de RyR tienen una participación diferente dependiendo del origen de la contracción (despolarización o por receptores acoplados a proteína G) y si efectivamente se encuentran segregados en diferentes partes del RS actuando en microdominios con otros canales. Por otra parte, también es importante determinar cuáles son los diferentes tipos de CCDV y la participación de otros canales activados por Ca^{2+} (como los canales de Cl_{Ca}) involucrados en el proceso contráctil de VIP.

8.- CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados muestran que el receptor de Ryanodina (RyR) es funcional en Venas Intrapulmonares Pequeñas de ratas y que participa potenciando la contracción inducida por despolarización como por la vía asociada a proteína G.

Los resultados aquí mostrados sugieren que RyR2 es la isoforma más importante en la contracción inducida por despolarización, mientras que RyR1 y RyR3 participarían mayormente en el mecanismo contráctil inducido por agonistas de receptores acoplados a proteína Gq.

Nuestros resultados demuestran por primera vez la existencia y funcionalidad de RyR en VIP, lo que abre un nuevo campo en el estudio de los mecanismos asociados a la contractibilidad en estos vasos.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Al-Mousa, F., & Michelangeli, F. (2009). Commonly used ryanodine receptor activator, 4-chloro-m-cresol (4CmC), is also an inhibitor of SERCA Ca²⁺ pumps. *Pharmacological Reports*, 61(5), 838-842. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70139-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70139-2)
- 2.- Bai, Y., Edelmann, M., & Sanderson, M. J. (2009). *The contribution of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors to agonist-induced Ca²⁺ signaling of airway smooth muscle cells*. 297, 15.
- 3.- Benham C.D. ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery. *Journal of Physiology* (1989), 419. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017893>.
- 4.- Bergner, A., & Sanderson, M. J. (2002). Acetylcholine-induced Calcium Signaling and Contraction of Airway Smooth Muscle Cells in Lung Slices. *The Journal of General Physiology*, 119(2), 187-198. <https://doi.org/10.1085/jgp.119.2.187>
- 5.- Berridge, M. J. (2008). Smooth muscle cell calcium activation mechanisms: Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *The Journal of Physiology*, 586(21), 5047-5061. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160440>
- 6.- Billaud, M., Lohman, A. W., Johnstone, S. R., Biwer, L. A., Mutchler, S., & Isakson, B. E. (2014). Regulation of Cellular Communication by Signaling Microdomains in the Blood Vessel Wall. *Pharmacological Reviews*, 66(2), 513-569. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007351>
- 7.- Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(3), 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005>
Burnstock, G. (2017). Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
- 8.- Capes, E. M., Loaiza, R., & Valdivia, H. H. (2011). Ryanodine receptors. *Skeletal Muscle*, 1(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-18>
- 9.- Clark, J. H., Kinnear, N. P., Kalujnaia, S., Cramb, G., Fleischer, S., Jeyakumar, L. H., Wuytack, F., & Evans, A. M. (2010). Identification of Functionally Segregated Sarcoplasmic Reticulum Calcium Stores in Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13542-13549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.101485>
- 10.- Collier, M. L., Ji, G., Wang, Y.-X., & Kotlikoff, M. I. (2000). Calcium-Induced Calcium Release in Smooth Muscle. *Journal of General Physiology*, 115(5), 653-662. <https://doi.org/10.1085/jgp.115.5.653>

- 11.- Cortijo, J., Martí-Cabrera, M., Bernabeu, E., Domènech, T., Bou, J., Fernández, A. G., Beleta, J., Palacios, J. M., & Morcillo, E. J. (1997). Characterization of 5-HT receptors on human pulmonary artery and vein: Functional and binding studies. *British Journal of Pharmacology*, 122(7), 1455-1463. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701509>
- 12.- Counter, W. B., Wang, I. Q., Farncombe, T. H., & Labiris, N. R. (2013). Airway and pulmonary vascular measurements using contrast-enhanced micro-CT in rodents. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(12), L831-L843. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00281.2012>
- 13.- Ding, X., & Murray, P. A. (2005). Regulation of pulmonary venous tone in response to muscarinic receptor activation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(1), L131-L140. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00230.2004>
- 14.- Du, G. G., Khanna, V. K., & MacLennan, D. H. (2000). Mutation of Divergent Region 1 Alters Caffeine and Ca²⁺ Sensitivity of the Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor). *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11778-11783. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11778>
- 15.- Du, W., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Meissner, G., & Eu, J. P. (2005). Ryanodine Receptors in Muscarinic Receptor-mediated Bronchoconstriction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26287-26294. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502905200>
- 16.- Echeverri, D., Buitrago, L., Delgadillo, A., Beltrán, M., & Montes, F. (2008). Efecto vasodilatador in vitro de la cafeína en aorta de conejos ateroscleróticos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 20(2), 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(08\)72582-8](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(08)72582-8)
- 17.- Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., & Prieto, A. (2010). Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. *International Journal of Vascular Medicine*, 2010, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2010/834060>
- 18.- Efremov, R. G., Leitner, A., Aebersold, R., & Raunser, S. (2015). Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), 39-43. <https://doi.org/10.1038/nature13916>
- 19.- Evans, A. M., Wyatt, C. N., Kinnear, N. P., Clark, J. H., & Blanco, E. A. (2005). Pyridine nucleotides and calcium signalling in arterial smooth muscle: From cell physiology to pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(3), 286-313. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.03.003>
- 20.- Fabiato, A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *The Journal of General Physiology*, 85(2), 247-289. <https://doi.org/10.1085/jgp.85.2.247>

