UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE FARMACIA

IMPLICACIÓN DEL AMP CÍCLICO EN LA VASODILATACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO Y EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL POR HIPOXIA

Tesis doctoral

Verónica García Morales

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE FARMACIA

IMPLICACIÓN DEL AMP CÍCLICO EN LA VASODILATACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO Y EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL POR HIPOXIA

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Verónica García Morales

Santiago de Compostela, mayo de 2014

La presente memoria ha sido realizada gracias a la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-22051), por la Xunta de Galicia (INCITE08PXIB203092PR).y a la Beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de de Educación, Cultura y Deporte.

Departamento de Farmacoloxía

Facultade de Farmacia

Campus Vida

D. **Manuel Campos Toimil**, profesor titular del Departamento de Farmacoloxía de la Universidade de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **"Implicación del AMP cíclico en la vasodilatación dependiente de endotelio y en la disfunción endotelial por hipoxia"** ha sido elaborada por la licenciada en Farmacia Dña. **Verónica García Morales** en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia bajo su dirección. Y considerando que se encuentra concluida, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste, expide y firma el presente informe en Santiago de Compostela a 25 de abril de 2014.

Fdo.: Dr. Manuel Campos Toimil

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mi familia

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

A mi director el Dr. Manuel Campos por sus enseñanzas, su dedicación, su paciencia y su apoyo en el desarrollo de esta tesis y en mi formación como investigadora.

Al Dr. Francisco Orallo por darme la oportunidad de formar parte de su grupo y por transmitirme su ilusión por la investigación.

Al Dr. José Leiro del Instituto de Investigación e Análises Alimentarias de la USC y al Dr. Ernesto Cano del Departamento de Farmacología por su ayuda y orientación en la realización de experimentos.

Al grupo de investigación de Biofarma del Departamento de Farmacología por permitirme el uso de su equipamiento.

A mis compañeros del Departamento de Farmacología, en especial a Andrea, Dolo, Jacobo, Javier, Laura, Mati y Sonia por ser unos excelentes compañeros, por prestarme su ayuda en todo momento y por vuestra amistad. A Belén por ser una compañera más, por tu amistad y por todos los momentos vividos. A Ana Arrese, por toda la ayuda prestada y por su comprensión.

I also would like to thank to Dr. Martina Schmidt and Dr.Guido Krenning to give me the chance to join to their laboratories and to all the people from the Department of Molecular Pharmacology and from the Laboratory of Cardiovascular Regenerative Medicine of the University of Groningen.

A mi familia y amigos por estar siempre a mi lado para ayudarme, escucharme y aconsejarme. A David, gracias por tu inagotable paciencia, tu apoyo incondicional y tu cariño.

Índice

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **3**

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **7**

1 EL ENDOTELIO: ESTRUCTURA Y FUNCIONES **9**

1.1 Regulación del tono vascular por el endotelio 9

1.1.1 Factores de relajación derivados del endotelio 10

1.1.2 Factores de contracción derivados del endotelio 13

1.1.3 La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) 15

1.1.3.1 Estructura y función enzimática de la NOS 15

1.1.3.2 Regulación de la eNOS 17

1.2 Función de barrera endotelial 26

1.2.1 Permeabilidad transcelular 27

1.2.2 Permeabilidad paracelular 29

1.2.3 Barrera extracelular: Adhesiones focales 32

1.2.4 El citoesqueleto endotelial 33

2 EL AMPC Y SUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN **37**

2.1 Regulación de los niveles de AMPc 39

2.1.1 Adenilil ciclasas (AC) 39

2.1.2 Fosfodiesterasas (PDE) 43

2.2 Efectores de AMPc 47

2.2.1 Proteína cinasa A (PKA) 47

2.2.2 Proteínas Epac 49

2.2.3 Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos 53

2.2.3.1 Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) 53

2.2.3.2 Canales modulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN) 54

2.3 Funciones del AMPc en el sistema vascular 55

2.3.1 Regulación del tono vascular por el AMPc 55

2.4 Regulación de la función de la barrera endotelial por el AMPc y sus efectores 57

2.5 Otras funciones del AMPc 60

3 RESPUESTA ENDOTELIAL EN CONDICIONES DE HIPOXIA 63

3.1 Efectos de la hipoxia en la función de barrera endotelial 65

3.2 Efectos de la hipoxia en el tono vascular 67

3.3 Efecto de la hipoxia en la retina. Modelo de retinopatía inducida por oxígeno en ratones 70

MATERIAL Y MÉTODOS 75

1 ESTUDIOS DE CONTRACTILIDAD EN AORTA TORÁCICA AISLADA DE RATA 77

1.1 Estudios funcionales de contracción-relajación en anillos de aorta torácica aislada de rata 77

1.2 Selección y mantenimiento de los animales de experimentación 77

1.3 Preparación y montaje del tejido vascular 78

1.4 Actividad vasorrelajante en anillos precontraídos de aorta de rata. 79

2 CULTIVOS CELULARES 80

2.1 Cultivo de células HUVEC 80

2.2 Cultivo de células HCAEC 81

3 MODELO DE RETINOPATÍA INDUCIDA POR OXÍGENO (OIR) EN RATÓN 81

4 AMPLIFICACIÓN POR RETROTRANSCRIPCIÓN- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 83

4.1 PCR Convencional 83

4.2 PCR en tiempo real (cuantitativa) 85

5 MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA 89

5.1 Principio de fluorescencia 89

5.2 Descripción del microscopio de fluorescencia y del microscopio confocal 90

5.3 Medida de calcio y óxido nítrico mediante sondas fluorescentes 92

5.4 Microscopía de inmunofluorescencia o inmunotinción 95

5.4.1 Estudio de los efectos de la hipoxia sobre la expresión de distintas proteínas en células HCAEC 96

5.4.2 Estudio de los efectos de la hipoxia sobre la expresión de la Epac-1 en modelo de ratón OIR 98

6 INMUNODETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ("WESTERN BLOT") 99

6.1 Inmunodetección de la expresión de proteínas en células HUVEC 99

6.2 Inmunodetección de la expresión de proteínas en homogeneizado de aorta de rata 101

6.3 Inmunodetección de la expresión de proteínas en células HCAEC..... 103

7 LIBERACIÓN DE NO EN CÉLULAS HCAEC..... 105

8 CITOMETRÍA DE FLUJO 106

8.1 Definición de la citometría de flujo..... 106

8.2 Componentes de un citómetro de flujo..... 107

8.3 Detección de EROs mediante citometría de flujo 108

9 ENSAYO DE PERMEABILIDAD EN CÉLULAS HCAEC 109

10 FÁRMACOS Y REACTIVOS..... 110

11 EXPRESIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS 114

RESULTADOS..... 119

1 EFECTOS DE FÁRMACOS QUE INCREMENTAN EL AMPC O QUE MODIFICAN SUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN SOBRE LA CONTRACTILIDAD VASCULAR..... 121

1.1 Efectos de la forskolina, el db-cAMP y el pCPT-cAMP sobre la contracción con fenilefrina 121

1.2 Efecto de la inhibición de la PKA sobre la contracción con fenilefrina y sobre la vasorrelajación inducida por forskolina 123

1.3 Efecto de la activación de la PKA sobre la contracción con fenilefrina 125

1.4 Efecto de la activación de la Epac sobre la contracción con fenilefrina 126

1.5 Efecto de la inhibición de la Epac sobre la contracción con fenilefrina y sobre la vasorrelajación inducida por forskolina 128

1.6 Efecto de la inhibición de la eNOS sobre la contracción con fenilefrina y sobre la vasorrelajación inducida por forskolina y db-cAMP..... 128

1.7 Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la vasorrelajación inducida por la forskolina..... 132

2 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES 135

3 EFECTO DE FÁRMACOS QUE INCREMENTAN EL AMPc O QUE MODIFICAN SUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL NO EN CÉLULAS ENDOTELIALES 136

3.1 Efecto de la forskolina, el db-cAMP, el pCPT-cAMP y de la activación de la PKA y la Epac sobre los niveles intracelulares de NO 136

3.2 Efecto de la inhibición de la eNOS sobre la liberación de NO intracelular inducida por forskolina 137

3.3 Efecto de la inhibición de la PKA y de la Epac sobre la liberación de NO intracelular inducida por forskolina 138

3.4 Evaluación de la participación del Ca^{2+} en la producción de NO inducida por AMPc 139

3.4.1 Efecto de la forskolina sobre los niveles intracelulares de NO en medio libre de Ca^{2+} 139

3.4.2 Efecto de la forskolina, el db-cAMP, el pCPT-cAMP y de la activación de la PKA y la Epac sobre sobre la $[Ca^{2+}]_c$ basal 140

3.5 Efecto de fármacos que modifican los niveles intracelulares de AMPc o que interfieren en sus rutas de señalización sobre la sobre la activación de la eNOS en células endoteliales 142

3.6 Efecto de la inhibición de distintas cinasas implicadas en la fosforilación de la eNOS sobre la liberación de NO intracelular inducida por forskolina 144

4 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR 145

4.1 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la homeostasis de NO en las células endoteliales 145

4.2 Efecto de la exposición a hipoxia en la generación de EROs en las células endoteliales 146

4.3 Efecto de la hipoxia sobre la expresión de la eNOSen las células endoteliales . 147

4.4 Efecto de la hipoxia sobre la expresión de las proteínas efectoras de AMPc en las células endoteliales 149

4.5 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de las proteína arginasa en las células endoteliales 152

4.6 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de la proteína VE-cadherina en las células endoteliales 154

4.7 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la permeabilidad de la barrera endotelial en las células endoteliales 155

4.8 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de la proteína Epac-1 en ratones modelo OIR 156
4.9 Efectos de fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la generación de NO y EROs en condiciones de normoxia y de hipoxia en las células endoteliales 158
4.10 Efectos de fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la activación de la eNOS en las células endoteliales expuestas a hipoxia. 160
4.11 Efectos de fármacos que incrementan los niveles de AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la hiperpermealidad inducida por hipoxia en las células endoteliales..... 162
4.12 Efectos de inhibidores de arginasa sobre los niveles de NO y ROS en condiciones de normoxia y de hipoxia en las células endoteliales..... 164
4.13 Efectos de inhibidores de HATs e inhibidores de HDACs sobre niveles de NO y ROS en condiciones de normoxia y de hipoxia en las células endoteliales..... 165

DISCUSIÓN 171

1 EFECTOS VASORRELAJANTES DEL AMPC DEPENDIENTES DE ENDOTELIO 173

1.1 Importancia del endotelio en la relajación por forskolina/AMPc 173
1.2 Participación de la PKA en el efecto vasodilatador del AMPc 174
1.3 Participación de la Epac en el efecto vasodilatador del AMPc 176

2 EFECTOS DEL AMPC EN LA BIOSÍNTESIS DE NO ENDOTELIAL 179

2.1 Participación del NO en la relajación dependiente de endotelio inducida por el AMPc 179
2.2 Participación de las proteínas PKA y Epac en la activación de la eNOS inducida por el AMPc 181
2.3 Implicación de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal en la producción de NO inducida por AMPc 184
2.4 Participación de diversas cinasas en la activación de la eNOS inducida por el AMPc 186

3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR 188

3.1 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la generación de NO y EROs en las células endoteliales 188

3.1.1 Papel del AMPc y de sus proteínas efectoras en los efectos de la hipoxia sobre la generación de NO y EROs endoteliales 190

3.1.2 Participación de la enzima arginasa en los efectos de la hipoxia sobre la generación de NO y EROs endoteliales 194

3.1.3 Papel de la acetilación de histonas en los efectos de la hipoxia sobre la generación de NO y EROs endoteliales 195

3.2 Efecto de la hipoxia sobre la barrera endotelial. Papel del AMPc y de sus efectores PKA y Epac 197

3.3 Efecto de la retinopatía inducida por oxígeno en la expresión de la Epac-1 en la retina de ratón 201

CONCLUSIONES 203

BIBLIOGRAFÍA 207

ANEXOS 235

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abreviaturas

AA	ácido araquidónico
AC	adenilil ciclasa
Ach	acetilcolina
AKAP	proteínas de anclaje a la PKA
Akt	proteína cinasa serina/treonina
AMPc	AMP cíclico (3'-5' monofosfato cíclico de adenosina)
$[AMPc]_i$	concentración de AMPc intracelular
AMPK	proteína cinasa activada por AMPc
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
BH_4	tetrahidrobiopterina
BK_{Ca}	canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia
BSA	seroalbúmina bovina
$[Ca^{2+}]_c$	concentración de Ca^{2+} libre citoplasmática
CaM	calmodulina
CaMBD	dominio de unión a calmodulina
CaMKII	proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+}-CaM II
CBD	dominio de unión a AMPc
CI_{50}	concentración inhibitoria 50
CNB	dominio de unión de nucleótidos cíclicos
CNG	canales activados por nucleótidos cíclicos
COX	ciclooxigenasa
CREB	*cAMP-responsive element binding protein,* en inglés
Cys	cisteína
DAG	diacilglicerol
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol
DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DMSO	dimetilsulfóxido
EDH	hiperpolarización derivada de endotelio
EDHF	factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EDRF	factor relajante derivado de endotelio
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
Epac	*exchange proteins activated by cAMP,* en inglés
ERK	*extracellular signal regulated kinase,* en inglés
ERM	*proteína ezrin–radixin–moesin,* en inglés
ERO	especie reactiva de oxígeno
ET	endotelina
FAD	dinucleótido de flavina adenina
FMN	mononucleótido de flavina
FSC	*Forward Scatter,* en inglés
GC	guanilil ciclasa
GDP	difosfato de guanosina
Gi	proteína G inhibidora
GPCR	receptor acoplado a proteínas G
Gs	proteína G estimuladora
GTP	trifosfato de guanosina
GTPasa	guanosina trifosfatasa
GEF	factor de intercambio de nucleótido de guanina
GMPc	GMP cíclico (3'-5' monofosfato cíclico de guanosina)
GPCR	receptor acoplado a proteínas G
20-HETE	Ácido 20-hidroxieicosatetraenoico
HAT	histona acetil tranferasa
HCAEC	células endoteliales de arteria coronaria humana
HCN	Canales modulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización
HDAC	histona deacetilasa
Hsp	*heat shock protein,* en inglés
HUVEC	células endoteliales de vena umbilical humana
IgG	inmunoglobulinas G
IK_{Ca}	canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia intermedia
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible

IP_3	1,4,5-inositol trifosfato
JAM	*junctional adhesion molecule,* en inglés
KBN	solución Krebs bicarbonato normal
K_{ir}	canales rectificadores de la entrada de K^+
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno
MLC	cadena ligera de miosina
MLCK	cinasa de la MLC
MLCP	fosfatasa de la MLC
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
NOSIP	*eNOS interacting protein*, en inglés
NOSTRIN	*eNOS trafficking inducer protein,* en inglés
OIR	*oxygen induced retinopathy*, en inglés
P	postnatal
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDE	fosfodiesterasa
p-eNOS	fosforilación eNOS serina 1177
PGH2	protaglandina H_2
PGI_2	prostaciclina
PI3K	fosfoinositol 3 cinasa
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PKG	proteína cinasa dependiente de GMPc
PLA_2	fosfolipasa A_2
PLC	fosfolipasa C
PVDF	polifluoruro de vinilideno
Rap	*receptor-associated protein,* en inglés
RGS	*regulator of G protein signaling,* en inglés
ROCK	*rho-associated protein kinase,* en inglés
RTK	receptor tirosina cinasa
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
S0Ca^{2+}	solución libre de Ca^{2+}
SCC	*Side Scatter,* en inglés
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ser	serina
SK_{Ca}	canales de K^+ activados por Ca^{2+} de pequeña conductancia
SN	solución externa normal
SNARE	s*oluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor,* en inglés
SOCS3	*supressor of cytokine signaling 3,* en inglés
Thr	treonina
TNF-α	factor de necrosis tumoral α
TSA	tricostatina A
TxA_2	tromboxano A_2
Tyr	tirosina
UTR	*untranslated regions,* en inglés
VE-cadherina	cadherina vascular endotelial
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
VASP	fosfoproteína estimulada por vasodilatadores
VVO	*vesicle-vacuolar organelle,* en inglés
ZO	*zone-occludin,* en inglés
WKY	Wistar Kyoto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Justificación y Objetivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

No existen dudas sobre la importancia fisiológica que tiene el endotelio, la monocapa celular que recubre el interior de los vasos sanguíneos. Además de constituir una barrera semipermeable entre el sistema sanguíneo y el espacio extravascular, regulando el contenido de líquidos plasmáticos y el transporte diferentes sustancias, juega un papel crucial en el control de múltiples funciones importantes en la homeostasis vascular (Khazaei *et al.*, 2008). Entre estas funciones cabe destacar su participación en la regulación del tono vascular de las células musculares lisas subyacentes, mediante la liberación de diversas moléculas vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI_2) o el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) y de factores contracturantes, como la endotelina (Dora, 2010; Galley y Webster, 2004; Serban *et al.*, 2010; Giles *et al.*, 2012).

El 3 ', 5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) es un segundo mensajero que juega un importante papel en la regulación de numerosos procesos y funciones en las células endoteliales en condiciones fisiológicas y patológicas (incluyendo la regulación del tono vascular, la función de barrera endotelial, la angiogénesis, etc.) (Schmidt *et al.*, 2013; Sayner, 2011; Metrich *et al*., 2010). En concreto, el papel del AMPc en la relajación de los vasos sanguíneos ha sido, y continúa a ser, objeto de estudio destacado en la farmacología y en la fisiología del sistema cardiovascular. Aunque durante muchos años se pensó que la relajación vascular inducida por el AMPc se producía mediante efectos directos sobre el músculo liso vascular y de forma independiente de la presencia de un capa endotelial funcional, ahora es ampliamente aceptado que el endotelio también participa en este proceso (Ferro *et al.*, 1994; Queen *et al.*, 2006; Schäefer *et al.* 2003; Zieba *et al.*, 2011). Previamente, varios autores habían sugerido que la vasorrelajación mediada por un incremento del AMPc en el endotelio podría deberse a una liberación de NO tras activar a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Sin embargo los mecanismos que subyacen a esta acción no son aún plenamente comprendidos (Butt *et al.*, 2000; Zhang y Hintze, 2001).

Tradicionalmente, se creía que el AMPc ejercía sus efectos casi en exclusiva mediante la activación de la proteína cinasa A (PKA), con la excepción de la posible modulación directa de algún tipo de canal iónico por el AMPc. Sin embargo, el descubrimiento de las proteínas de intercambio activadas directamente por AMPc

(Epac, *Exchage proteins directly activated by cAMP)*, junto con la aparición de fármacos que las activan de modo selectivo, ha permitido demostrar su participación en diversas funciones celulares atribuidas anteriormente a la activación de la PKA (Gloerich y Bos, 2010; Schmidt *et al.*, 2013). Por lo tanto, el descubrimiento de las Epac ha abierto nuevos horizontes en la investigación en el campo del AMPc y de sus rutas de señalización.

Además, se han puesto de manifiesto una serie de interacciones entre el AMPc y el Ca^{2+} (Kwan *et al.*, 2009). El Ca^{2+} participa en la regulación de un gran número de procesos dependientes del endotelio, entre los que cabe destacar la regulación del tono vascular (Fleming y Busse, 2003). De hecho, en respuesta a los incrementos de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) las células endoteliales sintetizan y liberan diversos factores vasoactivos tales como el NO. Además, la actividad de la eNOS es altamente sensible a los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ (Dudzinsky y Michel, 2007; Mount *et al*., 2007).

Por otra parte, debido a la multifuncionalidad de la monocapa endotelial, es fácil comprender que una alteración de la misma podría estar implicada en el origen de diversas patologías. En los últimos años, se ha hecho evidente que la disfunción endotelial es un evento clave de los cambios patofisiológicos que se producen en el inicio y la progresión de las lesiones inducidas por diversos factores entre los que se encuentra la hipoxia.

La hipoxia es una reducción en el nivel normal de la tensión de oxígeno. Se produce durante el desarrollo de varias enfermedades vasculares, como la aterosclerosis, la hipertensión pulmonar, la trombosis venosa y la retinopatía (Hulten y Levin, 2009; Voelkel *et al.*, 2013; Bovill y Vliet, 2011; Grimm y Willmann, 2012).En respuesta a hipoxia, el endotelio exhibe múltiples anormalidades estructurales y funcionales que pueden contribuir aún más a la patogénesis de dichas enfermedades. Es ampliamente reconocido que la hipoxia se asocia con un aumento de la permeabilidad endotelial, un deterioro de la vasodilación y un incremento del estrés oxidativo. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la respuesta vascular a la hipoxia son complejos y no se conocen totalmente.

Debido a que los niveles de AMPc se ven disminuidos en condiciones de hipoxia, una alteración en las rutas de señalización de este nucleótido podría estar implicada en la disfunción endotelial inducida por la baja tensión de oxígeno

Con estos antecedentes, hemos creído que resultaría de interés la realización de un estudio sobre los efectos vasorrelajantes dependientes de endotelio del AMPc. Para ello, nos hemos centrado en la implicación de las proteínas PKA y Epac en dichos efectos y en la influencia del AMPc en la biosíntesis de NO endotelial, a través de la una posible activación de la eNOS (por elevación de la $[Ca^{2+}]_c$ o por la acción de diversas proteínas cinasas). De modo complementario, hemos investigado si las condiciones de hipoxia pueden alterar los efectos del AMPc sobre la eNOS y la síntesis de NO, sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y sobre la función de barrera endotelial.

En vista de lo expuesto, en el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes **objetivos**:

1. Estudiar la contribución del endotelio al efecto vasorrelajante de fármacos que incrementan las concentraciones intracelulares de AMPc ($[AMPc]_i$) o que interfieren en sus rutas de señalización, centrándonos en la implicación de las proteínas PKA y Epac en dicho efecto.

2. Investigar el papel de la síntesis de NO en la vasorrelajación inducida por el AMPc, así como el efecto sobre la actividad de la eNOS de agentes que modifican la $[AMPc]_i$ o que interfieren en sus rutas de señalización.

3. Estudiar la participación de diversas cinasas implicadas en la activación de la eNOS sobre la liberación de NO endotelial y sobre la vasorrelajación inducida por el AMPc.

4. Investigar la posible implicación de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal en la producción de NO endotelial inducida por el AMPc.

5. Estudiar el efecto de la hipoxia sobre la síntesis endotelial de NO y EROs y sobre la función de barrera endotelial, y la participación del AMPc y de sus rutas de señalización en dicho efecto.

6. Estudiar el efecto de la hipoxia sobre la expresión de diversas proteínas (PKA, Epac, eNOS, Arginasa y VE-cadherina) en las células endoteliales y evaluar los cambios en la expresión de la Epac-1 en la fase de hipoxia, empleando un modelo de retinopatía inducida por oxígeno en ratones.

7. Estudiar la participación de las enzimas arginasa, histonas acetil transferasas (HATs) e histonas deacetilasas (HDACs) sobre la síntesis endotelial de NO y EROs en condiciones de hipoxia.

Consideramos que el presente trabajo de investigación tiene un interés práctico muy importante, dado el importante papel que desempeña el AMPc en la regulación de diversas funciones endoteliales. Así, el estudio de las rutas activadas por este nucleótido cíclico en condiciones fisiológicas y en condiciones de baja tensión de oxígeno suponen un paso previo para alcanzar una mejor comprensión de múltiples patologías vasculares en las que se produce una alteración de la función endotelial. Todo ello podrá servir de base para la propuesta de nuevas estrategias terapéuticas frente a dichas enfermedades.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Revisión bibliográfica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 El endotelio: estructura y funciones

El endotelio constituye la capa más interna de los vasos sanguíneos, se encuentra en contacto con la sangre circulante y forma una barrera estructural entre el espacio vascular y el resto de tejidos. La superficie total de la capa endotelial se compone de 1,6 x 10^{13} células, con una superficie de aproximadamente 1-7 m^2, lo que constituye aproximadamente un 1 kg de peso en un humano adulto. Las células endoteliales poseen 25-50 µM de largo, 10-15 µM de ancho y 5 µM de profundidad (Galley y Webster, 2004).

El endotelio constituye una barrera semipermeable que regula el intercambio de iones, solutos y células entre la sangre y los tejidos circundantes. Además de actuar como una barrera física, juega un papel crucial en el control de múltiples funciones importantes en la homeostasis vascular. Por lo tanto, la capa endotelial es un tejido activo y dinámico, con funciones metabólicas y sintéticas. Las células endoteliales ejercen acciones autocrina, paracrina y endocrina con influencia sobre células musculares lisas, plaquetas y leucocitos periféricos (Khazaei *et al.*, 2008). Entre las funciones que regula el endotelio cabe destacar su participación en la regulación del tono vascular y, por tanto, de la presión arterial (Dora, 2010; Serban *et al.*, 2010; Giles *et al.*, 2012). El endotelio también participa en la producción de enzima de conversión de la angiotensina, en la regulación de la coagulación intravascular, la inflamación y la modulación inmune y tiene capacidad de influir en el crecimiento y proliferación de las células musculares lisas que conforman la capa media de los vasos sanguíneos (Herrmann y Lerman, 2001; Schouten *et al.*, 2008; Khazaei *et al.,* 2008).

1.1 Regulación del tono vascular por el endotelio

Las células endoteliales participan en la regulación del tono vascular de las células musculares lisas subyacentes mediante la liberación de diversas moléculas vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI_2) o el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) y de factores contracturantes, como la endotelina. A este control del tono vascular contribuyen también otras sustancias

liberadas por la pared endotelial (histamina, bradicinina, sustancia P, etc.) (Dora, 2010; Galley y Webster, 2004; Herrmann y Lerman, 2001; Widlansky *et al.*, 2003).

1.1.1 Factores de relajación derivados del endotelio

I. *Óxido nítrico (NO)*

El NO fue descrito por primera vez por Furchgott y Zawadzki (Furchgott y Zawadzki, 1980) como un factor de relajación derivado del endotelio, por lo que inicialmente fue denominado EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*). Se trata de una molécula endógena de gran importancia fisiológica que participa en la regulación del tono vascular y de la presión arterial (Moncada *et al.*, 1991), siendo en las grandes arterias como la aorta, arterias coronarias y cerebrales, el principal contribuyente a la relajación dependiente del endotelio (Vanhoutte, 2003).

El NO es un gas soluble con una vida media de 6-30 segundos, que se genera mediante la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina por la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS) (Palmer *et al.*, 1988) en presencia de oxígeno y múltiples cofactores. Existen tres isoformas de la enzima NOS, dos de las cuales se han encontrado en las células endoteliales. La NOS-III o NOS endotelial (eNOS) que como su nombre indica se expresa de forma constitutiva en las células endoteliales y la NOS-II o inducible (iNOS) que se expresa en respuesta a estrés celular (Galley y Webster, 2004). La síntesis del NO se abordará en profundidad en el apartado siguiente.

El NO pueden ser sintetizado por las células endoteliales en respuesta a estímulos fisiológicos como el *shear stress* o fuerzas de cizallamiento (roce tangencial de la sangre contra la capa endotelial), que induce la activación de la eNOS probablemente mediante la fosforilación de la proteína cinasa serina/treonina (Akt), también denominada proteína cinasa B (PKB) (Dimmeler *et al.*, 1999). También es sintetizado en respuesta a sustancias endogénas como acetilcolina, serotonina, trombina, histamina, ADP, sustancia P, etc., que liberan NO mediante su interacción con receptores específicos de membrana de la célula endotelial que activan distintas rutas intracelulares que modulan la actividad de la eNOS mediante fosforilación de la

Akt o mediante la unión de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90, *heat shock protein* 90) (Michel y Vanhoutte, 2010; Serban *et al*., 2010).

Una vez sintetizado, el NO difunde desde las células endoteliales hacia las células del músculo liso vascular en donde activa a la enzima guanilil ciclasa (GC), mediante la unión a su grupo hemo (Garthwaite, 2010). La activación de esta enzima conduce a una mayor producción de monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina (GMPc). Este nucleótido activa su principal efector, la cinasa dependiente de GMPc (PKG, proteína cinasa G) e induce la relajación muscular por aumento de la recaptación de Ca^{2+} por el retículo endoplásmico y la subsiguiente reducción de la concentración de calcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_c$), y por activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}) que dan lugar a una hiperpolarización de la membrana plasmática. Estos procesos se combinan para dar lugar a la relajación de las células del músculo liso. Hay dos tipos de PKG (I y II), siendo la PKG de tipo I la cinasa más importante en la mediación de la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria. La actividad de GMPc finaliza por su conversión a 5'-GMP por las fosfodiesterasas (PDE) (Kwan *et al.*, 2009).

Además de su importancia en el control del tono vasomotor, el NO también participa en la regulación de la homeostasis vascular e inmunológica. El NO inhibe la adhesión y agregación plaquetaria y promueve la desagregación plaquetaria, inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio, la migración y la proliferación de células del músculo liso y regula la apoptosis. Estos efectos biológicos hacen de el NO un componente importante en la prevención endógena de la lesión vascular, la inflamación y procesos de trombosis involucrados en el proceso aterosclerótico (Khazaei *et al.*, 2008). En muchos procesos patológicos como la diabetes, el infarto de miocardio o la inflamación crónica, existe una disfunción de la síntesis de NO.

