

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



**PARTICIPACIÓN DEL CANAL DE CLORURO ACTIVADO POR
CALCIO (TMEM16A) EN LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ATP EN
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE VENAS INTRAPULMONARES
DE RATA**

MARCELO CRISTIAN FONSECA LLERENA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN FISIOLÓGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del director de tesis, Mauricio Henríquez Luna.

2023

Dedicatoria

A mí siempre presente y amada madre, María Ester Llerena Campos.....

Agradecimientos

A mi hermana Perla

A mis primos hermanos Michel y Alexis

A mi sobrino Matías

A mis compañeras de laboratorio, Andrea, Aline y Valentina

A mi hermano y director de tesis, por todos los aprendizajes a pesar de los miles de obstáculos que debimos sortear, siempre buscando los caminos para llegar al mejor puerto. Finalmente, el arte de descubrir y aportar a la ciencia se manifestó y de manera promisoria.

La luz se mostró tenue, sin embargo, el camino está allí, esperando ser descubierto y así será.....

Financiamiento

- Líneas de apoyo a la investigación financiadas por el ICBM (2018)
- U-REDES G 2018-35 Red para el Estudio de Enfermedades Cardiopulmonares de Alta Letalidad (REECPAL)

Índice de Abreviaturas

VDCC: canales de calcio dependientes de voltaje

GPCR: receptor acoplado a proteína G

VIP: venas intrapulmonares pequeñas

PCLS: rebanadas de pulmón de corte preciso

RE: retículo endoplásmico

CMLV: células musculares lisas vasculares

CaCC: canales de cloruro activados por calcio

ROCE: entrada de calcio operado por receptor

SOCE: entrada de calcio operado por almacenamiento

PASMC: células musculares lisas de arteria pulmonar

SERCA: bomba de calcio-ATPasa del retículo endoplásmico

CaM: calmodulina

PCL-β: fosfolipasa C-beta

MLCK: enzima quinasa de la cadena liviana de la miosina

MLC: proteína cadena liviana de la miosina

MLCP: enzima fosfatasa de la cadena liviana de la miosina

PKC: proteína quinasa C

NO: óxido nítrico

sGC: proteína guanil ciclasa soluble

cGMP: proteína guanina monofosfato cíclica

PKG: enzima proteína quinasa G

PMCA: bomba calcio de la membrana plasmática

NCX: intercambiador sodio/calcio

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

[Ca²⁺]_o: concentración de calcio extracelular

IP₃: inositol trifosfato

IP₃R: receptor de IP₃

HBSS: solución salina balanceada de Hank's

Ach: acetilcolina

Mch: metacolina

Índice

1. Resumen.....	9-10
2. Abstract.....	11-12
3. Introducción.....	13-24
3.1 Célula Muscular Lisa.....	13-13
3.2 Calcio y regulación de la contracción en Células Musculares Lisas Vasculares.....	14-17
3.3 Receptores Purinérgicos.....	17-18
3.4 Canales de Cl ⁻ activados por Ca ²⁺	18-24
4. Hipótesis.....	25-25
5. Objetivo General.....	25-25
6. Objetivos Específicos.....	25-25
7. Materiales y Métodos.....	26-30
7.1 Cálculo Tamaño Muestral.....	26-26
7.2 Diseño Experimental.....	26-26
7.3 Animales.....	26-27
7.4 Preparación de Rebanadas de Pulmón de Corte Preciso.....	27-27
7.5 Estudios funcionales de contracción de Venas Intrapulmonares Pequeñas.....	27-28
7.6 Registro y Análisis de Imágenes.....	28-28
7.7 Criterios de Exclusión.....	28-29
7.8 Análisis Estadístico.....	29-30
8. Resultados.....	31-41
8.1 Caracterización de la respuesta contráctil a ATP en VIP.....	31-33
8.2 Rol del cloruro en la contracción muscular inducida por ATP en	

células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas (Objetivo 1).....	33-37
8.3 Determinación de la respuesta contráctil inducida por ATP en presencia de antagonistas y agonista específicos para TMEM16A en células musculares lisas de venas intrapulmonares de ratas (Objetivo 2)..	37-41
9. Discusión.....	42-49
10. Conclusiones.....	50-50
11. Limitaciones.....	51-51
12. Bibliografía.....	52-65
13. Anexo.....	66-68

1. Resumen

Introducción: La unidad básica del músculo liso es la célula muscular lisa. La regulación de la contracción en la célula muscular lisa es a través de segundos mensajeros que abren canales intracelulares, presentes en el Retículo Endoplasmático (RE), liberando iones de calcio. Otra vía es por la entrada de calcio desde el medio extracelular por la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC) generando contracción. El ATP es un agonista fisiológico que activa el receptor purinérgico acoplado a proteína G_q , G_s y G_i en la membrana celular. En nuestro laboratorio hemos visto que la contracción de las VIP inducida por ATP depende de la estimulación de los receptores metabotropos $P2Y_{2/4}$ y la posterior activación de la fosfolipasa C beta (PCL- β), la producción de inositol trifosfato (IP_3), la activación del receptor de inositol trifosfato (IP_3R), la liberación de Ca^{2+} , por lo tanto, aumento en la concentración intracelular de calcio [Ca^{2+}]_i y contracción. El cloruro es el anión intracelular más abundante en las células musculares lisas vasculares (CMLV) (~ 50 mM). Para su activación se requiere la unión de 2 iones de Ca^{2+} y el aumento de la permeabilidad de Cl^- . Como resultado, se produce la corriente de salida del ion cloruro generando despolarización de la membrana plasmática activando los VDCC, la entrada de Ca^{2+} , lo que favorece la mantención de la contracción. Resultados de estudios funcionales de contracción en VIP muestran que la contracción inducida por KCl es inhibida entre un 78.5% para Nimodipino y 95.8% para Nicardipino. Sorprendentemente, la contracción inducida por ATP es también inhibida entre un 45.4% para Nitrendipino y 86.4% para Nimodipino. Nosotros postulamos como hipótesis que esta inhibición por dihidropiridinas (DHP) en la contracción, cuando usamos ATP, se observa debido a la presencia de canales de cloruro activados por Ca^{2+} del tipo TMEM16A que despolarizan la membrana y consecuentemente activan los VDCC.

Objetivo: Evaluar la participación del canal de cloruro activado por Ca^{2+} (TMEM16A) en la contracción muscular inducida por ATP en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas.

Metodología: Se obtuvieron rebanadas de pulmones de ratas macho Sprague-Dawley (~430g) para realizar estudios de vasoconstricción e inhibición de VIP inducida a ATP en medio con NaI y con inhibidores como Ani9, T16AinhAO1 y Benzbromarona (Protocolo CBA1183 FMUCH). Los resultados de contracción son mostrados como la mediana \pm S.E.M. Los datos fueron analizados con test no paramétrico Kruskal-Wallis con post hoc test de Dunn y Wilcoxon. Se consideró una significación estadística $p < 0.05$

Resultados: Hay cambios importantes en la cinética de la contracción, particularmente la aparición de dos fases (una rápida y una lenta) en presencia de NaI. Sin embargo, no hay diferencias en el porcentaje máximo de la contracción al estimular con ATP en medio con NaCl y NaI,

Los tres inhibidores no disminuyeron el porcentaje máximo de contracción, sin embargo, inmediata y rápidamente el vaso se relaja, afectando la mantención de la contracción en el tiempo.

Conclusiones: Con los resultados obtenidos podemos decir que el Canal de Cloruro activado por Ca^{2+} (TMEM16A) es funcional en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas y participa en la contracción muscular inducida por ATP.

2. Summary

Introduction: The basic unit of smooth muscle is the smooth muscle cell. The regulation of contraction in the smooth muscle cell is through second messengers that open intracellular channels, present in the Endoplasmic Reticulum (ER), releasing calcium ions. Another route is through the entry of calcium from the extracellular medium through the activation of voltage-gated calcium channels (VDCC) generating contraction. ATP is a physiological agonist that activates the G_q , G_s , and G_i protein-coupled purinergic receptors on the cell membrane. In our laboratory we have seen that the contraction of the VIPs induced by ATP depends on the stimulation of the $P2Y_{2/4}$ metabotropic receptors and the subsequent activation of phospholipase C beta ($PCL-\beta$), the production of inositol triphosphate (IP_3), the activation of the inositol triphosphate receptor (IP_3R), the release of Ca^{2+} , therefore, an increase in the intracellular concentration of calcium $[Ca^{2+}]_i$ and contraction. Chloride is the most abundant intracellular anion in vascular smooth muscle (VSMC) cells (~50 mM). Its activation requires the binding of 2 Ca^{2+} ions and an increase in Cl^- permeability. As a result, the outward current of the chloride ion is produced, generating depolarization of the plasmatic membrane, activating the VDCCs, the entry of Ca^{2+} , which favors the maintenance of contraction. Results of functional studies of contraction in VIP show that the contraction induced by KCl is inhibited between 78.5% for Nimodipine and 95.8% for Nicardipine. Surprisingly, ATP-induced contraction is also inhibited between 45.4% for Nitrendipine and 86.4% for Nimodipine. We postulate as a hypothesis that this inhibition by dihydropyridines (DHP) in contraction, when we use ATP, is observed due to the presence of TMEM16A-type Ca^{2+} -activated chloride channels that depolarize the membrane and consequently activate VDCCs.

Objective: To evaluate the participation of the Ca^{2+} -activated chloride channel (TMEM16A) in ATP-induced muscle contraction in smooth muscle cells of small intrapulmonary veins of rats.

Methodology: Lung slices from male Sprague-Dawley rats (~430g) were obtained for studies of ATP-induced VIP vasoconstriction and inhibition in medium with Nal and with inhibitors such as Ani9, T16AinhAO1 and Benzbromarone (CBA1183 FMUCH

Protocol). Shrinkage results are shown as the median \pm S.E.M. The data were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis test with the Dunn and Wilcoxon post hoc test. Statistical significance was considered $p < 0.05$

Results: There are important changes in the contraction kinetics, particularly the appearance of two phases (one fast and one slow) in the presence of NaI. However, there are no differences in the maximum percentage of contraction when stimulating with ATP in the medium with NaCl and NaI.

The three inhibitors did not decrease the maximum percentage of contraction; however, the vessel immediately and quickly relaxes, affecting the maintenance of contraction over time.

Conclusions: With the results obtained, we can say that the Chloride Channel activated by Ca^{2+} (TMEM16A) is functional in smooth muscle cells of small intrapulmonary veins of rats and participates in ATP-induced muscle contraction.

3. Introducción:

3.1 Célula Muscular Lisa

La unidad básica del músculo liso es la célula muscular lisa. Desde el punto de vista regulatorio la célula muscular lisa normalmente utiliza la señalización de un segundo mensajero para abrir canales intracelulares que liberan los iones calcio que controlan la contracción. Estos procesos, en contraste con el acoplamiento de excitación y contracción, que se da en el músculo estriado, son lentos y, por lo tanto, adecuados para las contracciones más pausadas y sostenidas que se requieren en el músculo liso [Kuo, 2015].

El músculo liso se encuentra revistiendo las paredes de varios órganos y estructuras tubulares del cuerpo, incluidos el intestino, la vejiga, las vías respiratorias, el útero, los vasos sanguíneos y el estómago. Recibe inervación del sistema nervioso autónomo, y su estado contráctil también está controlado por estímulos hormonales, autocrinos y paracrinos. En el caso del músculo liso vascular, se requiere una contracción permanente para proporcionar tono a los vasos, permitiendo así la regulación del flujo sanguíneo. Los vasos sanguíneos se dividen en vasos de conducción, como la aorta torácica, los cuales presentan mayor diámetro y vasos de resistencia, como las arteriolas que son de diámetro menor. Los vasos sanguíneos de resistencia muestran una respuesta miogénica, que puede aumentar por encima del rango fisiológico (70 a 100 mmHg) dando como resultado un estado contráctil sostenido, lo que provoca un aumento en el tono de los vasos y una hipertensión en el tiempo [Kuo, 2015].

En todas las células musculares, la contracción depende de un aumento de la concentración de calcio citosólico. El calcio tiene una concentración extracelular de 2 a 4 mM y una concentración citosólica en reposo de ~100 nM. También se almacena dentro de las células en el RE, a una concentración de ~0,4 mM [Bootman, 2012] y en mitocondrias a una concentración de 1 a 5 μ M [Chalmers, 2003].

3.2 Calcio y regulación de la contracción en Células Musculares Lisas Vasculares

El inicio de la contracción en respuesta al aumento de KCl extracelular, en condiciones experimentales, se debe a la presencia de los canales de K^+ . Se sabe que cambiar la diferencia de $[K^+]$ internas y externas en las CMLV produce despolarización de la membrana, flujo de entrada de Ca^{2+} y la contracción de las CMVL [Cox, 2002; Pathan, 2011]. La despolarización celular y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ son factores fisiológicos importantes en la inducción de la contracción en las CMLV [Hayabuchi, 2016; Joseph, 2013].

Por otra parte, endotelina, ATP, norepinefrina y otros agonistas fisiológicos se unen y activan GPCR en la membrana celular, generando IP_3 y liberación de calcio desde el RE provocando así la contracción por medio de las oscilaciones de calcio [Du, 2021]. Estas últimas se producen por la liberación y recaptación de Ca^{2+} desde el RE, dando como resultado aumentos y disminuciones cíclicas del Ca^{2+} citoplasmático [Koopmans, 2014] gracias a la participación de la bomba de calcio-ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) que recaptura el Ca^{2+} del espacio citoplasmático aumentando su concentración en el RE [Du, 2021]. Por otra parte, angiotensina II activa GPCR que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ y que regulan la entrada de Ca^{2+} por entrada de calcio operado por receptor (ROCE) y la entrada de Ca^{2+} por entrada de calcio operado por almacenamiento (SOCE). En las células musculares lisas de arteria pulmonar humanas (PASMC), la $[Ca^{2+}]_i$ está regulada principalmente por un equilibrio de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y la entrada de Ca^{2+} a través de los canales permeables al Ca^{2+} de la membrana celular, así como el secuestro de Ca^{2+} hacia los depósitos intracelulares por la SERCA, la salida de Ca^{2+} a través de la Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPasa y el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática. Las PASMC expresan funcionalmente varios canales permeables al Ca^{2+} , incluidos VDCC que son activados por la despolarización de la membrana y canales ROCE que son estimulados y activados por vasoconstrictores, como la endotelina-1, serotonina, fenilefrina, e histamina, y por factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas. La activación de los

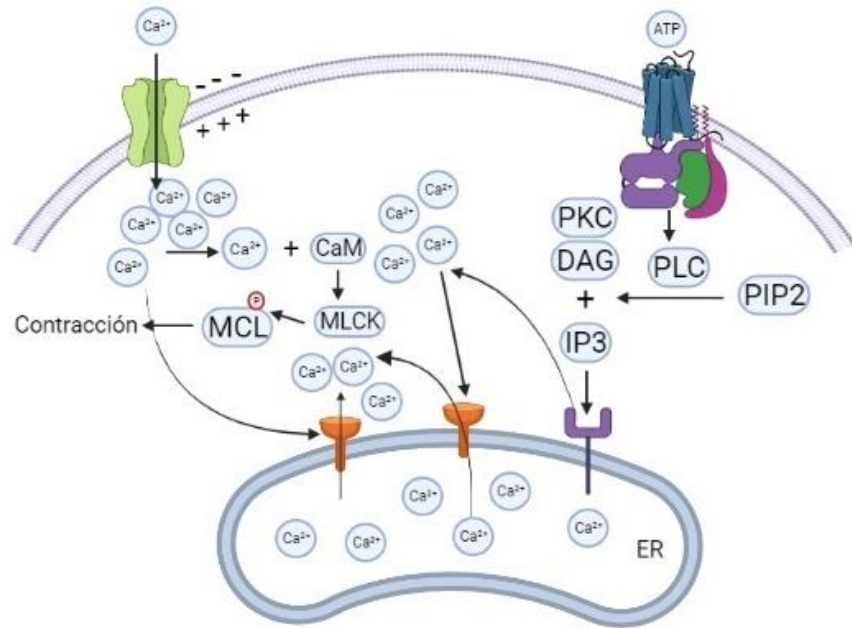
canales ROCE por interacción entre ligandos y receptores de membrana da como resultado la entrada de Ca^{2+} operada por ROCE que contribuye importantemente al aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en PASMC expuestas a vasoconstrictores y factores de crecimiento. Las PASMC también poseen canales SOCE que se abren por el agotamiento de Ca^{2+} RE, lo que conduce a la entrada de Ca^{2+} operada por ROCE o entrada de Ca^{2+} por SOCE [Yamamura, 2011]

El calcio citoplasmático se une a CaM, que luego interactúa con la MLCK, lo que hace que fosforile la MLC en S19 o Y18. La MLC fosforilada permite que la cadena pesada de la miosina forme puentes cruzados con la actina, produciendo actomiosina fosforilada, que produce la contracción (Figura 1).