- 21.- Fessenden, J. D., Feng, W., Pessah, I. N., & Allen, P. D. (2006). Amino Acid Residues Gln⁴⁰²⁰ and Lys⁴⁰²¹ of the Ryanodine Receptor Type 1 Are Required for Activation by 4-Chloro-*m*-cresol. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21022-21031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600670200>
- 22.- Fessenden, J. D., Wang, Y., Moore, R. A., Chen, S. R. W., Allen, P. D., & Pessah, I. N. (2000). Divergent Functional Properties of Ryanodine Receptor Types 1 and 3 Expressed in a Myogenic Cell Line. *Biophysical Journal*, 79(5), 2509-2525. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76492-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76492-7)
- 23.- Fruen, B. R., Mickelson, J. R., & Louis, C. F. (1997). Dantrolene Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release by Direct and Specific Action at Skeletal Muscle Ryanodine Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 26965-26971. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.26965>
- 24.- Gao, Y. (2017). *Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4810-4>
- 25.- Gao, Y., & Raj, J. U. *Role of veins in regulation of pulmonary circulation*. 288, 14 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005
- 26.- George, C. H., Higgs, G. V., & Lai, F. A. (2003). Ryanodine Receptor Mutations Associated With Stress-Induced Ventricular Tachycardia Mediate Increased Calcium Release in Stimulated Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 93(6), 531-540. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000091335.07574.86>
- 27.- Guibert C1, Pacaud P, Loirand G, Marthan R, Savineau JP.(1996). Effect of extracellular ATP on cytosolic Ca²⁺ concentration in rat pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol*. 271(3 Pt 1):L450-8. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.271.3.L450>
- 28.- Held, H.-D., Martin, C., & Uhlig, S. (1999). Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *British Journal of Pharmacology*, 126(5), 1191-1199. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702394>
- 29.- Henríquez, M., Fonseca, M., & Pérez-Zoghbi, J. F. (2018). Purinergic receptor stimulation induces calcium oscillations and smooth muscle contraction in small pulmonary veins: Ca²⁺ signalling and contraction in pulmonary veins. *The Journal of Physiology*, 596(13), 2491-2506. <https://doi.org/10.1113/JP274731>
- 30.- Helliwell, R.M., Wang, Q., Hogg, R.C. *et al*. Synergistic action of histamine and adenosine triphosphate on the response to noradrenaline in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. 426, 433–439 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00388307>
- 31.- Hiorns, J. E., Bidan, C. M., Jensen, O. E., Gosens, R., Kistemaker, L. E. M., Fredberg, J. J., Butler, J. P., Krishnan, R., & Brook, B. S. (2016). Airway and Parenchymal Strains during Bronchoconstriction in the Precision Cut Lung Slice. *Frontiers in Physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00309>

- 32.- Hislop, A., & Reid, L. (1973). Fetal and childhood development of the intrapulmonary veins in man — Branching pattern and structure. *Thorax*, 28(3), 313-319. <https://doi.org/10.1136/thx.28.3.313>
- 33.- Hyvelin, J.-M., Martin, C., Roux, E., Marthan, R., & Savineau, J.-P. (2000). Human Isolated Bronchial Smooth Muscle Contains Functional Ryanodine/Caffeine-sensitive Ca-Release Channels. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(2), 687-694. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.2.9911025>
- 34.- Itoh, T., Ueno, H., & Kuriyama, H. (1985). Calcium-induced calcium release mechanism in vascular smooth muscles — assessments based on contractions evoked in intact and saponin-treated skinned muscles. *Experientia*, 41(8), 989-996. <https://doi.org/10.1007/BF01952119>
- 35.- Jacobson, A. R. (2006). Structural determinants of 4-chloro-m-cresol required for activation of ryanodine receptor type 1. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.106.022491>
- 36.- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F., & Williams, M. (2002). Purine and Pyrimidine (P2) Receptors as Drug Targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(19), 4057-4093. <https://doi.org/10.1021/jm020046y>
- 37.- Janssen, L. J. (2002). *Ionic mechanisms and Ca²⁺ regulation in airway smooth muscle contraction: Do the data contradict dogma?* 282, 18.
- 38.- Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J., & Chen, S. R. W. (2008). Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal*, 414(3), 441-452. <https://doi.org/10.1042/BJ20080489>
- 39.- Kramer, A. W., & Marks, L. S. (1965). The occurrence of cardiac muscle in the pulmonary veins of rodentia. *Journal of Morphology*, 117(2), 135-149. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051170202>
- 40.- Krause, T., Gerbershagen, M. U., Fiege, M., Weißhorn, R., & Wappler, F. (2004). Dantrolene? A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, 59(4), 364-373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2004.03658.x>
- 41.- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in Muscle Contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a006023. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>
- 42.- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), a003996-a003996. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- 43.- Laporte, R. (2004). Pharmacological Modulation of Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 439-513. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.1>