La disponibilidad del NO en los vasos depende de muchos factores: del nivel de expresión de la eNOS, de la disponibilidad del sustrato y cofactores necesarios para la actividad de la eNOS, del estado de fosforilación de dicha enzima y de la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales pueden inactivar el NO (Searles, 2006).

II. Prostaciclina (PGI_2)

Otro importante vasodilatador derivado del endotelio es la PGI_2, que se sintetiza principalmente en las células endoteliales a partir del ácido araquidónico (AA) por acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) (Vane y Botting, 1994). La COX1 se expresa constitutivamente en las células endoteliales y es la principal isoforma implicada en la producción de la PGI_2. Dado que la enzima fosfolipasa A_2 (PLA_2) transforma los fosfolípidos de membrana en AA, es el paso limitante de la síntesis de PGI_2. Además, es un proceso dependiente de Ca^{2+}, ya que la PLA_2 es sensible a este ión (Khazaei *et al.*, 2008).

La PGI_2 relaja el músculo liso vascular al activar un receptor de fosfoinositol que estimula la enzima adenilil ciclasa (AC), dando lugar a un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, que provoca vasodilatación mediante distintos mecanismos (ver apartado 3.1.1). Además, la PGI_2 también puede difundir a la sangre, donde inhibe la agregación plaquetaria.

La acción de la PGI_2 está estrechamente relacionada con los efectos del NO, ya que la PGI_2 potencia su liberación. A su vez, el NO potencia los efectos de la PGI_2 al inhibir las PDE, enzima que degrada el AMPc. El incremento de AMPc prolonga los efectos de la PGI_2 en las células musculares lisas vasculares (Khazaei *et al.*, 2008).

III. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

En 1988, Taylor y Weston (1988) describieron un agente vasodilatador producido por el endotelio que era diferente del NO y de la PGI_2. Este factor induce vasorrelajación por hiperpolarización de las células musculares lisas en presencia de la combinación de inhibidores de la NOS y la COX. Por el contrario, la ouabaína, un inhibidor de la ATPasa de Na^+/K^+, o la despolarización de las células de músculo liso con una elevada concentración de K^+ extracelular, impide dicha relajación vascular. Originalmente, de forma errónea, la hiperpolarización derivada de endotelio (EDH, *endothelial-derived hyperpolarization*) se atribuyó a un único mediador endotelial al que se le denominó EDHF (Edwards y Weston, 2001; Triggle *et al.*, 1999).

Hoy en día se sabe que la EDH es una ruta compleja que comprende diferentes mecanismos. Por una parte, se han identificado diferentes moléculas tales como ácidos epoxyeicosatrienoicos, iones de K^+, monóxido de carbono, péptido C natriurético y peróxido de hidrógeno, los cuales inducen vasodilatación por hiperpolarización del músculo liso tras activar diferentes canales de K^+ (Giles *et al*., 2012). Adicionalmente, existe otra ruta que no que incluye la síntesis o liberación de ningún factor hiperpolarizante de las células endoteliales y de las células musculares lisas y que contribuye a la relajación dependiente de endotelio. Esta vasorrelajación se produce por un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en las células endoteliales, seguido de la apertura de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia intermedia (IK_{Ca}) y de pequeña conductancia (SK_{Ca}). Estos canales presentan distinta distribución subcelular: los canales SK_{Ca} están ampliamente distribuidos en la membrana plasmática, mientras que los IK_{Ca} se expresan de forma preferente en proyecciones de las células endoteliales hacia las células del músculo liso. Tras la activación de los IK_{Ca}, la hiperpolarización se propaga al músculo liso por las uniones en hendidura (*gap junctions*) mioendotelilales, mientras que tras la activación de los SK_{Ca}, el flujo de K^+ activa en el músculo liso los canales rectificadores de la entrada de K^+ (K_{ir}) y/o a la bomba ATPasa Na^+/K^+, induciendo la hiperpolarización del músculo liso (Félétou y Vanhoutte, 2009).

1.1.2 Factores de contracción derivados del endotelio

I. *La endotelina-1 (ET-1)*

Hay tres tipos de endotelinas (ET), pero las células endoteliales vasculares producen solamente ET-1. La ET-1 es un potente vasoconstrictor y debido a su corta vida media actúa principalmente como un vasorregulador activo localmente (Khazaei *et al.*, 2008). La ET-1 se libera en respuesta a diversos estímulos, entre los que se encuentran la hipoxia, la adrenalina, las fuerzas de cizallamiento y la isquemia (Boulanger y Luscher, 1990; Cines *et al.*, 1998).

La ET-1 se une a dos tipos de receptores de endotelina acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein coupled receptors*): un receptor que media vasoconstricción, el ET_A,

que se encuentra en las células vasculares del músculo liso, y un receptor que media vasodilatación, el ET_B, localizado en las células endoteliales (Boulanger y Luscher, 1990; Herrmann y Lerman, 2001).

La vasoconstricción provocada por la activación de la ET-1 está asociada con aumentos en la $[Ca^{2+}]_c$ en los miocitos vasculares. Cuando la ET-1 se une a la proteína G acoplada al receptor ET_A, causa la activación de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la escisión del fosfatidilinositol 3'-5'-bifosfato en inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y el DAG aumenta el flujo de entrada de Ca^{2+}desde el exterior celular (Kiely *et al.*, 1997; Khazaei *et al.*, 2008).

Los efectos vasodilatadores de la ET-1 están mediados por el receptor ET_B que activa la enzima PLA_2 en las células endoteliales y da lugar a la síntesis de otros factores derivados del endotelio como la PGI_2. Además, el receptor ET_B también puede aumentar la formación de NO y así tener un efecto protector contra la vasoconstricción excesiva (Giardina *et al.*, 2001).

II. Prostaglandina H_2 (PGH_2) y tromboxano A_2 (TxA_2)

Las células endoteliales liberan factores de contracción como la PGH_2 y el TxA_2 como. La PGH_2 es un precursor de todos los prostanoides (Stankevicius *et al.*, 2003), que deriva del AA mediante la acción de la COX1 y de la COX2. A continuación, da lugar a otros eicosanoides biológicamente activos como el TxA_2. La PGH_2 y el TXA_2 causan vasoconstricción del músculo liso vascular al reducir las concentraciones intracelulares de AMPc y/o incrementar la $[Ca^{2+}]_c$ (Halushka *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1994a).

III. Ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE)

El 20-HETE es uno de los principales metabolitos del AA, a partir del cual es sintetizado por la PLA_2, tras un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$. El 20-HETE inhibe los canales BK_{Ca} en las células musculares lisas vasculares, promoviendo la despolarización de la membrana, la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción. Existen evidencias que sugieren

que el 20-HETE tiene un papel central en la regulación de la función vascular pulmonar y renal. El 20-HETE es un potente constrictor de las arterias renales y cerebrales (McGiff y Quilley, 2001). De hecho, el bloqueo de su formación afecta a la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral, y elimina la presión inducida por la constricción de las arterias cerebrales (Gebremedhin *et al.*, 2000).

1.1.3 La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

1.1.3.1 Estructura y función enzimática de la NOS

La NOS es la enzima implicada en la biosíntesis del NO mediante la transformación de la L-arginina en L-citrulina. Se trata de una reacción muy compleja en la que se necesita O_2 y diversos cofactores: tetrahidrobiopterina (BH_4), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), dinucleótido de flavina adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN), el grupo hemo y la calmodulina (CaM) (Michel y Vanhoutte, 2010).

La NOS es una enzima multidomio constituida por un dominio monooxigenasa N-terminal, que presenta una región de unión a tetrahidrobiopterina (BH_4) y al grupo hemo. La L-arginina se une a la enzima activa en una región próxima al grupo hemo. También presenta un dominio reductasa C-terminal que presenta regiones de unión a FMN, FAD y NADPH. Los dominios N-terminal y C-terminal se unen mediante una secuencia corta que presenta la región de unión a la CaM (Michel y Vanhoutte, 2010). La forma activa de la NOS es dimérica, formada por dos subunidades idénticas. La unión de BH_4 y del grupo hemo es esencial para la dimerización de la enzima. Los monómeros de NOS son catalíticamente inactivos y no pueden unir ni sustrato ni cofactores (Fleming y Busse, 1999; Michel y Vanhoutte, 2010).

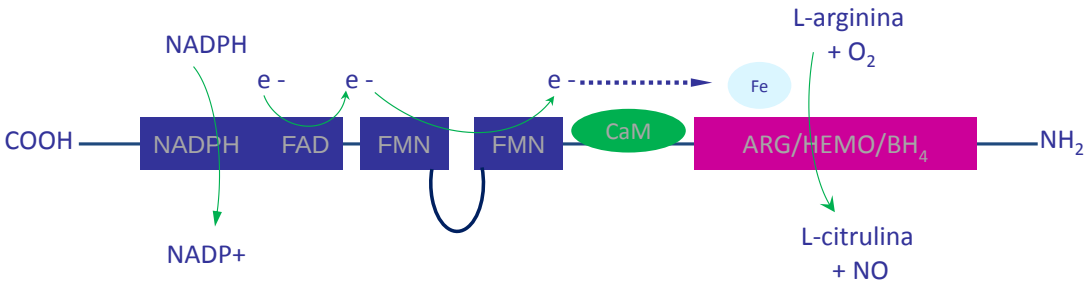

Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la eNOS y de la reacción de síntesis del NO. (Modificado de Michel y Vanhoutte, 2010).

La enzima NOS cataliza la reacción de síntesis de NO a partir de la oxidación de un nitrógeno guanidinio terminal de la L-arginina. Inicialmente, tras la oxidación del NADPH, los electrones son transferidos en el dominio reductasa hacia el FAD y finalmente hacia el FMN. La unión de la CaM facilita el flujo de electrones desde el dominio reductasa al dominio monooxigenasa, así como desde el FAD al FMN. Los electrones fluyen desde un el dominio reductasa de un monómero de la NOS hasta el dominio oxigenasa del otro monómero, demostrando que la dimerización de la NOS es necesaria para su completa actividad catalítica (Michel y Vanhoutte, 2010). La interacción de los electrones con el ión hierro del grupo hemo, en el lugar catalítico de la enzima, permite la reacción de la L-arginina con el O_2 dando lugar a NO y L-citrulina (Alderton *et al.*, 2001).

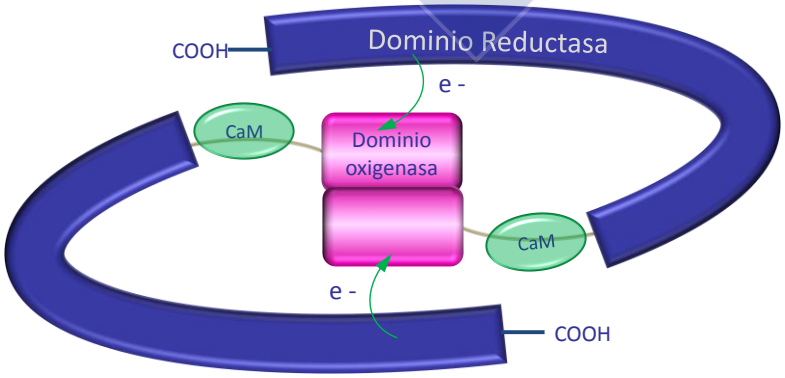

Figura 2. Estructura dimérica de la eNOS que permite la transferencia de electrones desde el dominio reductasa de un monómero de la eNOS al dominio oxigenasa de otro monómero.

Existen tres isoformas de la NOS: NOS-I, NOS-II y NOS-III. La NOS-I o de tipo neuronal (nNOS) se encuentra predominantemente en el sistema nervioso. La NOS-II o iNOS se encuentra en macrófagos, neutrófilos y otras células inflamatorias. La NOS-III o eNOS se encuentra en las células endoteliales y también en los miocitos cardíacos, en los osteoclastos, osteoblastos y células mesangiales renales en menor grado (Forstermann y Munzel, 2006).

La nNOS y la eNOS se expresan de forma constitutiva y son enzimas dependientes de Ca^{2+}, aunque se ha demostrado que la eNOS puede ser activada también de forma independiente de este ión (Ayajiki *et al*., 1996). La iNOS es independiente de Ca^{2+} y no se expresa típicamente en las células en reposo, sino que es inducida por mediadores proinflamatorios y endotoxinas (Lirk *et al*., 2002).

Estas tres isoformas son producto de genes diferentes y comparten aproximadamente un 50-60% de identidad de secuencia. Aunque estas isoformas poseen propiedades químicas y enzimáticas similares, poseen características reguladoras y catalíticas diferentes que las caracterizan.

1.1.3.2 Regulación de la eNOS

I. *Regulación transcripcional y post-transcripcional de la eNOS*

Aunque la eNOS se define como constitutiva, ya que las células endoteliales expresan niveles basales de la proteína, se han identificado múltiples estímulos fisiológicos y patológicos que modulan su expresión mediante mecanismos que alteran los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en el estado estacionario de la enzima. Estos mecanismos comprenden cambios en el ratio de transcripción del gen de la eNOS (regulación transcripcional) y alteración del procesamiento y de la estabilidad del ARNm (regulación post-transcripcional).

Entre los estímulos que regulan la expresión de la eNOS se encuentran el *shear stress*, el crecimiento celular, las citocinas, las lipoproteínas, los factores de crecimiento y el estrés oxidativo, entre otros (tabla 1). En cada uno de estos casos, la expresión en el ARNm de la eNOS, y por tanto la capacidad para producir NO, puede

verse incrementada entre dos y tres veces. En general, pequeños cambios en los niveles de NO pueden dar lugar a importantes cambios fisiológicos (Searles, 2006).

Estímulo	Regulación Transcripcional	Regulación Post-transcripcional
Shear stress	Incremento de la transcripción	Incremento estabilidad
Crecimiento celular	Sin efecto	Incremento estabilidad
Peróxido de Hidrógeno	Incremento de la transcripción	Incremento estabilidad
TGF-β1	Incremento de la transcripción	Desconocido
LDL oxidado	Disminuye e incrementa la transcripción	Disminuye la estabilidad
TNF-α	Disminuye la transcripción	Disminuye la estabilidad
LPS	Sin efecto	Disminuye la estabilidad
Hipoxia	Disminuye e incrementa la transcripción	Disminuye la estabilidad
Estrógenos	Incremento de la transcripción	Sin efecto
VEGF	Posible incremento de la transcripción	Incremento estabilidad
Inhibición HDAC	Incremento transcripción	Posible incremento estabilidad
Proteína cinasa	Incremento transcripción	Sin efecto
Rho GTPasa	Sin efecto	Disminuye la estabilidad
Hipercolesterolemia	Desconocido	Disminuye la estabilidad

Tabla 1. Estímulos fisiológicos y fisiopatológicos que regulan de la expresión de la eNOS. (Modificado de Searles, 2006).

Aunque los niveles de ARNm de la eNOS pueden estar influenciados por cambios en la transcripción, diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la

modulación post-transcripcional en respuesta a numerosos estímulos. Esto se debe a que el ARNm de la eNOS tiene una larga vida media en el estado estacionario (10-35 h), siendo capaz de acumularse en el citosol y, por lo tanto, la síntesis de las proteínas codificadas puede persistir mucho tiempo después de que la transcripción de genes haya sido reprimida. Por lo tanto, la alteración de la vida media de los transcriptos estables acumulados puede ser el medio más rápido y eficiente de la modulación de los niveles de ARNm en el estado estacionario y de la expresión génica. Este nivel de regulación proporciona a las células endoteliales flexibilidad para efectuar cambios fenotípicos rápidos en respuesta a diferentes estímulos (Searles, 2006).

En cuanto a la regulación transcripcional, el promotor de la eNOS, al igual que otros genes denominados constitutivos, carece de la típica secuencia *TATA box* pero posee múltiples secuencias *cis*-ADN (ácido desoxirribonucleico) reguladoras, siendo muchos de ellos sitios de unión esenciales para la actividad del promotor. Existe una larga lista de factores de transcripción que se unen al promotor de la eNOS, lo que determina que los niveles de ARNm para esta enzima puedan ser modulados por los distintos estímulos mencionados al comienzo de este apartado (Searles, 2006; Fleming y Busse, 2003).

Por otra parte, la expresión específica de la eNOS en células endoteliales y la supresión de su expresión en células no endoteliales está regulada por mecanismos epigenéticos, es decir, por mecanismos que modifican la estructura de la cromatina, pero que no afectan a la secuencia de nucleótidos. Estos mecanismos son la metilación del ADN y las modificaciones de proteínas histonas. El promotor de la eNOS se encuentra fuertemente metilado en las células no endoteliales en comparación con las células endoteliales. Además, el promotor de la eNOS en las células endoteliales presenta unas modificaciones específicas de histonas que determinan la estructura de la cromatina, las cuales desarrollaremos en profundidad en el siguiente apartado.

La regulación transcripcional de la eNOS incluye la modificación del transcripto primario, el transporte nucleocitoplasmático, la localización subcelular, la estabilidad del ARNm y la eficiencia del traslado. El control post-transcripcional a estos distintos niveles está mediado en gran parte por elementos de ARN que actúan en posición *cis* localizados en regiones 5´y 3 no traducidas (UTRs, *untranslated regions*) del ARNm. La

regulación depende de una combinación de las estructuras primarias y secundarias de esos elementos y de su reconocimento por proteínas de unión a ARN que actúan en posición *trans.*

Otro mecanismo de regulación post-trancripcional es el ARNm *cis*-antisentido natural denominado sONE, el cual presenta un exón complementario con la eNOS de más de 662 nucleótidos entre secuencias codificadoras de proteínas y secuencias 3' – UTR. El sONE regula a la baja la expresión de la eNOS en células no endoteliales, asimismo en células endoteliales su sobreexpresión también regula a la baja la expresión de la eNOS (Searles, 2006). Son necesarios más estudios para determinar cómo se regula su expresión en las células endoteliales y cúal es su papel en la regulación de la eNOS en condiciones fisiológicas y patofisiológicas.

II. Regulación transcripcional y post-transcripcional de la eNOS por enzimas histonas

La estructura de la cromatina está regulada por una gran diversidad de modificaciones en el N-terminal de las histonas H3 y H4 (acetilación, metilación, fosforilación, etc.). Estas modificaciones son llevadas a cabo y mantenidas por distintas enzimas de histonas (Fish *et al.,* 2005).

La acetilación de las histonas es el proceso más estudiado. Las enzimas histonas acetil tranferasas (HATs) y las enzimas histonas deacetilasas (HDACs) regulan el estatus de acetilación de las proteínas histonas. La acetilación de las histonas en el centro promotor determina la estructura de la cromatina, la cual regula la accesibilidad de ciertas secuencias de ADN a la maquinaria de transcripción. Un predominio de la actividad de HDAC resulta en la hipoacetilación de histonas, que está asociada con el ensamblaje de estructuras de heterocromatina represivas y el consecuente silenciamiento de genes, mientras que la hiperacetilación de histonas está asociada con la formación de eucromatina y la activación de la transcripción (Rossig *et al.*, 2002).

En las células endoteliales existe una combinación específica de modificaciones de histonas en los nucleosomas del centro del promotor de la eNOS y en las regiones

codificantes proximales posteriores. A esta combinación de modificaciones en las histonas se le denomina "código específico de histonas" y está asociado con la activación transcripcional. En las células endoteliales, en comparación con las no endoteliales, se observa un enrequecimiento en la acetilación de las histonas H3 y H4 y en la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (Matouk y Marsden, 2008). Estas modificaciones son llevadas a cabo por las HATs y por la enzima histona metil tranferasa de la lisina 4 (Fish *et al.*, 2005).

En las células no endoteliales se ha demostrado que existe una elevada cantidad de HDACs que se encuentran reclutadas en la región del promotor proximal de la eNOS. Las modificaciones realizadas por esta enzimas hacen que la estructura de la cromatina sea innacesible a los factores de transcripción (Fish *et al.*, 2005). La relevancia fisiológica de este hallazgo se pone de manifiesto mediante el empleo del inhibidor de HDAC, la tricostatina A (TSA), que induce la expresión del ARNm de la eNOS en células musculares lisas, observándose un incremento de la acetilación de las histonas H3 y H4 del promotor proximal de la eNOS (Matouk y Marsden 2008, Fish *et al.*, 2005).

Se ha observado una disminución de la expresión de ARNm de la eNOS en diversas enfermedades cardiovasculares. Aunque no se conoce con exactitud la causa de dicha disminución, mecanismos epigenéticos como la modificación de histonas del promotor de la eNOS pueden ser importantes en el desarrollo de dichas enfermedades.

Por otra parte, la acetilación de histonas no es sólo importante en la regulación de la expresión celular específica de la eNOS, sino que diferentes estudios han puesto de manifiesto que es también importante en la regulación de la función endotelial. El inhibidor de HDAC, TSA, ha demostrado su efecto dual en las células endoteliales sobre la expresión de la eNOS, dando lugar a una inducción tras tratamientos cortos y a una inhibición tras tratamientos largos. Este efecto dual también se ha observado según la dosis empleada: a dosis bajas, el TSA incrementa la expresión de la eNOS; sin embargo, el empleo de dosis mayores resulta en una disminución de los niveles de la enzima (Gan *et al.*, 2006).

Los complejos efectos de la inhibición de las HDACs sobre la expresión de la eNOS pueden ser explicados mediante dos mecanismos diferentes. La inducción de la expresión de la eNOS por el TSA podría deberse a un incremento de la actividad del promotor de la eNOS por liberación del factor de transcripción represor Sp1 (Gan *et al.*, 2006). El mecanismo por el que el TSA inhibe la expresión de la eNOS podría explicarse por una inducción de la expresión *de novo* de un factor desestabilizante del ARNm de la eNOS, probablemente el sONE, un ARNm antisentido complementario al ARNm de la eNOS (Searles, 2006; Rossig *et al.,* 2002).

Esta regulación de la eNOS por el TSA también posee relevancia fisiológica. De hecho, los tratamientos con TSA contrarrestan la vasorrelajación dependiente de NO y la angiogénesis (Searles, 2006; Rossig *et al.*, 2002).

III. Modificaciones post-traduccionales de la eNOS

La actividad enzimática y localización de la eNOS está determinada por numerosas modificaciones reguladoras post-traduccionales (acilación, fosforilación interacciones de proteínas) que proporcionan mecanismos de activación o inhibición de la enzima en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. La existencia de múltiples mecanismos reguladores refleja el hecho de que la actividad de la eNOS está estrechamente contralada para prevenir los efectos perjudiciales que podrían causar tanto una sobreproducción de NO como una producción insuficiente (Dudzinski y Michel, 2007).

Acilación de la eNOS

En células quiescentes, la eNOS se localiza fundamentalmente en invaginaciones la membrana plasmática denominadas caveolas. Las caveolas son microdominios de la membrana caracterizadas por la presencia de la proteína de anclaje caveolina. Las caveolas agrupan diversos receptores y moléculas de señalización que intervienen en la regulación de la eNOS, así como la propia eNOS, siendo todos estos componentes necesarios para que exista una coordinación efectiva entre los estímulos que alcanzan

la célula y las señales activadoras de la enzima. La localización de la eNOS en las caveolas depende de la miristoilación (irreversible y co-translacional) de la glicina N-terminal seguida de las palmitoilaciones (post-translacionales) en los residuos cisteína (Cys), Cys 15 y Cys 26. Estas dos acilaciones proporcionan a la eNOS tres puntos de anclaje en las caveolas (Shaul, 2002; Dudzinski y Michel, 2007, Michel y Vanhoutte, 2010).

Papel del Ca^{2+} intracelular e unión a Calmodulina (CaM) en la activación de la eNOS

De las tres isoformas de la NOS, la eNOS es la más sensible a los cambios en la concentración $[Ca^{2+}]_c$. La actividad catalítica máxima de la eNOS depende de su unión a la CaM, proteína intracelular que regula la transducción de la señal cálcica. La unión de la CaM en el dominio de unión a CaM en la eNOS desplaza el *loop* autoinhibitorio adyacente facilitando la transferencia de electrones dependiente de NADPH entre los dominios reductasa y oxigenasa de la enzima. La unión de la CaM simultáneamente quebranta la interacción inhibitoria caveolina-eNOS. Numerosas rutas de señalización convergen en la movilización transitoria de Ca^{2+} intracelular para proporcionar el mecanismo más rápido de activación de la eNOS via CaM. Agonistas como la acetilcolina o la bradiquinina estimulan la producción de NO tras activar rutas de señalización que inducen un incremento en los niveles $[Ca^{2+}]_c$. Sin embargo la eNOS puede ser activada por diferentes estímulos, siendo el más importante el *shear stress*, sin que se produzca un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ .Esto se debe a que las diferentes cinasas implicadas en la activación de la eNOS, según el estímulo que se aplique, presentan diferente sensibilidad al Ca^{2+}. Por ejemplo, la activación de la proteína cinasa dependiente Ca^{2+}-CaM II (CaMKII) por un agonista es altamente dependiente de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$. Sin embargo, la activación de la proteína cinasa Akt por el *shear stress* no se ve afectada por la eliminación de Ca^{2+} (Fleming y Busse, 2003; Dudzinsky y Michel, 2007).

Fosforilación / desfosforilación de la eNOS

Los procesos de fosforilación y desfosforilación son, junto a la acilación y la unión de la CaM, los principales mecanismos de regulación post-traduccional implicados en la regulación de la actividad de la eNOS. La eNOS puede ser fosforilada en los residuos serina (Ser), en los residuos treonina (Thr) y en el residuo tirosina (Tyr), existiendo diferentes regiones de fosforilación. La fosforilación en los residuos Ser 1177, Ser 635 y Ser 617 promueve el incremento de la actividad de la enzima mientras que la fosforilación en la Ser 116, Trh 495 y Tyr 659 inhibe su actividad. Las fosforilaciones más importantes, hablando en términos de la regulación de la actividad de la eNOS, son las que tienen lugar en los residuos Ser 1177 y Thr 495.

El residuo Ser 1177 (o Ser 1179 bovino, el cual ha sido mejor caracterizado) se encuentra en el resido reductasa de la eNOS en las células endoteliales en cultivo. Este residuo no se encuentra fosforilado, sino que es fosforilado tras diversos estímulos como el *shear stress*, estrógenos, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), insulina o bradiquinina. La fosforilación es catalizada por diferentes proteínas cinasas, tales como la Akt, la proteína cinasa A (PKA); la proteína cinasa activada por AMPc (AMPK), la PKG o la CaMKII. La contribución de una o varias de estas cinasas depende del estímulo aplicado. Cuando la Ser 1177 es fosforilada, el flujo de electrones a través del dominio reductasa y, en consecuencia, la producción de NO se incrementa en dos o tres veces con respecto al nivel basal (Fleming y Busse, 2003).

El residuo Thr 495 se localiza en el dominio de unión a la CaM. En las células endoteliales en cultivo, este residuo se encuentra fosforilado de forma constitutiva. Como ya hemos mencionado antes, se trata de una región reguladora negativa, ya que su fosforilación está asociada con una disminución de la actividad de la eNOS puesto que interfiere en la unión de la CaM a su dominio. La cinasa implicada en la fosforilación de este residuos es la proteína cinasa C (PKC), lo que explica el hecho de que los inhibidores de esta cinasa o su regulación a la baja incremente de forma marcada la producción de NO (Fleming y Busse, 2003).

Por otra parte, numerosas fosfoproteínas fosfatasas participan en la regulación de la eNOS y su acción puede activar o inhibir la eNOS, dependiendo de la región específica de desfosforilación. Por ejemplo, la fosfoproteína fosfatasa 1 está implicada

en la desfosforilación de la Ser 1177 y, por lo tanto, disminuye la actividad de la eNOS, mientras que la fosfatasa 2A y la fosfoproteína fosfata 2B o calcineurina, aumentan la actividad de la enzima por defosforilación de la Thr 495 y de la Ser 116, respectivamente (Michel y Vanhoutte, 2010).

Otras modificaciones post-traduccionales de la eNOS

La S-nitrosilación constituye también un mecanismo reversible de regulación post-traduccional de la actividad de la eNOS *in vivo* en células endotelilales. La eNOS es inhibida por S-nitrosilación en los residuos Cys 94 y Cys 99 de la secuencia primaria humana, mientras que la de-nitrosilación incrementa su actividad. El mecanismo por el que la S-nitrosilación induce inhibición no se conoce del todo. Entre las hipótesis propuestas se ha sugerido que provoca la disociación del dímero activo de la enzima en monómeros inactivos, que afecta a la unión del sustrato o de los cofactores o que reduce el flujo de electrones entre los dos monómeros (Dudzinsky y Michel, 2007).

La unión de distintas proteínas a la eNOS también participa en la regulación de su actividad enzimática. Como hemos descrito anteriormente, las caveolinas son proteínas de membrana intrínsecas. La caveolina-1 y la caveolina-2 se expresan de forma abundante en las células endoteliales mientras que la caveolina-3 se expresa de forma específica en cardiomiocitos y músculo esquelético. La caveolina se une a la eNOS localizada en las caveolas, aunque aparentemente esta interacción no es necesaria para la localización de la eNOS en las caveolas. En las células en reposo, la caveolina inhibe tónicamente la eNOS, impidiendo por una parte la señalización de los receptores localizados en las caveolas que transducen las señales estimuladoras a la eNOS, y por otra parte inhibiendo la unión de la CaM a la eNOS. Las caveolinas están implicadas en diversas enfermedades entre las que se incluyen ateroesclerosis, hipertensión arterial, cardiomiopatías, diabetes y oncogénesis (Vanhoutte y Michel, 2010).