La principal vía para generar contracción es a través de la activación de la MLCK a través del complejo Ca^{2+} /calmodulina y la posterior fosforilación de MLC [Brozovich, 2003]. Sin embargo, esto está fuertemente modulado por una vía independiente de Ca^{2+} , que ocurre a través de la inhibición de MLCP, favoreciendo la contracción. Este proceso se conoce como sensibilización al Ca^{2+} [Somlyo, 1989] y, aunque los mecanismos aún no se conocen completamente, existe evidencia que, participan receptores acoplados a proteína G, los cuales activan a RhoA, la cual activa a su vez a ROCK [Somlyo, 2000; Wettschureck, 2002]. ROCK puede inhibir la enzima MLCP directamente o a través de CPI-17 [Schaafsma, 2012; Jernigan, 2014], Por otra parte, la activación de los receptores acoplados a proteína G pueden activar PKC, la que activa a CPI-17 en treonina 38 inhibiendo la MLCP favoreciendo la contracción. [Schaafsma, 2012; Jernigan, 2014].

Figura 1

Modelo estimulación de la contracción por activación de Receptores acoplados a proteína G y canales de calcio dependientes de voltaje en células musculares lisas vasculares



Contracción en CMLV: está dada principalmente por el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de RE y de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los VDCC

La principal vía para provocar la vasodilatación es a través de NO y que se logra mediante la activación de la sGC, que primero produce un aumento de cGMP y, por lo tanto, activa la PKG dependiente de cGMP. La activación de PKG activa a la enzima MLCP desfosforilando la MLC, generando la relajación del vaso [Kuo, 2015].

La bomba de calcio-magnesio ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador de sodio/calcio (NCX), también pueden eliminar el calcio del citosol. El calcio se disocia de la troponina C o calmodulina a medida que la concentración de calcio citosólico disminuye. Fisiológicamente las células endoteliales vasculares

liberan factores vasodilatadores para controlar la resistencia vascular periférica y la presión arterial.

3.3 Receptores Purinérgicos

Existen dos clases de receptores purinérgicos: los receptores P1 sensibles a adenosina y los receptores P2 que reconocen nucleótidos de purina y pirimidina (ATP, ADP, UTP, UDP) y UDP-azúcares [Abbracchio, 1994; Abbracchio, 2006; Ralevic, 1998]. Los nucleótidos y nucleósidos pueden liberarse de diferentes tipos de células participando en el control de la función vascular [Burnstock 2006, 2007, 2012], actuando sobre los receptores P1 y P2 expresados en el endotelio, músculo liso vascular y nervios perivasculares para regular los efectos vasomotores y tróficos. El ATP se degrada rápidamente en adenosina, a través de las enzimas ectonucleotidasas, adenosina puede tener sus propios efectos sobre los receptores P1 [Burnstock, 2014]. Hay cuatro receptores de adenosina/P1: A1, A2A, A2B y A3.

Los receptores P2 se dividen en receptores P2X, los cuales son ionotropos y receptores P2Y acoplados a proteína G, es decir, metabotropos [Abbracchio, 2006]. Hay siete proteínas receptoras P2X diferentes (P2X₁-P2X₇), cada una de las cuales tiene dos dominios transmembrana y un bucle extracelular, que pueden combinarse para formar receptores triméricos, homomultiméricos o heteromultiméricos [Barrera, 2005; Jiang, 2003; Kawate, 2009; Nicke, 1998]. Los receptores P2X₁₋₇ son receptores sensibles a ATP y actúan como canales de cationes para provocar la despolarización de la membrana [Li, 2010; North, 2002]. Los receptores P2X tienen diferentes sensibilidades al ATP y a su análogo estable α , β -metilen ATP (α , β -meATP), poseen diferentes tasas de desintegración de la corriente y pueden regularse de manera diferencial por calcio, zinc y protones extracelulares [Khakh, 2001, 2006; North, 2002; Roberts, 2006; Saul, 2013].

En el caso de los receptores P2Y, existen ocho tipos diferentes (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) [Abbracchio, 2006]. Los receptores P2Y se pueden dividir en función a sus agonistas endógenos en receptores que son selectivos a los nucleótidos de adenina (P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃) y receptores que son selectivos a los nucleótidos de uracilo

(P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₄) [Alexander, 2011; von Kügelgen, 2006]. El consenso durante muchos años fue que los receptores P2X vasculares están presentes en el músculo liso, mientras que el control endotelial del tono vascular involucra a los receptores P2Y (principalmente P2Y₁ y P2Y₂) (Burnstock, 2014; Ralevic, 1998).

Resultados en VIP de ratas sanas realizados en nuestro laboratorio utilizando vasoconstrictores fisiológicos como ATP, UDP, ADP y UTP, nucleótidos que están presentes y juegan un rol trascendental en el control del tono vascular venoso, muestran que VIP se contraen fuertemente en respuesta al ATP, ADP, UTP, UDP y UDP-Glucosa [Orellana, 2018] extracelular y también a otros vasoconstrictores fisiológicos relevantes para la circulación pulmonar, incluyendo Angiotensina II, Endotelina-1 [Henríquez, 2018]

3.4 Canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺

Los CaCC están presentes en el músculo liso vascular [Klockner, 1993; Lamb, 1994] y son activados en respuesta a norepinefrina, endotelina-1, histamina, serotonina [Klockner, 1991; Pacaud, 1989; Bulley, 2014], existiendo bastante evidencia que demuestra la contribución de las corrientes de cloruro activadas por Ca²⁺ en una variedad de células musculares lisas como arterias mesentéricas humanas, miocitos de arteria coronaria de conejo y humanas, cultivos celulares de PASMC, células de arteria de oreja de conejo, células musculares lisas de vena porta de rata, cultivo celular de músculo liso de arteria pulmonar de conejo y cultivo celular de músculo liso de aorta de cerdo [Klockner, 1993; Lamb, 1994; Yuan, 1997; Amedee, 1990; Pacaud, 1992; Wang, 1993; Droogmans, 1991]. Las corrientes de ion cloruro contribuyen funcionalmente a la contracción vascular inducida por Norepinefrina y un aumento en la conductancia de cloruro produce despolarización de la membrana plasmática [Lamb, 1998]. Es importante resaltar que el tono y la contractilidad del músculo liso vascular están estrechamente asociados al potencial de membrana (V_m) [Nelson, 1990]. Esta relación se mantiene por la dependencia de la contracción al flujo de entrada de Ca²⁺ a través de VDCC tipo L. El cloruro es el anión intracelular más abundante en las CMLV, con una $[Cl^-]_i$ de ~50 mM [Leblanc, 2005]. Es importante señalar que el potencial de equilibrio para el Cl⁻ en las células del músculo liso está entre -50 y -11

mV [Wahlstrom, 1973; Davis, 1996; Kreye, 1997; Kitamura, 2001]. Por ejemplo, el rango de trabajo de las arterias cerebrales de rata, desde completamente dilatadas hasta totalmente contraídas, ocurre entre potenciales de membrana de ~ -65 y -25 mV respectivamente, lo que eleva la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ entre ~ 120 a 350 nM, asimismo el aumento de la presión de 10 a 100 mmHg, provoca un cambio en el V_m de -63 a -32 mV generando la activación de los VDCC tipo L, provocando la entrada de Ca^{2+} [Knot, 1998]. Al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$, dos iones de Ca^{2+} se unen y activan el canal de Cl^- dando como resultado un flujo de salida de Cl^- , despolarización y vasoconstricción de los miocitos arteriales [Hill, 2001]. El concepto de que los canales de Cl^- contribuyen a la constricción miogénica se planteó a partir de experimentos que usaron moduladores farmacológicos, de los canales de Cl^- , [Hill, 2001; Leblanc, 2005; Nelson, 1997; Yamazaki, 1998].

La forma en que las CMLV regulan el Cl^- genera un sistema ideal para producir y mantener la despolarización. Las CMLV aumentan la concentración de Cl^- intracelular a través de varios mecanismos [Chipperfiweld, 1992; Davis, 1992; Davis, 1993]: el cotransporte $Na^+-K^+-2Cl^-$, el intercambio Cl^-/HCO_3^- y un tercer componente, posiblemente un transportador dependiente de ATP [Davis, 1996], también llamada bomba III [Chipperfiweld, 2000]. Mientras que el V_m en reposo en músculo liso vascular varía de aproximadamente -65 mV a -45 mV, es importante resaltar que el E_{Cl} es aproximadamente 15 a 30 mV más positivo que V_m . Por tanto, un aumento de la permeabilidad de Cl^- tendrá consecuencia importante en el potencial de la célula muscular vascular. Las estimaciones en reposo de las permeabilidades relativas del cloruro respecto del K^+ varían desde 0.09, en la arteria femoral de rata [Chipperfiweld, 1992], a 0.82 en la vena porta de la rata [Wahlstrom, 1973]; sin embargo, esta permeabilidad puede cambiar drásticamente después de la exposición a un agonista contráctil. Se ha demostrado que la estimulación adrenérgica aumenta la conductancia total de la membrana en la arteria carótida [Mekata, 1972] y arteria pulmonar de conejo [Casteels, 1977], arteria mesentérica [Bolton, 1984] y arteria pulmonar de cobayo [Byrne, 1987] asociado con la activación de una corriente de Cl^- (disminución de resistencia de la membrana). Algunos resultados han encontrado que la conductancia total de la membrana disminuye como en la arteria de la oreja [Kajiwara, 1981] y arteria

pulmonar de cobayo [Suzuki, 1986]. Estos resultados contrastantes pueden deberse a diferencias funcionales entre tejidos. Alternativamente, la interpretación de estos resultados puede complicarse por la naturaleza sincicial del músculo liso vascular. Los cambios en la resistencia de la membrana pueden disminuir o aumentar por cambios en el acoplamiento eléctrico entre las células.

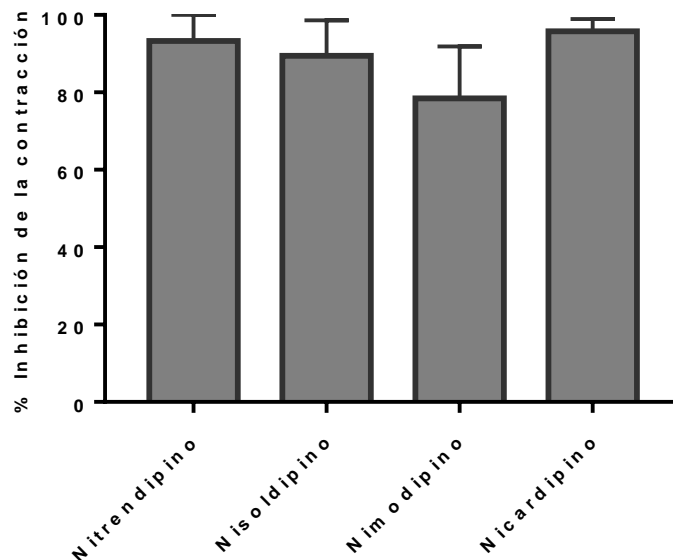
Las corrientes de cloruro activado por calcio son componentes importantes en la contracción del músculo liso de las vías respiratorias [Janssen, 1995]. En 2008, tres laboratorios de manera independiente descubrieron que las corrientes de cloruro activado por calcio están mediadas por la familia de proteínas TMEM16 (anoctamina) en una amplia variedad de células, incluido el músculo liso [Bao, 2008; Caputo, 2008; Schroeder, 2008]. TMEM16A se expresa en músculo liso de las vías respiratorias y juega un papel importante en la contracción de célula muscular lisa [Gallos, 2013]. Se han identificado varios inhibidores de TMEM16A selectivos y potentes [Huang, 2012; Oh, 2013]. Benzbromarona, uno de estos inhibidores, relaja las vías respiratorias centrales y periféricas a través de la hiperpolarización de la membrana y la atenuación del flujo de calcio [Danielsson, 2015].

Los canales de TMEM16A se expresan en CMLV y generan corrientes de Cl^- [Thomas-Gatewood, 2011; Wang, 2012; Li, 2016]. También se pueden expresar en músculo liso uterino [Danielsson, 2018], células intersticiales de Cajal [Huang, 2009], neuronas sensoriales [Cho, 2012] y en células epiteliales de las vías respiratorias [Huang, 2009; Huang, 2012]. TMEM16A se ha descrito como un regulador negativo de la proliferación de células de músculo liso arterial [Wang, 2012]. El aumento de volumen celular y el estiramiento de la membrana inducido por la presión estimulan los canales TMEM16A en las células del músculo liso arterial, lo que conduce a la despolarización y vasoconstricción. Los datos también sugieren que la distensión de la membrana activa canales de cationes no selectivos que estimulan los canales de TMEM16A a través de la señalización intracelular de Ca^{2+} . Los canales TMEM16A de las células del músculo liso arterial son un componente de un mecanismo mecano-sensible que contribuye a la respuesta miogénica.