- 44.- Large, W. A., & Wang, Q. (1996). Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(2), C435-C454. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.2.C435>
- 45.- Leblanc, N., Ledoux, J., Saleh, S., Sanguinetti, A., Angermann, J., O'Driscoll, K., Britton, F., Perrino, B. A., & Greenwood, I. A. (2005). Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells: A complex picture is emerging. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 83(7), 541-556. <https://doi.org/10.1139/y05-040>
- 46.- Levitan, I. (2016). *Vascular ion channels in physiology and disease*. Springer Science+Business Media.
- 47.- Lin, A. H. Y., Sun, H., Paudel, O., Lin, M.-J., & Sham, J. S. K. (2016a). Conformation of ryanodine receptor-2 gates store-operated calcium entry in rat pulmonary arterial myocytes. *Cardiovascular Research*, 111(1), 94-104. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw067>
- 48.- Lin, A. H. Y., Sun, H., Paudel, O., Lin, M.-J., & Sham, J. S. K. (2016b). Conformation of ryanodine receptor-2 gates store-operated calcium entry in rat pulmonary arterial myocytes. *Cardiovascular Research*, 111(1), 94-104. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw067>
- 49.- IINO, M. Calcium Release Mechanism in Smooth Muscle. *Hapan. J. Pharmacol.* 54, 345-354 (1990)
- 50.- Liu, Z., & Khalil, R. A. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 153, 91-122. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.012>
- 51.- Meissner, G. (2010). Regulation of Ryanodine Receptor Ion Channels Through Posttranslational Modifications. En *Current Topics in Membranes* (Vol. 66, pp. 91-113). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(10\)66005-X](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(10)66005-X)
- 51.- Meissner, G. (2017). The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *The Journal of General Physiology*, 149(12), 1065-1089. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711878>
- 53.- Michelakis, E. D., Weir, E. K., Wu, X., Nsair, A., Waite, R., Hashimoto, K., Puttagunta, L., Knaus, H. G., & Archer, S. L. (2001). Potassium channels regulate tone in rat pulmonary veins. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(6), L1138-L1147. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.6.L1138>
- 54.- Morecroft, I., Heeley, R. P., Prentice, H. M., Kirk, A., & MacLean, M. R. (1999). 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: Importance of the 5-HT_{1B} receptor. *British Journal of Pharmacology*, 128(3), 730-734. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702841>
- 55.- Pabelick, C. M., Sieck, G. C., & Prakash, Y. S. (2001). Invited Review: Significance of spatial and temporal heterogeneity of calcium transients in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology*, 91(1), 488-496. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.1.488>

- 56.- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A., & North, R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 452(5), 589-597. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0061-x>
- 57.- Paul-Pletzer, K., Yamamoto, T., Bhat, M. B., Ma, J., Ikemoto, N., Jimenez, L. S., Morimoto, H., Williams, P. G., & Parness, J. (2002). Identification of a Dantrolene-binding Sequence on the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 34918-34923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205487200>
- 58.- Peng, H., Yaney, G. C., & Kirber, M. T. (2010). Modulation of Ca²⁺ release through ryanodine receptors in vascular smooth muscle by protein kinase Ca. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(4), 791-802. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0850-0>
- 59.- Pérez, J. F., & Sanderson, M. J. (2005a). The Contraction of Smooth Muscle Cells of Intrapulmonary Arterioles Is Determined by the Frequency of Ca²⁺ Oscillations Induced by 5-HT and KCl. *The Journal of General Physiology*, 125(6), 555-567. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409217>
- 60.- Pérez, J. F., & Sanderson, M. J. (2005b). The Frequency of Calcium Oscillations Induced by 5-HT, ACH, and KCl Determine the Contraction of Smooth Muscle Cells of Intrapulmonary Bronchioles. *The Journal of General Physiology*, 125(6), 535-553. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409216>
- 61.- Rajagopal, S., & Ponnusamy, M. (2017). *Calcium Signaling: From Physiology to Diseases*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5160-9>
Rajagopal y Ponnusamyâ, Calcium Signaling From Physiology to Diseases.pdf. (2017).
- 62.- Ratz, P. H., Berg, K. M., Urban, N. H., & Miner, A. S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(4), C769-C783. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00529.2004>
- 63.- Rembold, C. M., Riper, D. A. V., & Chen, X.-L. (1995). *Focal [Ca²⁺]_i increases detected by aequorin but not by fura-2 in histamine- and caffeine-stimulated swine carotid artery.* 16.
- 64.- Rosner, S. R., Ram-Mohan, S., Paez-Cortez, J. R., Lavoie, T. L., Dowell, M. L., Yuan, L., Ai, X., Fine, A., Aird, W. C., Solway, J., Fredberg, J. J., & Krishnan, R. (2014). Airway Contractility in the Precision-Cut Lung Slice after Cryopreservation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(5), 876-881. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0166MA>
- 65.- Roux, E., Guibert, C., Savineau, J.-P., & Marthan, R. (1997). [Ca²⁺]_i oscillations induced by muscarinic stimulation in airway smooth muscle cells: Receptor subtypes and correlation with the mechanical activity. *British Journal of Pharmacology*, 120(7), 1294-1301. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701061>