La Hsp90 modula la activación de la eNOS inducida por agonistas. La unión a la Hsp90 estimula la actividad de la eNOS, incrementando su afinidad por la CaM, equilibrando la liberación de NO *versus* superóxido y, probablemente, facilitando la

unión del grupo hemo. Además, la Hsp90 también afecta a la actividad de la eNOS mediante diversos efectos sobre la cinasa Akt. La Hsp90 se une a la Akt, siendo necesaria para la interacción de la Akt con la eNOS. Además la Hsp90 estimula la catálisis de la eNOS aumentando su ratio de fosforilación dependiente de Akt y mantiene los niveles de Akt fosforilada protegiéndola de la degradación y desactivación (Dudzinsky y Michel, 2007).

Por último, la proteína asociada a eNOS (*eNOS interacting protein*, NOSIP) se une a la eNOS promoviendo su translocación desde las caveolas en la membrana plasmática a la membrana intracelular. La unión de la NOSIP a la eNOS es inhibida por la caveolina-1. Por otra parte, la proteína NOSTRIN (*eNOS trafficking inducer protein*) se une a la eNOS promoviendo su translocación de la membrana plasmática a las vesículas intracelulares, con la consiguiente disminución de la actividad (Vanhoutte y Michel, 2010).

1.2 Función de barrera endotelial

El endotelio vascular forma una barrera que controla el intercambio de solutos, macromoléculas y células entre la sangre y los tejidos circundantes. La función de barrera para el intercambio de dichas sustancias depende de la integridad de la estructura endotelial, la cual se ve sometida a cambios en el citoesqueleto, en los complejos de unión célula-célula y el acoplamiento de células a la matriz extracelular y a la membrana basal. Una regulación adecuada de estos eventos mantiene una baja permeabilidad selectiva para fluidos y solutos en condiciones fisiológicas normales. La disfunción de la barrera endotelial se produce durante la estimulación por agentes inflamatorios, agentes patógenos, células sanguíneas activadas o estados de enfermedad y se caracteriza por el flujo excesivo de plasma a través de la pared de endotelial a los tejidos circundantes (Komarova y Malik, 2010).

Existen dos rutas que permiten el paso de solutos y macromoléculas a través del endotelio: la vía transcelular, que permite el paso de macromoléculas como la albúmina y la vía paracelular, que restringe el paso de moléculas de más de 3 nm de radio (Komarova y Malik, 2010).

1.2.1 Permeabilidad transcelular

La ruta transcelular, también conocida como transcitosis, permite el paso de macromoléculas, como las proteínas plasmáticas, a través del endotelio. Este proceso es esencial para el transporte de la albúmina, de ligandos unidos a albúmina y de hormonas, así como para regular la presión oncótica en el endotelio (Komarova y Malik, 2010). El mecanismo por el que se produce el paso consiste en una endocitosis mediada por vesículas en la membrana luminal endotelial, seguido de transcitosis a través de la célula y exocitosis en la membrana basolateral. Este proceso puede ser finalizado por vesículas individuales capaces de realizar el transporte desde la membrana apical a la membrana basolateral de una célula endotelial, o bien ser realizado por un grupo de vesículas vacuolares (VVOs, *vesicle-vacuolar organelle*) interconectadas, que forman una estructura de canal de 80-200 nm de diámetro que atraviesa el interior celular (Yuan y Rigor, 2010).

La endocitosis y la exocitosis son mediadas por las caveolas las cuales, mediante la formación de vesículas, son capaces de transportar fluidos y solutos a través del interior celular. Las caveolas contienen caveolina-1, una proteína estructural reclutada a la membrana y que forma el ensamblaje oligomérico necesario para dar forma y estructura a la caveola. La caveola contiene componentes típicos de las balsas lipídicas, como el colesterol y esfingolípidos, así como moléculas de señalización y anclaje que modifican la función de la caveolina-1 e inician el transporte de vesículas. El colesterol es necesario para el reclutamiento de la caveolina-1 a la membrana. La oligomerización de la caveolina-1 y la formación de la caveola son iniciadas por la fosforilación de la caveolina-1 (realizada por la cinasa Src). El consiguiente reclutamiento de la dinamina (GTPasa grande) y de la intersectina (proteína adaptadora) permite la completa formación de la caveola, así como iniciar su despegue de la membrana plasmática formando vesículas endocíticas de aproximadamente 70 nm de diámetro (Predescu *et al*.; 2003). Estas vesículas permanecen incorporadas a la membrana mediante interacciones de receptores de acoplamiento sensibles al factor N-etilmaleimida soluble (SNAREs, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptors*). El desprendimiento de las vesículas es inducido por el factor sensible a N-etilmaleimida, una proteína de fusión de vesículas con actividad ATPasa.

Las vesículas formadas pueden ser recicladas, regresando a la membrana apical de la célula, o bien se pueden mover a través del interior celular a la cara basolateral (transocitosis), probablemente mediante interacciones con los microtúbulos (Liu *et al.*, 1993, Yuan y Rigor, 2010).

Al llegar a la membrana diana, las vesículas se unen a proteínas de acoplamiento y se fusionan con la membrana basolateral o con VVOs en el interior de la célula. Una vez se fusionan tanto a VVOs o a la membrana basolateral, las vesículas pueden realizar la exocitosis, liberando su contenido al tejido circundante (Predescu *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía se desconoce qué solutos son depositados por las vesículas en las VVOs y en qué medida esto contribuye a la permeabilidad basal o estimulada para cualquier soluto en particular (Dvorak *et al.*, 1995; Yuan y Rigor; 2010).

Además, existe un mecanismo alternativo para facilitar el paso transcelular de fluido a través de canales transmembrana de agua denominados acuaporinas. Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana expresadas en las células endoteliales que permiten el flujo difusivo de agua a través de la membrana celular. Sin embargo, en muchos tejidos se cree que la contribución de las acuaporinas al paso de solutos y macromoléculas es menor o insignificante.

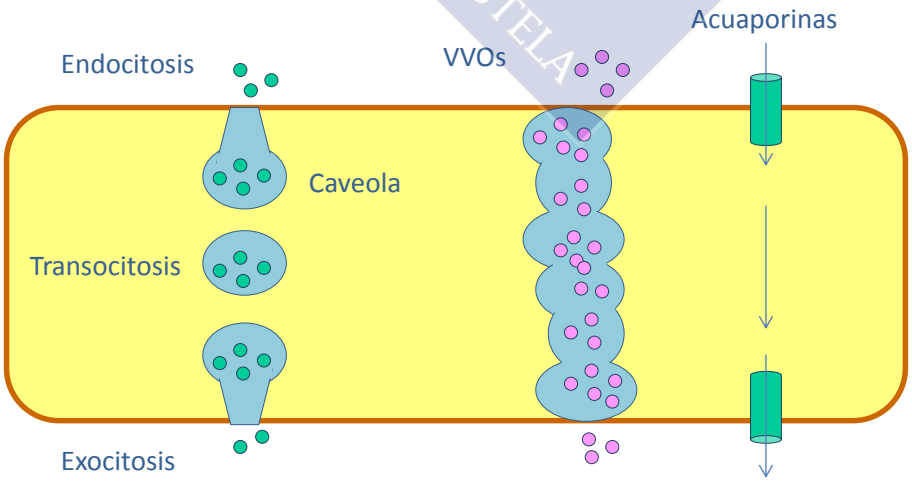

Figura 3. Representación esquemática del paso de fluidos, solutos y macromoléculas mediante la vía transcelular en las células endoteliales. (Modificado de Yuan y Rigor., 2010).

1.2.2 Permeabilidad paracelular

La vía paracelular está formada por el pequeño espacio intercelular existente entre células en contacto. Su principal función es restringir el libre paso de macromoléculas con un diámetro superior a 3 nm mediante las uniones interendoteliales, aunque permite el transporte por convección o difusión de moléculas de inferior tamaño. La permeabilidad de las uniones interendoteliales está determinada por las propiedades adhesivas de las proteínas que constituyen las uniones adherentes y las uniones estrechas. Esta estructura de uniones es dinámica, responde tanto a agonistas que incrementan la permeabilidad y a leucocitos en migración que separan las uniones interendoteliales como a mediadores estabilizadores de la barrera mediante el incremento de la expresión en la superficie e incremento de la adhesión de proteínas de unión para reforzar las uniones interendoteliales (Vanderbroucke *et al*., 2008).

I. *Uniones endoteliales adherentes*

Las uniones adherentes contienen cadherina vascular endotelial (VE-cadherina) como la principal proteína estructural que media la unión homofílica y la adhesión a células adyacentes de forma dependiente de Ca^{2+}. El dominio extracelular de la VE-cadherina está compuesto de 5 repeticiones tipo cadherina que oligomerizan para formar *cis*-oligómeros y *trans*-oligómeros entre células adyacentes (Mehta y Malik, 2006). Intracelularmente contiene dos dominios funcionales, el dominio juxtamembrana y el C-terminal. El dominio juxtamembrana se une a la catenina p-120. El dominio C-terminal se une a la β-catenina (la cual se une a la γ-catenina) y a la α-catenina. La α-catenina une el complejo cadherina-catenina al citoesqueleto de actina (Vanderbroucke *et al*., 2008).

A diferencia de las otras cateninas, la catenina p120 no se une al citoesqueleto de actina, pero su unión a la VE-cadherina también juega un papel importante en la organización de las uniones adherentes y, por lo tanto, en la regulación de la permeabilidad endotelial (Mehta y Malik, 2006). La catenina p120 regula las interacciones entre cadherinas, cinasas, fosfatasas y Rho guanosina trifosfatasas

(GTPasas), las cuales controlan el estado de fosforilación y la estabilidad de la interacción de las cadherinas entre sí y de la interacción de las cadherinas con las cateninas (Mehta y Malik, 2006).

Las interacciones dinámicas entre las uniones adherentes y el citoesqueleto de actina son cruciales para entender la regulación de la permeabilidad endotelial. Mientras que las bandas de actina cortical estabilizan las uniones adherentes, la reorganización de la actina en fibras de estrés contráctiles altera las uniones adherentes. Otro mecanismo involucrado en el desensamblaje de las uniones adherentes y la formación de huecos interendoteliales es el desensamblaje de los microtúbulos (Mehta y Malik, 2006; Vanderbroucke *et al*., 2008).

La integridad de las uniones adherentes puede ser regulada por cambios en la fosforilación de la VE-cadherina, la β- catenina y la p-120 (Vanderbroucke *et al*., 2008). La VE-cadherina y la β- catenina son fosforiladas por la PKC tras la estimulación por trombina, causando el desensamblaje de las uniones adherentes (Konstantoulaki *et al.*, 2003). La VE-cadherina también puede ser fosforilada en el residuo Ser 665 por el VEGF, que induce la internalización de la VE-cadherina y pérdida de la función de la barrera endotelial (Gavard y Gutkind, 2006). La internalización de las cadherinas, en repuesta a un agonista como la trombina, induce el incremento citoplásmatico de la caterina p120 la cual, a su vez, disminuye la activación de la Rho A e incrementa los niveles de GTPasas estabilizadoras de la barrera endotelial, Rac1 y Cdc42 (Noren *et al.*, 2000). Por último, un descenso en la fosforilación del residuo tirosina de la VE-cadherina fortalece la adhesión homotípica célula-célula por incremento de la cantidad de caterina p120 asociada con la cadherina (Lampugnani y Dejana, 1997). Por lo tanto, el incremento de la caterina p120 inducido por fosforilación es un mecanismo de señalización crucial para promover un mayor contacto célula-célula, necesario para el mantenimiento de una barrera endotelial intacta.

II. Uniones endoteliales estrechas

En comparación con la regulación de las uniones adherentes, la de las uniones endoteliales estrechas es menos conocida (Vanderbrouck *et al*., 2008). Aunque sólo

una quinta parte de las uniones entre células en el endotelio son uniones estrechas (Mehta y Malik, 2006), éstas son esenciales para el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial. Las uniones endoteliales estrechas están formadas por la adhesión homotípica de unas proteínas denominadas ocludinas o claudinas, que requieren la co-expresión de una proteína de unión llamada *zone-occludin* (ZO) 1 para su expresión en la superficie celular. Las ZO 1-3, presentes en las células endoteliales, son componentes intracelulares de las uniones estrechas que se asocian con la actina cortical (Bazzoni y Dejana, 2004). De los 24 miembros de la familia de las claudinas, únicamente la claudina-5 es una isoforma específicamente endotelial. Las ZO unen claudinas y ocludinas al citoesqueleto de actina mediante la proteasa cingulina (Cordenonsi *et al*., 1999). Estas interacciones permiten la reorganización de la actina para regular la estabilidad de las uniones estrechas mediante un mecanismo similar al descrito para las uniones adherentes (Bazzoni y Dejana, 2004).

III. Moléculas de unión adhesión

Las moléculas de unión adhesión (*junctional adhesión molecules*, JAMs) son miembros de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas G (IgG). Las proteínas JAMs son proteínas transmembrana que también forman interacciones homotípicas ente células endoteliales vecinas, permitiendo estabilizar aún más la barrera endotelial (Weber *et al.,* 2007; Vanderbroucke *et al*., 2008). Son los miembros menos conocidos del complejo de las proteínas adhesivas de las uniones interendoteliales en la regulación de la permeabilidad paracelular. LA JAM-A, JAM-B y JAM-C se expresan en las células endoteliales. La JAM-A se colocaliza en la uniones estrechas con las ocludinas, las claudinas, las ZOs y la cingulina, y se cree que regula el ensamblaje de las uniones mediante el reclutamiento y la unión de estas proteínas a su C-terminal intracelular para colocalizar estas proteínas con las uniones nacientes (Bazzoni y Dejana, 2004). Existen evidencias de que la JAM-A facilita la localización de la ZO-1 y de la ocludina en lugares en los que se están desarrollando las uniones estrechas en la membrana (Bazzoni y Dejana, 2001). Ante citocinas que incrementan la permeabilidad, la JAM-A se disocia del citoesqueleto de actina y desestabiliza las uniones. La JAM-C regula la permeabilidad paracelular por inducción de la inhibición de la GTPasa Rap1

para permitir el desmontaje de las uniones adherentes (Orlova *et al*., 2006; Vanderbroucke *et al*., 2008).

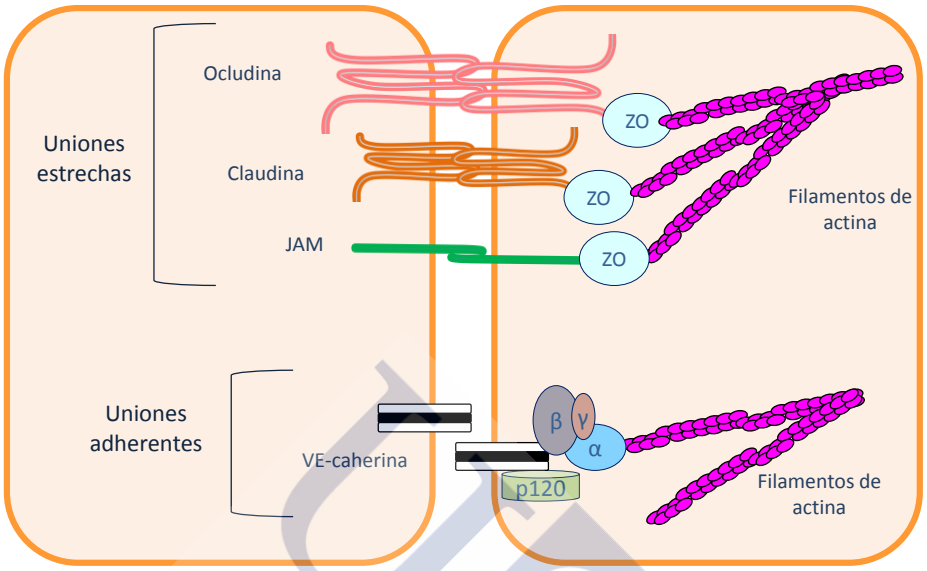

Figura 4. Representación esquemática de las uniones interendoteliales compuestas por las uniones adherentes y las uniones estrechas. (Modificado de Mehta y Malik, 2006).

1.2.3 Barrera extracelular: Adhesiones focales

Las adhesiones focales son puntos de unión entre la membrana basolateral del endotelio y la matriz circundante extracelular de la pared vascular (Wu, 2005). Sus principales componentes estructurales son los receptores transmembrana denominados integrinas. Las integrinas son una familia de glicoproteínas expresadas como heterodímeros α / β, cuyo dominio intracelular interactúa con el citoesqueleto, ya sea directa o indirectamente a través de proteínas de enlace (paxilina, talina, vinculina o α-actinina). Su dominio extracelular se une a proteínas de la matriz, tales como fibronectina, vitronectina, colágeno, fibrinógeno o laminina. La organización molecular de las integrinas varía dependiendo del estado químico y físico de las matrices extracelulares (Yuan y Rigor, 2010).

Las adhesiones focales ayudan a mantener las propiedades fisiológicas normales de la barrera endotelial, su ensamblaje y actividad. Además, median las respuestas de

hiperpermeabilidad bajo condiciones de estimulación en presencia de factores angiogénicos, mediadores de la inflamación, o fuerzas físicas (Yuan y Rigor, 2010).

Los mecanismos precisos por los cuales las adhesiones focales contribuyen al mantenimiento de las respuestas de la función de barrera y a la hiperpermeabilidad endotelial ante una estimulación no se conocen por completo (Wu, 2005). Se ha sugerido que varias señales físicas y químicas pueden ser detectadas y coordinadas en las zonas de contacto focal célula-matriz, donde las integrinas juegan un papel central en las interacciones transmembrana entre las células y la matriz extracelular (Yuan y Rigor, 2010).

1.2.4 El citoesqueleto endotelial

De manera similar a lo que ocurre en otros tipos de células, el citoesqueleto endotelial se compone de microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina. Estas estructuras son importantes para la morfología endotelial celular, la adhesión y la función de barrera. Mientras que el soporte estructural proporcionado por todos los componentes del citoesqueleto es importante para la integridad de la barrera, el citoesqueleto de actina es el más importante para la regulación de la permeabilidad endotelial (Yuan y Rigor, 2010).

I. *Microtúbulos*

Los microtúbulos son estructuras tubulares formadas por polímeros de subunidades heterodiméricas de α y β tubulina. La estructura tubular consta de 13 filamentos poliméricos paralelos dispuestos en un anillo. En las células endoteliales, los microtúbulos forman enlaces cruzados con los filamentos de actina y pueden afectar a la permeabilidad endotelial mediante efectos sobre los filamentos de actina (Yuan y Rigor, 2010). El reordenamiento dinámico de los de microtúbulos afecta a la organización de otros componentes del citoesqueleto, y se ha demostrado que la estabilización de los microtúbulos protege al endotelio frente a la formación de fibras de estrés de actina y a la hiperpermeabilidad (Shivanna y Srinivas, 2009). Asimismo,

como ya hemos mencionado con anterioridad, el ensamblaje de los microtúbulos es crucial para mantener la integridad de las uniones adherentes (Vanderbroucke *et al.*, 2008).

La despolimerización de los microtúbulos activa los factores de intercambio de nucleótidos de guanina y la señalización a través de la familia Rho GTPasas, dando lugar a la formación de fibras de estrés de actina (Birukova *et al.*, 2004b). Los microtúbulos se desestabilizan por el tratamiento de las células endoteliales con la citocina inflamatoria el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) (Shivanna y Srinivas, 2010), o con trombina (Birukova *et al.*, 2004a) y, por lo tanto, pueden contribuir a la disfunción de la barrera endotelial en respuesta a la inflamación.

II. Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios están formados por la asociación heterogénea de polímeros de proteínas. En la mayoría de las células, la principal proteína de los monómeros de los filamentos intermedios es la vimentina. Los filamentos intermedios son importantes para la estructura de las células endoteliales y se expresan más abundantemente en las células expuestas a esfuerzo de cizallamiento, por ejemplo en células endoteliales aórticas. Los filamentos intermedios están conectados a las proteínas de unión célula-célula y a las adhesiones focales en la membrana basal (Yuan y Rigor, 2010). El papel de los filamentos intermedios en el control de la función de barrera endotelial no está claro. Se cree que su función principal es proporcionar mayor soporte estructural y solidez, estabilizando las conexiones formadas por los microfilamentos de actina menos resistentes (McGuilem *et al.*, 2006).

III. Filamentos de actina

Los filamentos de actina son polímeros lineales de actina filamentosa (McGuilem *et al.*, 2006; Prasain y Stevens, 2009, Yuan y Rigor, 2010). La estabilidad de los filamentos de actina es dependiente de la concentración de actina globular dentro de la célula. El mantenimiento de la concentración intracelular de actina globular por

encima de la concentración crítica (0,1 M) favorece la polimerización y la formación de filamentos de actina. En condiciones fisiológicas normales, los filamentos de actina se distribuyen al azar en toda la célula (filamentos cortos y difusos de monómeros de actina) y en la banda periférica de las células (actina cortical) (Prasain y Stevens, 2009, Yuan y Rigor, 2010). Tras el tratamiento de las células endoteliales con agentes de inducción de hiperpermeabilidad, tales como trombina o histamina, los filamentos de actina se organizan en haces lineales paralelos a través del interior de la célula (fibras de estrés). La formación de fibras de estrés suele ir acompañada de una morfología celular contráctil y de la formación de huecos entre las células endoteliales adyacentes. En contraste, en las células endoteliales tratadas con agentes protectores de barrera, tales como la esfingosina-1-fosfato, los filamentos de actina se reorganizan y localizan en la periferia de la célula, fortaleciendo los contactos célula-célula. Se conocen al menos 80 proteínas que se unen al citoesqueleto de actina modificando su organización y función. Numerososas proteínas, entre ellas la cofilina, la gelsolina y las proteínas de choque térmico de 27 kDa (*heat shock protein 27*, Hsp27) regulan la polimerización de la actina (Prasain y Stevens, 2009, Yuan y Rigor, 2010). Además, la arquitectura del citoesqueleto de actina puede ser modificada por moléculas de señalización, como las GTPasas pequeñas de la familia Rho (Rac1, Cdc42, RhoA), para formar estructuras especializadas, tales como la actina cortical de la periferia de la célula o las fibras de estrés de actina (Prasain y Stevens, 2009, Yuan y Rigor, 2010). La reorganización del citoesqueleto y la formación de fibras de estrés inducen hiperpermeabilidad endotelial. Sin embargo, los mecanismos precisos y la contribución específica de este proceso a la regulación de la permeabilidad no están bien establecidos. En la mayoría de los casos, los reordenamientos del citoesqueleto son inseparables de otros eventos tales como la unión actina-miosina o la contracción (Yuan y Rigor, 2010).

IV. La maquinaria contráctil de la actomiosina

La contracción de la actomiosina (complejo formado por las proteínas actina y miosina) y el aumento de la tensión del citoesqueleto son los mecanismos centrales

para la inducción de la hiperpermeabilidad endotelial (Shen *et al*., 2009; Yuan y Rigor, 2010). Debido a que las uniones de las células endoteliales están conectadas a las adhesiones focales a través del citoesqueleto de actina, los cambios en la tensión del citoesqueleto afectan directamente a la estructura y a la función de barrera. En las células endoteliales, como en las células musculares, la miosina se une a la actina del citoesqueleto, y la tensión del citoesqueleto se incrementa por la actividad contráctil actina-miosina. La contractilidad de la actomiosina es potenciada por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina 2 (*miosin light chain 2*, MLC-2) por acción de la MLC cinasa (*miosin light chain kinase*, MLCK) cuya isoforma endotelial es dependiente de Ca^{2+}/CaM (Vanderbroucke *et al*., 2008). La fosforilación de la MLC-2 provoca un cambio dependiente de adenosín trifosfato (ATP) en la estructura terciaria de plegamiento de la proteína miosina y un cambio en la posición relativa a la actina. Este desplazamiento produce la fuerza contráctil actomiosina, aumentando la tensión en el citoesqueleto de actina (Shen *et al*., 2009). Debido a que este citoesqueleto está conectado a las proteínas de unión celular y a las adhesiones focales, la conexión de adhesión focal actúa como un punto de apoyo, permitiendo que la tensión del citoesqueleto "desarme" físicamente las uniones célula-célula y aumente la permeabilidad paracelular del endotelio. Por el contrario, la MLC fosfatasa (*miosin light chain phophatase*, MLCP) desfosforila la MLC, lo cual disminuye la contractilidad de la actomiosina, relaja el citoesqueleto de actina y disminuye la permeabilidad endotelial. Por lo tanto, un control óptimo del estado contráctil se basa en el equilibrio entre MLCK y la actividad MLCP.

Por otra parte, la Rho A, un miembro de la familia Rho GTPasas pequeñas, mediante su efector a la baja, la Rho cinasa (ROCK) inhibe la actividad de la MLCP y por lo tanto potencia la fosforilación de la MLC. También hay pruebas de que la ROCK fosforila directamente la MLC *in vitro* y de que aumenta la permeabilidad endotelial mediante la inducción de la fosforilación de VE-cadherina, aunque la importancia relativa de estos eventos permanece sin aclarar (Shen *et al*., 2009; Vanderbroucke *et al*., 2008).

2 El AMPc y sus rutas de señalización

El AMPc fue el primer segundo mensajero en ser identificado (Beavo y Brunton, 2002). Su descubrimiento por Rall y Sutherland en 1957 marcó el inicio de la teoría de los segundos mensajeros y las señales de transducción (Cheng *et al.*, 2008). El AMPc regula numerosos procesos biológicos y funciones celulares como el metabolismo, la transcripción de genes, la secreción, la homeostasis del Ca^{2+}, etc., así como diversas funciones específicas dependiendo del tipo celular (Schmidt *et al.*, 2013).

Además de regular numerosos procesos celulares directamente, el AMPc está también implicado en una serie de interacciones (*crosstalk*) entre rutas de señalización intracelular (Cheng *et al.*, 2008).

La generación de AMPc se inicia cuando un primer mensajero extracelular (neurotransmisores, hormonas, quimicionas, mediadores lipídicos o fármacos) se une a un GPCR. Las proteínas G que regulan la concentración intracelular de AMPc pueden ser de dos subtipos: proteína Gs (estimuladora) o Gi (inhibidora). La unión de ligando a un receptor acoplado a una proteína Gs da lugar al intercambio de guanosina 5´-difosfato (GDP) por guanosina 5'-trifosfato (GTP) en la subunidad Gαs de la proteína G, con la consecuente disociación del complejo βγ (Serezani *et al,* 2008). La subunidad Gαs libre estimula la enzima adenilil ciclasa (AC), que cataliza la ciclación del adenosín trifosfato (ATP) para generar AMPc y pirofosfato, siendo necesaria la presencia de iones Mg^{2+}. Por otra parte, la unión del ligando a un receptor acoplado a una proteína Gi inhibe la actividad de la AC y, por tanto, disminuye la producción de AMPc. En cuanto a la subunidad G*βγ*, ésta ejerce efectos específicos dependiendo de la isoforma de AC (Willoughby y Cooper; 2007).

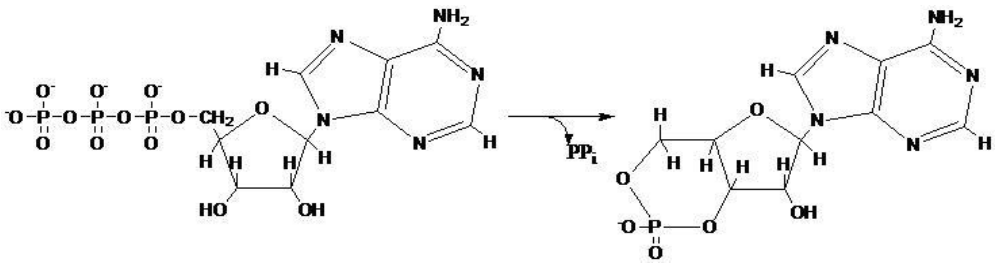

Figura 5. Conversión del ATP a AMPc catalizada por el enzima AC.

La generación de AMPc conlleva la posterior activación de efectores tales como la PKA, la Epac y canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos. Por último, las PDEs hidrolizan el AMPc y ponen fin a sus acciones (Murray, 2012).

Actualmente se acepta que la señalización de AMPc no es simplemente una cascada lineal, sino que se basa en una compleja red con múltiples vías de señalización reguladas de forma temporal y espacial. Este control espacio-temporal o compartimentalización de la señalización del AMPc viene determinado por cada uno de los componentes enzimáticos implicados en la generación y la acción del AMPc, ya que se presentan en diferentes isoformas o variantes y cada una de ellas posee mecanismos reguladores exclusivos. Además, estos componentes se encuentran confinados a localizaciones subcelulares definidas (Murray, 2012; Zaccolo *et al*., 2006). Esta regulación espacio-temporal explica por qué los distintos mecanismos de transducción de señales desencadenados por el AMPc (Baillie, 2009; Morgado *et al.,* 2012) pueden desencadenar eventos diferentes dependiendo de la zona en la que éstos tengan lugar (Cooper, 2005; Houslay *et al.,* 2007).

A continuación, se describen en detalle algunos de los componentes implicados en la señalización del AMPc.