Es importante señalar que la contracción de las VIP inducida por ATP depende de la estimulación de los receptores metabotrópicos P2Y_{2/4}, la activación de PCL-β, producción de IP₃, activación del IP₃R y posterior liberación de Ca²⁺ intracelular, por lo tanto, aumento en la concentración intracelular de calcio [Ca²⁺]_i y la generación de oscilaciones de Ca²⁺ mediadas por IP₃R en el RE de las CMLV [Henríquez, 2018]. Estudios en VIP muestran que la contracción inducida por KCl es inhibida entre un 78.5 ± 13.4% (Nimodipino) y 95.8 ± 3.1% (Nicardipino), debido al bloqueo de los canales VDCC tipo L, presentes en la membrana plasmática, lo que impide el ingreso de Ca²⁺ al citoplasma, por lo tanto, no se genera contracción (Figura 2).

Figura 2

Inhibición de la contracción inducida por KCl a distintas Dihidropiridinas

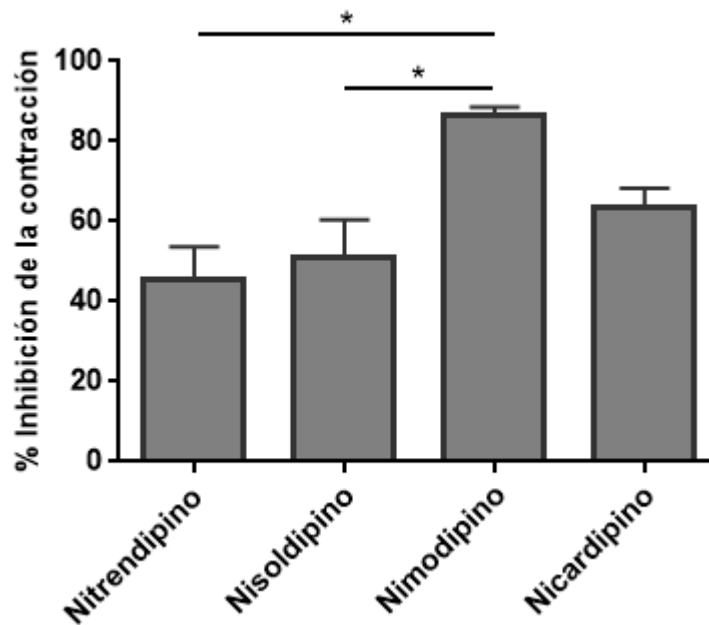


Inhibición de la contracción inducida por KCl 50 mM a distintas DHPs comerciales. La inhibición de la contracción a las 4 diferentes DHPs va desde un 78.5±13.4% para Nimodipino (10 nM) a un 95.8±3.1% para Nicardipino (10 nM) (n=7-8).

Sorprendentemente, la contracción inducida por ATP es también inhibida entre un 45.4±8.4% (Nitrendipino) y 86.4±2.2% (Nimodipino) ($p < 0.05$), datos presentados en la Figura 3.

Figura 3

Inhibición de la contracción inducida por ATP a distintas Dihidropiridinas



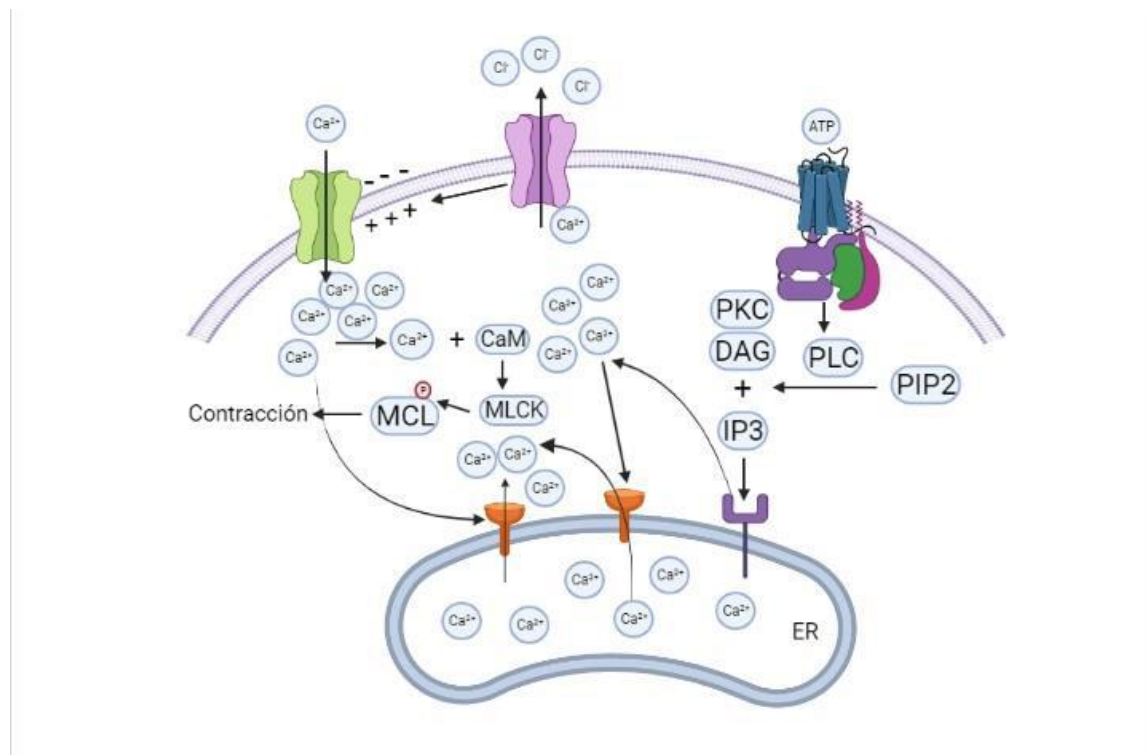
Inhibición de la contracción inducida por ATP 50 μ M a DHPs comerciales. La inhibición de la contracción a las 4 diferentes DHPs va desde un 45.4±8.4% para Nitrendipino (10 nM) a un 86.4±2.2% para Nimodipino (10 nM) ($n=7-8$) ($p < 0.05$)

Sabemos, como ya se planteó anteriormente, que ATP en VIP activa los receptores P2Y_{2/4} que están acoplados a proteína G_q produciendo IP₃ que activa los IP₃R provocando la salida de Ca²⁺ desde RE aumentando la [Ca²⁺]_i lo que genera contracción [Henríquez, 2018], sin embargo, ésta alcanza sólo un 13.6% en presencia de Nimodipino (figura 3). Nosotros postulamos que la inhibición en la contracción cuando usamos ATP en presencia de DHPs se debería a la participación de canales de CaCC, del tipo TMEM16A. Fisiológicamente en las células musculares lisas de VIP

existiría una triada entre los receptores $P2Y_{2/4}$, que vía IP_3 estimula la apertura del IP_3R , el cual permite la salida de Ca^{2+} desde RE, aumentando la concentración en el compartimento citoplasmático activando TMEM16A, generando una corriente de salida de Cl^- , provocando despolarización de la membrana citoplasmática lo que traería como consecuencia la apertura de canales de VDCC tipo L generando entrada de más Ca^{2+} al espacio intracelular, contribuyendo en la mantención de la contracción inducida por ATP. En la Figura 4, mostramos un modelo donde exponemos la participación de TMEM16A en la contracción de la CMLV de VIP en ratas.

Figura 4

Modelo participación TMEM16A en la contracción de VIP



Modelo de participación de canal TMEM16A en la vasoconstricción de VIP: triada en la generación de la vasoconstricción en VIP de ratas donde al estimular con ATP, éste actúa sobre receptores $P2Y_{2/4}$ que vía generación de IP_3 permite la salida de Ca^{2+} desde el RE, aumentando el $[Ca^{2+}]_i$, que a su vez activa los canales TMEM16A,

generando despolarización de la membrana activando los VDCC tipo L, aumentando más la $[Ca^{2+}]_i$ y por lo tanto, generando más contracción.

4. Hipótesis

El Canal de Cloruro activado por Ca^{2+} (TMEM16A) es funcional en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas y participa en la contracción muscular inducida por ATP.

5. Objetivo General

Evaluar la participación del canal de cloruro activado por Ca^{2+} (TMEM16A) en la contracción muscular inducida por ATP en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas.

6. Objetivos Específicos

- 1.- Demostrar el rol del cloruro en la contracción muscular inducida por ATP en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas.
- 2.- Determinar la respuesta contráctil inducida por ATP en presencia de inhibidores para TMEM16A en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas.

7. Materiales y Métodos

7.1 Cálculo Tamaño Muestral

Considerando un nivel de confianza de 95%, una precisión de 80%, una proporción de 50%, se calculó el tamaño muestral asociado considerando un 15% de pérdidas, dando un tamaño muestral de 10 animales.

7.2 Diseño Experimental

DISEÑO EXPERIMENTAL SEGÚN CADA OBJETIVO ESPECÍFICO	
OBJETIVOS	EXPERIMENTOS
Demostrar el rol del cloruro en la contracción muscular inducida por ATP en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas.	Experimento de contracción inducida por ATP en donde la solución externa de NaCl es reemplazada por NaI.
Determinar la respuesta contráctil inducida por ATP en presencia de inhibidores para TMEM16A en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas.	<ol style="list-style-type: none">1. Experimento de inhibición de la contracción a ATP en presencia de Ani9.2. Experimento de inhibición de la contracción a ATP en presencia de T16AinhAO1.3. Experimento de inhibición de la contracción a ATP en presencia de Benzbromarona.

7.3 Animales

Todos los procedimientos se realizaron a partir de las guías nacionales de manejo de animales y aprobadas por el CICUA de la Universidad de Chile (Protocolo CBA#1183 FMUCH). Se utilizaron 15 ratas macho, especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague – Dawley de edad mayor a 42 – 45 días con pesos entre 250 – 430 g. Los animales se obtuvieron del bioterio central de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile y fueron trasladados a dependencias del Laboratorio de Dinámicas

Broncovasculares y Daño Pulmonar para realizar la eutanasia. Las ratas fueron eutanasiadas a través de inyección intraperitoneal de Ketamina 180 mg/kg (Centrovet) y Xilazina 18 mg/kg (Ilium) y luego fueron transferidas a un panel de disección en condiciones de asepsia de acuerdo con el protocolo de bioética.

7.4 Preparación Rebanadas de Pulmón de Corte Preciso

En cada animal, previa aplicación local de Etanol al 100%, se realizó una toracotomía media anterior, desde la escotadura yugular hasta el apéndice xifoides, ampliándose en la base del tórax hacia cada lado, con lo que se obtuvo acceso amplio a ambos pulmones. Posteriormente la tráquea fue canulada 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 (SIGMA) al 2% en HBSS (Gibco) + HEPES (SIGMA) (mantenida a 37°C) mediante una jeringa. Inmediatamente se inyectó gelatina al 6% (Winkler) a 37°C en el ventrículo derecho por medio de un catéter intravenoso (NIPRO) para reemplazar la sangre de los vasos intrapulmonares. La agarosa y gelatina fueron solidificados manteniendo el cuerpo de la rata a 4°C durante 30 a 40 minutos. Los lóbulos pulmonares fueron separados y cortados transfiriendo cada trozo de pulmón a un vibrátomo (Compresstome VF-300), con el borde del corte del lóbulo situado en la base del émbolo del equipo. El trozo de pulmón se fijó y cubrió con gelatina al 6%. Una vez que la gelatina se solidificó en frío, el taco con el trozo de pulmón se cortó en rebanadas seriadas de 150 μm , las que fueron almacenadas por un período breve en HBSS frío. En cámara de flujo laminar ubicada en sala de cultivo, se les cambió el HBSS a medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (GibcoTM), suplementado con penicilina (CALBIOCHEM) y estreptomycin (SIGMA) y se dejaron a 37°C y CO₂ 5% en incubadora de cultivo celular hasta por 12 horas para posteriormente ser usadas en estudios funcionales de contracción.

7.5 Estudios funcionales de contracción de Venas Intrapulmonares Pequeñas

Se utilizaron rebanadas de pulmón que contenían VIP cuyos diámetros fueron de entre 150 y 300 μm . Las rebanadas seleccionadas se montaron en un cubreobjeto y fueron

fijadas con una malla de género a la cual se le realizó una perforación central, siendo flanqueada por dos líneas de silicona para formar un canal en donde quedó la rebanada de pulmón con la vena seleccionada y se tapó con un cubreobjetos para formar un canal de perfusión. Por un extremo del canal formado entre el portaobjetos y cubreobjetos se instaló un sistema de perfusión y por el otro extremo un sistema de aspiración. El portaobjeto con la rebanada se montó en la platina de un microscopio invertido de contraste de fase modelo DXS-2 trinocular a 25x.

7.6 Registro y Análisis de Imágenes

Las PCLS fueron expuestas a KCl, ATP, NaI, y a diferentes inhibidores del TMEM16A mediante perfusión automatizada. Los registros se realizaron a través de un microscopio invertido modelo DXS-2 trinocular a 25x y un sistema de fotocaptura usando el software S-Viewer que permitió obtener las imágenes desde una cámara digital de alta resolución 0,45x modelo SXY – I30 de 3.0 M pixeles acoplada al microscopio, capturando fotografías a 0,5 Hz durante todo el proceso de perfusión del sistema. Los registros fueron analizados usando 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 pixeles de cada fotografía). Con los valores obtenidos de área por segundo, se confeccionaron gráficos de registros área vs tiempo. Para cada uno de los resultados, la contracción lograda por el agonista o el agonista más el inhibidor estudiado fue normalizado por la contracción sub máxima por 75 mM de K⁺. En cada experimento se realizó un mínimo de 3 y máximo 6 registros.

7.7 Criterios de Exclusión

Debido a la aparición aleatoria de animales con neumonía se generaron criterios de exclusión primero de aquellos animales que obviamente presentaban signos pulmonares macroscópicos de neumonía. Además, para asegurar la consistencia de los resultados obtenidos de aquellos animales que pasaron la prueba de evidencia de signos de neumonía, se tomaron en cuenta los siguientes criterios para excluir datos de los resultados presentados en la presente tesis:

1. Se calculó la mediana del porcentaje de contracción en respuesta a 75 mM KCl, valor submáximo obtenido de todos los experimentos de curvas dosis respuesta a KCl, realizadas previamente en el laboratorio en ratas sanas y se calculó el primer y tercer cuartil respectivamente, 57% (76.6%-34.3%). Todos los experimentos que mostraron venas hipo reactivas (menores a 34.3%) o hiperreactivas (mayores a 76.6%) fueron excluidas.