- 66.- Sanderson, M. J. (2011). Exploring lung physiology in health and disease with lung slices. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 24(5), 452-465. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.05.001>
- 67.- Santulli, G., Lewis, D. R., & Marks, A. R. (2017). Physiology and pathophysiology of excitation–contraction coupling: The functional role of ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 38(1), 37-45. <https://doi.org/10.1007/s10974-017-9470-z>
- 68.- Somlyo, A. P. (1985). Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circulation Research*, 57(4), 497-507. <https://doi.org/10.1161/01.RES.57.4.497>
- 69.- Song, D. W., Lee, J.-G., Youn, H.-S., Eom, S. H., & Kim, D. H. (2011). Ryanodine receptor assembly: A novel systems biology approach to 3D mapping. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 105(3), 145-161. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.09.021>
- 70.- Sutko, J. L., Airey, J. A., Welch, W., & Ruest, L. (1997). *The Pharmacology of Ryanodine and Related Compounds*. 46.
- 71.- Tykocki, N. R., Boerman, E. M., & Jackson, W. F. (2017). Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. En R. Terjung (Ed.), *Comprehensive Physiology* (pp. 485-581). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
- 72.- Tykocki, N. R., Wu, B., Jackson, W. F., & Watts, S. W. (2015). Divergent signaling mechanisms for venous versus arterial contraction as revealed by endothelin-1. *Journal of Vascular Surgery*, 62(3), 721-733. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2014.03.010>
- 73.- Van Petegem, F. (2012). Ryanodine Receptors: Structure and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 31624-31632. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.349068>
- 74.- Weid, P.-Y., Serebryakov, V. N., Orallo, F., Bergmann, C., Snetkov, V. A., & Takeda, K. (1993). Effects of ATP on cultured smooth muscle cells from rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, 108(3), 638-645. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb12854.x>
- 75.- Wherens, X y Marks, A. Ryanodine Receptors: Structure, Function, and Dysfunction in Clinical Diseases. Springer Science 2005
- 76.- Wright, D. B., Tripathi, S., Sikarwar, A., Santosh, K. T., Pérez-Zoghbi, J., Ojo, O. O., Irechukwu, N., Ward, J. P. T., & Schaafsma, D. (2013). Regulation of GPCR-mediated smooth muscle contraction: Implications for asthma and pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.06.005>
- 77.- Yang, X.-R., Lin, M.-J., Yip, K.-P., Jeyakumar, L. H., Fleischer, S., Leung, G. P. H., & Sham, J. S. K. (2005). *Multiple ryanodine receptor subtypes and heterogeneous ryanodine receptor-gated Ca²⁺ stores in pulmonary arterial smooth muscle cells*. 289, 11.

- 78.- Zalk, R., Clarke, O. B., des Georges, A., Grassucci, R. A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W. A., Frank, J., & Marks, A. R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), 44-49. <https://doi.org/10.1038/nature13950>
- 79.- Zhao, F., Li, P., Chen, S. R. W., Louis, C. F., & Fruen, B. R. (2001). Dantrolene Inhibition of Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release Channels: MOLECULAR MECHANISM AND ISOFORM SELECTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13810-13816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006104200>
- 80.- Zheng, Y.-M., Wang, Q.-S., Liu, Q.-H., Rathore, R., Yadav, V., & Wang, Y.-X. (2008a). Heterogeneous Gene Expression and Functional Activity of Ryanodine Receptors in Resistance and Conduit Pulmonary as well as Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. *Journal of Vascular Research*, 45(6), 469-479. <https://doi.org/10.1159/000127438>
- 81.- Zheng, Y.-M., Wang, Q.-S., Liu, Q.-H., Rathore, R., Yadav, V., & Wang, Y.-X. (2008b). Heterogeneous Gene Expression and Functional Activity of Ryanodine Receptors in Resistance and Conduit Pulmonary as well as Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. *Journal of Vascular Research*, 45(6), 469-479. <https://doi.org/10.1159/000127438>
- 82.- Zheng, Y.-M., Wang, Q.-S., Rathore, R., Zhang, W.-H., Mazurkiewicz, J. E., Sorrentino, V., Singer, H. A., Kotlikoff, M. I., & Wang, Y.-X. (2005). Type-3 Ryanodine Receptors Mediate Hypoxia-, but Not Neurotransmitter-induced Calcium Release and Contraction in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *The Journal of General Physiology*, 125(4), 427-440. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409232>
- 83.- Zorzato, F., Scutari, E., Tegazzin, V., Clementi, E. and Treves, S. Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. *Molecular Pharmacology* December 1, 1993, 44 (6) 1192-1201