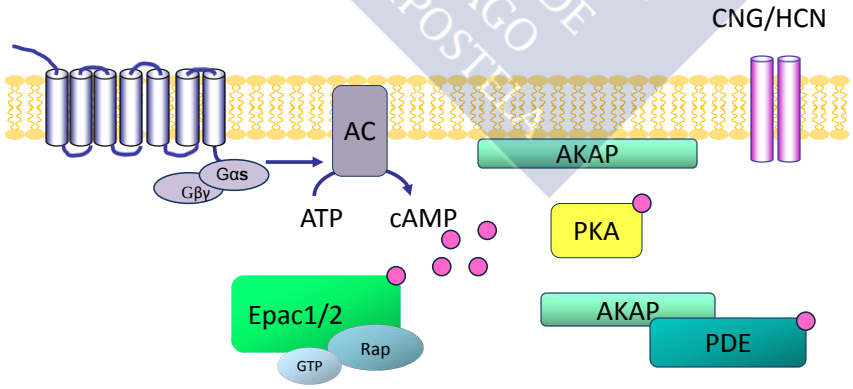

Figura 6. Representación esquemática de la vía de señalización del AMPc.

2.1 Regulación de los niveles de AMPc

2.1.1 Adenilil ciclasas (AC)

Se conocen 10 isoformas de AC en mamíferos. Las AC 1-9 son enzimas asociadas a la membrana plasmática que sintetizan AMPc en respuesta a estímulos extracelulares y su actividad es regulada por la unión de las proteínas Gs o Gi, como hemos descrito anteriormente (Cooper, 2005). Por su parte, la AC10 está localizada en el citosol y es denominada "soluble". La AC10 es insensible a las proteínas G y está regulada por el Ca^{2+}, el bicarbonato y el ATP, actuando como un sensor metabólico. (Zaccolo, 2011; Pavan *et al*., 2009).

La estructura general de las AC se puede dividir en cinco dominios principales: el NH_2 terminal, el primer dominio transmembrana (TM1), el primer lazo citoplasmático (C1a y C1b), el segundo dominio transmembrana (TM2) con dominios extracelulares de N-glicosilación y el segundo lazo citoplasmático que contiene los dominios C2a y C2b. C1a y C2a son regiones de unión al ATP altamente conservadas que dimerizan para formar la región catalítica. Los dominios C1b y C2b están menos conservados (Willoughby y Cooper, 2007) (figura 7).

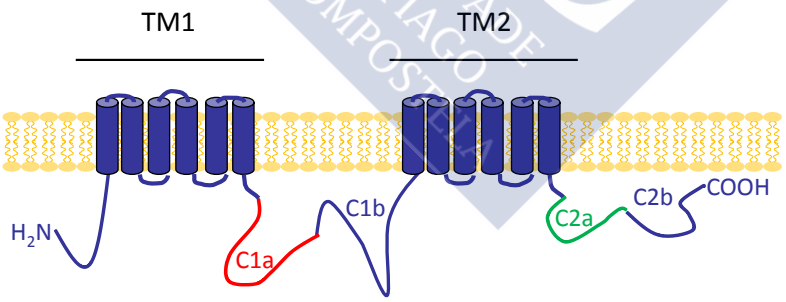

Figura 7. Estructura general de las AC. (Modificado de Willoughby y Cooper, 2007).

Las diferentes isoformas de AC se caracterizan por presentar distintas propiedades bioquímicas y distribución tisular. Las células musculares lisas vasculares, expresan diferentes isoformas entre las que destacan los subtipos 3, 5 y 6 (Ostrom *et al.,* 2002; Nelson *et al.,* 2011) mientras que en las células endoteliales vasculares se expresa de forma mayoritaria la AC6 (Bundey y Insel, 2003). También se diferencian en

su respuesta frente a diferentes señales, tales como la subunidad Gαs, la Gαi o el complejo βγ de las proteínas G, frente a proteínas cinasas como la PKA, la PKC o la CaMKII o frente al Ca^{2+} (tabla 2).

I. Regulación de las AC por las subunidades de la proteína G

Todas las isoformas de AC identificadas son estimuladas por la subunidad Gαs. Sin embargo, en ensayos realizados en líneas celulares, se han encontrado diferencias en la sensibilidad a la estimulación por Gαs. Esto podría estar causado por las diferencias en la expresión selectiva de un GPCR específico y de las AC en un dominio subcelular concreto, o bien por limitaciones en las cantidades de AC relativas a la cantidad de proteínas G.

En cuanto a la regulación por Gαi, las isoformas AC1, AC3, AC5, AC6, AC8 y AC9 son inhibidas por esta proteína, mientras que las isoformas AC2, AC4 y AC7 no lo son. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los tejidos donde estas últimas isoformas se expresan de manera mayoritaria (pulmón e hígado) los receptores acoplados a Gαi están ausentes (Wettschureck y Offermanns, 2005).

El complejo βγ de las proteínas G ejerce efectos específicos, dependiendo de la isoforma de AC: la AC1 y la AC8 son inhibidas, mientras que la AC2, AC4, y AC7 son estimuladas. La AC3, AC5, AC6 y AC9 son insensibles a la regulación directa por Gβγ (Willoughby y Cooper, 2007).

II. Regulación de las AC por otras proteínas

Hasta el momento, se ha podido demostrar que la PKA inhibe la actividad de las AC5 y AC6 mediante su fosforilación. Se ha observado que la optimización de la reducción de la actividad se debe a la localización de la PKA en un complejo de señalización donde también se encuentran las proteínas de anclaje a la cinasa A (AKAPs, *A-kinase anchoring-proteins*) y la AC5/6.

Asimismo, todas las isoformas de AC son potencialmente susceptibles de ser reguladas por la PKC, como consecuencia de la activación de la ruta de la PLC. Por una

parte, mediante el incremento de Ca^{2+} por la generación de IP_3, se regularían las AC sensibles al Ca^{2+} y mediante la producción de DAG, la PKC activa las AC insensibles al Ca^{2+}. También se ha observado que las AC responden de forma selectiva a isoformas específicas de PKC (Willoughby y Cooper, 2007).

Existen, además, numerosos artículos que evidencian una modulación de las AC por parte del receptor tirosina cinasa (RTK), aunque el efecto que se describe es bastante modesto. Esto se debe a que la repuesta al RTK se produce en un marco temporal muy estrecho y en un dominio celular en particular, dónde un cambio local en los niveles de AMPc sí es de importancia. Se ha observado además que el regulador intracelular de la señalización de las proteínas G (RGS, *regulator of G protein signaling*) controla numerosos GPCR y sus moléculas efectoras, incluyendo las AC. Sin embargo, el papel de estas proteínas en la señalización de las AC aún está por determinar (Willoughby y Cooper, 2007).

III. Regulación de las AC por el Ca^{2+}

Las isoformas AC1 y AC8 son estimuladas por el Ca^{2+} de manera dependiente de CaM. Para la AC1 se desconoce tanto su mecanismo de activación como el sitio específico de la unión para la CaM, aunque se sabe que este último está localizado próximo al dominio catalítico. Por su parte, la AC8 presenta dos sitios de unión a la CaM, el N-terminal y el C-terminal y se ha propuesto un mecanismo de activación. En condiciones basales de Ca^{2+}, la AC8 se encuentra en un estado de autoinhibición. El centro catalítico de la enzima se encuentra estéricamente impedido por el dominio regulador que contiene una secuencia pseudo-sustrato y un dominio de unión a CaM (CaMBD). Al unirse la CaM se produce un cambio conformacional, con lo que el centro catalítico queda expuesto al sustrato. Tras la entrada de Ca^{2+}, éste se une a la CaM, que completa su unión al COOH-terminal, desapareciendo así el estado de autoinhibición (Willoughby y Cooper, 2007).

En cuanto a la AC3 existe controversia, ya que existen estudios que demuestran que puede ser activada via Ca^{2+}/CaM, aunque también se ha propuesto que puede ser inhibida directamente por el Ca^{2+} o mediante la CaMKII.

En lo referente a la AC9 también existen discrepancias, pues se ha sugerido que la regulación de esta isoforma via Ca^{2+}/calcineurina podría estimular, inhibir o incluso no ejercer ningún efecto sobre su actividad.

Todas las AC son susceptibles de ser inhibidas por concentraciones supramicromolares de Ca^{2+}. Esta inhibición se debe a que el Ca^{2+} compite por el sitio de unión a metal de baja afinidad "sitio A" con el Mg^{2+} en el dominio catalítico. Sin embargo, solamente la AC5 y la AC6 son inhibidas, por cambios fisiológicos en el Ca^{2+}, es decir, por concentraciones submicromolares (Willoughby y Cooper, 2007).

		Respuesta a otras moléculas de señalización					
Isoforma	**Expresión**	**$G_s\alpha$**	**$G_i\alpha$**	**$G_{\beta\gamma}$**	**Proteínas cinasas**	**RGS**	**Ca^{2+}**
AC1	Cerebro, retina	↑	↓	↓	↓ CaMK IV ↑ RTK		↑ (Vía CaM)
AC2	Pulmón, cerebro	↑	→	↑	↑ PKC		→
AC3	Epitelio olfatorio, páncreas, cerebro	↑	↓	→	↓ CaMK II	↓	↑ (?) (CaM *in vitro*)
AC4	Riñón, cerebro hígado	↑	→	↑	↑ PKC		→
AC5	Corazón, cuerpo estriado	↑	↓	→	↑ PKC (ζ>α) ↓ PKA ↑ RTK	↓	↓
AC6	Corazón, riñón, cerebro, hígado, testículos	↑	↓	→	↓ o ↑ PKC ↓ PKA ↑ RTK	↓	↓
AC7	Pulmón, riñón, corazón	↑	→	→	↑ PKC (δ)		→
AC8	Cerebro, páncreas	↑	↓	↓	→ PKC		↑ (vía CaM)
AC9	Testículos, cerebro, músculo esquelético, pulmón, riñón	↑	↓	→	↓ PKC		↓ (vía calcineurina)

Tabla 2. Clasificación de las AC y su regulación. Estimulación, inhibición o sin efecto se representan por ↑, ↓ o → respectivamente (Modificado de Willoughby y Cooper, 2007 y Pavan *et al.*, 2009).

Entre los fármacos activadores de AC, el más conocido es la forskolina (Pavan *et al*., 2009). La forskolina es un labdano diterpeno aislado de las raíces de *Plectranthus barbatus (Coleus forskohlii)* ampliamente utilizado en investigación en estudios *in vivo*

e *in vitro* para determinar el papel del AMPc en numerosos procesos celulares en diferentes órganos. También ha sido empleado para determinar el papel de AMPc en la patogénesis de diferentes enfermedades, incluyendo diversos trastornos autoinmunes o inflamatorios. En consecuencia, ha sido considerada como posible agente terapéutico en el tratamiento de la fibrosis pulmonar, la insuficiencia cardíaca, el glaucoma, etc. (Alasbahi y Melzig; 2012).

La forskolina es un activador hidrofóbico de todas las AC unidas a membrana en mamíferos, exceptuando la AC9 (Pavan *et al*.; 2009). También se ha descrito que interacciona directamente con canales iónicos y transportadores de glucosa (Insel y Ostrom, 2003).

La forskolina interacciona con la AC en el sitio hidrofóbico creado por las subunidades catalíticas C1 y C2. En concreto la forskolina, se une al extremo opuesto a aquel donde el ATP se une en el centro catalítico e hibrida los dos dominios citoplasmáticos mediante una combinación de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno, mejorando de este modo su actividad enzimática (ver figura 8). Los enlaces de hidrógeno se forman entre los aminoácidos altamente conservados de las AC y el grupo C1-OH, el grupo C7-acetilo o el grupo C11-OH de los diterpenos.

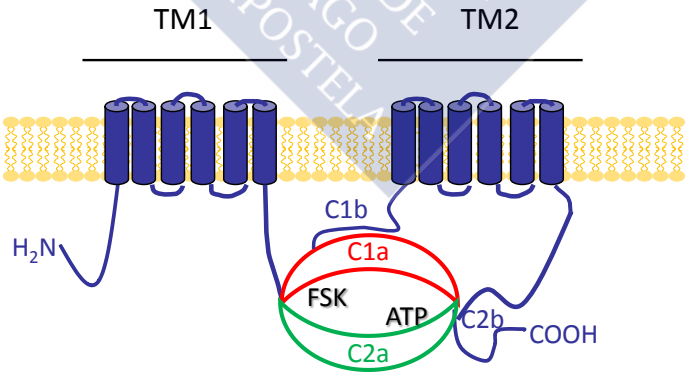

Figura 8. Mecanismo de activación de las AC por la forskolina (FSK). (Modificado de Pavan *et al*., 2009).

2.1.2 Fosfodiesterasas (PDE)

Las PDE son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace 3'-5'-fosfodiéster de los nucleótidos cíclicos, enlaces que se establecen en los ácidos

nucleicos entre la pentosa de un nucleótido y el grupo fosfato de otro. Estas enzimas tienen como misión finalizar la señalización mediada por los nucleótidos cíclicos y su actividad se modula finamente en coordinación con las AC y GC a través de efectores y rutas de retroalimentación para mantener los niveles óptimos de nucleótidos cíclicos (Keravis y Lugnier, 2012).

Existen 11 familias de PDE en mamíferos, derivadas de 21 genes. La diversidad de las PDE se ve incrementada por el procesamiento de ARN alternativo y por múltiples promotores que dan lugar a la formación de numerosas isoformas de PDE. Las PDE se clasifican en función de su secuencia aminoacídica, pues aunque comparten un dominio catalítico altamente conservado, la secuencia aminoacídica fuera de esta región es diferente. También se clasifican en función de sus propiedades reguladoras y de sus características catalíticas (Bender y Beavo, 2006; Tilley y Maurice, 2002).

El dominio catalítico de las PDE (dominio C) se encuentra en el extremo COOH terminal de aproximadamente 250 aminoácidos y alberga el sitio de unión a los nucleótidos cíclicos donde, además, la PDE4 posee características reguladoras. Poseen además un dominio regulador (dominio R), menos conservado, normalmente localizado en el extremo NH2 terminal. La parte NH2 terminal puede sufrir además procesos de fosforilación/desfosforalización (PDE 1, 3, 4, 5) (Francis *et al.,* 2011).

Además, existen numerosos dominios proteicos que proporcionan o tienen el potencial para proporcionar un control regulador, que se encuentran anexos al dominio C. Entre ellos se encuentran los dominios de unión a CaM (PDE1), los dominios GAF (PDE 2, 5, 6, 10, 11), los dominios PAS (Per-ARNT-Sim) (PDE8), los dominios UCR (*upstream conserved regulator)* (PDE4) y los dominios autoinhibitorios. Los dominios GAF participan en: 1) interacciones proteína-proteína; 2) interacciones proteína-PDE y 3) unión de nucleótidos cíclicos (Francis *et al.,* 2011).

Familia	Nucleótido cíclico	Distribución
PDE1	AMPc, GMPc	Corazón, cerebro, pulmón, músculo liso
PDE2	AMPc, GMPc	Glándula adrenal, corazón, pulmón, hígado, plaquetas, células endoteliales
PDE3	AMPc, GMPc	Corazón, músculo liso, pulmón, hígado, plaquetas, adipocitos, inmunocitos
PDE4	AMPc	Cerebro, células de Sertolli, riñón, hígado, corazón, músculo liso, pulmón, células endoteliales, inmunocitos
PDE5	GMPc	Pulmón, plaquetas, músculo liso, corazón, células endoteliales, cerebro
PDE6	GMPc	Fotoreceptores, glándula pineal, pulmón
PDE7	AMPc	Músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro páncreas, linfocitos T
PDE8	AMPc	Testículos, ojo, hígado, músculo esquelético, corazón, riñón, ovario, cerebro, linfocitos T, tiroides
PDE9	GMPc	Riñón, hígado, pulmón, cerebro
PDE10	AMPc, GMPc	Testículos, cerebro tiroides
PDE11	AMPc, GMPc	Músculo esquelético, próstata, glándula pituitaria, hígado corazón

Tabla 3. Clasificación de la familia de fosfodiesterasas. (Modificado de Keravis y Lugnier, 2012).

Las PDE también se clasifican en función de nucleótico cíclico que degradan (tabla 3). Algunas PDE degradan AMPc y GMPc (PDE 1, 2, 3, 10 y 11). Sin embargo, otras degradan específicamente AMPc (PDE 4, 7 y 8) o GMPC (PDE 5, 6 y 9) (Stangherlin y Zaccolo, 2012). Para explicar la especificidad de las PDE por uno u otro nucleótico cíclico, Zhang *et al.* (2004a) propusieron el mecanismo denominado conmutación de la glutamina (*glutamine switch).* Según esta teoría, en las PDE de las que se conoce su estructura parece que existe un residuo invariante de glutamina que establece la unión del anillo de purina al lugar activo (*binding pocket*). El residuo de glutamina invariante en el sitio activo de la enzima puede adoptar alternativamente

dos orientaciones diferentes: en una orientación la red de enlaces de hidrógeno admite el enlace de guanina, que conduce a la selectividad por GMPc y en la otra orientación de la red admite enlace con la adenina, lo que resulta en la selectividad hacia AMPc. En las PDE que pueden hidrolizar tanto GMPc como AMPc, las glutaminas pueden rotar libremente, y por ello conmutan entre ambas orientaciones.

Las PDE 1, 2, 4 se expresan en la mayoría de los tejidos, mientras que el resto se encuentran más restringidas a tejidos específicos. En la mayoría de las células, la PDE3 y la PDE 4 son las principales implicadas en la hidrólisis del AMPc. Además, las familias de PDE no se diferencian sólo en su distribución en los distintos tejidos, sino también en localizaciones intracelulares.

En el sistema vascular se expresan 8 familias de PDE (PDE1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9). La expresión de las diferentes variantes y su relativa abundancia varía entre especies (Stangherlin y Zaccolo, 2011). Según un trabajo llevado a cabo por el grupo del Dr. Maurice (Rose *et al*., 1997) los subtipos 3 y 4 representan el 70% del total de la actividad de PDE en la aorta de rata. En las células endoteliales se expresan la PDE2, la PDE4 y la PDE5 (Lugnier, 2006; Campos-Toimil *et al*., 2008).

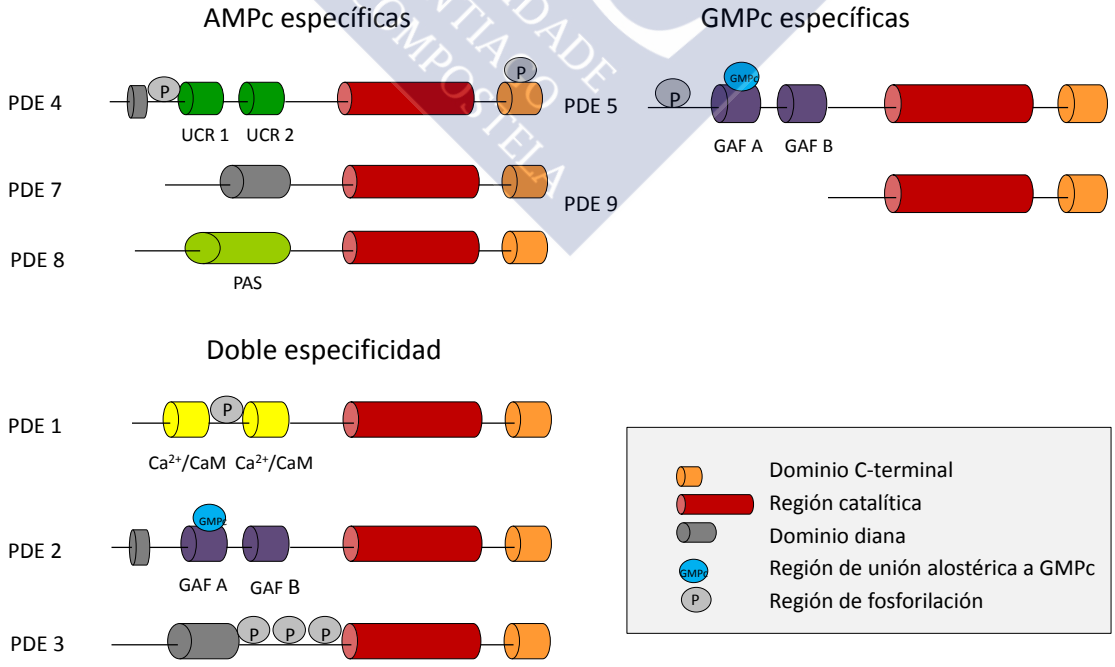

Figura 9. Representación esquemática de la estructura de las PDE que se expresan en el sistema vascular. (Modificado de Stangherlin y Zaccolo, 2011).

2.2 Efectores de AMPc

2.2.1 Proteína cinasa A (PKA)

La PKA es el efector de AMPc más conocido y hasta el descubrimiento de las Epac se consideraba que los principales efectos del AMPc en células de mamíferos eran mediados por su activación.

La PKA fue una de las primeras proteínas cinasas en ser descubierta y es una de las mejor caracterizadas. A diferencia de la mayoría de las proteínas cinasas de eucariotas, está formada por dos subunidades separadas: la subunidad reguladora (R) y la catalítica (C). La unidad C es fosforilada por la proteína cinasa dependiente de fosfoinositol en la región treonina 197, siendo esta fosforilación necesaria para la maduración y óptima actividad biológica de la PKA.

La subunidad C es regulada mediante la interacción con la subunidad inhibitoria R, la cual secuestra a la subunidad C en una holoenzima heterotetramérica inactiva R_2C_2 (Cheng *et al.*, 2008). Cuando aumentan los niveles de AMPc, éste se une a las subunidades R en dos regiones denominadas A y B. En un principio, cuando se encuentra en estado inactivo, sólo está expuesto el sitio B y, al unirse el AMPc, se produce un cambio estérico intramolecular aumentando la unión del AMPc al sitio A. Al unirse 4 moléculas de AMPc, dos a cada subunidad R, la PKA se disocia en una subunidad dimérica R unida a cuatro moléculas de AMPc por un lado y dos monómeros C por otro (ver figura 9). A continuación, la subunidad C libre puede afectar a diversos eventos celulares mediante la fosforilación de sustratos proteicos nucleares y citoplasmáticos, incluyendo enzimas y factores de transcripción (Kopperud *et al.*, 2002).

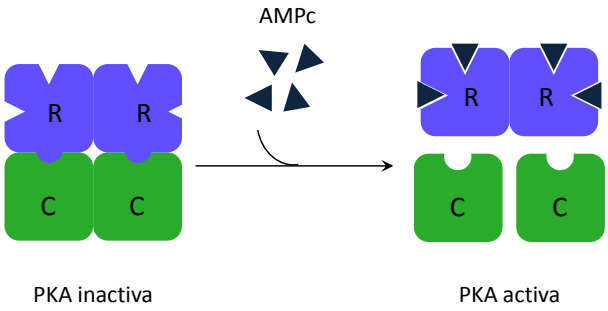

Figura 10. Representación de la activación de la PKA tras la unión de cuatro moléculas de AMPc.

Existen dos tipos de PKA, PKA I y PKA II, que se diferencian en las subunidades R (RI y RII). Para la subunidad R, se han identificado cuatro genes (RIα, RIIα, RIβ, RIIβ). Ambas subunidades (RI y RII) contienen en el terminal carboxilo dos dominios de unión a AMPc altamente conservados (CBD, *cAMP binding domain*). Difieren en el N-terminal, especialmente en la región bisagra que se une al sitio de reconocimiento del péptido de la subunidad C. La región bisagra de la subunidad RII contiene una serina que puede ser autofosforilada por la subunidad C, mientras que la subunidad RI contiene un lugar de pseudo-fosforilación (Cheng *et al.*, 2008).

Existen tres genes que codifican para la subunidad C (Cα, Cβ y Cγ). Cα y Cβ presentan una alta homología entre sus secuencias y se expresan ampliamente, mientras que Cγ presenta menor homología con las otras subunidades y se encuentra principalmente en los testículos (Kim *et al.*, 2007).

Las subunidades R se expresan en diferentes tejidos y su distribución subcelular también parece ser distinta. Además, son capaces de formar homo y heterodímeros, con lo que existen un amplio número de combinaciones que contribuyen a la gran diversidad y a la especificidad en la señalización del AMPc (Taskén y Aandahl, 2004).

La diferencia en la localización subcelular de la PKA se debe a la unión de las subunidades R por las AKAPs. Estas proteínas van a aumentar la eficiencia y la especificidad de los procesos de señalización. Han sido identificadas un gran número de proteínas AKAPs, la mayoría de las cuales se unen a la PKA II. Sin embargo, se han encontrado AKAPs específicas para las dos isoformas. Las AKAPS se unen a las subunidades R en los primeros 50 residuos de aminoácidos del N-terminal. La gran

diversidad en las secuencias en esta región entre RI y RII podría explicar la diferencia en la afinidad de unión a las AKAPs. Aunque en condiciones fisiológicas la cantidad de unidades C y unidades R es similar, la cantidad relativa de las isoformas RI y RII depende ampliamente de las condiciones fisiológicas y del estado hormonal del tejido (Cheng *et al.*, 2008).

La PKA I es bioquímicamente soluble y se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que la PKA II se encuentra confinada a compartimentos y estructuras subcelulares anclada por AKAPs específicas para diferentes tejidos y células (Michel y Scott, 2002).

La activación de la PKA por el AMPc regula un amplio número de procesos celulares, tales como el metabolismo, la regulación de genes, el crecimiento y la división celular, la diferenciación celular, la motilidad del esperma y la conductividad de diversos canales iónicos (Skalhegg y Taskén, 1997). En el sistema vascular, la PKA media la relajación del músculo liso vascular (Ferro *et al.*, 2004) y en el endotelio participa en la regulación de la función de la barrera y en la angiogénesis (Lorenowicz *et al.*, 2008).

2.2.2 Proteínas Epac

En 1998 se descubrió la existencia de una nueva clase de proteínas implicadas en la transducción de la señal mediada por el AMPc. Estas proteínas, denominadas Epac o también cAMP-GEF (*cAMP-specific guanine nucleotide exchange factors*) fueron identificadas cuando se trataba de desentrañar el mecanismo por el que las proteínas Rap eran activadas por el AMPc de forma independiente de la PKA (Cheng *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2013; Roberts y Dart, 2014).

Las proteínas Epac actúan como factores de intercambio del nucleótido guanina (GEFs) para las proteínas asociadas a receptor (Rap, *receptor-associated protein*) de tipo 1 y 2. Las Rap 1 y 2 pertenecen a la familia Ras de proteínas G, las cuales se encuentran en estado inactivo cuando están unidas a GDP y en estado activo cuando lo están a GTP. Las Epac, al igual que otras GEFs, catalizan el intercambio de GDP por GTP y, por lo tanto, activan a las Rap (Gloerich y Bos, 2010).

Se han identificado dos isoformas de Epac, denominadas Epac-1 (cAMP-GEF I) y Epac-2 (cAMP-GEF II). Se encuentran codificadas por 2 genes diferentes: *RAPGEF3*, que genera la Epac1 y *RAPGEF4*, que genera las variantes Epac-2A (larga) y Epac-2B (corta) (Breckler *et al*., 2011). Se ha identificado, además, otra proteína homóloga a Epac denominada Repac, pero que no posee el dominio de unión al AMPc (Gloerich y Bos, 2010).

La Epac-1 y la Epac-2 están presentes en la mayoría de los tejidos, aunque su nivel de expresión es diferente. La Epac-1 se expresa abundantemente en vasos sanguíneos, riñón, tejido adiposo, sistema nervioso central, ovarios y útero, mientras que la Epac-2 se encuentra distribuida de forma más restringida, siendo más abundante en el sistema nervioso central, glándula adrenal y páncreas (Gloerich y Bos, 2010). Su nivel de expresión también depende de las distintas etapas de desarrollo y de las alteraciones microambientales patofisiológicas producidas por distintas enfermedades (Schmidt *et al.*, 2013).

Estructuralmente, las Epac son proteínas multidominio que contienen una región catalítica C-terminal y una región reguladora N-terminal. La región reguladora actúa como una región autoinhibitoria y contiene dos dominios: un dominio denominado "*dishevelled-Egl-10-Pleckstrin*" (DEP), responsable de la asociación de la Epac a la membrana y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNB, *cyclic nucleotide-binding*) de alta afinidad por el AMPc (CNB-B). La Epac-2A posee además un dominio de unión a nucleótidos cíclicos, con baja afinidad por el AMPc (CNB-A) y del cual se desconoce su función (de Rooij *et al.*, 2000; Rehmann *et al.*, 2008). La región catalítica está formada por un dominio homólogo CDC25 (CDC25-HD), responsable de la actividad de intercambio de nucleótido y por una unidad de intercambio de Ras (REM, *Ras-exchanger motif*) responsable del intercambio de GDP-GTP (Cheng *et al*., 2008) Entre estos dos dominios se encuentra el dominio de asociación a Ras (RA, *Ras-associating*), que permite la interacción de las proteínas Epac-2A con las Ras unida a GTP, controlando así la activación espacio-temporal de la Rap por el AMPc (Schmidt *et al.*, 2013).