2. Como segundo criterio de exclusión se utilizó el método ROUT para eliminar valores atípicos (outliers). El programa estadístico Prism 7.0 ofrece este método automático que utiliza una regresión no lineal (regresión robusta) para ajustar la curva no influenciada por valores atípicos, los residuos del ajuste robusto se analizan para detectar cualquier valor atípico y realiza una regresión de mínimos cuadrados ordinarios en los datos restante. La regresión no lineal, como la regresión lineal, asumen que la dispersión de datos alrededor de la curva ideal sigue una distribución gaussiana o normal. La regresión minimiza la suma de los cuadrados de las distancias verticales o del valor Y entre los puntos y la curva. Los valores atípicos pueden dominar el cálculo de la suma de los cuadrados y generar malos resultados. Primero se ajustan los datos usando una forma robusta de regresión no lineal, basada en la suposición de que la dispersión sigue una distribución Lorentziana. Para definir valores atípicos, se adapta el enfoque de tasa de descubrimiento falso para manejar las comparaciones múltiples. Luego, se eliminan los valores atípicos y se analizan los datos mediante una regresión de mínimos cuadrados ordinarios. Debido a que el método combina la regresión robusta y la eliminación de valores atípicos, se llamó método ROUT. (Harvey J Motulsky and Ronald E Brown. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. BMC Bioinformatics 2006, 7:123 doi:10.1186/1471-2105-7-123).

7.8 Análisis estadístico

Los resultados son mostrados como la mediana y el rango intercuartílico. Para los análisis se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 7.0 y la significancia estadística se analizó con la prueba no-paramétrica de Wilcoxon para la comparación de dos grupos relacionados y Kruskal Wallis con post hoc test de Dunn, para

comparaciones en más de dos grupos. Para el análisis de los datos, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

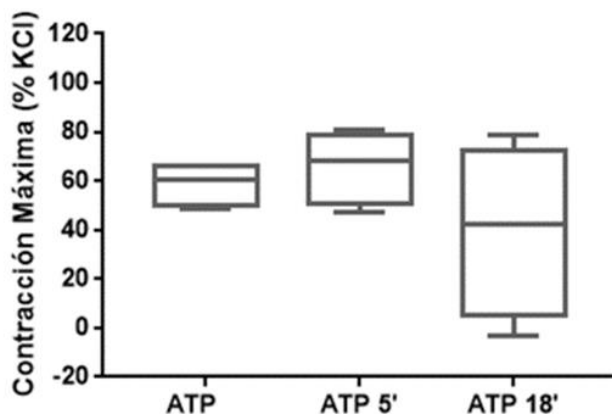
8. Resultados

8.1 Caracterización de la respuesta contráctil a ATP en VIP

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la contracción inducida por ATP en VIP presenta una contracción que alcanza su máximo rápidamente y que se sostiene durante toda la estimulación. Esta contracción estaría dada por el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocada por activación, vía IP_3 , de los IP_3R presentes en el RE [Henríquez, 2018].

A modo de comprobar que el porcentaje de la contracción máxima a ATP no varía durante el tiempo, se realizaron 4 experimentos de 1 rata estimulando la contracción a $100 \mu M$ ATP durante 18 minutos, datos que se muestran en el gráfico de la Figura 5.

Figura 5 Cuantificación del porcentaje de la contracción máxima a ATP durante 18 minutos



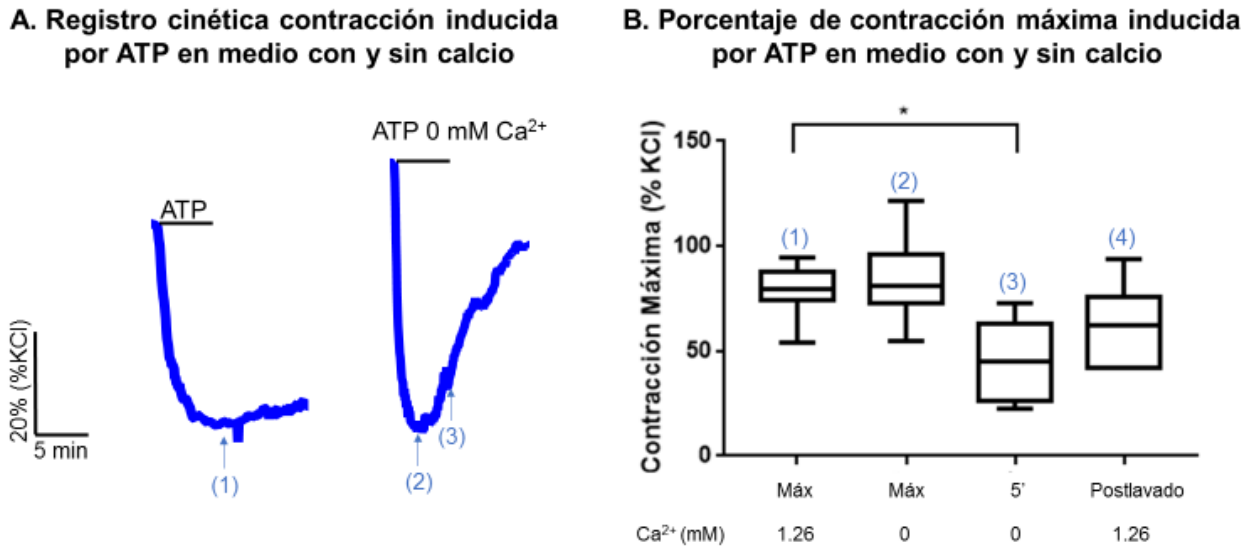
Cuantificación del porcentaje de la contracción máxima a ATP durante 18 minutos. No se observan diferencias en la mediana del porcentaje de contracción máxima (ATP), con la mediana del porcentaje de contracción máxima a los 5 minutos

(ATP 5') y con la mediana del porcentaje de contracción máxima a 18 minutos (ATP 18'). Test Kruskal Wallis con post hoc test de Dunn

La mediana del porcentaje de contracción máxima a 100 μM ATP fue de 60.8% (66.4%-50.1%), después de 5 minutos de estimulación la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 68.3% (79%-50.9%) y a los 18 minutos de estimulación a 100 μM ATP la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 42% (72.3%-5.4%) si bien en este tiempo aumenta la variabilidad, no existen diferencias entre las medianas de los porcentajes de contracción máxima (Figura 5 y Figura 1 anexo 1).

Para comprobar que la contracción máxima al estimular con ATP no depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, se realizaron 7 experimentos de 3 ratas diferentes de estimulación de la contracción a 100 μM ATP en medio con HBSS con 0 mM Ca^{2+} , datos que se muestran en la Figura 6. El registro de la cinética de contracción a 100 μM ATP en medio con HBSS con 0 mM Ca^{2+} presenta una contracción que alcanza su máximo rápidamente y se relaja constantemente hasta los 5 minutos de exposición (Figura 6A y Figura 2 anexo 1). Al estimular primero la contracción a 100 μM ATP, el porcentaje de contracción máxima fue de 78% (88,8%-69,2%). Al pre incubar por 1 minuto con HBSS con 0 mM Ca^{2+} y luego estimular la contracción a 100 μM ATP en HBSS con 0 mM Ca^{2+} el porcentaje de contracción máxima fue de 81.1% (95.9%-73.1%) y a los 5 minutos el porcentaje de contracción máxima fue de 44.7% (63.1%-22.3%). Al estimular la contracción a 100 μM ATP después de 10 minutos de lavado con HBSS, el porcentaje de contracción máxima fue de 61.9% (75.4%-42.2%), no existiendo diferencias entre los porcentajes de contracción máxima a ATP (Figura 6B).

Figura 6 Registro y cuantificación de la estimulación de la contracción por ATP en medio con Ca^{2+} y sin Ca^{2+}



Efecto en la contracción máxima inducida por ATP en medio con 1.26 mM Ca^{2+} y 0 mM Ca^{2+} . A) Registro cinética contracción inducida a ATP en medio con 0 mM Ca^{2+} B) Porcentaje contracción máxima inducida a ATP en medio con 0 mM Ca^{2+} (1) cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μM ATP (15exps/3R), (2) cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μM ATP en medio con 0 mM Ca^{2+} (7exps/3R), (3) cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μM ATP en medio con 0 mM Ca^{2+} 5 minutos estímulo (7exps/3R) * $p < 0.05$. Test Kruskal-Wallis con post hoc test de Dunn, (4) Cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μM ATP postlavado (7exps/3R)

8.2 Rol del cloruro en la contracción muscular inducida por ATP en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas (Objetivo 1).

Para cumplir con el *Objetivo 1* de esta tesis se realizaron experimentos funcionales de contracción en VIP de PCLS de ratas sanas donde se estudió el rol que cumple el ion cloruro asociado a la expresión funcional del canal TMEM16A. La racional fue que el

canal TMEM16A es más permeable a yoduro que a cloruro por lo que realizamos experimentos de contracción inducida por ATP donde la solución externa de 146 mM NaCl es reemplazada por 137.9 mM NaI. El V_m en reposo en las CMLV es aproximadamente -49 mV y no cambia al reemplazar Cl^- por I^- ya que no hay evidencia de la existencia de canales para I^- y la salida de Cl^- está limitada por la entrada de I^- , que es más permeable que Cl^- , a pesar de que la concentración externa de Cl^- es de 7.9 mM. Al inducir la contracción con 100 mM ATP en medio con 146 mM NaCl teóricamente el V_m cambiaría a -37 mV acercándose al E_{Cl} (-25 mV), sin embargo, cuando inducimos la contracción con 100 mM ATP en medio con 137.9 mM NaI el V_m cambiaría a -81 mV, hiperpolarizando la membrana. De esta manera, se limitaría la despolarización inducida por la corriente de salida de cloruro e impediría la activación de los VDCC, provocando, por lo tanto, una menor contracción. Se realizaron 15 experimentos en 3 ratas diferentes de contracción inducida a 100 μ M ATP donde la solución externa era de 146 mM NaCl. Se realizaron 9 experimentos en 3 ratas diferentes de contracción inducida a 100 mM ATP donde la solución externa fue reemplazada por 137.9 mM NaI. La mediana del porcentaje de contracción máxima a 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl (ATP Control) normalizada a 75 mM KCl fue de 78% (88.9%-69.2%) y el porcentaje de contracción máxima inducida a 100 μ M ATP en medio con 137.9 mM NaI fue de 80.7% (102.5%- 69.3%), no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos valores, datos que se muestran en la Figura 7B y Figura 3 anexo 1. Interesantemente, se observó una diferencia en el registro de la cinética de la contracción inducida por 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl en comparación con la estimulación de la contracción con 100 μ M ATP en medio con 137.9 mM NaI, (Figura 7A). El registro característico de la cinética de contracción a 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl muestra una contracción rápida que alcanza rápidamente el máximo y que se mantiene durante los 3 minutos de perfusión, relajándose la vena posterior al retiro del estímulo. Sin embargo, cuando estimulamos la contracción a 100 μ M ATP en medio con 137.9 mM NaI se observa una contracción rápida, pero que se enlentece antes de alcanzar el máximo de contracción, alcanzando la contracción máxima sólo al final de los 3 minutos de estimulación (Figura 7A). El ajuste exponencial de los registros (Figura 7C) de 4 experimentos en 3 ratas diferentes

permitió obtener distintas constantes de tiempo Tau (T) de los registros de las cinéticas de contracción. Cuando se estimuló la contracción a 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl el registro de la cinética de contracción se ajustó a un tiempo Tau, siendo la mediana T1 de 26.1 segundos (36.05s-16.38s). El ajuste exponencial se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$y = y_0 + A_1 e^{-(x-x_0)/t_1}, \text{ donde } y_0: \text{compensación}$$

x_0 : punto centro

A_1 : amplitud

t_1 : constante de tiempo

Interesantemente, cuando se estimuló la contracción a 100 μ M ATP en medio con 137.9 mM NaI, el registro de la cinética de contracción se ajustó a dos Tau, mostrando un componente rápido T1 cuya mediana fue de 17.8 segundos (18.86s-11.38s) y uno lento T2 cuya mediana fue de 240 segundos (10848s-78.78s). El ajuste exponencial se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$y = y_0 + A_1 e^{-(x-x_0)/t_1} + A_2 e^{-(x-x_0)/t_2}, \text{ donde } y_0: \text{compensación}$$

x_0 : punto centro

A_1 : amplitud 1

t_1 : constante de tiempo 1

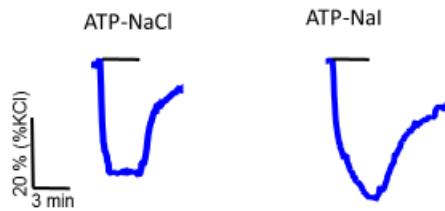
A_2 : amplitud 2

t_2 : constante de tiempo 2

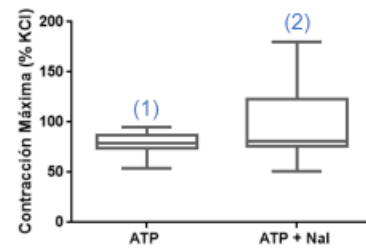
siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), cuando aplicamos test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn. El registro de las cinéticas de contracción y la cuantificación de los datos se muestran en la figura 7A y B respectivamente.

Figura 7. Efecto del yoduro en la contracción inducida por ATP

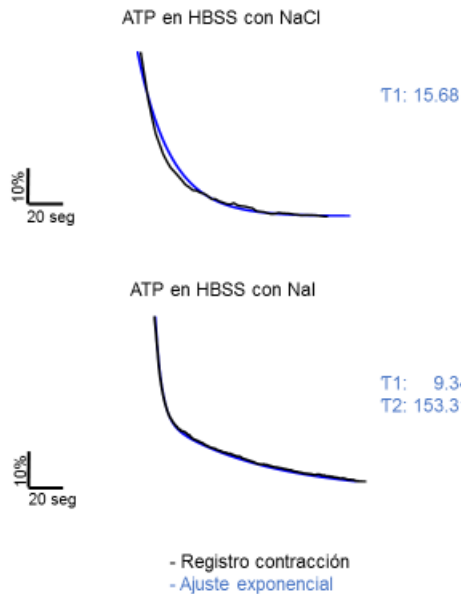
A. Registro de la cinética de contracción en respuesta a ATP en medio con NaCl y NaI



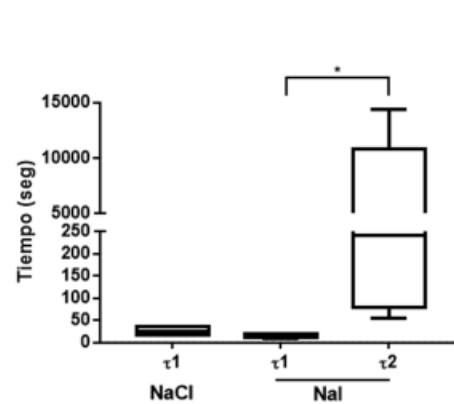
B. Porcentaje de contracción máxima a ATP en medio con NaCl y NaI



C. Ajuste exponencial del registro de la cinética de contracción máxima a la estimulación por ATP en medio con NaCl y NaI



D. Cuantificación T1 a estimulación por ATP en medio con NaCl y T1 y T2 a estimulación por ATP en medio con NaI



Efecto del reemplazo del cloruro por yoduro en la contracción inducida por ATP: A) Registro de la cinética de contracción a 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl y 137.9 mM

Nal. B) (1) Cuantificación del porcentaje de la contracción máxima a 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl (15exps/3R) y (2) en medio con 137.9 mM Nal (9exps/3R). C) Ajuste exponencial del registro de la cinética de contracción máxima a la estimulación de la contracción inducida por ATP en medio con NaCl y en medio con Nal. D) Cuantificación de las constantes de tiempo T1 y T2 a la estimulación de la contracción por ATP en medio con NaCl y en medio con Nal (4exps/3R), * $p < 0.05$. Test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn

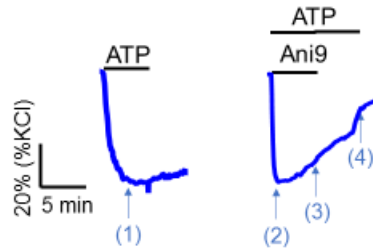
8.3 Determinación la respuesta contráctil inducida por ATP en presencia de inhibidores para TMEM16A en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas. (Objetivo 2).