ANEXO 1: Documento de autorización Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile



Santiago, a 25 de marzo de 2019

Certificado n°: **19241-MED-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1044 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Función del receptor de *Ryanodina* en la contracción de células musculares lisas de venas pulmonares pequeñas de rata”**, de la Investigadora **Francisca Varas A.**, Tesista del Magíster en Fisiología, Escuela de Post Grado, Facultad Medicina, Universidad de Chile, y como Investigador Responsable y Patrocinador el **Dr. Mauricio Henríquez Luna**, Profesor Asistente, Director del Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar del Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los Investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **28** ratas, *Rattus norvegicus* de la cepa *Sprague Dawley*, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, desde marzo de 2019 a diciembre de 2019 tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **VID, Universidad de Chile N°ENL029/2017**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

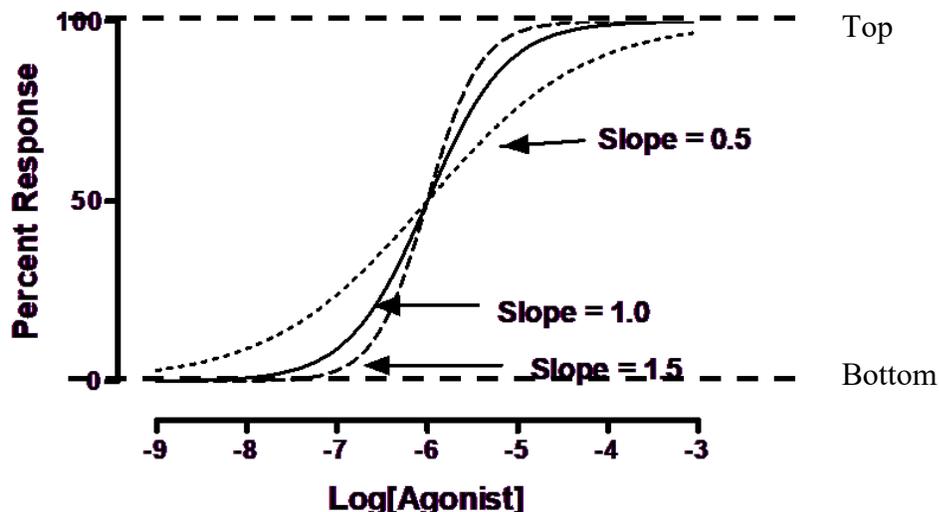

Ronald Vargás Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

ANEXO 2: Descripción curva dosis-respuesta ajustada a una función sigmoidea.



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X)})$$

Top (punto superior) y bottom (punto inferior) : son mesetas en las unidades del eje Y.

EC50: es la concentración de agonista (en el eje X) que genera una respuesta en la mitad de la curva entre el punto inferior y el punto superior. Por lo tanto, representa la concentración de un compuesto en el cual se observa el 50% de su efecto máximo.

Pendiente (Hill slope) : corresponde a la inclinación de la curva. Una curva dosis-respuesta con una pendiente estándar tiene una pendiente de Hill de 1.0. Una curva más pronunciada tiene un factor de pendiente más alto, y una curva menos profunda tiene un factor de pendiente más bajo. En términos prácticos, una pendiente menor (en un mismo gráfico) significa que la respuesta al compuesto utilizado es más lenta en relación a una curva que presente una pendiente mayor.

https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg_dr_stim.htm
https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg_hill_slope.htm

ANEXO 3: Mecanismo de despolarización inducida por KCl

I.- ANTECEDENTES:

a) Condiciones iónicas fisiológicas de célula muscular lisa (SMC)

CONDICIONES FISIOLÓGICAS SMC				
	Int	Ext	V _{eq}	
K⁺	150 mM	5,9 mM	-86 mV	Se mueve de interno (inicial) a externo (final)
Cl⁻	35 mM	125 mM	-34 mV	Se mueve de interno (inicial) a externo (final)
Na⁺	10 mM	145 mM	+61 mV	Se mueve de externo (inicial) a interno (final)

b) Cálculos HBSS y KCl 75 mM

		High K	1000		HBSS 1X		75mM K
stock	mM	mL	FINAL mM		mM		1:1
CaCl ₂	1000	1,26	1,26		1,26		1,26
MgSO ₄	500	1,8	0,9		0,49		0,695
KH ₂ PO ₄	500	0,9	0,45		0,44		0,445
Na ₂ HPO ₄	500	0,68	0,34		0,35		0,345
KCl			142		5,3		73,65
NaCl			0		137,9		68,95
Cl			144,52		145,72		145,12
K			142,45		5,74		74,095
Na			0,68		138,6		69,64