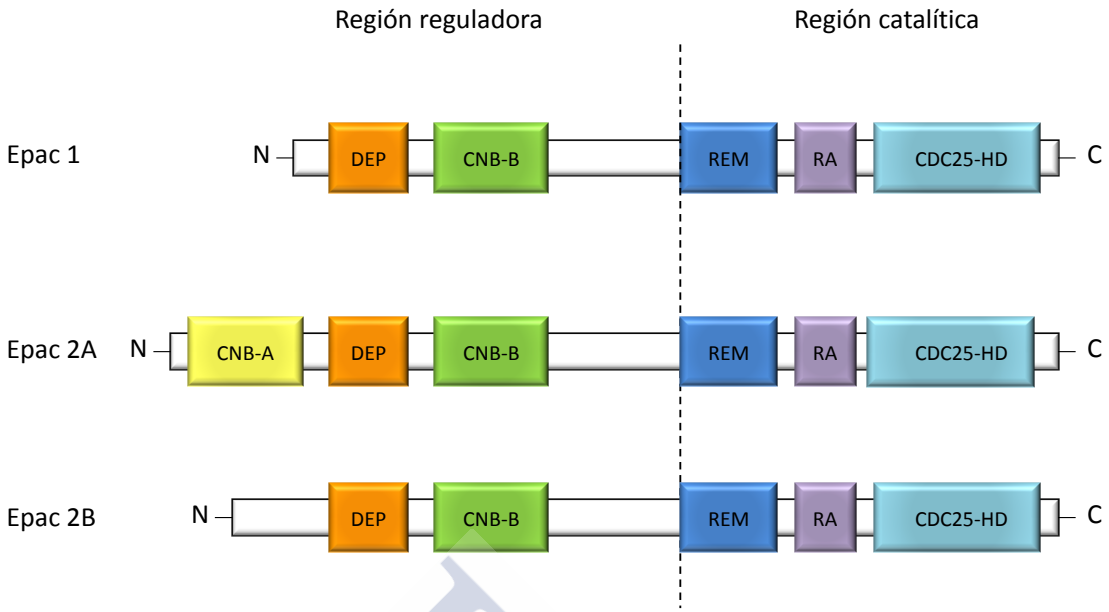

Figura 11. Representación esquemática de la estructura de las proteínas Epac. (Modificado de Métrich *et al*, 2010).

Cuando las proteínas Epac se encuentran en las conformaciones inactivas, los dominios CNB dificultan estéricamente la unión de la proteína Rap al dominio CDC25-HD a la región catalítica. Tras la unión de AMPc, se produce un pequeño cambio conformacional en el dominio CNB-B, que permite a la región reguladora alejarse de de la región catalítica, desapareciendo el efecto auto-inhibitorio que ésta ejercía (Rehmann *et al.*, 2006).

Esta conformación se estabiliza por interacciones entre AMPc, el dominio CNB-B y el dominio REM. No se encontraron diferencias significativas entre las conformaciones activas e inactivas del dominio CDC25-HD, lo que apoya la idea de que el AMPc regula la actividad de Epac mediante la supresión de una autoinhibición, en lugar de hacerlo mediante la inducción de un cambio alostérico en el sitio de unión a Rap (Gloerich y Bos, 2010).

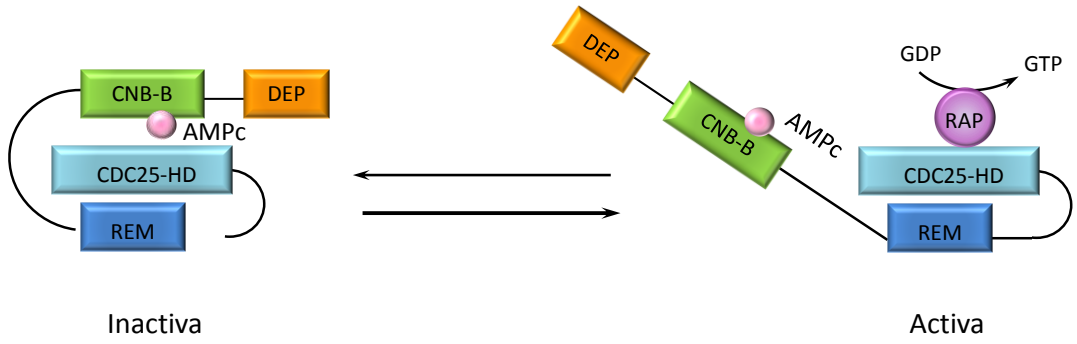

Figura 12. Representación esquemática de la activación de las proteínas Epac. (Modificado de Schmidt *et al.*, 2007).

Las proteínas Epac participan en múltiples funciones celulares mediadas por AMPc, tales como la adhesión celular, las uniones célula-célula, la secreción/exocitosis, la diferenciación celular y la proliferación, la apoptosis, la expresión de genes, la hipertrofia cardíaca y la fagocitosis (Cheng *et al.*, 2008). En diversos procesos, la Epac puede actuar sola o en combinación con la PKA, ejerciendo efectos sinérgicos o antagónicos, lo cual pone de manifiesto una interconectividad entre estas dos vías activadas por el AMPc. Las proteínas Epac son abundantes en la vasculatura, donde modulan la señalización de citocinas, incrementan la integridad de la barrera endotelial, participan en la remodelación vascular y en la regulación de la función de canales iónicos entre otras funciones. (Yokoyama *et al.,* 2008; Doebele *et al.,* 2009; Purves *et al.,* 2009; Parnell *et al.,* 2012; Roberts *et al*, 2013).

Las proteínas Epac se encuentran en diferentes localizaciones subcelulares: en las membranas plasmáticas, en el citosol, en el núcleo y membranas nucleares y en la mitocondria. Esta localización varía según el tipo celular y el ciclo celular (Breckler *et al.*, 2011) y es la que determina que las Epac activen diferentes efectores, lo que explica la diversidad de sus efectos biológicos en una misma célula. De hecho, existen numerosas evidencias de que la señalización de las Epac está regulada de forma espacial y temporal por distintos mecanismos de anclaje que controlan las funciones específicas de los GEF mediante su reclutamiento a diversas localizaciones subcelulares (Breckler *et al.*, 2011). Entre esos mecanismos de anclaje se encuentran las proteínas *ezrin–radixin–moesin* (ERM), que reclutan la Epac a la membrana plasmática, o las proteínas de unión Ran 2 (RanBP2), que la anclan al poro nuclear.

Numerosos estudios apoyan la participación de las proteínas AKAP en la regulación de la señalización de las proteínas Epac, pudiéndose encontrar complejos multiproteicos de AKAPs que incluyen proteínas Epac en distintos tipos celulares (Breckler *et al.*, 2011). De igual forma, también existen evidencias de que las PDE contribuyen a la señalización de las Epac de forma temporal y espacial (Gloerich y Bos, 2010).

2.2.3 Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos

2.2.3.1 Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG)

Los canales CNG son canales de cationes no selectivos que se abren por la unión de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. A pesar de que su actividad muestra una débil dependencia de voltaje, se considera que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje (Kaupp y Seifert; 2002).

Los canales CNG son proteínas tetraméricas, cuyas subunidades se disponen alrededor de un poro central. Cada subunidad tiene seis dominios transmembrana, un dominio N terminal y uno C-terminal, ambos intracelulares. En el dominio C-terminal se encuentra el sitio de unión al nucleótido cíclico (CNB) y el dominio C-de enlace (*C-linker*), que conecta el dominio CNB con el poro. La unión del ligando al CNB favorece la apertura del canal, probablemente debido a un cambio conformacional en el CNB, que es tranferido al poro a través del movimiento en el C-de enlace. Para la total apertura del canal se precisa la unión de cuatro ligandos. Todos los canales caracterizados hasta el momento responden en cierta medida a ambos nucleótidos. Los canales CNG no se insensibilizan por la continua presencia del ligando y su actividad parece ser modulada por proteínas de unión a Ca^{2+} (CaM) y mediante mecanismos de fosforilación/desfosforilación (Craven y Zagotta, 2006)

Estos canales se han encontrado en una gran variedad de tejidos y células y se ha establecido que su activación genera la señal eléctrica primaria en los fotorreceptores y en las neuronas sensoriales olfativas. (Craven y Zagotta, 2006). Sin embargo, en otros tipos celulares su función no es del todo conocida.

En las células endoteliales, la activación de los CNGA2 causa un flujo de Ca^{2+} en respuesta a la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+}. También se ha observado que participan en el flujo de Ca^{2+} en respuesta al AMPc agentes como la adenonisa y los agonistas β-adrenérgicos. Además, contribuyen a la entrada no capacitativa de Ca^{2+} inducida por ATP, por lo que podrían participar en el control del tono vascular (Kwan *et al*., 2009) (Shen *et al.*, 2008). Por último, se ha podido establecer su participación en la contracción del músculo liso vascular inducida por el TxA2 (Leung *et al.,* 2010).

2.2.3.2 Canales modulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN)

Al igual que los canales CNG, los HCN pertenecen a la superfamilia de canales activados por voltaje y son canales catiónicos cuya actividad es modulada por la unión de nucleótidos cíclicos. Presentan además una estructura similar. Sin embargo, a diferencia de los CNG, estos canales se activan por hiperpolarización de la membrana y son ligeramente selectivos para el K^+. Además, desempeñan un papel fisiológico muy diferente a los CNG, pues estos canales participan en la regulación de la frecuencia cardíaca y neuronal (Kaupp y Seifert, 2002; Craven y Zagotta, 2006).

2.3 Funciones del AMPc en el sistema vascular

2.3.1 Regulación del tono vascular por el AMPc

El aumento de los niveles citosólicos de AMPc provoca la relajación de muchos tipos de músculo liso, incluido el vascular, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales tiene lugar dicho efecto. Estos mecanismos varían entre los diferentes tipos de vasos sanguíneos, entre diferentes especies e incluso dependen del estímulo desencadenante de la vasoconstricción previa.

En general, la relajación de las arterias mediada por AMPc se debe a una disminución del Ca^{2+} citosólico en las células musculares lisas o bien a la alteración de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles. Estos efectos han sido tradicionalmente atribuidos a la activación de la PKA y a los posteriores eventos de fosforilación los cuales conducen a (Morgado *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2013):

-Incremento de la recaptación de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares o un descenso en el flujo neto de Ca^{2+} en las células musculares lisas (Mundina-Weilenmann *et al.,* 2000; Akata, 2007a*;* Cuiñas *et al.,* 2013).

-Activación de las corrientes de K^{+} que hiperpolariza la membrana de las células musculares lisas y reduce el flujo de Ca^{2+} por descenso de la actividad de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Nelson *et al.,* 1990; Nelson y Quayle, 1995).

-Descenso de la sensibilidad al Ca^{2+} de la fosforilación de la MLC dando lugar a una reducción de la formación de puentes cruzados actina-miosina y por tanto a la relajación. (Akata, 2007b).

-Alteración de la relación entre la fosforilación de la MLC y la interacción de los filamentos actina-miosina (Beall *et al.* 1999; Woodrum *et al.* 1999; Salinthone *et al.* 2008).

Los efectos vasorrelajantes inducidos por las proteínas Epac son menos conocidos que los mediados por PKA. Sin embargo, existen numerosas publicaciones recientes que sugieren un papel para la Epac en la regulación del tono vascular y del flujo sanguíneo (Sukhanova *et al.,* 2006; Roscioni *et al.,* 2011; Zieba *et al.,* 2011; Schmidt *et al.*, 2013). El efecto vasorrelajante de la Epac en las células musculares lisas

de distintos órganos y especies se ha atribuido a una disminución de la fosforilación de la MLC y a una disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de la fuerza de contracción mediante la regulación a la baja de la actividad de RhoA (Roscioni *et al.,* 2011; Zieba *et al.,* 2011, Schmidt *et al.*, 2013).

Recientemente, en un estudio realizado en arterias mesentéricas, también se ha propuesto que la activación de la Epac provoca un incremento en la liberación de Ca^{2+} de áreas del retículo endoplasmático próximo a la membrana plasmática. Este efecto activa a los canales BK_{Ca} que inducen hiperpolarización de la membrana, limitando la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca^{2+} dependientes de voltaje, dando lugar a la vasorrelajación (Roberts *et al*., 2013).

Además, la relajación vascular mediada por AMPc se debe también a los efectos ejercidos en las células endoteliales, aunque las rutas de señalización implicadas no se conocen totalmente. Por una parte, se ha demostrado que la activación de la PKA induce la vasorrelajación de forma dependiente de endotelio al estimular la producción de NO mediante fosforilación de la eNOS (Butt *et al*., 2000). La activación de la eNOS por la PKA se produce al incrementar su sensibilidad a la CaM y de manera independiente del Ca^{2+} (Ferro *et al*., 2004).

Por otra parte, en arterias con el endotelio intacto, se demostró que la Epac ejerce su efecto vasorrelajante mediante la apertura de canales SK_{Ca} e IK_{Ca}, debido a un aumento global de la $[Ca^{2+}]_c$ y causando hiperpolarización de las células endoteliales, lo que sugiere que sigue la ruta clásica del EDHF (ver apartado 1.1.1 de esta Revisión Bibliográfica). Además, la Epac también induce relajación por activación de la eNOS, que se podría producir por un aumento global de la $[Ca^{2+}]_c$ y de forma independiente a la ruta del EDHF. Sin embargo la activación de la eNOS por la Epac también podría producirse por un flujo adicional de de Ca^{2+} debido a la depleción de reservorios intracelulares o a la hiperpolarización. Según esta última hipótesis, la apertura de canales SK_{Ca} e IK_{Ca} y la subsiguiente hiperpolarización sería un requerimiento previo para la activación de la eNOS.

Por último, los canales CNG también podrían estar implicados en el efecto vasorrelajante inducido por el AMPc en las células endoteliales. Se ha demostrado que los incrementos de AMPc inducidos por adenosina y epinefrina en células endoteliales,

incrementan el flujo de Ca^{2+} por activación directa de los canales CNGA2 (Cheng *et al.,* 2008; Shen *et al.,* 2008, Kwan *et al.,* 2009). Este incremento de Ca^{2+} endotelial provoca la generación y liberación de factores de relajación derivados de endotelio como el NO y el EDHF. Se ha sugerido que este flujo de Ca^{2+} podría provocar la disociación de la eNOS de la caveolina, lo que provoca la activación de la enzima (Kwan *et al.,* 2009).

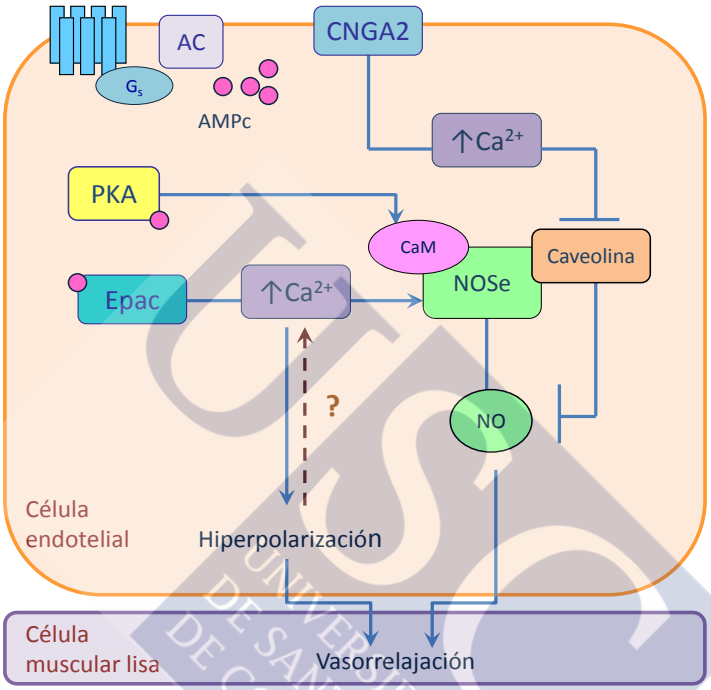

Figura 13. Mecanismos propuestos para explicar el efecto vasorrelajante dependiente de endotelio inducido por el AMPc.

2.4 Regulación de la función de la barrera endotelial por el AMPc y sus efectores

Como hemos comentado en el apartado 1.2, el endotelio vascular forma una barrera que controla el intercambio de solutos, macromoléculas y células entre la sangre y los tejidos circundantes. La alteración de la función de la barrera endotelial conduce a una excesiva permeabilidad vascular que puede dar lugar a situaciones patológicas importantes como edema o inflamación crónica. Por lo tanto, los mecanismos necesarios para el mantenimiento de las funciones de la barrera endotelial en condiciones de reposo, así como la vías de señalización que conducen a la ruptura de la barrera son de gran importancia biológica (Baumer *et al*., 2009).

EL AMPc participa en la regulación de la función de la barrera endotelial. El incremento de su concentración mediante agonistas β-adrenérgicos reduce la permeabilidad vascular. Además, los activadores de AC y los inhibidores de PDE, que inducen un incremento del AMPc, disminuyen la permeabilidad basal y contrarrestan el incremento de la permeabilidad provocada por mediadores inflamatorios *in vitro* e *in vivo*. Este efecto del AMPc es debido a la activación de la PKA y de la Epac. Ambas proteínas pueden actuar de forma independiente o en sinergia (Cullere *et al*., 2005).

La activación de la PKA atenúa la contracción de la actomiosina y la tensión endotelial mediante diversos procesos. Sin embargo, en la actualidad, no está claro si todos estos eventos se producen de forma simultánea o independientemente para atenuar la disrupción de la barrera endotelial inducida por distintos agentes (Sayner, 2011).

Por una parte, la activación de la PKA inhibe a la proteína RhoA, y por lo tanto ésta no puede activar a su efector a la baja, la ROCK (*rho-associated protein kinase)*. En consecuencia, se incrementa la actividad de la MLCP, que desfosforila la MLC y por lo tanto disminuye la contracción de la actomiosina (Quiao *et al.*, 2003; Goeckeler y Wysolmerski, 2005). Frente a trombina o histamina, el incremento de la actividad de la PKA también modula de forma directa la actividad de la MLCP. Además la PKA fosforila la MLCK provocando una disminución de su actividad (Sayner, 2011).

Asimismo, la PKA también protege la integridad de la barrera endotelial mediante la estabilización de los microtúbulos (Lorenowicz *et al*., 2008).

Por último, la PKA estabiliza la actina cortical mediante la fosforilación de proteínas de unión a actina como la filamina y la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP). Frente a agentes como la bradiquinina, que alteran la barrera endotelial al translocar la filamina al citosol, la activación de la PKA mantiene a la filamina en la periferia (Wang *et al*., 1996; Hastie *et al.*, 1997; Sayner, 2011). También se ha determinado que la PKA, mediante la fosforilación de VASP, participa en la protección de la barrera endotelial inducida por adenosina (Comerford *et al.,* 2002) y atenúa la hiperpermeabilidad inducida por LPS (Bogatcheva *et al.,* 2009). Los mecanismos por los que la PKA ejerce dicho efecto protector no están del todo claros,

pero se cree que la VASP está implicada en la activación de la proteína Rac (Sayner, 2011).

El empleo de activadores selectivos de la Epac ha permitido determinar su participación en el efecto protector de la barrera endotelial ejercido por el AMPc que no podía ser sólo explicado mediante la activación de la PKA. La activación de la vía Epac-Rap1 reduce la permeabilidad vascular mediante la acumulación de moléculas de unión, como la VE-cadherina, en los contactos célula-célula, un enriquecimiento de la actina cortical y una disminución de la actividad de la Rho (Metrich *et al.*, 2010; Sayner, 2011). Actualmente, se desconoce el mecanismo por el que la vía de la Epac-Rap 1 aumenta la acumulación de la VE-cadherina y mejora las propiedades adhesivas, aunque estudios recientes sugieren la participación de las α- y β- cateninas (Noda *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la activación de la ruta de la Epac-Rap1 reduce la hiperpermeabilidad inducida por PAF (Adamson *et al.*, 2008) y por la trombina (Baumer *et al.*, 2008; Cullere *et al.* 2005; Kooistra *et al.*, 2005). La ruta Epac-Rap 1 reduce la permeabilidad vascular basal mediante la activación de los GEFs Vav2 y Tiam 1, que activan a la Rac y a la Cdc42 (Birukova *et al.*, 2007). La Rac, a su vez, activa a distintos efectores, entre los que se incluyen la proteína de unión a actina cortical (*cortactin*) o la *p-21 activated kinase 1* (PAK1) y la p190-Rho-GAP que dan lugar a un incremento en la integridad de la barrera endotelial. Entre otros procesos, la PAK inhibe la activación de la Rho. Además también se demostrado en fibroblastos que la p190-Rho-GAP regula a la baja la Rho (Sayner, 2011). Por otra parte, en el efecto protector inducido por el péptido natriurético atrial ante la hiperpermeabilidad provocada por trombina, la Epac participa en colaboración con la PKA disminuyendo la fosforilación de la MLC (diana de la Rho/ROCK) y, por lo tanto, disminuye la formación de fibras de estrés de actina (Birukova *et al.*, 2008).

Además, la Epac regula la integridad de la red de microtúbulos, ya que es capaz de revertir la permeabilidad vascular provocada por α-TNF y el factor de necrosis tumoral β (β-TNF), citocinas que promueven la disfunción de la barrera endotelial desestabilizando dicha red (Metrich *et al*., 2010; Schmidt *et al.*, 2013).

Existen, además, otros mecanismos que confirman el papel de la Epac en la estabilización de la barrera endotelial. Se ha observado que la Epac interacciona con las proteínas ERM, promocionando la adhesión celular, un proceso que permite la comunicación entre las integrinas y los componentes de la matriz extracelular (Gloerich y Bos, 2010). Además, la Epac interactúa directamente con la PDE4D en los contactos célula-célula mantenidos por la VE-cadherina e interacciona con la AKAP9, lo que constituye un vínculo directo entre la VE-cadherina y las integrinas. Por último, se ha determinado que el efector de Epac, Rap1 estabiliza los contactos célula-célula mantenidos por β-catenina a través de la proteína Krit (Schmidt *et al.*, 2013).

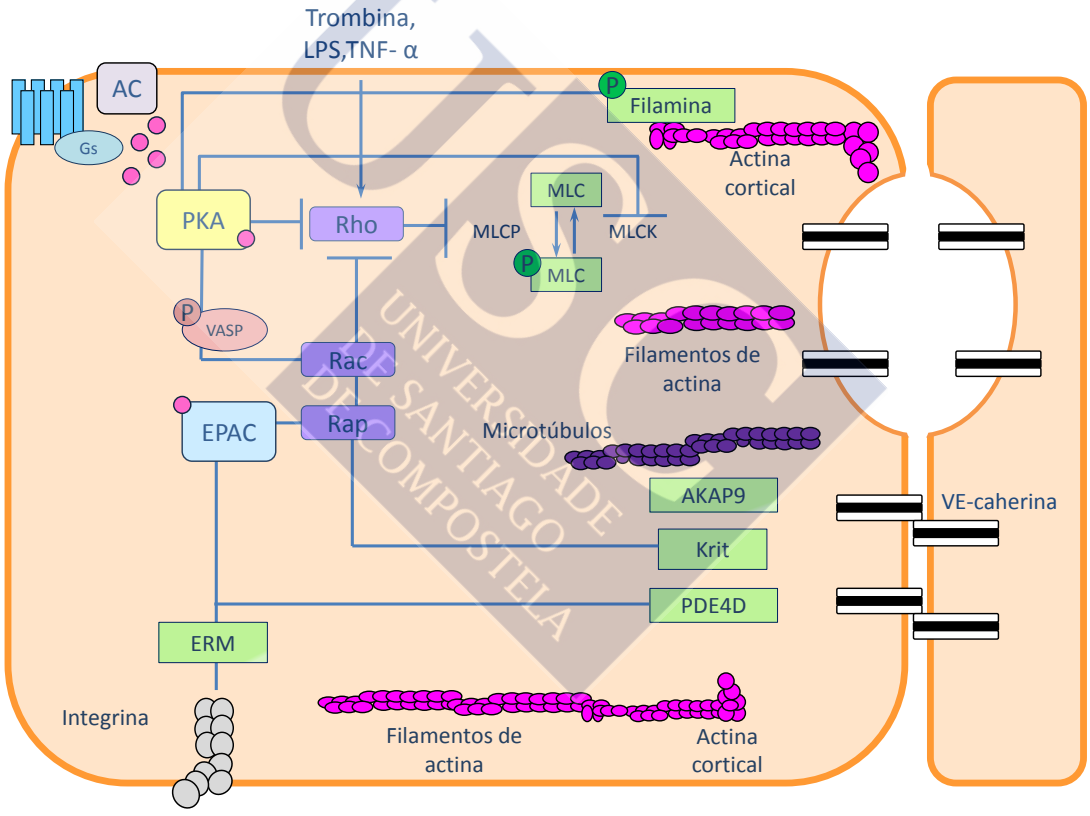

Figura 14. Representación esquemática del mantenimiento de la función de barrera endotelial mediada por AMPc ante agentes inductores de permeabilidad. (Modificado de *Schmidt et al.*, 2013.)

2.5 Otras funciones del AMPc

El AMPc también regula otros procesos de gran importancia biológica en el sistema vascular mediante la activación de la PKA o la Epac.

En situaciones de inflamación crónica, la vía de la Epac / Rap 1 es capaz de inhibir la transmigración endotelial excesiva de leucocitos. Por lo tanto, la activación de esta ruta puede tener importantes consecuencias en situaciones en las que una respuesta inflamatoria exagerada desemboca en una enfermedad vascular como la aterioesclerosis (Wittchen *et al.*, 2005). Sin embargo, esto discrepa con otro estudio en el cual no se observó este bloqueo de la migración de leucocitos (Cullere *et al.*, 2005). Otros aspectos relacionados con la transmigración de leucocitos que podrían estar influenciados por la Epac son la adhesión y la migración (Gloerich y Bos, 2010).

La Epac-1 también promueve la expresión del supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS3, *supressor of cytokine signaling 3)*, el cual inhibe el complejo de trans-señalización del receptor de interleucina (IL) 6 y por lo tanto limita las acciones proinflamatorias de la IL-6 en las células vasculares endoteliales (Sands *et al.*, 2006). Por lo tanto, la ruta AMPc-Epac-Rap1-SOCS3 puede ser útil a la hora de llevar a cabo estrategias para combatir aquellas patologías asociadas con la inflamación vascular crónica (Borland *et al.*, 2009).

El AMPc también participa en la regulación de la angiogénesis, un proceso importante tanto en el desarrollo como en procesos patológicos como en el crecimiento de tumores y metástasis (Métrich *et al.*, 2010). Existen evidencias de la participación de las proteínas PKA y Epac en dicho proceso, aunque su papel no está del todo claro.

Por una parte, la angiogénesis inducida por la integrina α5β1 es mediada por una inhibición de la PKA. Además, la activación farmacológica de la PKA, o bien la sobreexpresión de su subunidad catalítica, inhibe la angiogénesis de células endoteliales e induce su apoptosis por activación de la caspasa-8. Por otra parte, el AMPc, a través de la PKA, ejerce una acción bifásica en la función de las integrinas endoteliales, dependiendo de su nivel y de su cinética: los incrementos transitorios de los niveles de AMPc y de la actividad de la PKA estimulan la adhesión, propagación y migración mediada por la integrina αVβ3, mientras que niveles sostenidos ejercen el efecto contrario (Rüegg y Mariotti, 2003).

Las proteínas Epac participan también en el proceso angiogénico. Se ha demostrado *in vivo* que la vía Epac / Rap1 inhibe la angiogénesis al inducir la expresión

de la trombospondina-1, una molécula anti-angiogénica (Doebele *et al.*, 2009). También se ha demostrado *in vitro* que la activación de las Epac estimula la proliferación de células endoteliales vasculares, un proceso involucrado en angiogénesis. Esta estimulación de la angiogénesis se produce mediante la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK, *extracelular signal regulated kinase*) y la promoción de la vía fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) / Akt / eNOS / NO (Namkoong *et al.*, 2009).

Mediante el empleo de la forskolina, se observó que el AMPc induce o inhibe la migración de las células musculares lisas dependiendo de las dosis empleadas. A dosis bajas se induce la migración por activación de la Epac, y a dosis altas se inhibe por activación de la PKA. Las proteínas Epac, de forma independiente o en combinación con la PKA, también participan en la proliferación del músculo liso (Schmidt *et al.*, 2013).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 Respuesta endotelial en condiciones de hipoxia

Hipoxia es el término que describe un estado de falta de oxígeno al producirse un desbalance entre la demanda de oxígeno y el transporte de O_2 (Chan y Vanhoutte, 2013). Un descenso en el nivel de oxígeno es un factor común en diversas enfermedades, incluyendo desórdenes primarios pulmonares, desórdenes cardíacos, donde la sangre arterial oxigenada se mezcla con la sangre venosa, y desórdenes vasculares, donde el suministro de sangre arterial esté comprometido (Karimova y Pinsky, 2001).

Los diferentes órganos y tejidos han desarrollado mecanismos sensibles a cambios agudos y crónicos en los niveles de oxígeno para generar una respuesta ante ellos. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la respuesta vascular a la hipoxia son complejos y no se conocen totalmente (Chan y Vanhoutte, 2013).