Hay diversos trabajos que estudian las distintas funciones y papel en diferentes tejidos del canal TMEM16A. Para poder realizar estos estudios se utilizaron moduladores farmacológicos como son los inhibidores que actúan sobre TMEM16A como Ani9, T16AinhAO1 y Benzbromarona que en concentraciones del orden de los 10 μ M demostraron efectividad en estudios electrofisiológicos en células musculares lisas de arteria pulmonar de rata y en células de tiroides de rata que expresan TMEM16A, también en miografías en arteria coronaria descendente anterior izquierda, arterias coronarias septales y las arterias mesentéricas de tercer orden de ratas y en estudios de contracción (fuerza) en músculo liso de vía aérea humana (Forrest, 2012; Greenwood, 2019; Seo, 2016; Hao, 2021; Huang, 2012).

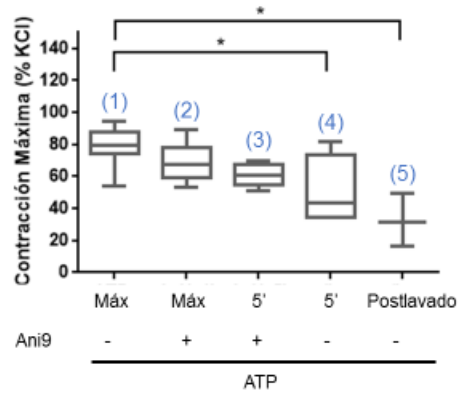
En la Figuras 8 (A-C-E) se muestran los registros de las cinéticas de contracción máxima a 100 μ M ATP en presencia de 10 μ M Ani9, T16AinhAO1 y Benzbromarona, tres inhibidores que actúan sobre el canal TMEM16A. Como ya se describió, el registro de la cinética de contracción a 100 μ M ATP en medio con 146 mM NaCl (control) muestra una contracción que alcanza un máximo de contracción rápidamente y que se mantiene durante los 5 minutos de perfusión. En general, la cinética de la contracción a 100 μ M ATP en presencia de cualquiera de los tres inhibidores fue de una contracción rápida inicial y una posterior relajación durante los 5 minutos a pesar de la perfusión de ATP (Figuras 8 A-C-E).

Figura 8 Respuesta a inhibidores de TMEM16A a la contracción inducida por ATP

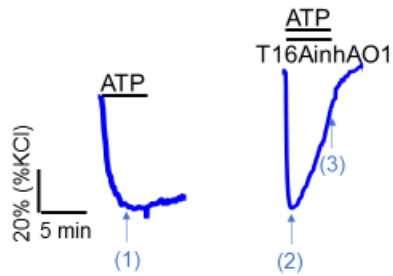
A. Registro de la cinética de contracción en respuesta a ATP en presencia de Ani9



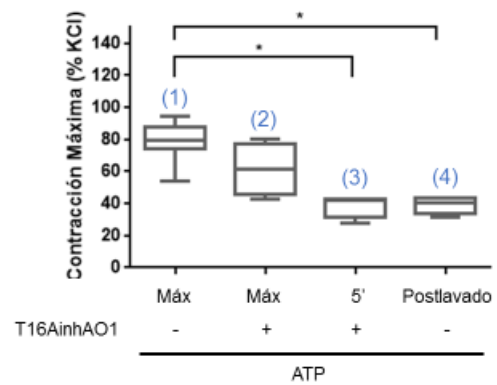
B. Porcentaje de la contracción máxima por ATP en presencia de Ani9



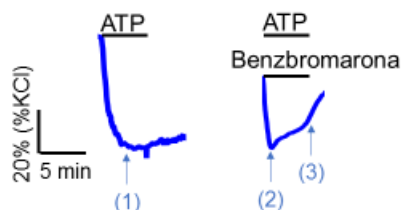
C. Registro de la cinética de contracción en respuesta a ATP en presencia de T16AinhAO1



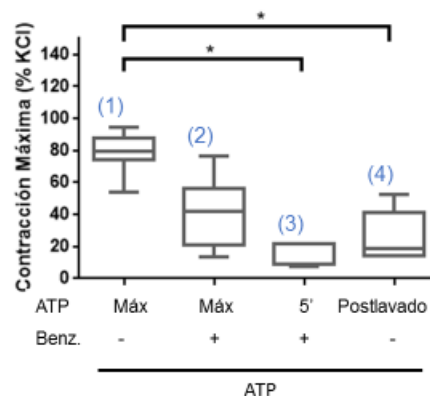
D. Porcentaje de la contracción máxima por ATP en presencia de T16AinhAO1



E. Registro de la cinética de contracción en respuesta a ATP en presencia de Benzbromarona



F. Porcentaje de la contracción máxima por ATP en presencia de Benzbromarona



Respuesta a inhibidores de TMEM16A a la contracción inducida por ATP. A)

Registro cinética del porcentaje máximo de la contracción a 100 μ M ATP en presencia de 10 μ M Ani9, B) (1) Cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μ M ATP (15exps/3R), (2) cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μ M ATP en presencia 10 μ M Ani9, preincubación Ani9 5 minutos (7exs/2R), (3) cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μ M ATP en presencia 10 μ M Ani9 (7exps/2R) a los 5 minutos de estímulo, (4) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μ M ATP después de sacar inhibición 10 μ M Ani9 (4exps/1R) * p <0.05. Test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn y (5) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μ M ATP (3exps/1R) * p <0.05. Test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn, C) Registro cinética del porcentaje máximo de la contracción a 100 μ M ATP en presencia 10 μ M T16AinhAO1, D) (1) Cuantificación porcentaje contracción máxima a 100 μ M ATP (15exps/3R), (2) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μ M ATP en presencia 10 μ M T16AinhAO1, preincubación T16AinhAO1 3 minutos, (4exps/2R), (3) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μ M ATP en presencia 10 μ M T16AinhAO1 a los 5 minutos de estímulo (4exps/2R) * p <0.05. Test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn y (4) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μ M ATP (4 exps/2R) * p <0.05. Test Kruskal-Wallis con post

hoc Test de Dunn, E) Registro cinética del porcentaje máximo de la contracción a 100 μM ATP en presencia 10 μM Benzbromarona, F) (1) Cuantificación porcentaje máxima de contracción a 100 μM ATP (15exps/3R), (2) cuantificación porcentaje de contracción máxima por 100 μM ATP en presencia 10 μM Benzbromarona, preincubación Benzbromarona 5 minutos (7exps/3R), (3) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μM ATP en presencia 10 μM Benzbromarona 5 minutos de estímulo (7exps/3R) * $p < 0.05$. Test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn y (4) cuantificación porcentaje de contracción máxima a 100 μM ATP (7exps/3R) * $p < 0.05$. Test Kruskal-Wallis con post hoc Test de Dunn.

El gráfico de la Figura 8B y Figura 4 anexo 1 se muestra la cuantificación del efecto de Ani9 sobre la contracción inducida por ATP. La mediana del porcentaje de contracción máxima por 100 μM ATP normalizada a 75 mM KCl, como control, fue de 78% (88,8%-69,2%). Una preincubación de 10 μM por 5 minutos del inhibidor Ani9, la mediana del porcentaje de contracción a 100 μM ATP máxima fue de 67,7% (77.7%-59.4%) y a los 5 minutos de estímulo la mediana del porcentaje de contracción máxima a la estimulación por 100 μM ATP en presencia de 10 μM Ani9 disminuyó a 64.5% (69.5%-56.6%), sin embargo, y sorprendentemente al remover los 10 μM Ani9 manteniendo el estímulo a 100 μM ATP por otros 5 minutos, la mediana del porcentaje de contracción máxima siguió disminuyendo hasta un 43.3% (73.7%-34.9%), siendo esta diferencia estadísticamente significativo con respecto a la estimulación de la contracción a 100 μM ATP control ($p < 0.05$). Finalmente, al estimular la contracción a 100 μM ATP después de 10 minutos de lavado con HBSS, la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 31.1% (49.5%-16.5%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación control con 100 μM ATP ($p < 0.05$).

El gráfico de la Figura 8D y Figura 5 anexo 1 muestra la cuantificación del efecto de la preincubación de 3 minutos T16AinhAO1 sobre el porcentaje de contracción máxima por 100 μM ATP normalizada a 75 mM KCl. Al estimular la contracción como control, con 100 μM ATP, la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 78% (88,8%-69,2%). Al estimular la contracción a 100 μM ATP en presencia de 10 μM T16AinhAO1 la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 61,7% (77.1%-

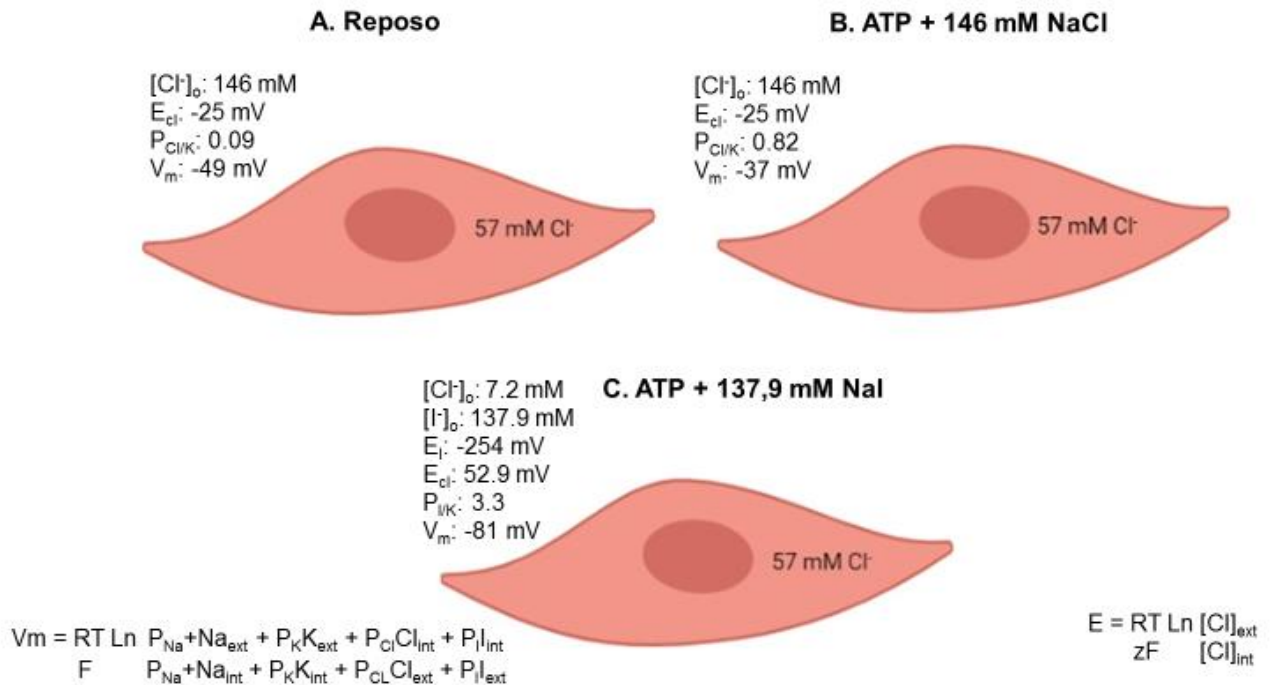
45.8%) y a los 5 minutos de estímulo la mediana del porcentaje de contracción a la estimulación por 100 μM ATP en presencia de 10 μM T16AinhAO1 disminuyó a 42.4% (42.8%-31.2%) siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación de la contracción a 100 μM ATP control ($p < 0.05$). Finalmente, al estimular la contracción a 100 μM ATP después de 10 minutos de lavado con HBSS, la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 40.7% (43.2%-33.6%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación control con 100 μM ATP ($p < 0.05$).

El gráfico de la Figura 8F y Figura 6 anexo 1 muestra la cuantificación del efecto Benzbromarona sobre porcentaje de contracción máxima por 100 μM ATP normalizada a 75 mM KCl en luego de una preincubación de 5 minutos de 10 μM del inhibidor. Al estimular como control, con 100 μM ATP, la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 78% (88,8%-69,2%). Al estimular la contracción a 100 μM ATP en presencia de 10 μM Benzbromarona la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 42% (56.2%-20.8%) y a los 5 minutos de estímulo la mediana del porcentaje de contracción a la estimulación por 100 μM ATP en presencia de 10 μM Benzbromarona disminuyó a 9.2% (21.6%-8.8%) siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación de la contracción a 100 μM ATP control ($p < 0.05$). Finalmente, al estimular la contracción a 100 μM ATP después de 10 minutos de lavado con HBSS, la mediana del porcentaje de contracción máxima fue de 18.7% (41.1%-14.4%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación control con 100 μM ATP ($p < 0.05$).

9. Discusión

Los resultados del Objetivo 1 muestran que al estimular la contracción con ATP en medio con NaI, no se produce una disminución significativa de la mediana del porcentaje de contracción máxima en comparación cuando estimulamos la contracción con ATP en medio con NaCl, sin embargo, de forma importante el registro de la cinética de contracción varía significativamente, cuando usamos NaI, la cinética de contracción en respuesta a ATP en presencia de NaCl es en una constante de tiempo (T_1) y cuando usamos NaI, una cinética en dos fases significativamente diferentes en cuanto a sus constante de tiempo: una rápida (T_1) y otra lenta (T_2). La razón teórica de este cambio en la cinética de contracción se debe a que el V_m calculado, según la ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz [Hodgkin y Katz, 1949], de la célula muscular lisa de las VIP en nuestros experimentos en reposo es de -49 mV, con E_{Cl} de -25 mV. Al estimular los receptores $P2Y_{2/4}$ con ATP vía IP_3 , la concentración de calcio intracelular aumenta, lo que activaría el canal TMEM16A aumentando la permeabilidad de Cl^- a 0.82 y en un medio con NaCl cambiaría el potencial de membrana a -37 mV, acercándose el V_m al E_{Cl} , produciéndose la corriente de salida de Cl^- , la despolarización de la membrana, y como consecuencia la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, la entrada de Ca^{2+} y la mantención de la contracción tal como ha sido descrito para otros agonistas en otras células musculares lisas aisladas de arteria pulmonar humana [Yamamura, 2012; Chipperfield, 2000; Kitamura, 2001; Leblanc, 2005; Hirota, 2006; Huang, 2012; Danielson, 2015; Hübner, 2015; Danielson 2020; Le, 2019]. Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente, la permeabilidad relativa del canal TMEM16A a yoduro respecto a K^+ es mayor ($P_{I/K}:3.3$) que la de cloruro ($P_{Cl/K}:0.89$), de manera tal que al estimular la contracción con ATP en medio con NaI, el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ activaría los canales TMEM16A, sin embargo, el V_m disminuiría a -81 mV, hiperpolarizando la membrana, e impidiendo la activación de los VDCC tipo L, impidiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula e inhibiendo la mantención de la contracción vascular (ver Figura 9).