II.- POTENCIAL DE EQUILIBRIO IÓNICO SEGÚN NERST

$$V_{Eq} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \left(\frac{[Ion]_{out}}{[Ion]_{in}} \right)$$

$$R = 8,31; T^{\circ} = 310 \text{ }^{\circ}\text{K}; F = 96.500$$

a) Condiciones basales: HBSS

<p><u>K⁺</u>: K⁺ out= 5,74 mM K⁺ in = 150 mM (fisiológico)</p> <p>V_{eq}K⁺ = 0,026 * ln (5,74/150) V_{eq}K⁺ = -84,84 mV</p>	<p><u>Cl⁻</u>: Cl⁻ out= 145,72 Cl⁻ in = 35 mM (fisiológico)</p> <p>V_{eq}Cl⁻ = 0,026 * ln (145,72/35) V_{eq}Cl⁻ = -37,08 mV</p>	<p><u>Na⁺</u>: Na⁺ out= 138,6 Na⁺ in = 10 mM (fisiológico)</p> <p>V_{eq}Cl⁻ = 0,026 * ln (138,6/10) V_{eq}Cl⁻ = + 68,35 mV</p>
--	--	---

b) KCl 75 mM

<p><u>K⁺</u>: K⁺ out= 74,05 mM K⁺ in = 150 mM (fisiologico)</p> <p>$V_{eqK^+} = 0,026 * \ln(74,05/150)$ $V_{eqK^+} = -18,35 \text{ mV}$</p>	<p><u>Cl⁻</u>: Cl⁻ out= 145,12 Cl⁻ in = 35 mM (fisiologico)</p> <p>$V_{eqCl^-} = 0,026 * \ln(145,12/35)$ $V_{eqCl^-} = -36,97 \text{ mV}$</p>	<p><u>Na⁺</u>: Na⁺ out= 69,64 Na⁺ in = 10 mM (fisiologico)</p> <p>$V_{eqNa^+} = 0,026 * \ln(69,64/10)$ $V_{eqNa^+} = +50,45 \text{ mV}$</p>
--	--	--

III- POTENCIAL DE MEMBRANA

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{P_K[K]_e + P_{Na}[Na]_e + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_e} \right] \quad (32)$$

R= 8,31; T°= 310 °K; F= 96.500

a) Condiciones basales: HBSS

	Int	Ext	P
K⁺	150 mM	5,74 mM	1
Na⁺	10 mM	145,72 mM	0,1
Cl⁻	35 mM	125 mM	1

$$V_m = \frac{8,31 * 310}{96.500} \ln \left[\frac{1 * 5,74 + 0,1 * 145,72 + 1 * 35}{1 * 150 + 0,1 * 10 + 1 * 125} \right]$$

$$V_m = 0,026 \ln \left[\frac{5,74 + 14,572 + 35}{150 + 1 + 125} \right]$$

$$V_m = 0,026 \ln \left[\frac{55,312}{276} \right]$$

$V_m = -41,17 \text{ mV}$

b) KCl 75 mM:

	Int	Ext	P
K+	150 mM	74,095 mM	1
Na+	10 mM	69,64 mM	0,1
Cl-	35 mM	145,12	1

$$V_m = \frac{8,31 * 310}{96.500} \ln \left[\frac{1 * 74,095 + 0,1 * 69,64 + 1 * 35}{1 * 150 + 0,1 * 10 + 1 * 145,12} \right]$$

$$V_m = 0,026 \ln \left[\frac{74,095 + 6,96 + 35}{150 + 1 + 145,12} \right]$$

$$V_m = 0,026 \ln \left[\frac{116,055}{296,12} \right]$$

$V_m = -24,35 \text{ mV}$

IV.- POTENCIAL ELECTROQUIMICO

a) Condiciones basales: HBSS

K⁺: K⁺ out (final)= 5,74 mM
 K⁺ in (inicial) = 150 mM (fisiológico)
 V_m = - 41,17 mV

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = R * T * \ln (C_{final}/C_{inicial}) + z * F * V_m$$

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = 8,31 * 310 * \ln(5,74/150) + 1 * 96500 * -0,041$$

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = 2,576,1 * \ln(0,38) + - 3.956$$

$\Delta\mu_{K+(i-e)} = -12.362 \text{ Joules/mol}$ (signo negativo implica que es un proceso TDN favorable)