Alguna de estas respuestas se debe a la activación de la transcripción inducida por hipoxia mediante la acción de varios factores de transcripción claves, como el gen de respuesta temprana de crecimiento-1 (Erg-1 early growth response-1), el factor nuclear κβ, la proteína activadora-1 o el factor inducible por hipoxia (HIF, *hypoxia inducible factor*) (Kayyali *et al.*, 2002, Ten y Pinsky, 2002), entre otros. Sin embargo, otros eventos son considerados demasiado rápidos para ser resultado de un proceso transcripcional. Entre esos últimos se incluyen la mobilización y liberación de P-selectina, que permite la unión y la activación de los neutrófilos, y la fosforilación de la xantina oxidasa, con el consecuente incremento de su actividad enzimática.

Entre los factores de transcripción mencionados, el factor HIF es el de mayor interés. Se trata de un heterodímero compuesto por una subunidad α y una β. La subunidad HIF-1α está sujeta a una rápida degradación proteosomal dependiente de la presencia de oxígeno mediante la hidroxilación de residuos de prolina por hidrolasas. La presencia de bajas concentraciones de oxígeno previne la degradación de la subunidad HIF-1α, se acumula y dimeriza con la subunidad HIF-1β, la cual se expresa de forma constitutiva, permitiendo que el heterodímero HIF-1 se una a las secuencias HRE (elementos de repuesta a la hipoxia) de los promotores de genes diana. Además de la bien caracterizada HIF-1α, se conocen dos isoformas más de la subunidad α: HIF-

2α e HIF-3 α, cuya estabilidad parece que está sujeta a la misma regulación por oxígeno que la HIF-1α (Hu *et al*., 2003; Li *et al.,* 2006; Castellano *et al.*, 2011; Chan y Vanhoutte, 2013). Los factores HIF dirigen los ajustes de adaptación en la homeostasis vascular mediante la activación de distintos genes. como la eritropoyetina, que incrementa la masa de los eritrocitos, el VEGF, el cual es un activador de la angiogénesis y un factor inductor de la permeabilidad en los tejidos isquémicos, así como varios genes para el control del metabolismo celular, entre ellos diversos genes que codifican enzimas glicolíticas o transportadores de glucosa (Ten y Pinsky, 2002).

Las células endoteliales, debido a su localización en contacto con la sangre, se encuentran sujetas a perturbaciones en el ambiente, incluyendo los cambios en la tensión de oxígeno. Sin embargo, en comparación con otros tipos celulares (cardiomiocitos, neuronas, células tubulares renales), son relativamente resistentes a un descenso en el contenido de oxígeno en el tejido adyacente. Tras la exposición *in vitro* de las células endoteliales a hipoxia, se observó que las células sobreviven con una ligera reducción de la producción de energía, manteniendo sus funciones metabólicas básicas. Tras 48 h de exposición a hipoxia, las células endoteliales sintetizan ATP y proteínas a un nivel aproximadamente del 70 % con respecto a los valores de normoxia (Pinsky *et al*., 1995). Aunque tras 24 h de exposición a hipoxia las células endoteliales son resistentes a la apoptosis, un mayor tiempo de exposición (48 h) da lugar a una reducción del 45% en su viabilidad (Stempien-Otero *et al.*, 1999). Por lo tanto, es lógico esperar un comportamiento disfuncional en células endoteliales que presentan incipientes cambios apoptóticos o necróticos.

Cuando las células endoteliales se ven sometidas a un período de privación de oxígeno, exhiben un patrón característico de respuestas como mecanismo de adaptación para prolongar la supervivencia de la célula. Sin embargo, dichas respuestas pueden provocar un daño permanente o incluso la muerte celular, produciéndose una disfunción endotelial que finaliza en un proceso patológico, dependiendo de las circunstancias fisiológicas (Chan y Vanhoutte, 2013). La exposición a hipoxia modifica el fenotipo endotelial hacia un fenotipo en el que se ven disminuidas las propiedades anticoagulantes. Además, la permeabilidad y la adhesión

de leucocitos se ven incrementadas y las características proinflamatorias dominan en el medio endovascular (Ten y Pinsky, 2002).

3.1 Efectos de la hipoxia en la función de barrera endotelial

Numerosos estudios han demostrado que la hipoxia altera la función de la barrera endotelial y, en consecuencia, provoca un incremento de la permeabilidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Ogawa *et al*., 1990; Partridge, 1995; An *et al*., 2005). En condiciones normales, el endotelio sólo permite la difusión de forma restringida de solutos y moléculas de un tamaño determinado. Sin embargo, tras la exposición a hipoxia las uniones laterales entre células endoteliales adyacentes se retraen, observándose huecos intercelulares de 1-3 μM, dando lugar a un estado de hiperpermeabilidad caracterizado por un incremento en la fuga paracelular de solutos proteínas y leucocitos (Karimova y Pinsky, 2001; Ten y Pinsky, 2002). Clínicamente esta situación se manifiesta como un aumento de la permeabilidad capilar que conduce a la formación de edemas.

La ruta de señalización del AMPc es esencial para el mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto de actina. Tras la exposición a hipoxia, los niveles de este segundo mensajero disminuyen precipitadamente debido a una reducción de la actividad de las AC. Este descenso da lugar a una retracción de los márgenes laterales de las células adyacentes (Ogawa *et al.*, 1990; Ten y Pinsky, 2002). En condiciones de estrés, como ocurre durante el proceso de oxigenación/reperfusión, se observa además un incremento en la actividad de las PDE II, III y IV, lo que también contribuye al descenso de los niveles de AMPc (Karimova y Pinsky, 2001).

La exposición a hipoxia produce una alteración del balance de las fuerzas físicas que regulan la función de la barrera endotelial (descritas en detalle en el apartado 1.2). La hipoxia induce una respuesta contráctil en las células endoteliales, siendo esta contracción atribuible a la activación de la maquinaria contráctil actomiosina tras activarse la ruta de señalización Rho/ROCK. Además, también se observa un incremento en la fosforilación de la MLC en las células endoteliales.

Otro de los efectos observados tras la exposición a hipoxia es el cambio de la estructura de los filamentos de actina, que pasa de una estructura en forma de bandas a una estructura de fibras de estrés en paralelo. Además, éstas se vuelven más gruesas y aumentan en número con el tiempo de exposición a hipoxia (Kayyali *et al*., 2002; An *et al*., 2005). Esta alteración del citoesqueleto de actina se debe a la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (MAPK p38) que media la fosforilación de la Hsp27 en las células endoteliales pulmonares. La Hsp27 pertenece a la familia de las proteínas Hsp inducidas por estrés y durante el estrés celular y el crecimiento media la polimerización de los filamentos de actina y la formación de fibras de estrés (An *et al*., 2005).

Tras la exposición a hipoxia/reoxigenación también se observa un incremento de la permeabilidad endotelial, acompañada de la activación de la maquinaria contráctil endotelial, desarreglo del citoesqueleto y pérdida de VE-cadherina en las uniones celulares. Se produce también edema, acompañado de un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$, de fosforilación de la MLC, de un aumento de la señalización de la RhoA/ROCK y de una inactivación de la vía de la Rac1 (Aslam *et al*., 2013).

El aumento de la permeabilidad capilar, después de la exposición a hipoxia, está estrechamente vinculado a la estimulación del VEGF, importante promotor de la angiogénesis y del aumento de la permeabilidad vascular. La regulación a la alta del VEGF en respuesta a la hipoxia se debe a la actividad de los factores de transcripción HIF-1 y Egr-1, inducidos por la hipoxia (Semenza, 2001; Ten y Pinsky, 2002). La inducción del factor HIF-1 promueve la expresión de genes críticos para la supervivencia en condiciones bajas de oxígeno y, por lo tanto, se puede considerar una vía biosintética de la adaptación al estrés hipóxico. El Erg-1 es un factor de transcripción nuclear para múltiples mediadores proinflamatorios. En respuesta a situaciones de hipoxia o de isquemia en el área endotelial inicia diferentes eventos, dando lugar a una respuesta inflamatoria y, por lo tanto, puede ser responsable del daño vascular y perivascular. La regulación a la alta del factor Egr-1 inducida por la hipoxia en células de la pared vascular se ha asociado con un incremento del derrame capilar pulmonar (Ten y Pinsky, 2002).

3.2 Efectos de la hipoxia en el tono vascular

La respuesta a hipoxia en condiciones *in vitro* puede ser monofásica, bifásica o trifásica, dependiendo del lecho vascular. La respuesta monofásica consiste en una contracción sostenida, la bifásica consiste en una contracción transitoria seguida de una relajación y la trifásica consiste en una contracción transitoria, una fase de relajación también transitoria y una contracción sostenida (Chan y Vanhoutte, 2013).

El aumento de la contracción dependiente de endotelio se ha observado en las arterias coronarias y femoral canina, porcina y humana (Chan y Vanhoutte, 2013). La eliminación del endotelio en la aorta de rata suprime la vasoconstricción inducida por hipoxia e incrementa la vasodilatación (Pape *et al.,* 1997, Ten y Pinsky, 2002). Esta vasoconstricción parece resultar de un desequilibrio entre la síntesis y liberación de agentes vasodilatadores y sustancias vasoconstrictoras por el endotelio.

La hipoxia también ejerce efectos crónicos en la vasculatura. Numerosos estudios han demostrado que la viabilidad y la proliferación de las células musculares aumentan tras un tratamiento de hipoxia crónico. Ese efecto puede ser atribuido al aumento de la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas y al factor de crecimiento de fibroblastos (Chan y Vanhoutte, 2013).

Se han propuesto distintos factores que podrían estar involucrados en la vasoconstricción vascular provocada por la hipoxia. Entre ellos se encuentran los aniones superóxido que actuarían neutralizando el óxido nítrico, los endoperóxidos, el TxA2 y las endotelinas. La expresión de la endotelina-1 (ET-1), un potente vasoconstrictor sintetizado de forma constitutiva por el endotelio, se ve incrementada tras la exposición hipóxica o isquémica en cultivos celulares (Morita y Kourembanas, 1995) y en ratones neonatos (Tsang *et al.*, 2001). El incremento de la ET-1 tras la hipoxia está inducido por el factor de transcripción HIF-1 y por la proteína activadora 1 (Yamashita *et al.*, 2001, Ten y Pinsky, 2002). Sin embargo, la participación de la ET-1 ha sido puesto en duda por algunos autores ya que el empleo de bosentan, una antagonista no selectivo de los receptores de ET, no ejerce efecto en la constricción inducida por hipoxia en arteria coronaria porcina (Chan y Vanhoutte, 2013). Estos mismos autores sugirieron la participación de productos vasoconstrictores de la

ciclooxigenasa en la vasoconstricción inducia por hipoxia. Asimismo, observaron una activación de la Rho cinasa, provocando una sensibilización al Ca^{2+}.

Otro de los efectos inducidos por hipoxia que afecta a la regulación del tono vascular es la disminución en la producción basal de NO en el endotelio (MCQuillan *et al.*, 1994). En la mayoría de los estudios realizados en cultivos celulares endoteliales se observa una disminución de la expresión y de la actividad enzimática de la eNOS y, en consecuencia, una disminución de la generación de NO (MCQuillan *et al*., 1994; Ostergaard *et al*., 2007; Takemoto *et al.*, 2002; Jin *et al.,* 2006; Laufs *et al.*, 1997; Phelan y Faller, 1996; Fish *et al.*, 2007; Fish *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012).

En condiciones experimentales *ex vivo*, tras una exposición crónica a hipoxia, también se ha observado una disminución de la vasorrelajación dependiente de endotelio en preparaciones de pulmón asilado de rata (Adnot *et al*., 1991), de arteria pulmonar y de aorta de rata (Shaul *et al*. 1993; Murata *et al*., 2002). Además, en cultivo organoide de arterias pulmonares humanas sometido a hipoxia, se observó una disminución de la expresión de la eNOS y de la síntesis de NO (Ziesche *et al.*, 1996).

La hipoxia provoca en las células endoteliales una disminución de la transcripción de la eNOS y una disminución de la estabilidad del transcripto, lo que da lugar a una disminución de los niveles de proteína eNOS y de su actividad productora de NO (McQuillan *et al*., 1994; Liao *et al*., 1995; Dudzinski *et al.,* 2006). Además, la presencia de mediadores inflamatorios y de citocinas en condiciones hipóxicas disminuye aún más la expresión de la eNOS y la producción de NO (Ziesche *et al*., 1996; Dudzinski *et al.*, 2006).

El mecanismo por el que la hipoxia induce un descenso en la transcripción de la eNOS no está claro (Fish *et al*., 2010). Por una parte existen evidencias de que la vía de Rho/ROCK podría estar implicada en la inhibición de la transcripción de la eNOS (Takemoto *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la hipoxia regula a nivel epigenético la eNOS. Como ya se ha descrito en detalle en el apartado 1.1.3.2 de la Revisión Bibliográfica, el promotor de la eNOS presenta una combinación específica de modificaciones de histonas denominado “código específico de histonas” y que, en células endoteliales en condiciones de normoxia, se caracteriza por un enriquecimiento en la acetilación de las histonas H3 y H4 y por la metilación de

la lisina 4 de la histona H3 (Matouk y Marsden 2008; Ho *et al.*, 2012). Este código determina la estructura de la cromatina, la cual regula la accesibilidad de ciertas secuencias de ADN a la maquinaria de transcripción. En condiciones de hipoxia se observa un descenso de la acetilación y metilación de dichas histonas y está asociado con un descenso en la transcripción del ARNm de la eNOS. (Fish *et al*., 2010; Ho *et al*., 2012).

Además de ser regulada epigenéticamente a nivel transcripcional, la eNOS también está regulada post-trancripcionalmente por la hipoxia, por el ARNm cis-antisentido natural, denominado sONE, el cual presenta un exón complementario con la eNOS de más de 662 nucleótidos entre secuencias codificadoras de proteínas y secuencias 3'-UTR. En condiciones de normoxia, el sONE posee una mínima expresión basal, pero su expresión es fuertemente inducida por la hipoxia. Este incremento de su expresión regula de forma negativa la expresión de la eNOS (Fish *et al.,* 2007; Robb *et al*., 2004; Ho *et al.*, 2012).

Además, en condiciones de hipoxia se observa una reducción de la fosforilación de la Ser 1177 de la eNOS y un incremento de la fosforilación de la Thr 495, lo que provoca una disminución de la actividad de la enzima (Ostergaard *et al.,* 2007). La actividad de la enzima también se ve afectada durante la hipoxia por la disminución de la expresión de Akt, la cual puede fosforilar la Ser 1177 y por la alteración del metabolismo del Ca^{2+} en dichas condiciones. Asimismo, en condiciones de hipoxia, hay un incremento de las interacciones entre la eNOS y la caveolina-1, la CaM o la Hsp90, lo que resulta en una disminución de la actividad de la enzima (Ostergaard *et al*., 2007; Murata *et al.* ,2002).

Otra de las posibles causas que se han propuesto para explicar el descenso de la actividad de la eNOS en condiciones de hipoxia es una disminución de la disponibilidad del sustrato L-arginina para la síntesis de NO. En diferentes desórdenes asociados con hipoxia se ha observado una reducción del transporte de L-arginina, un descenso del metabolismo de la L-arginina vía eNOS en el endotelio y un incremento de la expresión de la enzima arginasa II (Prieto *et al*., 2011; Casanello *et al.*, 2009; Huynch y Chin-Dusting, 2006; Jin *et al.,* 2010).

Además, en condiciones de hipoxia se ha observado un incremento de la generación de EROs en diferentes tipos celulares, incluyendo las células endoteliales (Miyata *et al.*, 2010; Pearsltein *et al.*, 2002; Steiner *et al*., 2002). Por lo tanto, dicho incremento también podría estar implicado en la disminución de la biodisponibilidad de NO (Steiner *et al*., 2002).

Los resultados expuestos hasta el momento indican un descenso en la expresión de la eNOS en condiciones de hipoxia, sin embargo discrepan con estudios realizados por otros autores y que observaron un incremento de la expresión de la eNOS y/o de la producción de NO e incluso de otros autores que no observan modificación en la expresión de la eNOS (Murata *et al.,* 2001).

Un incremento de la expresión de la eNOS y/o de la producción de NO tras la exposición a hipoxia ha sido demostrada por distintos autores en células endoteliales *in vitro* (Arnet *et al*., 1996; Hoffmann *et al*., 2001; Chen y Meyrick, 2004; Coulet *et al*., 2003; Min *et al*., 2006) o *ex vivo*, empleando diferentes arterias (Pohl y Busse, 1989) u óganos (Quilan *et al*., 2000; Le Cras *et al*., 1998). Sin embargo, el mecanismo por el que se produce este incremento se desconoce. Coulet *et al.* (2003) propusieron que dicho incremento se debe a que HIF-2 estimula la transcripción de la eNOS, ya que determinaron un sitio de unión hipotético a HIF-2, con dos secuencias consenso con HIF localizadas en las posiciones 5373 y 5366 en el promotor de la eNOS. Por otra parte, Min *et al*. (2006) proponen que la unión de CREB (*cAMP-responsive element binding protein)* fosforilado al promotor del gen la eNOS incrementa la transcripción de la eNOS.

Por último, otros estudios han sugerido que la eNOS puede ser inducida a través de la participación de dos proteínas inducibles por hipoxia, la eritropoyetina y el VEGF (Dudzinski *et al.*, 2006).

3.3 Efecto de la hipoxia en la retina. Modelo de retinopatía inducida por oxígeno en ratones

La oxigenación de los tejidos en general, y la hipoxia en particular, son importantes reguladores de la fisiología y patofisiología de la retina. Una tensión de oxígeno

reducida, así como factores de transcripción inducibles por hipoxia y sus genes diana están críticamente involucrados en el desarrollo de la retina y, especialmente, en el desarrollo de una vasculatura retiniana normal (Grimm y Willmann, 2012).

Sin embargo, la hipoxia puede ocurrir como resultado de una alteración vascular causada por diversas patologías, como la hiperglucemia en la diabetes, la trombosis en las oclusiones venosas o los retrasos en el desarrollo en la retinopatía del prematuro. En estas situaciones, la hipoxia es el factor clave que induce una respuesta vascular a partir de la cual el tejido insuficientemente perfundido se revasculariza mediante del surgimiento de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes. Sin embargo, por razones no del todo conocidas, dicha revascularización a veces no se desarrolla con éxito, lo que lleva a la formación de vasos anormales (proceso denominado neovascularización), en lugar de nuevos capilares sanos (Scott y Frutiger, 2010). Se produce además una ruptura de la barrera hemato-retiniana. En consecuencia, ambos procesos conducen a edema, siendo en muchos casos de retinopatía isquémica la principal complicación que amenaza la visión. La pérdida de fotoreceptores y neuronas retinianas contribuye aún más a la pérdida de visión (Huang *et al*., 2001). En los casos más graves se puede producir el desprendimiento de la retina (Scott y Frutiger, 2010).

El modelo más popular para el estudio de la angiogénesis anormal en la retina es el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR, *oxygen-induced retinopathy*) en ratones. Los ratones de una semana de edad son expuestos a hiperoxia, la cual destruye los capilares en la retina. Al devolver los ratones a condiciones normales de oxígeno, la retina se vuelve hipóxica y se desencadena una respuesta de reparación vascular. Ello da como resultado la formación de *neovascular tufts*, que se definen como proliferaciones anormales de microcapilares que se proyectan desde los márgenes pupilares hacia el vítreo, un distintivo de las retinopatías isquémicas en patologías humanas. Aunque la patogénesis del daño vascular en las diferentes retinopatías isquémicas en humanos varía considerablemente, la etapa neovascular final es muy similar en todas estas retinopatías, por lo que el modelo OIR es una herramienta clave para el estudio de la patología vascular en retinopatías isquémicas. Existen otros modelos de hiperoxia-hipoxia en ratón (por ejemplo, los basados en los niveles de oxígeno cíclicos), así como en otras especies animales. Sin embargo, el

modelo OIR en ratón descrito por Smith *et al*. (1994b) se ha convertido en el protocolo de elección, ya que es fácilmente reproducible y cuantificable. Además, el estudio de los mecanismos moleculares implicados se ve facilitado en gran medida por las herramientas genéticas disponibles en ratones (Scott y Fruttiger, 2010).

El modelo OIR consta de dos etapas. Durante la primera etapa, las crías de ratón de edad postanal (P) 7 son expuestas a un 75 % de oxígeno hasta que alcanzan la edad P12. En los ratones, la vasculatura de la retina comienza normalmente a desarrollarse en el nacimiento y está completamente madura alrededor de 3 semanas después (Fruttiger, 2007). Esto significa que la vasculatura del ratón de edad P7 está todavía inmadura y, por lo tanto, es susceptible al daño por hiperoxia. La hiperoxia induce una destrucción rápida (en las primeras 24 h) principalmente de los capilares adyacentes a las arterias en el centro de la retina, ya que es donde se alcanzan las concentraciones más altas de oxígeno (Lange *et al.*, 2009), permaneciendo una red de capilares funcional en la periferia abastecida por arteriolas radiales y vénulas (Claxton y Fruttiger, 2003). Esta destrucción de capilares puede ser causada por el efecto tóxico de los niveles altos de oxígeno en las células endoteliales (Beauchamp *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2003), pero también son posibles otros mecanismos.

La hiperoxia no afecta a las venas y arterias más grandes y más maduras que se proyectan desde el centro a la periferia. Del mismo modo, los capilares en ratones de más edad (P21) en los que la vasculatura de la retina está totalmente desarrollada son resistentes a los efectos de hiperoxia. Por lo tanto, es muy probable que la hiperoxia interfiera con los procesos de desarrollo (Gu *et al.*, 2002).

La segunda etapa del modelo OIR se inicia cuando las crías de ratón son devueltas a condiciones de normoxia. La retina se convierte inmediatamente en hipóxica porque el centro de la retina se encuentra mermado en capilares y sólo hay suficiente oxígeno en la vecindad inmediata de los vasos radiales restantes. La vasculatura de la retina responde a la hipoxia iniciando un brote vascular desde los capilares restantes en la periferia y desde las venas. Sin embargo, algunos de los brotes vasculares de nueva formación no logran regenerar la red capilar y forman *neovascular tufts* hacia el vítreo. En contraste, las arterias no desarrollan brotes angiogénicos, sino que se vuelven tortuosas (Scott y Frutiger, 2010).

La exposición de crías de ratón a hiperoxia continua desde P7 hasta P27 (es decir, sin volver a condiciones de normoxia en P12), conduce, paradójicamente, a una regeneración vascular normal, lo que sugiere que la patología vascular en OIR podría ser una consecuencia de la aparición repentina de la hipoxia y una sobreexpresión de factores de crecimiento inducibles por hipoxia cuando los ratones se devuelven a condiciones de normoxia (Gu *et al.*, 2002). Entre los factores de crecimiento que han sido implicados en el modelo OIR se encuentran el VEGF, el factor de crecimiento similar a la insulina 1, la eritropoyetina y la angiopoyetina-2, entre otros. Además, hay una lista que se incrementa con rapidez de otros genes involucrados. Sin embargo, cómo estos genes afectan precisamente el comportamiento celular y cómo los diferentes tipos de células (neuronas, células gliales, células inflamatorias y vasculares) en la retina interactúan unos con otros en la OIR es todavía sólo entendida parcialmente (Scott y Fruttiger, 2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Material y Métodos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Estudios de contractilidad en aorta torácica aislada de rata

1.1 Estudios funcionales de contracción-relajación en anillos de aorta torácica aislada de rata

La técnica de órgano aislado permite eliminar las respuestas de tipo hormonal y reflejo que caracterizan los estudios *in vivo*, permitiéndonos así mismo obtener una mejor cuantificación de la concentración de los compuestos en estudio que acceden a la biofase y del efecto obtenido.

Por otra parte, se consigue llevar a cabo un estudio preciso y simplificado del mecanismo de acción de los fármacos, ya que se conocen y se pueden modificar localmente las condiciones de incubación de la preparación tisular.

1.2 Selección y mantenimiento de los animales de experimentación

Para la realización de los experimentos se emplearon ratas albinas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar Kyoto (WKY), suministradas por la empresa Criffa S.A. (Barcelona, España), que se crían y mantienen el Animalario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia.

Estos animales fueron dispuestos en grupos de cinco y mantenidos en condiciones de ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a una temperatura de 22-24 °C. Los animales tuvieron libre acceso a los gránulos de pienso (SAFE: Scientific Animal Food & Engineering, Francia) y a la bebida (agua).

Todos los procedimientos de manipulación y sacrificio de los animales de experimentación llevados a cabo en este trabajo han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia de acuerdo con las directrices españolas y europeas vigentes.

1.3 Preparación y montaje del tejido vascular

El sacrificio de los animales de experimentación se realizó mediante la inhalación de CO_2, suministrado durante un período de 2-3 minutos.

A continuación se procedió a la extracción de la aorta; para ello se realizó una incisión torácica-media y tras la separación de los pulmones y del corazón, se localizó la aorta y se procedió a su disección desde el diafragma hasta el cayado aórtico.

A continuación y de forma inmediata, para evitar el deterioro de la aorta, ésta se colocó en una placa de Petri, conteniendo con solución Krebs bicarbonato normal (KBN, composición en mM: NaCl 119; KCl 4,7; $CaCl_2.2H_2O$ 1,5; $MgSO_4.7H_2O$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; $NaHCO_3$ 25; EDTA-Na_2 0,03; ácido l-ascórbico 0,6; glucosa 11; pH 7,4) a 37 °C y burbujeada con gas carbógeno (95% O_2/5% CO_2). Se procedió a la limpieza de sangre, tejido adiposo y tejido conectivo circundante con la ayuda de pinzas y tijeras. Según el protocolo a seguir, en algunos anillos el endotelio fue eliminado mediante un raspado de la luz arterial con hilo grueso de algodón. Por último, se procedió a cortar la aorta en segmentos cilíndricos de 3-5 mm de longitud.

Una vez obtenidos, los anillos fueron introducidos en un baño de órganos con 10 mL de solución de KBN, con burbujeo constante de gas carbógeno y a una temperatura de 37 °C; mediante una cámara externa en la que se establece un circuito cerrado de agua termostatizada.

A través del lumen de cada segmento arterial se insertaron dos pinzas de acero inoxidable: una permanece fijada al baño de órganos y la otra se conecta a un transductor. Los anillos se someten a una tensión de 2 g y se lleva a cabo un período de estabilización de 1 h, con períodos de lavado en intervalos de 20 min y con reajuste de la tensión de reposo a 2 g.

A continuación, para producir la contracción de los anillos aórticos, se procede a añadir fenilefrina (1 µM), dejando estabilizar la preparación durante 30 minutos.

Para determinar la presencia o ausencia de endotelio funcional y basándonos en trabajos previos (Furchgot y Zawadki, 1980), se procedió a la evaluación de

efectos vasorrelajantes de la Ach (1 µM) sobre las contracciones tónicas anteriormente provocadas por la fenilefrina. Según estos trabajos, se considera que el endotelio es funcional cuando la relajación provocada por la Ach es superior al 50%, considerando el 100% de la contracción la inducida por la fenilefrina (1 µM). Asimismo, se considera que se ha producido la eliminación del endotelio en ausencia de efecto vasorrelajante por parte de la Ach.

Las contracciones se visualizaron y registraron con la ayuda de un equipo informatizado para el estudio de órganos aislados, el cual consta de:

- Transductor: Dynamometer UF1 (Pioden Controls LTD, Cantenbury, Gran Bretaña).

- Amplificador de 8 canales (MacLab/8sp).

- Software: Chart v.3.6.3 y Chart v.4.1.2 (PowerLab/MacLab, ADInstruments Pty Ltd).

1.4 Actividad vasorrelajante en anillos precontraídos de aorta de rata.

Una vez comprobada la presencia o ausencia de endotelio, después de un nuevo período de estabilización de al menos 1 hora (necesario para la recuperación del tono vascular basal), con intervalos de lavado de 20 min, se administró de nuevo la fenilefrina (1µM) para inducir la contracción de los anillos. Una vez estabilizada esta contracción (30 min), se añadieron al baño las correspondientes concentraciones acumulativas crecientes de cada uno de los fármacos a estudiar. Los anillos control fueron sometidos simultáneamente al mismo procedimiento pero omitiendo los compuestos y añadiendo el vehículo (diluciones apropiadas de dimetilsulfóxido (DMSO)

2 Cultivos celulares

2.1 Cultivo de células HUVEC

Para la realización de varias series de experimentos se emplearon células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cell*), una línea de células endoteliales procedentes de vena umbilical humana (línea celular HUVEC-CS, ATCC, Rockville, MD, EE.UU).

La composición del medio de cultivo empleado fue la siguiente: DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, inactivado por calor húmedo a 56 °C durante 30 min, heparina (0,1 mg/ml), factor de crecimiento endotelial (ECGS; 30 mg/mL), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina sulfato (100 µg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL). Las células fueron cultivadas en *flasks* de 75 cm^2 hasta alcanzar una densidad aproximada de 1,5 x 10^6 células. Durante esta fase de crecimiento las células se mantuvieron en un incubador en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO_2 del 5% en el aire y a una temperatura de 37 °C.

Al alcanzar la confluencia (90-95% de la superficie del *flask*) se realizaron subcultivos a una superficie dos veces mayor. Para ello se aspiró el medio de cultivo y se trató a las células con una solución de tripsina-EDTA (0,5 g /0,2 g) durante 5 min a 37 °C. Tras comprobar la proteólisis de la matriz extracelular, la suspensión celular resultante se diluyó 1:1 en medio de cultivo y se centrifugó a 100 *g* durante 10 min. El *pellet* resultante se resuspendió en medio de cultivo completo y se sembró en nuevos *flasks* de 75 cm^2.