Figura 9 Modelo cambios V_m cuando se estimula la contracción por ATP en medio con NaCl y NaI



Modelo cambios V_m cuando se estimula la contracción por ATP en medio con NaCl y NaI. A. V_m en estado de reposo. B. Cambio V_m al estimular la contracción por ATP en medio con NaCl. C. Cambio V_m al estimular la contracción por ATP en medio con NaI.

Los resultados del objetivo 2 muestran que existen diferencias en los registros de las cinéticas de contracción máxima a la estimulación a ATP en presencia de uno de los tres inhibidores utilizados siendo una característica común para los tres inhibidores es que muestran una cinética rápida de contracción, sin embargo, todos presentan una relajación rápida que varía dependiendo del inhibidor (Figura 8 A-C-E).

Resultados de la figura 8B muestran que hay una diferencia significativa cuando se estimula la contracción a ATP cuando se retira Ani9 del medio, disminuyendo la mediana del porcentaje de contracción máxima. Estos resultados sugieren que es

necesario pre-incubar más tiempo con Ani9 y además dar más tiempo de exposición a la estimulación de la contracción a ATP en presencia de Ani9.

Curvas dosis-respuesta de medición de corriente en membrana apical de células FRT que expresan TMEM16A muestran que 10 μM Ani9 inhibe completamente la corriente del canal [Seo, 2016]. Por otra parte, el efecto de 3 μM Ani9 en estudios de miografía en arteria coronaria de rata Wistar machos provocó una inhibición pequeña, pero no significativa a la contracción inducida por U46619 un agonista del receptor Tromboxano A₂ [Page, 2019]. Así mismo, en células musculares lisas de vena porta de ratón 1 μM Ani9 inhibió significativamente la corriente de cloruro activada por calcio. Sin embargo, resultados recientes señalan que Ani9 no bloquea efecto potenciador de ETX001, potenciador que promueve la hidratación de la mucosa en las vías respiratorias y elimina la mucosidad in vivo, actuando sobre canal TMEM16A. Tampoco la potenciación a ETX001 y la inhibición de TMEM16A por Ani9 afectan la contracción o relajación de muestras pulmonares humanas ex vivo [Danahay, 2020]. Una posible explicación de la inconsistencia entre estos datos con ETX001 y Ani9 y los estudios publicados, puede relacionarse con la falta de selectividad del inhibidor. Los datos presentados en estos estudios son inconsistentes con la hipótesis de que la modulación positiva de TMEM16A necesariamente inducirá la broncoconstricción o causará la constricción de la arteria pulmonar. Además, la inhibición de TMEM16A con el potente y selectivo inhibidor, Ani9, no relajó el músculo liso bronquial humano, no estimuló la función de las células caliciformes y tampoco alteró el tono de la arteria pulmonar [Danahay, 2020]. No está claro el mecanismo de acción de Ani9, es una molécula pequeña que atraviesa la membrana de la célula [Seo, 2016], por lo tanto, su acción es intracelular y podría ser a nivel de los sitios de unión a calcio. Es importante considerar la importancia de realizar curvas dosis respuesta del inhibidor Ani9 a la contracción inducida por ATP para obtener su EC₅₀ y comparar su sensibilidad con los otros inhibidores usados en este estudio.

Los inhibidores T16AinhAO1 y Benzbromarona usados a 10 μM inhiben parcialmente la contracción cuando se estimula con ATP. La mediana del porcentaje de contracción máxima a los 5 minutos de exposición con ATP en presencia de 10 μM T16AinhAO1

fue de 42.3%, y para Benzbromarona de 9%, significativamente menor que el porcentaje de contracción máxima al estimular la contracción con ATP sin inhibidor (78%). La inhibición parcial con T16AinhAO1 sugiere que el inhibidor necesita de mayor tiempo de exposición para disminuir el máximo de la contracción inducida por ATP.

Diversos estudios han demostrado que T16Ainh-AO1 induce vaso relajación en arterias pequeñas de resistencia, sin embargo, no está claro si actúan verdaderamente como inhibidores selectivos para los canales de cloruro activados por calcio, como TMEM16A. Estudios de tensión en arterias mesentéricas de rata Wistar macho adulto mostraron que al estimular la contracción con noradrenalina la reducción máxima de la tensión se logró con 10 μ M T16 AinhAO1 [Boedtkjer, 2015]. En otros estudios de tensión de arteria torácica de ratón, 10 μ M T16AinhAO1 relajó un 80% a la contracción inducida por methoxamine, un agonista de receptor α -adrenérgico [Davis, 2013]. T16Ainh-AO1 provocó desplazamientos hacia la derecha en curvas dosis respuesta de U46619, un agonista del receptor de serotonina, en segmentos de la arteria coronaria ratas Wistar macho, tanto a 3 μ M como a 10 mM versus DMSO [Page, 2019]. Es importante considerar la importancia de realizar curvas dosis respuesta del inhibidor T16AinhAO1 a la contracción inducida por ATP para obtener su EC_{50} y comparar su sensibilidad con los otros inhibidores usados en este estudio. A pesar de que se ha descrito como un potente inhibidor de canal TMEM16A, no está claro su mecanismo de acción.

Para el caso de Benzbromarona se analizó su capacidad para relajar una contracción inducida por Ach en anillos traqueales de cobayos. Los anillos se trataron con dosis crecientes del antagonista. La benzbromarona a una concentración de 10 μ M relajó significativamente una contracción inducida por Ach (70,9% de la fuerza contráctil) [Danielsson, 2015]. Además, PCLS de ratones C57BL/6 machos fueron usadas para estudios de contracción donde se estimuló la contracción con 0.3 μ M de MCh observando una relajación de ~72% cuando se estimula la contracción con MCh en presencia de 10 μ M Benzbromarona [Danielsson, 2015] Es importante considerar la importancia de realizar curvas dosis respuesta del inhibidor Benzbromarona a la

contracción inducida por ATP para obtener su EC_{50} y comparar su sensibilidad con los otros inhibidores usados en este estudio. Se ha descrito que el mecanismo de acción de benzbramarona sería bloqueando el poro del canal TMEM16A [Huang, 2012].

Cabe destacar que, para los tres inhibidores utilizados en esta tesis, después de removerlos mediante un lavado con HBSS por 10 minutos y volver a estimular la contracción con ATP la mediana del porcentaje de contracción máxima fue significativamente aún menor, lo que motiva a pensar que el inhibidor podría quedar unido al canal a pesar del lavado con la solución salina. Por la misma razón es importante considerar la necesidad de aumentar los tiempos de preincubación de los inhibidores y de estimulación de la contracción a ATP en presencia de los inhibidores.

Estos resultados permiten señalar que fisiológicamente en las células musculares lisas de VIP existe la triada entre los receptores $P2Y_{2/4}$, que vía IP_3 estimula la apertura del IP_3R , el cual permite la salida de Ca^{2+} desde ER, aumentando la concentración en el compartimento citoplasmático activando TMEM16A, generando una corriente de salida de Cl^- , provocando despolarización de la membrana citoplasmática lo que trae como consecuencia la apertura de canales de VDCC tipo L generando entrada de más Ca^{2+} al espacio intracelular, contribuyendo en la mantención de la contracción inducida por ATP. Sin embargo, quedan pendientes los experimentos para evaluar la participación de VDCC de manera más directa como es realizar la estimulación de la contracción por KCl en presencia de los inhibidores de TMEM16A, esperando que la contracción no sea inhibida y estudios de señalización de Ca^{2+} en las células musculares lisas de VIP inducidas por ATP y KCl en presencia de los inhibidores para TMEM16A en PCLS.

Además del uso de inhibidores será importante planificar experimentos con el activador Eact, activador del canal TMEM16A, en presencia de DHPs para demostrar la activación de VDCC a partir de canales TMEM16A. Eact ha mostrado aumento de la conductancia de CaCC en las células epiteliales de las glándulas submucosas salivales y de las vías respiratorias humanas, y estimularon la secreción de las glándulas submucosas en los bronquios humanos y la contracción del músculo liso en el intestino del ratón [Namkung, 2011]. En estudios de tensión de anillos traqueales de cobayos se estimuló la tensión con Eact (23.9%) en presencia de los inhibidores

Benzbromarona y T16AinhAO1 inhibiendo la contracción en 1.4% y 2.6% respectivamente [Danielson, 2020].

Se debe considerar como n válido a cada experimento de una misma rebanada ya que los vasos son diferentes: en diámetro y ubicación espacial dentro del tejido pulmonar. Por otra parte, cada rebanada es también diferente, ya que representan cortes espaciales distintos y que, por lo tanto, pueden contener venas que no están presentes en otras rebanadas. Además, con un mínimo de 3 animales diferentes podemos contar con un n suficiente para realizar los análisis estadísticos correspondientes. El único cuidado, aunque es un control interno de la técnica, es hacer dos experimentos con la misma vena ya que como son rebanadas existe la probabilidad, por continuidad, tomar dos rebanadas que contengan el mismo vaso

La técnica de PCLS permite estudiar la funcionalidad contráctil de la vena en el contexto del tejido completo, donde además del vaso y en este caso, de la célula muscular lisa, esta está rodeada de otras células, como el endotelio y adventicia, además de fibras elásticas, alveolos, macrófagos, eritrocitos, señales moleculares paracrinas y muchos otros eventos que ocurren al mismo tiempo y que forman parte de las respuestas que estamos estudiando. Por ende, es importante señalar la necesidad de usar, en el futuro, otras técnicas complementarias para completar los resultados. Una de ellas es el uso de cultivos primarios de células musculares lisas de VIP de ratas para poder estudiar la funcionalidad y expresión de canal TMEM16A. Es posible que se pierdan algunos mecanismos fisiológicos al cultivar células aisladas del contexto que es estudiar las células en el tejido completo, sin embargo, el cultivo celular nos entrega la especificidad de estudiar receptores o canales en la célula de interés. Existe bibliografía respecto a la preparación y uso de células musculares lisas de arterias vasculares y órganos en diversos modelos animales [Zhang, 2016; Lee, 2013], sin embargo, en VIP es muy limitado y es cuestionable su eficiencia. De lograrse se podrían realizar estudios de expresión de TMEM16A a través de inmunofluorescencia indirecta o inmunocitoquímica, ensayo de flujo de ion yoduro marcado con sonda fluorescente (YFP-I), RT q-PCR para detectar expresión de RNA y wester blot para ver la expresión del canal. Para complementar los estudios de

funcionalidad se podrían realizar registros de corriente de cloruro a través de patch-clamp.

Cabe destacar que también es necesario realizar estudios de otros canales iónicos que podrían estar participando en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y que están presentes en las células musculares lisas como son los canales de entrada de Ca^{2+} operados por almacenamiento (SOCE). Agonistas fisiológicos promueven un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ que provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) generando la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE por depleción de Ca^{2+} desde el RE [Ávila-Medina, 2018]. En estudios de entrada de Ca^{2+} por depleción de los depósitos de Ca^{2+} a través de la estimulación repetitiva de receptores P2Y de cultivo primario de células musculares lisas de arterias coronarias de cerdo se observó la participación de SOCE, sin embargo, la participación fisiológica de SOCE en la homeostasis del Ca^{2+} en venas intrapulmonares no ha sido estudiada.

El estudio de la funcionalidad contráctil de las células musculares lisas de VIP en PCLS, como ya se dijo, mantiene indemne todo el tejido pulmonar, por lo tanto, el mecanismo endotelial podría estar participando e inhibiendo la contracción a través de la vía de señalización intracelular NO, generación de GCs, activación de PKG, activación de MLCP y relajación [Kuo, 2015]. Sin embargo, nuestra técnica se basa en hacer circular una solución que contiene un agonista o antagonista a una velocidad de 1 mL por minuto a través de una pequeña cámara donde está montada la rebanada, por lo que si se produce NO este sería retirado inmediatamente impidiendo la relajación de las VIP. Como una estrategia experimental, complementaria y como control para comprobar lo anterior, se podrían diseccionar venas intrapulmonares de mayor calibre al usado en estudios funcionales de contractibilidad en PCLS y usarlas en estudios de tensión (miografía), donde se puede retirar el endotelio y realizar los estudios funcionales de contracción comparando los resultados. Otra forma, es realizar experimentos con L-NAME que es un inhibidor del óxido nítrico sintetasa.

Finalmente, cabe destacar que información entregada por varios investigadores, no se utilizaron anticuerpos por su baja especificidad para demostrar la presencia del canal TMEM16A. En estudios a futuro y para cumplir este objetivo, se propone determinar la

expresión de TMEM16A a través de la regulación a la baja del canal a través de la técnica de knock-down con shRNAs con vectores lentivirales [Moffat, 2006].

Importante mencionar que por primera vez se describe el canal de cloruro activado por calcio, del tipo TMEM16A en células musculares lisas de venas intrapulmonares de rata y que para su activación se requiere de la participación de los receptores purinérgicos P2Y_{2/4}.

10. Conclusiones

Hay cambios importantes en la cinética de la contracción, particularmente la aparición de dos fases (una rápida y una lenta) en presencia de NaI, a pesar, de que no hay diferencias en el porcentaje máximo de la contracción al estimular con ATP en medio con NaCl y NaI,

Los tres inhibidores no disminuyeron el porcentaje máximo de contracción, sin embargo, inmediata y rápidamente el vaso se relaja, afectando la mantención de la contracción en el tiempo.

Con los resultados obtenidos podemos decir que el Canal de Cloruro activado por Ca^{2+} (TMEM16A) es funcional en células musculares lisas de venas intrapulmonares pequeñas de ratas y participa en la contracción muscular inducida por ATP.

11. Limitaciones

Debido a la aparición aleatoria de animales procedentes del bioterio central con pulmones con signos macroscópicos de neumonía el n total de animales usados aumentó. Por otra parte, el n experimental de la cuantificación de la mediana de la contracción máxima por ATP (Control) fue obtenido a partir del primer grupo de animales tratados con antibióticos en el bioterio central.

12. Bibliografía

Abbracchio, M. P., Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445–475, 1994.

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII. Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341, 2006.

Adao, R., Santos-Gomes, J., Le Ribeuz, H., Brás-Silva, C., Antigny, F. Role of Ion Channel Remodeling in Endothelial Dysfunction Induced by Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolucules*, 12:484, 2022.

Albers, TM, Simon, MA and Clifford, CB: Histopathology of naturally transmitted ‘rat respiratory virus’: progression of lesions and proposed diagnostic criteria. *Vet Pathol* 46: 992-999, 2009.