Cl⁻: Cl⁻ out (final)= 145,72 mM
 Cl⁻ in (inicial) = 35 mM (fisiológico)
 V_m = -41,17 mV

$$\Delta\mu_{Cl-(i-e)} = R * T * \ln (C_{final}/C_{inicial}) + z * F * V_m$$

$$\Delta\mu_{Cl-(i-e)} = 8,31 * 310 * \ln(145,72/35) + -1 * 96500 * -0,041$$

$$\Delta\mu_{Cl-(i-e)} = 2,576,1 * \ln (4,16) + 3.956$$

$\Delta\mu_{Cl-(i-e)} = 7.630 \text{ Joules/mol}$

Na⁺: Na⁺ out (inicial) = 138,6 mM
 Na⁺ in (final) = 10 mM (fisiológico)
 V_m = -41,17,35 mV

$$\Delta\mu_{Cl(i-e)} = R \cdot T \cdot \ln(C_{final}/C_{inicial}) + z \cdot F \cdot V_m$$

$$\Delta\mu_{Cl(i-e)} = 8,31 \cdot 310 \cdot \ln(10/138,6) + 1 \cdot 96500 \cdot -0,041$$

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = 2,576,1 \cdot \ln(0,072) + -3.956$$

$\Delta\mu_{Cl(i-e)} = -10.728 \text{ Joules/mol}$ (signo negativo implica que es un proceso TDN favorable)

b) KCl 75 mM

K⁺: K⁺ out (final) = 74,095 mM
 K⁺ in (inicial) = 150 mM (fisiológico)
 V_m (en estas nuevas condiciones) = -24,35 mV

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = R \cdot T \cdot \ln(C_{final}/C_{inicial}) + z \cdot F \cdot V_m$$

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = 8,31 \cdot 310 \cdot \ln(74,095/150) + 1 \cdot 96500 \cdot -0,024$$

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = 2,576,1 \cdot \ln(0,49) + -2.316$$

$\Delta\mu_{K+(i-e)} = -4.132 \text{ Joules/mol}$ (signo negativo implica que es un proceso TDN favorable)

Cl⁻: Cl⁻ out (final) = 145,12 mM
 Cl⁻ in (inicial) = 35 mM (fisiológico)
 V_m (en estas nuevas condiciones segun Nerst calculado arriba) = -24,35 mV

$$\Delta\mu_{Cl(i-e)} = R \cdot T \cdot \ln(C_{final}/C_{inicial}) + z \cdot F \cdot V_m$$

$$\Delta\mu_{Cl(i-e)} = 8,31 \cdot 310 \cdot \ln(145,72/35) + -1 \cdot 96500 \cdot -0,024$$

$$\Delta\mu_{K+(i-e)} = 2,576,1 \cdot \ln(4,16) + 2.316$$

$\Delta\mu_{Cl(i-e)} = 5.990 \text{ Joules/mol}$

Na⁺: Na⁺ out (inicial) = 69,64 mM
 Na⁺ in (final) = 10 mM (fisiológico)
 V_m (en estas nuevas condiciones segun Nerst calculado arriba) = -24,35 mV

$$\Delta\mu_{Na+(i-e)} = R \cdot T \cdot \ln(C_{final}/C_{inicial}) + z \cdot F \cdot V_m$$

$$\Delta\mu_{Na+(i-e)} = 8,31 \cdot 310 \cdot \ln(10/69,64) + 1 \cdot 96500 \cdot -0,024$$

$$\Delta\mu_{Na+(i-e)} = 2,576,1 \cdot \ln(0,14) + -2.316$$

$\Delta\mu_{Na+(i-e)} = -7.315 \text{ Joules/mol}$ (signo negativo implica que es un proceso TDN favorable)

Entonces:

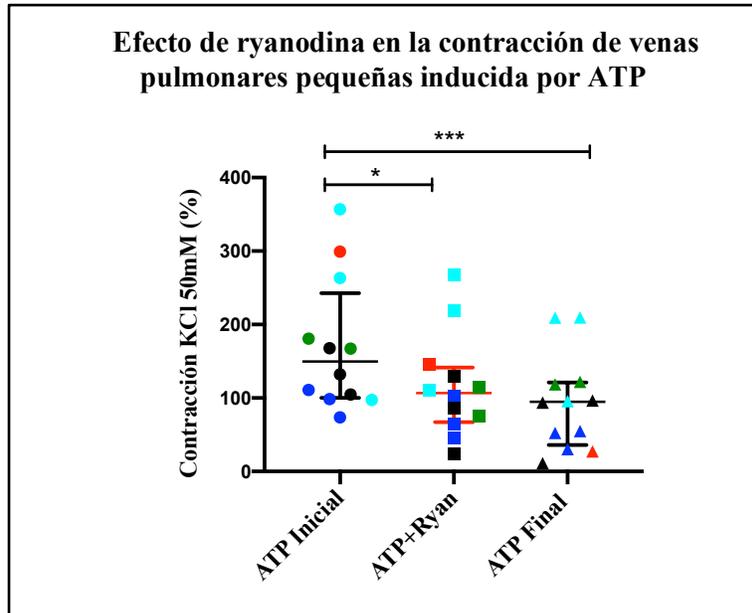
	K ⁺				Cl ⁻				Na ⁺			
	Int mM	Ext mM	V _{eq} mV	Δμ J/mol	Int mM	Ext mM	V _{eq} mV	Δμ J/mol	Int mM	Ext mM	V _{eq} mV	Δμ J/mol
HBSS	150	5,74	-84,84	-12.362	35	145,72	-37,08	7.630	10	138,6	68,35	10.728
KCl 75 mM	150	74,09	-18,35	-4.132	35	145,12	-36,97	5.990	10	69,64	50,45	7.315