Por último, las células HUVEC fueron congeladas regularmente con el objeto de poder ser utilizadas con posterioridad. La composición del medio de congelación consta de un 10% de DMSO en el correspondiente medio de cultivo completo. Las células confluentes en un *flask* de 75 cm^2 fueron tripsinizadas y resuspendidas en 1 mL de medio de congelación, conservándose en nitrógeno líquido (-195 °C).

2.2 Cultivo de células HCAEC

Para la realización de otra serie de experimentos se emplearon células endoteliales de arteria coronaria (HCAEC, *Human coronary artery endotelial cell*) (Lonza, Breda, Holanda).

La composición del medio de cultivo empleado fue la siguiente: RPMI-1640 suplementado con 1% penicilina/streptomicina, 2mM L-glutamina, 20% de FBS, 50 µg/mL de extracto pituitario bovino y 5 U/mL de heparina.

Las células fueron sembradas en *flasks* de 75 cm^2 que se recubrieron previamente con una solución de 0,1 % de gelatina en PBS, para facilitar la adhesión de las células a la superficie del *flask*. Las células se mantuvieron durante la fase de crecimiento en un incubador en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO_2 del 5% en el aire y a una temperatura de 37 °C. En los experimentos realizados en condiciones de hipoxia las células se mantuvieron durante 24 horas en un incubador con una tensión de O_2 del 2% a 37 °C. Una vez alcanzada la confluencia se realizaron subcultivos a una superficie dos veces mayor. Para ello se aspiró el medio de cultivo y se trataron las células con una solución de Accutase™ (PAA Laboratories, Austria) durante 5 min a 37 °C. Tras comprobar la proteólisis de la matriz extracelular, se centrifugó a 150 *g* durante 5 min. El *pellet* resultante se resuspendió en medio de cultivo completo y se sembró en nuevos *flasks* de 75 cm^2. Antes de realizar cualquier experimento las células HCAEC permanecieron en medio carente de FBS durante dos horas. Por último, las células HCAEC fueron congeladas siguiendo el mismo protocolo descrito para células HUVEC.

3 Modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) en ratón

El modelo OIR en ratones descrito por Smith *et al*. (1994b), se empleó para el estudio en los cambios de la expresión de la proteína Epac-1 mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y la técnica de inmunotinción.

Este modelo OIR en ratones fue desarrollado en el 5° Departamento Médico dirigido por el Dr. Hans-Peter Hammes (Facultad de Medicina de Mannheim, Alemania) y en colaboración con el Grupo de Investigación de Medicina Cardiovascular Regenerativa, bajo la supervisión de Dr. Guido Krenning (Centro Médico Universitario de Groningen, Holanda). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las directrices de la declaración de la experimentación animal expedido por la *Association for Research in Vision and Opthalmology* (ARVO) y fueron aprobados por la Junta Local de Cuidado de los Animales (Facultad de Medicina de Mannheim, Alemania).

El modelo OIR en ratones empleado se desarrolló en ratones de la cepa C57BL/6J, los cuales se mantuvieron en ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad con libre acceso a pienso estándar y a bebida (agua). Para el desarrollo de este modelo se escogieron ratones de 7 días de edad postnatal (P7), para optimizar el balance en el desarrollo de la retina entre la regresión de la arteria hialoidea y la incompleta vascularización de la retina. A esta edad, por lo tanto, la vasculatura de la retina de los ratones se encuentra aún en estado inmaduro y es susceptible al daño por hiperoxia.

Los ratones de edad P7 fueron separados en dos grupos. El grupo de ratones control se mantuvo en condiciones normales de O_2 durante todo el proceso. El grupo de ratones OIR permaneció en una cámara de incubación (Stuart Scientific, Redhill, Reino Unido) en condiciones de hiperoxia (75% O_2) durante 5 días (edad P12). A los animales que se mantuvieron en hiperoxia se les proporcionaron alimentos y agua suficientes para 5 días y la cámara no se abrió en ningún momento durante el tiempo de exposición a hiperoxia. A continuación, los ratones del grupo OIR se trasladaron a condiciones normales de O_2, lo que provoca que la retina se vuelva rápidamente hipóxica.

Los estudios de expresión de la proteína Epac-1 se realizaron durante la fase de hipoxia en el desarrollo de la OIR, a la edad P12 (6 h de exposición a hipoxia) y P13 (24 h de exposición a hipoxia). Los ojos fueron enucleados bajo profunda anestesia y fueron inmediatamente fijados en un 4% de formalina. Las retinas fueron aisladas según el protocolo descrito por Hammes *et al.* (1991). De forma

resumida, para su aislamiento, las retinas fueron sometidas a digestión con un combinado de pepsina (5% de pepsina en 0,2% de ácido clorhídrico durante 1,5 h) y de tripsina (2,5% en 0,2 mol/l de Tris durante 15-30 min). A continuación, fueron almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

4 Amplificación por Retrotranscripción- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.1 PCR Convencional

I. Extracción del ARN

El ARN total de las muestras de células HUVEC se aisló empleando un sistema de columnas de intercambio iónico (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel GmbH and Co KG, Alemania).

En primer lugar, se realizó la separación de los ácidos nucleicos en fase alcohólica. Luego, la retención de los ácidos nucleicos en una columna de intercambio iónico. A continuación, se realizó una digestión enzimática del ADN y un lavado posterior de la columna con disolventes compatibles para eliminar el ADN. Por último, se eluyó el ARN en condiciones de baja fuerza iónica con H_2O libre de RNasas y se midió la concentración por espectrofotometría (relación 260/280 nm). El ARN total aislado se distribuyó en alícuotas de 2 µg que fueron conservadas a –80 °C.

II. Retrotranscripción y PCR

La técnica de la retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) fue empleada en el presente trabajo para caracterizar la presencia de ARN codificante para β-actina, eNOS, Epac-1, Epac-2, PKA-RIIα y Rap1, en células HUVEC. Estas proteínas son parte de la maquinaria enzimática y estructural de las células vasculares, por lo que debe existir una coherencia entre los niveles de ARN codificante para dichas proteínas y sus niveles de expresión.

Todos los experimentos de RT-PCR para estudiar la expresión de estas proteínas fueron realizados en el laboratorio del Dr. José Leiro Vidal del Instituto de Análisis Alimentarios de la USC.

La composición de la mezcla de reacción de la RT (25 µl de volumen final a pH 8,4) fue la siguiente: ARN total (2 µg), iniciadores aleatorios (hexámeros de ADN; 0,5 µg), retrotranscriptasa recombinante M-MLV-RT (1000 U), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP; 10 mM), tampón 5x de retrotranscripción (5 µl) e inhibidores de RNasa (40 U/µl). La retrotranscripción (RT) se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler Personal; Eppendorf, Hamburgo, Alemania) empleando procedimientos estandarizados (1 h a 37 °C). La composición de la mezcla de PCR (25 µl; pH 8,4) fue: 1,5 mM MgCl2, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,16 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), 0,4 µM de cada iniciador, 1 U de la Taq ADN polimerasa y 1 µl del producto obtenido en la RT.

Empleando las herramientas informáticas *Clustal W2* y *Primers* (www.yeastgenome.org) se diseñaron cebadores (*primers)* específicos para secuencias de aproximadamente 20 nuleótidos de la especie *Homo sapiens* (tabla 4).

Gen	Secuencia del *primer*	Tm	Tamaño
β-actina	s: 5´-AACTGGGACGACATGGAGAA-3´ a: 5´ TCCAGACGCAGGATGGCAT-3´	65 °C	330 bp
eNOS	s: 5'-GCACAGGAAATGTTCACCTA-3' a: 5'-TCCATGCAGACAGCCACAT-3'	52 °C	480 bp
Epac-1	s: 5'- ATCGGCAGTGCTGCTCTG-3' a: 5'- CCTTGCTGTGTGGTTCAAAGA-3'	55 °C	392 bp
Epac-2	s: 5'-TATGGTGTTATGGAAACGGG-3' a: 5'-ACCTTCTTCCCCCTGGTTAAA-3'	55 °C	649 bp
PKA-RIIα	s: 5'- TTGACCAAGGAGATGATGGA-3' a: 5'- TCTTCATGATGTCCATGCAGG-3'	55 °C	612 bp
Rap1	s: 5'-CAGTTCAGTTTGTTCAGGGAA-3' a: 5'-TGCAGAAGATTCTAAAAAGGC-3'	52 °C	345 bp

Tabla 4. Secuencia de *primers* empleados en PCR convencional así como los tamaños correspondientes de los fragmentos amplificados. s: *primer* sentido;

a: *primer* antisentido. Tm: temperatura a la cual la doble hélice del ADN se disocia en dos hebras sencillas.

La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: i) una fase de 5 min a 94 °C, ii) 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a la temperatura de alineamiento (Tm - 5 °C) y 90 s a 72 °C, iii) una fase de 7 min a 72 °C y finalmente la temperatura fue fijada a 4 °C hasta que se recogieron los productos de la PCR y se adicionó el tampón de parada (2,5 µl por tubo). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparado en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) (composición en mM: Tris-base 45 mM; H_3BO_3 45 mM; EDTA 1 mM; pH 8), teñido con bromuro de etidio (0,05 µl/ml). Las bandas fueron visualizadas con un sistema de adquisición de imágenes dotado con una lámpara ultravioleta (Fluo-Chem FC2 MultiImage II; Alpha Innotech).

4.2 PCR en tiempo real (cuantitativa)

I. Aislamiento de ARN

El ARN total de las muestras de células HCAEC, así como de retinas aisladas de los ratones control y ratones OIR se aisló empleando el reactivo Trizol® (Invitrogen, Pasley, Reino Unido). Este proceso de aislamiento consiste en las siguientes etapas:

- *Homogenización de las muestras:* Tras la adicción de un volumen adecuado de Trizol®, las células HCAEC fueron lisadas pipeteando arriba y abajo las muestras de forma repetida. La homogenización de los ojos de ratón se realizó con la ayuda de una jeringa.

- *Fase de separación:* Las muestras homogeneizadas fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para la completa disociación del complejo núcleo-proteico. A continuación, se añadió a cada muestra un volumen adecuado de cloroformo, se agitaron con un vortex durante 15 segundos y se centrifugaron a 12.000 *g* durante 15 minutos a 4 °C. Tras la realización de este paso, se obtienen dos fases: una inferior conteniendo cloroformo y una fase superior acuosa que contiene ARN. Esta fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo para continuar con el aislamiento.

- *Aislamiento del ARN:* Se añadió a cada muestra un volumen adecuado de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y por último se centrifugó a 12000 *g* durante 10 minutos a 4 °C, observándose en el fondo del tubo un *pellet* de ARN.

- *Lavado de ARN:* Tras eliminar el sobrenadante se añadió sobre el *pellet* un volumen adecuado de etanol al 75%. Posteriormente se agitó con el vortex y se centrifugó a 7500 *g* durante 5 minutos a 4 °C. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado para aumentar la pureza del ARN.

A continuación, el *pellet* se dejó secar al aire durante 10-15 minutos y se disolvió en H_2O_2 libre de RNasas. Por último se incubó a 55-60 °C durante 10-15 minutos y se midió la concentración de ARN por espectrofotometría en una relación 260/280 nm (NanoDrop; Thermo Scientific, MA, EE.UU) y se almacenó a -80 °C hasta su empleo.

II. Retrotranscripción y PCR

La composición de la mezcla de reacción de la RT (20 µl de volumen final) fue la siguiente: ARN total (0,5ng-5µg), reactivos proporcionados por el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, MA, EE.UU): *primers* de hexámeros aleatorios (0,2 µg), transcriptasa reversa M-MuLV (200 U/µl), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP; 10 mM), tampón 5x de retrotranscripción (4 µl) e inhibidores de RNasa (20 U/µl) y H_20_2 libre de nucleasas para completar hasta los 20 µl de volumen final. La retrotranscripción (RT) se llevó a cabo en un termociclador (Biometra, Goettingen, Alemania) siguiendo procedimientos estandarizados.

La PCR en tiempo real nos permite amplificar y simultáneamente detectar y cuantificar el producto amplificado en tiempo real. La monitorización en tiempo real de la PCR se basa en el empleo de técnicas de fluorescencia. Mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN

sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado (Higuchi *et al*., 1994).

Existen dos clases principales de marcadores fluorescentes que se emplean en la PCR en tiempo real: marcadores genéricos (o agentes intercalantes) y marcadores específicos (sondas de hibridación específicas). Los marcadores específicos presentan la ventaja de ser muy precisos, pero necesitan un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas que resulta muy costoso y laborioso.

Los marcadores genéricos son fluorocromos que cuando se unen a las dobles cadenas de ADN emiten fluorescencia. A este tipo de marcadores pertenece el fluorocromo SYBER Green I empleado en este trabajo (figura 15).

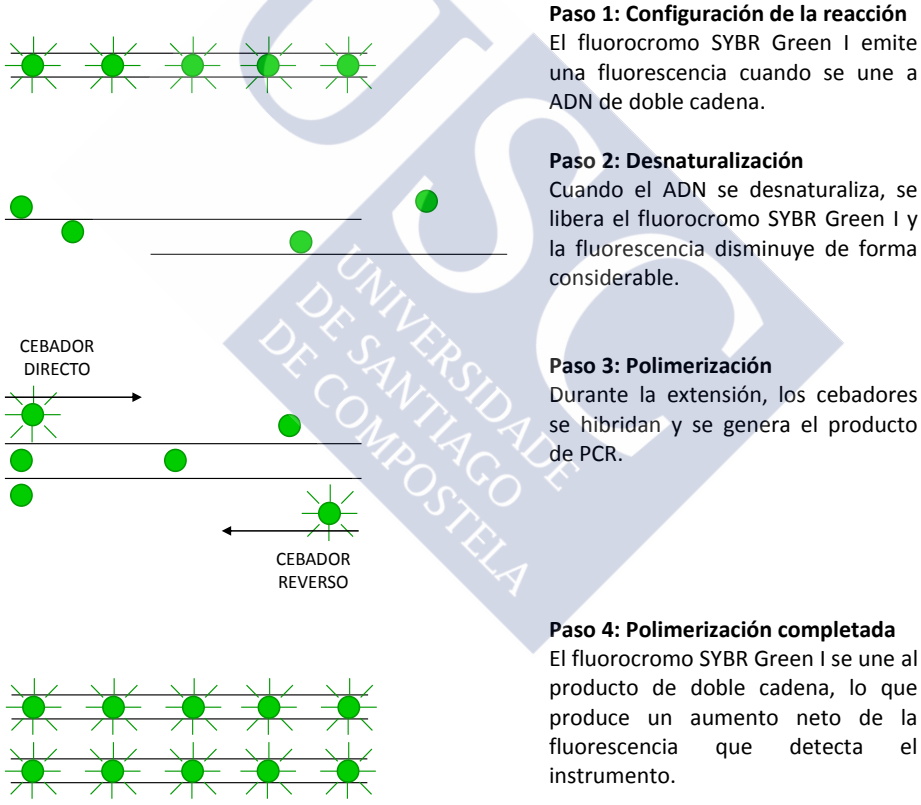

Figura 15. Funcionamiento del fluorocromo SYBR Green I en una PCR a tiempo real (Imagen modificada de: "Guía de reactivos *Applied Biosystems StepOne™ Real Time PCR System*").

La composición de la solución de la PCR (10µl) fue la siguiente: 5µl de ADNc y 5µl de SYBR Green PCR master Mix (BioRad, CA, EE.UU.) que contiene una mezcla de: iTaq polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$, fluorocromo SYBR® Green I, potenciadores, estabilizadores y fluoresceína. A los 5µL SYBR Green PCR master Mix se añadieron los *primers* específicos para los genes diana y los genes de referencia: *sense* y *antisense* a concentración 10 µM. Los *primers* empleados (Biolegio, Países Bajos) en la PCR a tiempo real se muestran en la tabla 5.

Gen	Secuencia del *primer*	Especie
18S	s: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' a:5'- CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'	Ratón
β-actina	s:5'-CCAAGCGAGAAGATGA-3' a: 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'	Humana
Epac-1	s: 5'- GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGCTGCAGTACTGGGTG-3' a:5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCTGCTGGACATAAGC-3'	Ratón
PKA-RIIα	s:5'-GAAGATCGTGTGTGGGAAGGT -3' a: 5'-TGACCCATTCTTGAGGTTC -3'	Humana
VE-cadherina	s:5'-GTTCACCTTCTGCGAGGATA -3' a: 5'-GTAGCTGGTGGTGTCCATC -3'	Humana

Tabla 5 Secuencia de *primers* empleados en PCR en tiempo real. s: *primer* sentido; a: *primer* antisentido.

La PCR se realizó en el instrumento de detección VIAA-7 (Applied Byosystem, CA, EE.UU) siguiendo procedimientos estandarizados. Cada reacción se realizó por duplicado. Como genes de referencia se emplearon β-actina en las muestras procedentes de células HCAEC y 18S en la retina aislada de ratón.

5 Microscopía de fluorescencia

5.1 Principio de fluorescencia

El funcionamiento del microscopio de fluorescencia se basa en el uso de moléculas denominadas fluorocromos. Los fluorocromos presentan la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica. La parte de la molécula que emite fluorescencia se denomina fluoróforo. En este proceso de fluorescencia se distinguen tres etapas: excitación, pérdida de energía y emisión. Durante la etapa de excitación la molécula absorbe un fotón procedente de una fuente de luz externa y, como consecuencia, pasa del estado fundamental a un estado excitado caracterizado por un nivel energético superior (etapa de excitación). Rápidamente la molécula pasa al modo vibracional (menor energía que el estado excitado), disipándose energía en forma de calor (etapa de pérdida de energía). Posteriormente, la molécula tiende a pasar de nuevo al estado fundamental a través de un proceso mediante el cual emite energía en forma de luz (etapa de emisión). Durante este proceso se produce una pérdida de energía, por lo que la longitud de onda del fotón emitido (λ_{em}) es siempre mayor que la longitud de onda del fotón absorbido por la molécula (λ_{ex}). A esta diferencia en las longitudes de onda se la conoce como desplazamiento de Stokes.

Los fluorocromos pueden tener afinidad por distintos elementos celulares o pueden estar acoplados químicamente a otras moléculas, como anticuerpos, que reconocen específicamente cierto componente celular. Cuando el fluorocromo se conjuga a un anticuerpo la técnica se denomina inmunofluorescencia, en la cual se distinguen dos tipos principales de marcaje:

- Método de marcaje directo: consiste en el uso de un anticuerpo primario ligado a un fluoróforo que reacciona directamente con el antígeno objeto de estudio si éste se encuentra presente.

- Método de marcaje indirecto: consiste en el uso de un anticuerpo primario no marcado, que se une específicamente al antígeno diana, y de un anticuerpo secundario, que lleva el fluoróforo, que reconoce al anticuperpo

primario y se une a él. Varios anticuerpos secundarios pueden unirse a un anticuerpo primario; lo que proporciona una amplificación de la señal debido al aumento del número de moléculas de marcadores fluorescentes por antígeno.

En el presente trabajo hemos empleado la microscopía de fluorescencia para medir los cambios producidos en la $[Ca^{2+}]_i$ y para estudiar los incrementos de la concentración de óxido nítrico (NO) libre en células HUVEC. En otra serie de experimentos se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para determinar los cambios en la expresión de distintas proteínas en células HCAEC y en retina aislada de ratón

5.2 Descripción del microscopio de fluorescencia y del microscopio confocal

El microscopio de fluorescencia es similar a un microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz de excitación (proveniente de una lámpara halógena) es refinada mediante un monocromador antes de incidir sobre la muestra (figura 16). Además, en el camino óptico de un microscopio de fluorescencia hay un espejo dicroico que refleja la luz de excitación e incide sobre la muestra excitando al fluoróforo. Éste emite fotones a una longitud de onda mayor que la incidente. La luz emitida por la muestra atraviesa el espejo dicroico y llega a un filtro de emisión que selecciona la longitud de onda de emisión (λ_{em}) óptima para el fluoróforo.

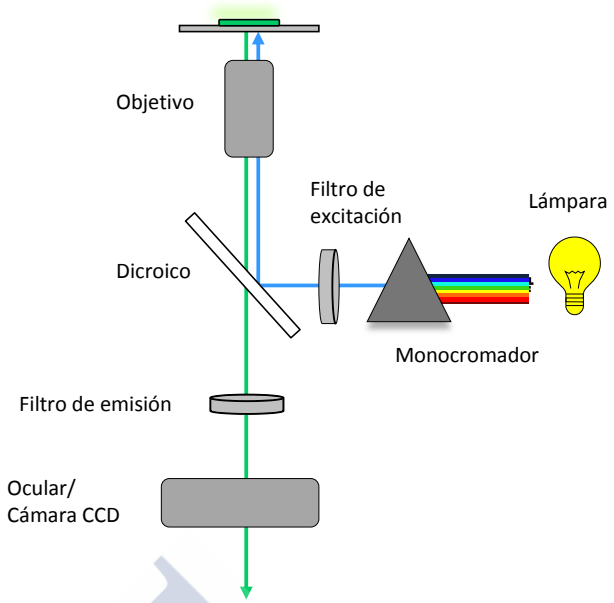

Figura 16. Esquema del camino óptico en un microscopio de epifluorescencia.

El microscopio confocal es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar y/o reconstruir imágenes tridimensionales. El principio de microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde, 1988).

En la figura 17 se representa el funcionamiento de un microscopio confocal. La luz procedente de un láser, atraviesa un primer diafragma y es reflejada mediante un espejo dicroico y enfocada en un punto de la muestra mediante la lente de un objetivo. La señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicroico y es enfocada en un fotomultiplicador; un diafragma o *pinhole* es colocado delante del fotomultiplicador para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco.

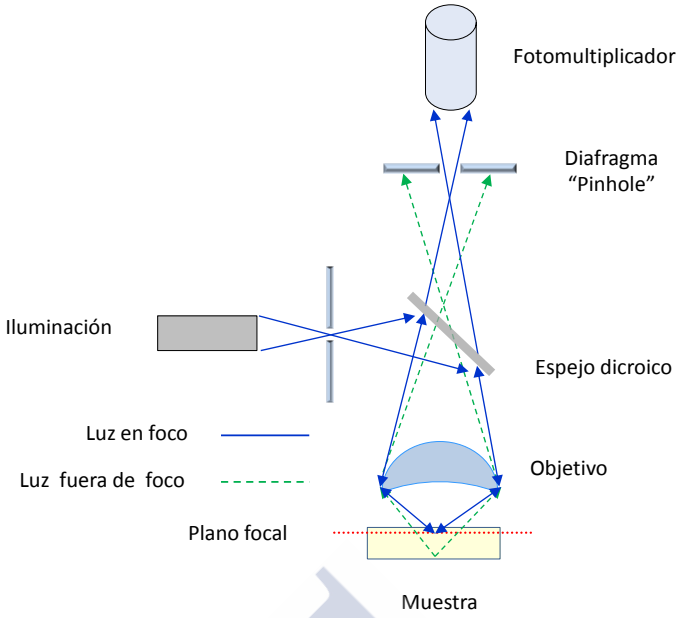

Figura 17. Esquema del principio de microscopía confocal. La luz procedente de los puntos fuera del plano focal es eliminada por el diafragma o *pinhole*. (Imagen adaptada de "Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría". Sampedro *et al*., 1995).

5.3 Medida de calcio y óxido nítrico mediante sondas fluorescentes

Las medidas de la producción de NO en las células HUVEC se efectuaron empleando la 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), una sonda intracelular no ratiométrica que aporta información sobre los incrementos del NO libre en el interiorcelular. El DAF-2 reacciona con el NO en presencia de oxígeno para producir triazolofluoresceína (DAF-2T), un compuesto altamente fluorescente. La fluorescencia se monitoriza empleando una λ_{ex} de 485 nm y una λ_{em} de 538 nm (figura 18 B).

Las medidas de la $[Ca^{2+}]_i$ se llevaron a cabo empleando fura-2. Este fluorocromo, al unirse al Ca^{2+}, muestra un desplazamiento en su espectro de absorción entre 300 y 400 nm cuando se monitoriza su emisión a 510 nm (figura 18 A). De ese modo, mediante una excitación dual (λ_{ex}= 340 y 380 nm), se obtienen dos imágenes de emisión diferentes y con la relación entre ambas se pueden conocer las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en la región seleccionada (de ahí la denominación de sonda ratiométrica).

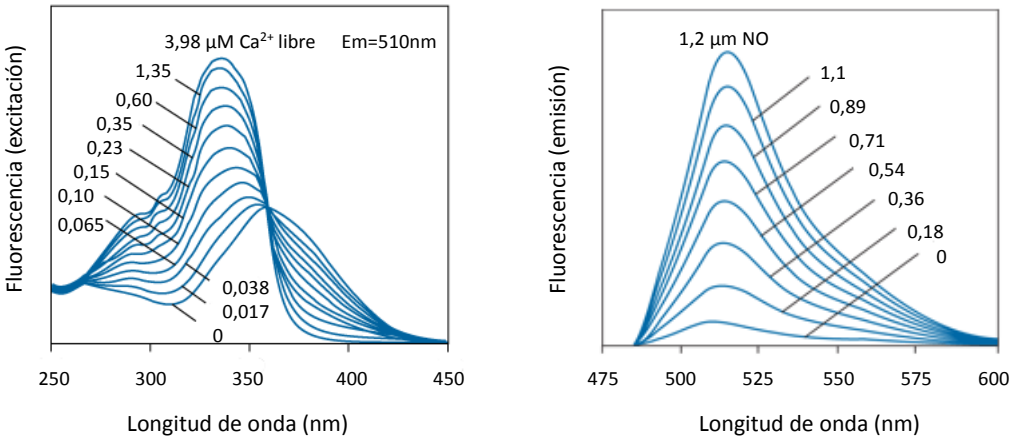

Figura 18. A) Espectro de excitación del fura-2 en medios con diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre (0-3,98 µM). B) Espectro de emisión del DAF-2 en medios con diferentes concentraciones de NO (0–1,2 µM) (Disponible en la web: http://www.b2b.invitrogen.com).

Para la realización de estos experimentos, las células se sembraron a baja densidad (~1500 células/cm^2) en placas Petri de 35 mm de diámetro a las que previamente se había practicado un orifico de 20 mm de diámetro para sustituir la superficie de plástico por una de vidrio (0,1 mm de grosor) que permita la transmisión de los haces de luz de excitación y emisión. Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo de 2 a 4 días antes de la realización de los experimentos.

Los protocolos de carga con las sondas fluorescentes fueron similares para los dos fluorocromos utilizados. Para ello, se emplearon los derivados fura-2 acetoximetiléster (fura-2 AM) y DAF-2 diacetato (DAF-2 DA) que pueden atravesar por difusión la membrana celular. Una vez en el interior celular, estos derivados son transformados por las esterasas intracelulares en fura-2 y DAF-2, que no atraviesan la membrana, quedando así retenidos en el citoplasma celular (figura 19). Las soluciones de carga fueron preparadas el mismo día de los experimentos en solución externa normal (SN; composición en mM: NaCl 140, KCl 5, CaCl2.H2O 1,5, MgCl2 2, HEPES 10, glucosa 11, pH 7,4) a partir de las correspondientes soluciones stock, de modo que la concentración final fuese de 2,5 µM y 5 µM para el fura-2 AM y el DAF-2 DA, respectivamente. Las células fueron incubadas durante 60 min a 37

°C con 1 mL de solución de carga por placa. Posteriormente, se realizaron dos lavados con SN para eliminar los restos de sonda que no difundieron al interior celular y se dejaron las células en el incubador (37 °C) durante 10-15 minutos para que las esterasas intracelulares hidrolizasen las formas esterificadas de las sondas dejando las formas ácidas libres. Para el estudio de los incrementos de la concentración de NO, se incorporó a la solución de carga y a la SN, L-arginina (100 µM).

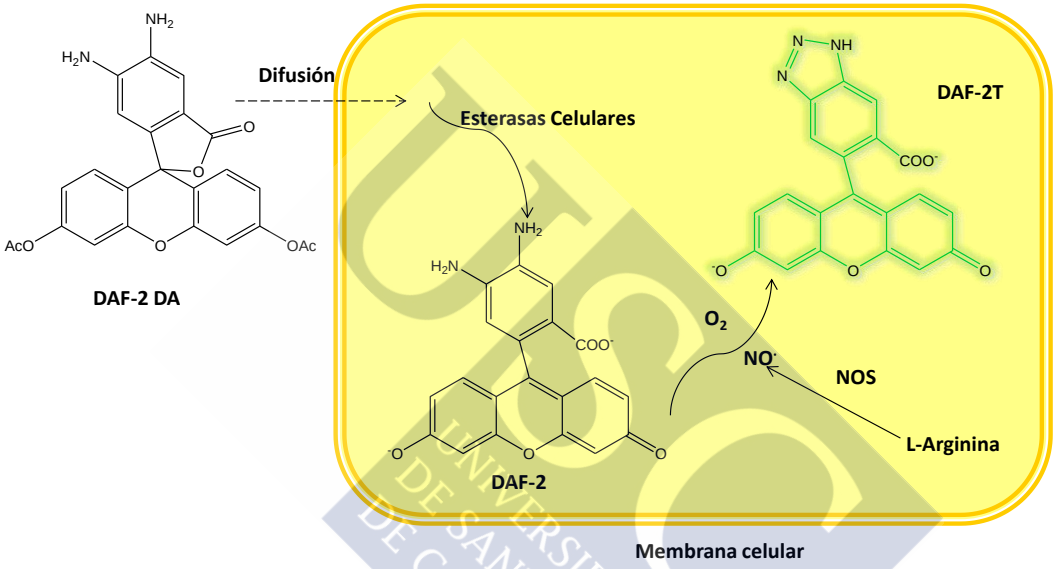

Figura 19. Principio de detección de de la producción de NO con la sonda DAF-2 DA.