Alexander, S.P.H., Mathie, A., Peters, J-A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edn. *Br J Pharmacol* 164 (Suppl. 1): S1–S324, 2011.

Amedee, T., Large, W. A., Wang, Q. Characteristics of chloride currents activated by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *J Physiol.* 428:501–516, 1990.

Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J. and Smani, T. The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front. Physiol.* 9:257, 2018 doi: 10.3389/fphys.2018.00257 Bao, R., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., Bellvé, K., Fogarty, K. E., ZhuGe, R. A close association of RyRs with highly dense clusters of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels underlies the activation of STICs by Ca²⁺ sparks in mouse airway smooth muscle. *J Gen Physiol* 132: 145–160, 2008. doi:10.1085/jgp.200709933.

Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado R. D., Edwardson J. M. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J. Biol. Chem.* 280, 10759–10765, 2005.

Ben-Ari, Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3:728–39, 2002.

Bergfeld, G. R., Forrester, T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 26:40–47, 1992.

Billaud, M., Lohman, A. W., Straub, A. C., Looft-Wilson, R., Johnstone, S. R., Araj, C. A. Pannexin1 regulates alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction. *Circ Res* 109:80–85, 2011.

Boedtker, D., Kim, S., Jensen, A. D., Matchkov, V. M., Adersson, K. New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels – T16Ainh-A01, CaCCinh-A01 and MONNA –what do they inhibit? *British Journal of Pharmacology.* 172 4158-4172, 2015.

Bodin, P., Burnstock, G. Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells. *Experientia* 51:256–259, 1995.

Bolton, T. B., Lang, R. J. and Takewaki, T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of the guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol. (Lond.)* 351: 549–572, 1984.

Bootman, M. D. Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 2012; a011171.

Brayden, J. E., and Nelson M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256: 532–535, 1992.

Brozovich, F. Rho Signaling. Agonist Stimulation and Depolarization Come Together. *Circ Res.* 93:481-483, 2003.

Bulley, S., Jaggar, J. Cl⁻ channels in smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 466(5): 861-872, 2014.

Burnstock, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 166–176, 2006.

Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797, 2007.

Burnstock, G. Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Br. J. Pharmacol.* 167 (2), 238–255, 2012.

Burnstock, G., Ralevic, V. Purinergic signalling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 66, 102–192, 2014.

Byrne, N. G., and Large, W. A. The action of noradrenaline on single smooth muscle cells freshly dispersed from the guinea pig pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 91: 89–94, 1987.

Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., Galletta, L. J. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322: 590–594, 2008. doi:10.1126/science.1163518.

Casteels, R., K. Kitamura, Kuriyama, H., and Suzuki, H. The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol. (Lond.)* 271: 41–61, 1977.

Chalmers, S. and Nicholls, D. The Relationship between Free and Total Calcium Concentrations in the Matrix of Liver and Brain Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, N° 21, Issue of May 23, pp. 19062-19070, 2003.

Chipperfiweld, A. R., Davis, J. P. and Harper, A. A. An acetazolamide-sensitive inward chloride pump in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 407–412, 1993.

Chipperfiweld, A.R., Harper, A. A. Chloride in smooth muscle. (74); 175-221, 2000.

Cho, H., Yang, Y. D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back S. K., Na H. S., Harfe B. D., Wang F., Raouf R., Wood J. N., Oh U. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 15: 1015–1021, 2012. doi:10.1038/nn.3111.

Clapp, L. H., and Gurney. A. M. ATP-sensitive K1 channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 262 (Heart Circ. Physiol. 31): H916–H920, 1992.

Cox, R. H. Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 38 13–23, 2002.

Danahay, H., Fox, R., Lilley, S., Charlon, H., Adley, K., Christie, L., Ansari, E., Here, C., Flem, B., Willians, C., Beaudons, S., Callingwood, S., Gosling, M. Potentiating TMEM16A does not stimulate airway mucus secretion or bronchial and pulmonary arterial smooth muscle contraction. *FASEB BioAdvances.* 2:464–477, 2020.

Danielsson, J., Perez-Zoghbi, J., Bernstein, K., Barajas, M. B., Zhang, Y., Kumar, S., Sharma, P. K., Gallos, G., Emala, C. W. Antagonists of the TMEM16A calcium-activated chloride channel modulate airway smooth muscle tone and intracellular calcium. *Anesthesiology* 123: 569–581, 2015.

Danielsson, J., Vink, J., Hyuga, S., Fu, X. W., Funayama, H., Wapner, R., Blanks, A. M., Gallos, G. Anoctamin channels in human myometrium: a novel target for tocolysis. *Reprod Sci* 25: 1589–1600, 2018.

Danielsson, J., Kuforiji, A., Yocum, G., Zhang, Y., Xu, D., Gallos, G., and Emala, Ch. Agonism of the TMEM16A calcium-activated chloride channel modulates airway smooth muscle tone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 318: L287–L295, 2020.

Davis, J. P. The effects of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁻ co-transport and Cl⁽⁻⁾- HCO₃⁻ exchange blockade on the membrane potential and intracellular chloride levels of rat arterial smooth muscle, in vitro. *Exp. Physiol.* 77: 857–862, 1992.

Davis, J. P., Chipperfield, A. R. and Harper, A. A. Accumulation of intracellular chloride by (Na-K-Cl) co-transport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25: 233–237, 1993.

Davis, J. P. L. Evidence against a contribution by Na-Cl cotransport to chloride accumulation in rat arterial smooth muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 491: 61–68, 1996.

Davis, A. J., Shi, J., Pritchard, H. A., Chadha, P. S., Leblanc, N., Vasilikostas, G., Yao, Z., Verkman, A. S., Albert, A. P., Greenwood, I. A. Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16Ainh-A01. *Br. J. Pharmacol.* 168, 773–784, 2013.

Dogan, M., Yildiz, O., Oktay, S., Gokhan, K. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 33; 504–523, 2019.

Droogmans, G., Callewaert, G., Declerck, I., Casteels, R. ATP-induced Ca²⁺ release and Cl⁻ current in cultured smooth muscle cells from pig aorta. *J Physiol.* 440:623–634, 1991.

Du, X. M., Zhi, J. M., Yang, D., Wang, Q., Luo, X and Deng, X. Research progress in the mechanism of calcium ion on contraction and relaxation of airway smooth muscle cells. *J. Recept. Signal Transduct.* 41(2):117-122, 2021.

Elwell, MR, Mahler, JF and Rao, GN: 'Have you seen this?' Inflammatory lesions in the lungs of rats. *Toxicol Pathol* 25: 529 -531, 1997.

Forrest, A, Joyce, T, Huebner, M, Ayon, R, Wiwchar, M, Joyce, J, Freitas, N, Davis, A, Ye, L, Duan, D, Singer, Ch, Valencik, M, Greenwood, L, Leblanc, N. Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C1229–C1243, 2012.

Forrester, T, Lind, A. R. Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J Physiol* 204:347–364, 1969.

Gallos, G., Remy, K. E., Danielsson, J., Funayama, H., Fu, X. W., Chang, H. Y. Functional expression of the TMEM16 family of calcium-activated chloride channels in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 305: L625-34, 2013.

Gelband, C. H., and Hume. J. R. $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K1 channels in canine renal artery. Novel mechanism for agonist-induced membrane depolarization. *Circ. Res.* 77: 121–130, 1995.

Hao, Wang., Di, Ma., Xiaojuan. Zhu., Panyue, Liu., Shuai, Li., Bo, Yu., Hong, Yang. Nimodipine inhibits intestinal and aortic smooth muscle contraction by regulating Ca^{2+} -activated Cl. *Toxicology and Applied Pharmacology* 421; 115543, 2021.

Hayabuchi, Y. The action of smooth muscle cell potassium channels in the pathology of pulmonary arterial hypertension. *Pediatr. Cardiol.* 38 1–14, 2016.

Henderson, KS., Dole, V., Parker, NJ., et al: *Pneumocystis carinii* causes a distinctive interstitial pneumonia in immunocompetent laboratory rats that had been attributed to 'rat respiratory virus'. *Vet Pathol* 49: 440-452, 2012.

Henríquez, M. Purinergic receptor stimulation induces calcium oscillations and smooth muscle contraction in small pulmonary veins. *J Physiol* 596.13 pp 2491–2506, 2018.

Hill, M. A., Zou, H., Potocnik, S. J., Meininger, G. A., Davis, M. J. Invited review: Arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca^{2+} signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J Appl Physiol* (1985). 91:973–983, 2001.

Hirota, S., Trimble, N., Pertens, E., Janssen, L. Intracellular Cl^- fluxes play a novel role in Ca^{2+} handling in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Jun;290(6):L1146-53, 2006. doi: 10.1152/ajplung.00393.2005.

Hodghin and Katz. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108, 37-77, 1949.

Huang, F., Rock, J. R., Harfe, B. D., Cheng, T., Huang, X., Jan, Y. N., Jan, L. Y. Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 21413–21418, 2009. doi:10.1073/pnas.0911935106.

Huang, F., Zhang, H., Wu, M., Yang, H., Kudo, M., Peters, C. J., Woodruff, P. G., Solberg, O. D., Donne, M. L., Huang, X., Sheppard, D., Fahy, J. V., Wolters, P. J., Hogan, B. L., Finkbeiner, W. E., Li, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y., Rock, J. R. Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 16354–16355, 2012. doi:10.1073/pnas.1214596109.

Hübner, C., Schroeder, B., Ehmke, H. Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch.* Mar;467(3):605-14, 2015. doi: 10.1007/s00424-014-1684-y.

Hyun-Soo, K., Sung-Im, D., and Youn, W. K. Histopathology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompetent laboratory rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8: 442-446, 2014.

Icenhour, CR, Rebholz, SL, Collins, MS and Cushion, MT: Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol* 39: 3437-3441, 2001.

Janssen, L. J., Sims, S.M. Ca²⁺-dependent Cl⁻ current in canine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C163–C169, 1995. doi:10.1152/ajpcell.1995.269.1.C163.

Jiang, L. H., Kim, M., Spleta, V., Bo, X., Surprenant, A., North R. A. Subunit arrangement in P2X receptors. *J. Neurosci.* 23 (26), 8903–8910, 2003.

Joseph, B. K., Thakali, K. M., Moore, C. L., Rhee, S. W. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: implications for novel therapeutic approaches. *Pharmacol. Res.* 70 126–138, 2013.

Kauffmanstein, G., Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Bachelard, H., Robaye, B., D'Orleans-Juste, P. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res* 85:204–213, 2010.

Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T., Gouaux, E. Crystal structure of the ATPgated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460 (7255), 592–598, 2009.

Kajiwara, M., Kitamura, K. and Kuriyama, H. Neuromuscular transmission and smooth muscle membrane properties in guinea-pig ear artery. *J. Physiol. (Lond.)* 315: 283–302, 1981.

Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Séguéla, P., Voigt, M., Humphrey, P. A. International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53, 107–118, 2001.

Khakh, B. S., North, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527–532, 2006.

Kitamura, K., Yamazaki, J. Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature. *Jpn J Pharmacol.* 85:351–7, 2001.

Klockner, U. Intracellular calcium ions activate a low conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery. *Pflügers Arch.* 424: 231–237, 1993.

Klockner, U., and G. Isenberg. Endothelin depolarizes myocytes from porcine coronary and human mesenteric arteries through a calcium-activated chloride current. *Pflügers Arch.* 418: 168–175, 1991.

Knot, H. J., Nelson, M. T. Regulation of arterial diameter and wall $[Ca^{2+}]$ in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol.* 508:199–209, 1998.

Koopmans, T., Anaparti, V., Castro-Piedras, I. Ca^{2+} handling and sensitivity in airway smooth muscle: emerging concepts for mechanistic understanding and therapeutic targeting. *Pulm Pharmacol Ther.* 29(2):108–120, 2014.

Kreye, V. A., R. Kern, and Schleich, I. ^{36}Cl efflux from noradrenaline-stimulated rabbit aorta inhibited by sodium nitroprusside and nitroglycerine. In: Excitation-

Contraction Coupling in Smooth Muscle, edited by Casteels, R. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland, 145–150, 1997.

Kuo, I. Y. and Ehrlich, B. E. Signaling in Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 2;7(2), 2015. doi: 10.1101/cshperspect.a006023

Lamb, F S., and Barna, T. Chloride ion currents contribute functionally to norepinehrine-induced vascular contraction. *Am J Physiol.* 275:44;H151-H160, 1998.

Lamb, F. S., Volk, K. A. and Shibata, E. F. Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. *Circ. Res.* 75: 742–750, 1994.

Le, S., Jia, Z., Chen, J., Yang, H. Molecular basis of PIP₂-dependent regulation of the Ca²⁺-activated chloride channel TMEM16A.

Leblanc, N., Ledoux, J., Saleh, S., Sanguinetti, A., Angermann, J., O’Driscoll, K., Britton, F., Perrino, B. A., Greenwood I. A. Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells: a complex picture is emerging. *Can J Physiol Pharmacol.* 83:541–56, 2005.

Lee, K.J., Czech, L., Waypa, G.B., Farrow, K.N. Isolation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Neonatal Mice. *J. Vis. Exp.* (80), e50889, doi:10.3791/50889 (2013).

Li, M., Kawate, T., Silberberg, S. D., Swartz, K. J. Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat. Commun.* 1; 44, 2010.

Li, R. S., Wang, Y., Chen, H. S., Jiang, F. Y., Tu, Q., Li, W. J., Yin, R. X. TMEM16A contributes to angiotensin II-induced cerebral vasoconstriction via the RhoA/ROCK signaling pathway. *Mol Med Rep* 13: 3691– 3699, 2016. doi:10.3892/mmr.2016.4979.

Mekata, F., and Niu, H. Biophysical effects of adrenaline on the smooth muscle of the rabbit common carotid artery. *J. Gen. Physiol.* 59: 92–102, 1972.

Miner, K., Labitzke, K., Liu, B., Wang, P., Henckels, K., Gaida, K., Elliott, R., Chen, J.J., Liu, L., Leith, A., Trueblood, E., Hensley, K., Xia, XZ., Homann, O., Bennett, B., Fiorino, M., Whoriskey, J., Yu, G., Escobar, S., Wong, M., Born, TL., Budelsky, A., Comeau,

M., Smith, D., Phillips, J., Johnston, J. A., McGivern, J. G., Weikl, K., Powers, D., Kunzelmann, K., Mohn, D., Hochheimer, A., Sullivan, J. K. Drug Repurposing: The Anthelmintics Niclosamide and Nitazoxanide Are Potent TMEM16A Antagonists That Fully Bronchodilate Airways. *Front Pharmacol.* 14;10:51, 2019. doi: 10.3389/fphar.2019.00051. eCollection 2019.

Moffat, J., Grueneberg, D., Yang, X., Kim, S., Kloepper, A., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T., Luo, B., Grenier, J., Carpenter, A., Foo, S., Stewart, S., Stockwell, B., Hacohen, N., Hahn, W., Lander, E., Sabatini, D. and Root, D. A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* 124, 1283–1298, March 24, 2006.