V _m HBSS	-41,14
V _m KCl 75 mM	-24,35

Comentario final:

La despolarización inducida por 75 mM de KCl ocurre porque el potencial de equilibrio del K⁺ se modifica de -84 a -18 mV, sin variación en el potencial de equilibrio del Cl⁻. Por otra parte el potencial de membrana se eleva de -41 a -24 mV. Aunque las variaciones en los potenciales aún indican que la tendencia del K⁺ es moverse desde el interior de la célula hacia el exterior, estos cambios generan menor salida de K⁺, lo que implica acumulación de cargas positivas en el citosol. Por último, es importante mencionar que la variación del potencial de equilibrio del K⁺ (en una solución de 75 mM de KCl) se logra modificando el potencial de equilibrio del Na⁺ con el fin de mantener isotonicidad de la solución.

ANEXO 4: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ATP: análisis sin outlier



	ATP Inicial	ATP+Ryan	ATP Final
n (exps/ratas)	13/5	13/5	13/5
Percentil 25%	100,1	67,05	35,96
Mediana	149,7	106,6	94,77
Percentil 75%	242,7	141,6	121,2

ANEXO 5: Efecto de ryanodina en la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por ATP y ADP. Evaluación por animal

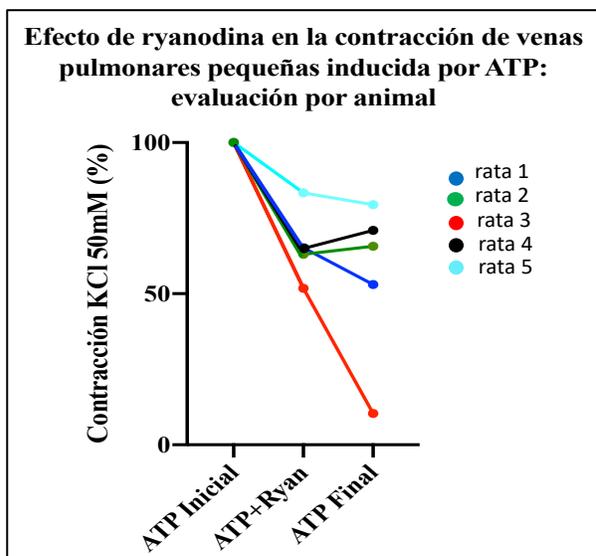


Figura A: Efecto de ryanodina en la contracción de venas pulmonares pequeñas inducida por ATP. Valor inicial de la contracción fue normalizado a 100%. Cada punto representa la mediana de contracción por animal estudiado. Se observa que la incubación de ryanodina 50 μ M por 30 minutos disminuyó la contracción por ATP 1mM. La inhibición se mantuvo posterior al lavado de 10 minutos en base a datos presentados en figura 9.

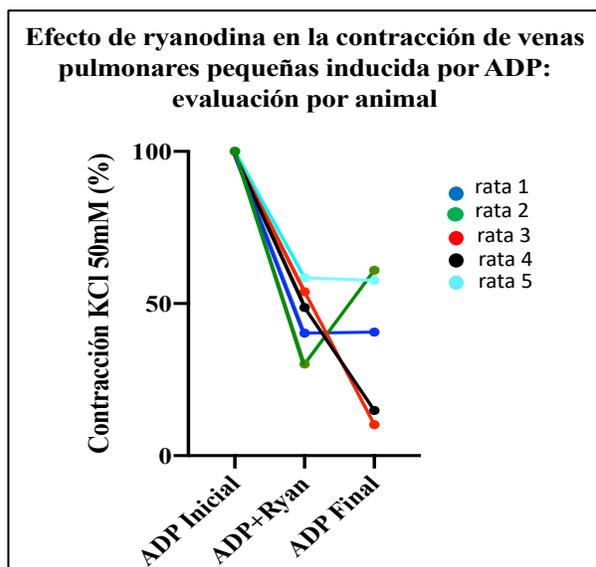


Figura B: Efecto de ryanodina en la contracción de venas pulmonares pequeñas inducida por ADP. Valor inicial de la contracción fue normalizado a 100%. Cada punto representa la mediana de contracción por animal estudiado. Se observa que la incubación de ryanodina 50 μ M por 30 minutos disminuyó la contracción por ADP 1mM. La inhibición se mantuvo posterior al lavado de 10 minutos en base a datos presentados en figura 12.