Namkung, W., Yao, Z., Finkbeiner, W., and Verkman, A. Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction. *FASEB J.* 25, 4048 – 4062, 2011.

Mortensen, S. P., Gonzalez-Alonso, J., Bune, L. T., Saltin, B., Pilegaard, H., Hellsten Y. ATP-induced vasodilation and purinergic receptors in the human leg: roles of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R1140–R1148, 2019.

Mroz, M. S., Keely, S. J. Epidermal growth factor chronically upregulates Ca²⁺-dependent Cl⁻ conductance and TMEM16A expression in intestinal epithelial cells. *J. Physiol.* 590, 1907– 1920, 2012.

Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F and Standen. N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* 259 (Cell Physiol. 28): C3–C18, 1990.

Nicke, A., Bäumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., Schmalzing G. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17 (11), 3016–3028, 1998.

North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067, 2012.

Oh, S.J., Hwang, S.J., Jung, J., Yu, K., Kim, J., Choi, J.Y., Hartzell, H.C., Roh, E.J., Lee, C.J. MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1. *Mol Pharmacol* 84: 726–735, 2013. doi:10.1124/mol.113.087502.

Orellana, C. Comparación de la respuesta contráctil de venas intrapulmonares pequeñas a uridine difosfato entre ratas con hipertensión arterial y ratas sanas. Tesis de Grado Magíster en Fisiología. 2018.

Pacaud, P., Loirand, G., Lavie, J. L., Mironneau, C. and Mironneau, J. Noradrenaline activates a calcium-activated chloride conductance and increases the voltage-dependent calcium current in cultured single cells of the rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 97: 139–146, 1989.

Pacaud, P., Loirand, G., Gregoire, G., Mironneau, C., Mironneau, J. Calcium-dependence of the calcium-activated chloride current in smooth muscle cells of rat portal vein. *Pflugers Arch.* 421:125–130, 1992. [PubMed: 1382263]

Page, H., Dalsgaard, T., Baldwin, S., Jepps, T., Povstyan, O., Olesen, S., Greenwood, I. TMEM16A is implicated in the regulation of coronary flow and is altered in hypertension. *Br J Pharmacol.* 176:1635–1648, 2019.

Pathan, A. R., Rusch, N. J. Two-pore domain K⁺ channels evidence for TWIK-2 in blood pressure regulation. *Hypertension* 58 539–541, 2011.

Pritchett-Corning, K.R, Cosentino, J. and Clifford, C.B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 43: 165-173, 2009.

Ralevic, V., Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492, 1998.

Riley, L.K, Simmons, J.H, Purdy, G. Research update: Idiopathic lung lesions in rats. *ACLAD Newsletter* 20: 9-11, 1999.

Roberts, J.A., Vial, C., Digby, H.R., Agboh, K.C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A., Evans, R.J. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 542, 486–500, 2006.

Saul, A., Hausmann, R., Kless, A., Nicke, A. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front. Cell. Neurosci.* 7;250, 2013.

Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., Jan, L.Y. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134: 1019–1029, 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.09.003.

Seo, Y., Lee, H. K., Perk, J., Jeon, D., Jo, S., Jo, M., Namkung, W. Ani9 A novel Potent Small-Molecule ANO1 Inhibitor with Negligible Effect on ANO2 PLOS-ONE, May 24, 2014.

Seo, Y., Lee, H.K., Park, J., Jeon, D-k, Jo, S., Jo, M, Ani9, A Novel Potent Small-Molecule ANO1 Inhibitor with Negligible Effect on ANO2. *PLoS ONE* 11(5): 2016 e0155771. doi:10.1371/journal.pone.0155771

Slaoui, M, Dreef, H.C and van Esch, E. Inflammatory lesions in the lungs of Wistar rats. *Toxicol Pathol* 26: 712-714, 1998.

Somlyo, A and Himpens, B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEBJ* 3: 2266-2276; 1989.

Somlyo, A. P and Somlyo, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology* 522.2, pp. 177—185, 2000.

Sun, H., Xia, Y., Paudel, O., Yang, X. R., Sham, J. S. Chronic hypoxia-induced upregulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in pulmonary arterial myocytes: a mechanism contributing to enhanced vasoreactivity. *J. Physiol.* 590, 3507–3521, 2012.

Suzuki, H. Increase in membrane resistance during noradrenaline- induced depolarization in arterial smooth muscle. *Jpn. J. Physiol.* 36: 433–440, 1986.

Thomas-Gatewood, C., Neeb, Z.P., Bulley, S., Adebisi, A., Bannister, J.P., Leo, M.D., Jaggar, J.H. TMEM16A channels generate Ca^{2+} -activated Cl^- currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301:1819–27, 2011.

Truong, E., Phua, P., Reggi, A., Ferrera, L., Goliette, L., Levy, S., Moises, A., Gil, O., Diez-Cecilia, E., Lee, S., Verkman, A., Anderson, M. Substituted 2-Acylaminocycloalkylthiophene-3-carboxylic Acid Arylamides as Inhibitors of the Calcium-Activated Chloride Channel Transmembrane Protein 16A (TMEM16A). *J. Med. Chem* 60, 4626-4635, 2017.

Von Kügelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 110, 415–432, 2006.

Wahlstrom, B. A. Ionic fluxes in the rat portal vein and the applicability of the Goldman equation in predicting the membrane potential from flux data. *Acta Physiol. Scand.* 89: 436–448, 1973.

Wang, Q, Large, W.A. Action of histamine on single smooth muscle cells dispersed from the rabbit pulmonary artery. *J Physiol.* 468:125–139, 1993. [PubMed: 8254503]

Wang, M., Yang, H., Zheng, L.Y., Zhang, Z., Tang, Y.B., Wang, G. L., Du, Y.H., Lv, X.F., Liu, J., Zhou, J.G., Guan, Y.Y. Downregulation of TMEM16A calcium-activated chloride channel contributes to cerebrovascular remodeling during hypertension by promoting basilar smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 125:697–707, 2012.

Wang, H., Ma, D., Zhu, X., Liu, P., Li S., Yu, B., Yang, H. Nimodipine inhibits intestinal and aortic smooth muscle contraction by regulating Ca^{2+} -activated Cl^- channels. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 421: 115543, 2021.

Wettschureck, N. and Offermanns, S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med* 80:629–638, 2002.

Yamazaki, J., Duan, D., Janiak, R., Kuenzli, K., Horowitz, B., Hume, J. R. Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 507:729–36, 1998.

Yamamura, A, Yamamura, H, Zeifman, A, Yuan, J.X. Activity of Ca^{2+} -activated Cl^- channels contributes to regulating receptor- and store-operated Ca^{2+} entry in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pulm Circ* 1:269-79, 2011.

Yuan, X.J. Voltage-gated K^+ currents regulate resting membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in pulmonary arterial myocytes. *Circ. Res.* 77: 370–378, 1995.

Yuan, X.J. Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone. *Am J Physiol.* 272:L959–L968, 1997.

K.E., Zhang, X., McCallinhart, P.E., Lucchesi, P.A., Trask, A.J. Isolation of Murine Coronary Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Vis. Exp.* (111), e53983, doi:10.3791/53983 (2016).

13. Anexo 1

Figura 1

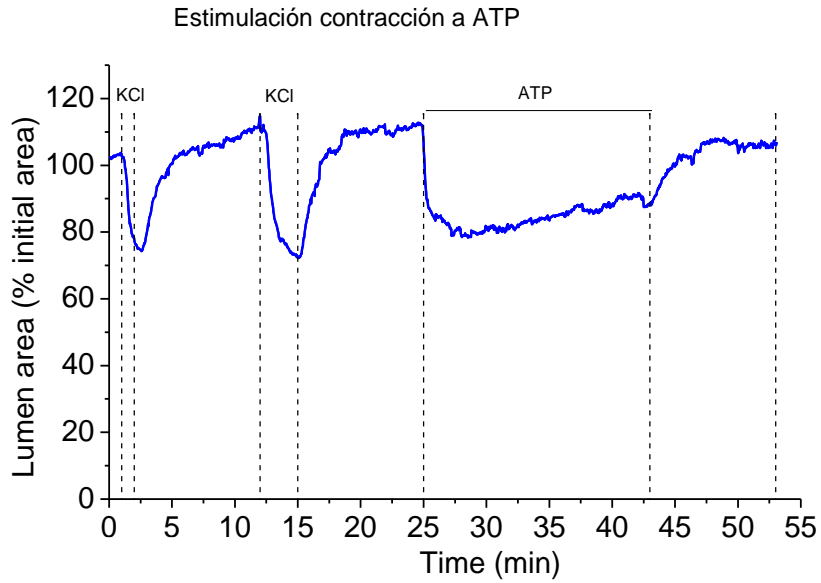


Figura 2

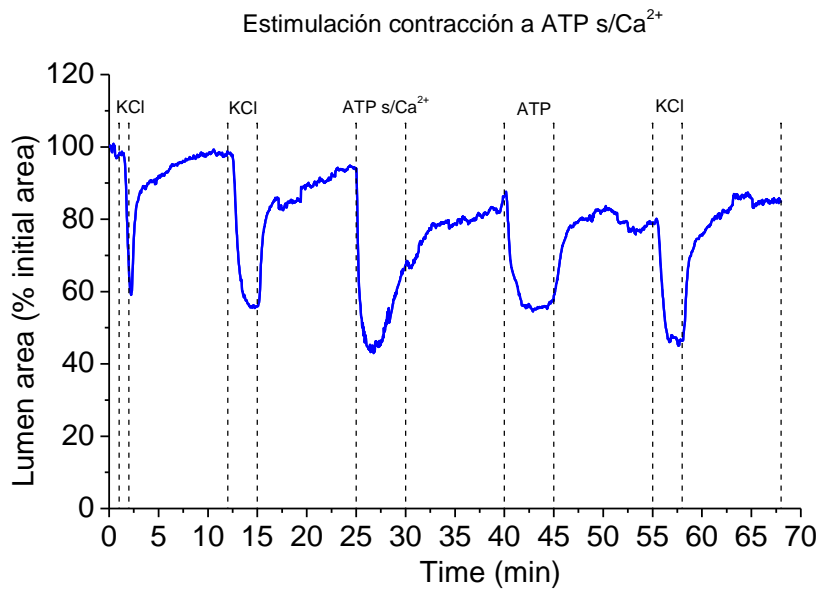


Figura 3

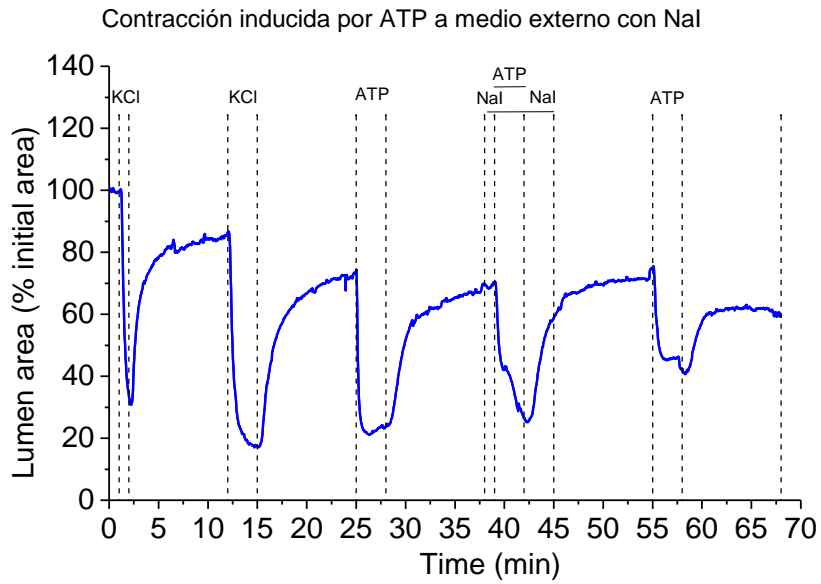


Figura 4

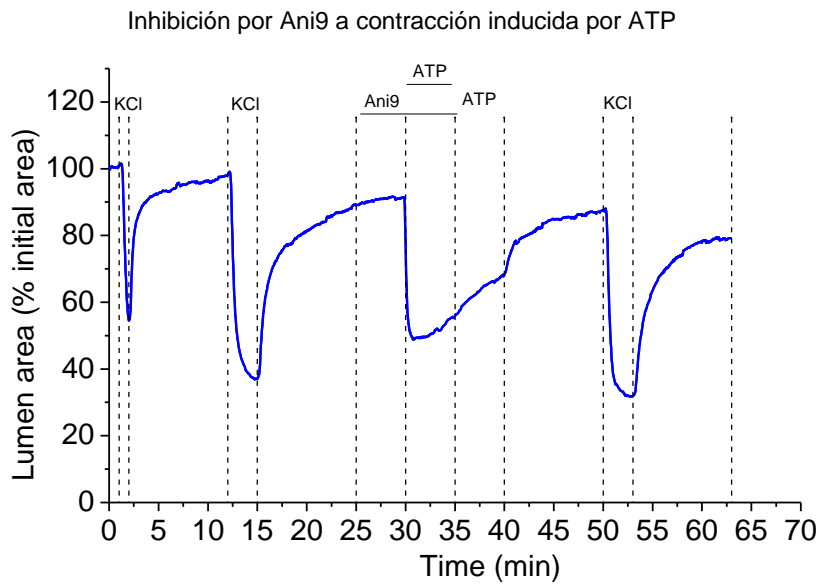


Figura 5

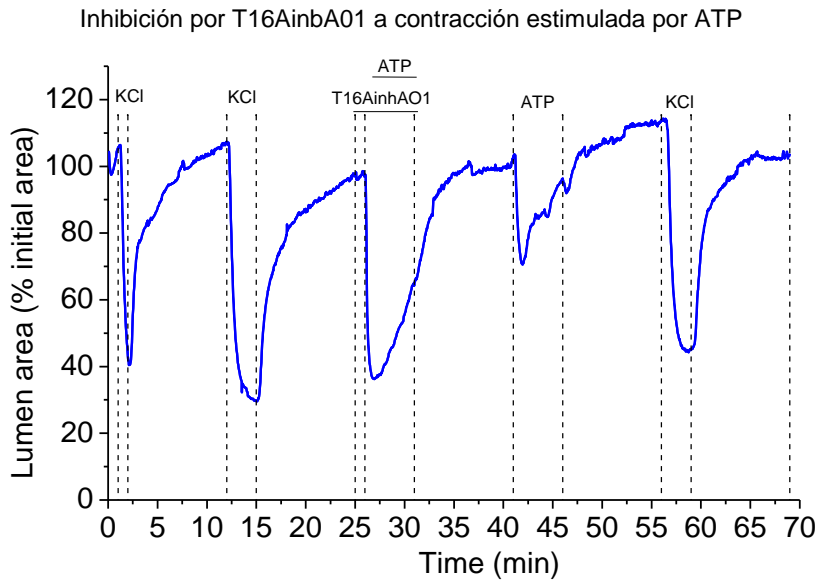


Figura 6