Para la realización de estos experimetos se empleó un microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert 135, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un objetivo de fluorita (Plan-Neofluar, 63X/1,25 aceite, Carl Zeiss). El equipo consta además de una cámara CCD (Rolera XR Monofast 1394 refrigerada; QImaging®, Surrey, Canada) capaz de digitalizar la información lumínica.

En nuestros experimentos con fura-2, las muestras fueron excitadas alternativamente a 340 ± 10 nm y a 380 ± 10 nm, (100 ms de tiempo de exposición para cada longitud de onda) la luz fue reflejada empleando el espejo dicroico de 400 y la fluorescencia emitida fue filtrada con el filtro de 510 ± 20 nm. Para los experimentos de medición de los niveles intracelulares de NO, las células fueron

excitadas a 490 ± 10 nm (40 ms de exposición) para la visualización de la fluorescencia emitida por el DAF-2T generado tras la unión de la sonda DAF-2 al NO. La luz de excitación se reflejó por medio de un espejo dicroico de 500 nm y la fluorescencia emitida se recogió tras atravesar un filtro de 510 ± 20 nm.

En los experimentos realizados para ambas sondas se adquirieron 2-4 imágenes de emisión de fluorescencia para cada longitud de onda de excitación, con las que el programa informático realiza una media. Las imágenes así obtenidas fueron registradas cada 2-5 s y almacenadas para su análisis posterior mediante el programa MetaFluor 7.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, EE. UU.).

Dependiendo del protocolo a seguir, en algunos experimentos se empleó una solución libre de Ca^{2+} (S0Ca^{2+}; composición en mM: NaCl 140, KCl 5, $MgCl_2$ 2, EGTA 10, HEPES 10, glucosa 11, pH 7,4) y antes de la realización de los experimentos se añadió un agente quelante de Ca^{2+}, el BAPTA-AM (10 µM).

Los fármacos (o los vehículos para los correspondientes experimentos control) fueron añadidos en volúmenes de 2 a 20 µl a un volumen final de 2 ml de SN o S0Ca^{2+} según el protocolo. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (~20 °C) para minimizar la compartimentalización y la extrusión de la célula de la sonda fluorescente. Como control positivo de la técnica al finalizar los experimentos se añadió ionomicina (1µM) o nitroprusiato sódico (100 µM) para los experimentos de medida de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la liberación de NO, respectivamente.

5.4 Microscopía de inmunofluorescencia o inmunotinción

La técnica de inmunofluorescencia fue empleada para el estudio de los cambios en la expresión de proteínas en células HCAEC y en retina asilada de ratones modelo OIR y ratones control. Dependiendo de la proteína objeto de estudio y del tipo de muestra, se emplearon diferentes protocolos y distintos equipos de microscopía de fluorescencia, los cuales se describen en detalle a lo largo de este apartado.

5.4.1 Estudio de los efectos de la hipoxia sobre la expresión de distintas proteínas en células HCAEC

Para el estudio en los cambios de la expresión de las proteínas Arginasa II, eNOS, Epac-1, PKA-RIIα y VE-cadherina se emplearon células HCAEC. Las células (30.000 células/cm^2) fueron cultivadas en placas de 8 pocillos (Lab-Tek Chamber Slide, Nalge Nunc. International, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) hasta alcanzar la confluencia. A continuación, se mantuvieron cultivos en paralelo en condiciones de normoxia o hipoxia, tal y como se indica en el apartado 2.2 de esta sección, durante 24 h antes de realizarse la inmunotinción.

Para la preparación de la muestra, las células fueron fijadas con PFA al 2% en PBS durante 30 minutos, tras lo cual, fueron rehidratadas con PBS (10 minutos). A continuación, para permitir la entrada de los anticuerpos en el interior celular, se empleó como agente permeabilizante un detergente no iónico, Tritón X-100 al 0,3% en PBS. Este agente no se empleó para el estudio de la VE-cadherina, ya que se trata de una proteína transmembrana. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron durante 10 minutos con seroalbúmina bovina (BSA) disuelta al 2% en PBS (solución de bloqueo) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos.

A continuación, las muestras se incubaron con la dilución adecuada de anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Las diluciones de anticuerpo primario empleadas aparecen detalladas en la tabla 6. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS conteniendo Tween-20 al 0,05%.

Al día siguiente se realizó una segunda incubación con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con distintos fluorocromos: Alexa Fluor® 488 policlonal anti-conejo o Alexa Fluor® 594 policlonal anti-conejo, (ambos de Molecular Probes, Invitrogen, OR, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La dilución empleada para ambos anticuerpos secundarios fue 1:250 en una solución de DAPI (1:5000), empleado para teñir el núcleo celular y suplementado con un 10% de suero humano natural. Transcurrido este tiempo, se añadió una gota

de Citifluor AF1 (Agar Scientific, Essex, Reino Unido), para preservar la fluorescencia de los fluorocromos.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario
Arginasa II	Santa Cruz	1:100	Conejo
eNOS	BD Biosciences	1:200	Conejo
Epac-1	Abcam	1:100	Conejo
PKA-RIIα	Santa Cruz	1:100	Conejo
VE-cadherina	Cell Signalling	1:150	Conejo

Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección por fluorescencia en células HCAEC.

La adquisición de imágenes en aquellas muestras para el estudio de la expresión de la PKA-RIIα y de la Arginasa II se realizó mediante microscopía de inmunofluorescencia con un microscopio automatizado Leica DMRXA (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), usando un objetivo de 40x en aceite de inmersión. Las muestras fueron excitadas alternativamente a diferentes longitudes de onda para la visualización de los fluorocromos: a ~365 nm para el DAPI y a ~485 nm para el AlexaFluor® 488. La fluorescencia emitida se monitorizó tras atravesar los filtros correspondientes. Posteriormente, las imágenes fueron visualizadas con el software Leica QWin (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Las preparaciones para la determinación de la expresión de la eNOS, Epac-1 y VE-cadherina fueron observadas en un microscopio de barrido láser confocal (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) en el Centro de *Imaging* y Microscopía perteneciente al Centro Médico de la Universidad de Groningen (Países Bajos). Para la realización de este experimento, las muestras fueron excitadas a diferentes longitudes de onda: a ~405 nm para el fluorocromo DAPI y a ~638nm para el fluorocromo AlexaFluor® 594. Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo de 40x de inmersión en aceite y de 1,3 de apertura numérica.

5.4.2 Estudio de los efectos de la hipoxia sobre la expresión de la Epac-1 en modelo de ratón OIR

En otra serie de experimentos se empleó la inmunotinción para el estudio en los cambios de la expresión de la Epac-1 en secciones preparadas a partir de retinas aisladas de ratones control y ratones modelo OIR.

Las retinas aisladas fueron cortadas en secciones de 4 µm en el interior de un criostato. Las secciones obtenidas fueron recogidas en un portaobjetos y se dejaron secar al aire durante 1 hora. La fijación del tejido se realizó con acetona durante 20 minutos. A continuación, las muestras fueron rehidratadas con PBS (3 veces/5 minutos). Se añadió BSA al 2% en PBS durante 20 minutos como solución de bloqueo. Luego, se incubó con el anticuerpo primario Epac-1 policlonal anti-conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido) en una dilución 1:100 durante toda la noche a 4°C, tras el lavado de las muestras como se describe en los protocolos anteriores se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario (anti-conejo) conjugado con el fluorocromo AlexaFluor® 594 (Molecular Probes, Invitrogen, OR, EE.UU.) a una dilución 1:500 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar un nuevo lavado de las muestras, se añadió una gota de Citifluor AF1 (Agar Scientific, Reino Unido) sobre las secciones de tejido y se conservaron las muestras a 4 °C hasta la adquisición de imágenes. Las muestras fueron observadas con el sistema TissueFAXs (Tissuegnostics Gmbh, Vienna, Austria) en el Centro de *Imaging* y Microscopía perteneciente al Centro Médico de la Universidad de Groningen (Países Bajos). Este sistema está compuesto por un microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 y de un software de adquisición de imágenes (TissueFAXs, Tissuegnostics Gmbh, Vienna, Austria). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo de 40x de inmersión en aceite y las muestras fueron excitadas a ~535 nm.

6 Inmunodetección de la expresión de proteínas ("Western Blot")

6.1 Inmunodetección de la expresión de proteínas en células HUVEC

I. Determinación de la concentración proteica en células HUVEC

Para los experimentos de expresión proteica, se cultivaron las células HUVEC hasta su confluencia, y se trataron durante 30 minutos con los correspondientes fármacos o el vehículo control.

Para la lisis celular se empleó tampón RIPA frío (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton-X -100 1%, desoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, pH 8), al que se le añadió un cocktail de inhibidores de proteasa (Roche Diagnosis, Mannheim, Alemania) y un coctail de inhibidores de fosfatasa 3 (Sigma Aldrich, St.Louis, MO; EE.UU). Las células se mantuvieron en agitación constante durante 30 min a 4°C y se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 *g* a 4°C, tras lo cual se obtuvieron los extractos proteicos totales en el sobrenadante.

La cantidad total de proteína en la muestra se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a cuprosos en medio alcalino. Los iones cuprosos reaccionan con el BCA para formar un compuesto de color púrpura, que es proporcional al contenido de proteína de la muestra. La lectura de la absorbancia se realizó a ~562 nm en un lector multifuncional de placas (Fluostar Optima™, BMG Labtech, GmBh Offenburg, Alemania).

Para cuantificar la proteína se realizó una curva patrón con diferentes cantidades de BSA diluída en el tampón en el que se disuelve la muestra. La concentración de proteína se calculó por interpolación en la curva patrón obtenida con BSA.

II. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de la expresión de proteínas ("western blot") en células HUVEC

La expresión de las proteínas objeto de estudio se determinó mediante separación electroforética en geles de policarilamida en presencia de dodecil

sulfato sódico (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) al 10%, y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa empleando procedimientos estandarizados de *western blot,* tal y como se detalla a continuación.

Los lisados celulares conteniendo 30 µg de proteína se diluyeron en tampón de carga, cuya composición fue la siguiente: SDS 2,4%; solución de Laemmli (azul de bromofenol 0,001%; glicerol 10%; Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8) 23% y β-mercaptoetanol 0,05%. A continuación las muestras fueron reducidas y desnaturalizadas por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos. La composición de los geles de poliacrilamida fue la siguiente: poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 29:1) en tris-HCl 0,37 M 10%, SDS 0,1%, persulfato amónico (PSA) 0,25%, TEMED 0,06%, pH 8,8, para el gel de desarrollo. Se dejó polimerizar durante 1 h aproximadamente antes de añadir el gel concentrador (composición: poliacrilamida en Tris-HCl 0,125 M 4%, SDS 0,1%, PSA 0,1% y TEMED 0,001%; pH 6,8).

Las electroforesis fueron realizadas a 120 V durante 1 hora y media, en tampón de electrodos (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%; pH 8,3).

Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas estudiadas se utilizó el reactivo Page *Ruler™ Plus prestained protein ladder* (Fermentas, Thermo Ontario, Canadá), que abarca un amplio rango de pesos moleculares (10-250 kDa).

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas mediante un sistema comercial denominado *iBlot ™ Dry Blotting System* que consiste en una unidad eléctrica de transferencia (*iBlot ™ Gel Transfer Device*, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU) que permite una transferencia rápida y en seco de las proteínas. Para ello dispusimos de un kit comercial desechable (*IBlot™ Gel Transfer Stacks nitrocellulose regular*, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU), que posee una membrana de nitrocelulosa integrada, un electrodo de cobre y el ánodo y cátodo apropiados, en una matriz de gel que permite la transferencia de proteínas.

Una vez finalizada la transferencia se bloquearon los sitios activos remanentes de las membranas con tampón TBS (composición en mM: Tris-HCl 50; NaCl 150 pH

7,4) con 0,1% de Tween-20 y 3% de BSA (solución de bloqueo), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se procedió a la incubación de las membranas con el correspondiente anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados fueron: eNOS policlonal anti-ratón y eNOS pS1177 policlonal anti-ratón, dilución 1:500 (ambos de BD, Biosciences, San Jose, CA, EE.UU). Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos de las membranas con tampón TBS con 0,1% de Tween-20.

A continuación, se realizó una segunda incubación con un anticuerpo secundario correspondiente al primario (monoclonal anti-ratón, dilucion 1:1000 conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h en agitación en tampón TBS con 0,1% de Tween-20. Transcurrido este tiempo, se procedió al lavado de las membranas con tampón TBS conteniendo 0,1% de Tween-20 (3 lavados de 5 min).

El revelado de las membranas se efectuó con una cámara CCD de captura de luminiscencia (Fluo-Chem FC2 MultiImage II; Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE. UU.) y mediante el empleo de un sustrato quimioluminiscente (ECL) para la peroxidasa de rábano (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.). El análisis densiométrico de las bandas se realizó mediante el software Image J version 1.45s (National Institues of Health, MD, EE.UU).

6.2 Inmunodetección de la expresión de proteínas en homogeneizado de aorta de rata

I. Determinación de la concentración proteica en homogeneizado de aorta de rata

Para la realización de estos experimentos, se emplearon ratas albinas macho de la cepa WKY y la extracción de la aorta se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.3 de esta sección.

Para investigar expresión de las proteínas Epac-1 y Epac-2, las aortas se lavaron en PBS frío, se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA frío complementado con un cocktail de inhibidores de proteasa (Roche Diagnosis, Mannheim, Alemania).

Para investigar la expresión y fosforilación de la proteína VASP las aortas se incubaron en KBS con el vehículo (control) o el fármaco a estudiar durante 10 minutos a 37 °C. A continuación se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en tampón de lisis Tris-Tritón frío composición en mM: NaCl 100, Tris–HCl 10, EDTA 1, EGTA 1, Triton X-100 1%, glicerol 10%, deoxicolato de sodio 0,5% y SDS 0,1%; pH 7.4) complementado con un cocktail de inhibidores de proteasa (Roche Diagnosis, Mannheim, Alemania) y un cocktail de inhibidores de fosfatasas 3 (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, EE.UU).

A continuación los homogeneizados se sonicaron y se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 *g* a 4 °C. La cantidad total de proteína en la muestra se determinó mediante el método del BCA (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de la expresión de proteínas ("western blot") en homogeneizado de aorta de rata

El protocolo empleado para la realización de la electroforesis, la electrotransferencia y la inmunotedección fue el mismo que el descrito para células HUVEC con la diferencia de que se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de concentración 8% de poliacrilamida. Los anticuerpos primarios empleados fueron: Epac-1 policlonal anti-ratón, Epac-2 policlonal anti-ratón, ambos diluidos 1:500 en solución de bloqueo (ambos de Cell Signalling, Danvers, MA, EE.UU) y GADPH policlonal anti-ratón, diluido 1:1000 en solución de bloqueo (Santa Cruz, California, EE.UU). Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo monoclonal anti-ratón o monoclonal anti-conejo según correspondiese conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), diluidos 1:1000.

6.3 Inmunodetección de la expresión de proteínas en células HCAEC

I. Determinación de la concentración proteica en células HCAEC

Para la lisis celular se empleó tampón comercial RIPA frío (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasa y un cocktail de inhibidores de fosfatasas 3 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EE.UU). Para la extracción proteica las muestras fueron sonicadas durante 1 minuto y posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 16.000 *g* a 4 °C.

La cantidad total de proteína en la muestra se determinó mediante el sistema *DC* protein assay, (BioRad CA, EE.UU). Se trata de un método colorimétrico basado en el ensayo de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y que presenta ciertas modificaciones que nos permite la realización del experimento en menos tiempo. La reacción se desarrolla en dos fases:

1.-Reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+}.

2.-Reducción del reactivo de Folin por las proteínas que reaccionaron con el Cu^{2+}, obteniéndose un color azulado, que es proporcional al contenido de proteína de la muestra.

La lectura de la absorbancia se realizó a ~750 nm en un lector multifuncional de placas y la cuantificación de la concentración de proteína se realizó de igual forma que en las células HUVEC mediante una curva patrón de BSA.

II. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de la expresión de proteínas ("western blot") en células HCAEC

Mediante técnicas estandarizadas y siguiendo un protocolo similar al empleado en células HUVEC, de cada muestra se separaron 30 µg de proteína mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de concentración variable de poliacrilamida (7,5-12,5%). Posteriormente se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF).

El método de detección empleado en esta serie de experimentos fue el de detección directa de fluorescencia infrarroja: *Odyssey Infrared Imaging System* (Li-COR Biosciences, NE, EE.UU). Para ello, se bloqueó la membrana durante una hora temperatura ambiente con solución de bloqueo (*Odyssey® Blocking Buffer*, Li-COR Biosciences, NE, EE.UU) específica para este método de detección. Para los lavados posteriores de la membrana y la incubación con el anticuerpo primario se siguió el mismo protocolo descrito para células HUVEC.

Los anticuerpos primarios empleados con sus correspondientes diluciones se detallan en la tabla siguiente:

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario
β-actina	Sigma	1:2000	Ratón
eNOS	BD Biosciences	1:500	Ratón
eNOS pS1177	BD Biosciences	1:500	Ratón
Arginasa II	Santa Cruz	1:1000	Conejo
PKA-RIIα	Santa Cruz	1:1000	Conejo
Epac-1	Cell Signalling	1:1000	Ratón
Epac-2	Cell Signalling	1:500	Ratón
VE-cadherina	Cell Signalling	1:1000	Conejo

Tabla 7. Lista de anticuerpos empleados para la detección de la expresión de proteínas en células HCAEC.

A continuación se incubaron las membranas durante una 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico acoplado a un tinte fluorescente visible en el espectro infrarrojo: IRDye®800 policlonal anti-ratón ó IRDye® 680 policlonal anti-conejo (Li-COR Biosciences NE, EE.UU), ambos diluidos 1:10.000 en solución de bloqueo. Tras lavar la membrana con tampón TBS con un 0,1% de Tween-20 (3 lavados de 5 min), las membranas se escanearon empleando el instrumento Odyssey®CLx (Li-COR Biosciences NE, EE.UU) que consta de dos láser de excitación infrarroja (700 y 800 nm), permitiéndonos la visualización de las

bandas. El análisis densiométrico de las bandas se realizó mediante el software Image J version 1.45s (National Institues of Health, MD, EE.UU).

7 Liberación de NO en células HCAEC

En estos experimentos se determinó la producción de NO en células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia y en condiciones normales. Para ello se sembraron células HCAEC en placas transparentes de 24 pocillos (40.000 células/cm^2) previamente recubiertos con solución de gelatina al 0,1% en PBS. Transcurridas 48 h alcanzaron la confluencia y las células se mantuvieron durante 2 h en medio de cultivo carente de suero.

Seguidamente, las células fueron tratadas con los fármacos a estudiar o con el correspondiente vehículo. Como control positivo de la técnica se empleó nitroprusiato de sodio (100 µM). A continuación, se mantuvieron cultivos paralelos de células en el incubador durante 24 horas a 37 °C en condiciones de hipoxia o en condiciones de normoxia.

Transcurrido este tiempo se procedió a la cuantificación de nitritos presentes en el sobrenadante. Para ello se empleó un kit comercial de alta sensibilidad *Measure-IT™ High-Sensitivity Nitrite Assay Kit* (Molecular Probes™, Invitrogen detection technologies; Eugene, EE.UU.) que nos permite la detección de nitritos que se encuentran a concentraciones en el rango picomolar. Los nitratos son analizados tras su conversion enzimática a nitritos, por lo que este ensayo nos permite una cuantificación efectiva de la generación de NO. Los nitritos presentes en el sobrenadante se determinaron siguiendo las intrucciones del fabricante. Al finalizar el ensayo se obtiene un producto fluorescente que es proporcional a la cantidad de nitritos generados.

La fluorescencia de los sobrenadantes se midió a temperatura ambiente empleando un lector de placa (Varioskan®, Thermo Scientific, MA, EE.UU). Las λ_{ex} y de λ_{em} empleadas fueron ~365 nm y ~450 nm, respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron corregidos determinando la concentración de proteína para cada muestra, para ello se empleó un ensayo modificado de Lowry (BioRad, VA, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8 Citometría de flujo

8.1 Definición de la citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que se basa en la medida de la emisión de la fluorescencia y de la dispersión de la luz al hacer pasar una suspensión de células alineadas, arrastradas por un flujo portador frente a un sistema de detección (haz de láser focalizado con el que interacciona físicamente).

La dispersión de la luz viene determinada por diferentes características celulares y se clasifica en:

- Luz dispersa de ángulo pequeño, *Forward Scatter* (FSC): luz dispersada frontalmente en un ángulo cónico pequeño (0-10 grados) casi coincidente con la luz incidente. Es un parámetro que resulta proporcional al tamaño de la partícula causante de la dispersión de la luz.
- Luz dispersa en ángulo recto, *Side Scatter* (SCC): luz dispersada a 90 grados del eje de la luz incidente y es proporcional a la complejidad estructural interna de la partícula. También se la designa luz dispersa obtusa, lateral u ortogonal.

Además de señales de luz dispersa, los citómetros de flujo están diseñados para generar, captar y analizar simultáneamente diversas señales de fluorescencia, ya sea porque las partículas analizadas sean autofluorescentes o porque llevan incorporados determinados fluorocromos. Esta fluorescencia emitida es recogida en la misma dirección que el *Side Scatter*, aunque en este caso los fotones atraviesan una serie de filtros adaptados a la longitud de onda de la fluorescencia que se quiere detectar, antes de llegar al detector correspondiente.

8.2 Componentes de un citómetro de flujo

Los componentes básicos de un citómetro de flujo son:

- Sistema hidraúlico: controles neumáticos y fluidos para establecer un flujo laminar que permita a la suspensión celular atravesar la cámara de flujo. Las células o partículas son expuestas una a una a un haz iluminador.

El flujo laminar que se produce en el citómetro es el resultado de la interacción de dos tipos de fluidos: el fluido de la muestra y el fluido de la vaina. Los dos fluidos se hacen coincidir en la cámara de flujo. En ésta, la muestra es inyectada coaxialmente a través de una aguja, estrechada en su extremo, en el seno del fluido de la vaina, confinado en un embudo que en su extremo también se estrecha, adoptando una forma trombocónica.

La geometría cónica de la cámara y la diferencia de presiones/velocidades de los dos fluidos configuran el enfoque hidrodinámico de la muestra. El fluido de la vaina se hace circular a una velocidad constante, siempre mayor que la de la muestra. Como resultado de todo ello, las partículas son forzadas a alinearse a su paso por el centro del orificio de salida, y el fluido de la muestra se hace uniforme y estable, envuelto por el de la vaina.

- Sistema de iluminación: Suele ser un rayo láser monocromático, unidireccional, que puede ser focalizado con relativa facilidad hacia dimensiones muy pequeñas. La mayor parte de los citómetros utilizan luz láser de Argón.

- Sistema óptico: Está constituído por lentes focalizadoras, filtros ópticos y detectores.

Las lentes focalizadoras tienen por objeto conducir, focalizar y conformar el rayo láser en la cámara de detección, dónde interactúa con las partículas, con la mayor iluminación y excitación posibles.

Los filtros ópticos se intercalan para dirigir y/o seleccionar convenientemente las señales de luz dispersa y de fluorescencia hacia los detectores. Por último

los detectores reciben las señales de luz dispersa y de fluorescencia y convierten los fotones en pulsos eléctricos.

Normalmente los citómetros poseen cinco sistemas ópticos de medidas, dos de dispersión (uno hacia delante y otro en ángulo recto) y tres de fluorescencia.

- Sistema electro-informático: Transforma la luz dispersa en señales eléctricas y las procesa para su análisis.

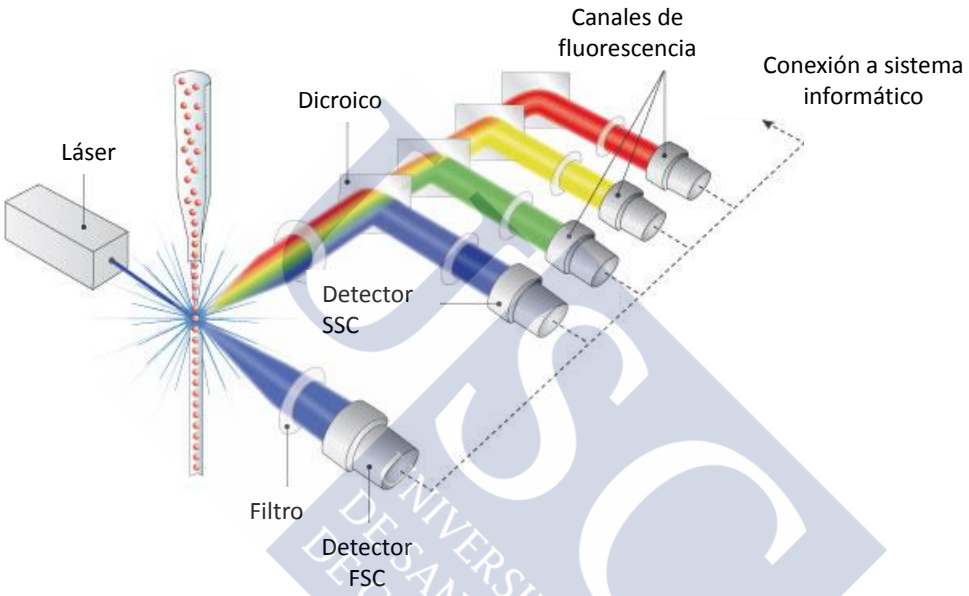

Figura 20. Esquema de los componentes de un citómetro de flujo. (Imagen modificada de Biotech Spain).

8.3 Detección de EROs mediante citometría de flujo

La detección de EROs intracelular se realizó mediante citometría de flujo empleando la sonda 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU).

En estos experimentos se determinó la producción de EROs intracelular en células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia y de normoxia. Para ello se sembraron células HCAEC en placas transparentes de 6 pocillos (40.000 células/cm^2) recubiertos con solución de gelatina al 0,1% en PBS. Transcurridas 48 h, las células

alcanzaron la confluencia y se procedió a cambiar el medio de cultivo por medio carente de suero durante las dos horas previas a realizar el tratamiento.

Seguidamente, las células fueron tratadas con el fármaco a estudiar o con el correspondiente vehículo, tras lo cual se mantuvieron cultivos celulares en paralelo durante 24 horas a 37 °C en condiciones de hipoxia o en condiciones de normoxia. Como control positivo de la técnica se empleó H_2O_2 (10 µM), que se añadió a los correspondientes pocillos 30 min antes de comenzar el experimento.

A continuación, se incubaron las células con la sonda DCFH-DA (50 µM) durante 10 min a 37 °C y se mantuvieron en el incubador en condiciones de normoxia o hipoxia. El DCFH-DA es de-esterificado en el interior celular y posteriormente oxidado por las EROs obteniéndose el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), que es altamente fluorescente.

Luego, las células fueron disociadas empleando Accutase™, centrifugadas a 100 *g* durante 5 minutos y resuspendidas en 100 µl de PBS. Seguidamente las muestras, protegidas de la luz, fueron analizadas empleando un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU). La fluorescencia del DCFH se monitorizó empleando una λ_{ex}~ 495 nm y una λ_{em} ~ 530 nm.

Se analizaron un mínimo de 12.000 eventos: células dentro de los parámetros de tamaño (*Forward Scatter*) y fluorescencia seleccionados previamente para cada muestra. Para el análisis de los resultados se empleó el software WinList versión 6.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU).

9 Ensayo de permeabilidad en células HCAEC

En estos experimentos se determinó la permeabilidad de la monocopa endotelial en células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia y en condiciones normales.

Para la realización de estos experimentos se empleó un sistema compuesto por una placa portadora de 24 pocillos (Nunc™ Carrier Plate System, Thermo Scientific, MA, EE.UU) y por 24 insertos con una membrana de policarbonato de

tamaño de poro 0,4 µm para el cultivo de células (Nunc™ Polycarbonate Membrane Inserts, Thermo Scientific, MA, EE.UU). Cada inserto contiene una cavidad de acceso basolateral que permite añadir medio de cultivo a la placa portadora. La densidad de poros de la membrana de los insertos permite a las células permanecer en contacto con el medio de cultivo.

Se sembraron células HCAEC en los insertos y se mantuvieron en cultivo durante 72 h o hasta que la monocapa de células endoteliales estuvo completamente formada. A continuación se añadieron los fármacos a estudiar y como control de la técnica se emplearon aquellos insertos en los que no se sembraron células. A continuación, y de forma paralela, se mantuvo una placa conteniendo los 24 insertos en un incubador en condiciones de normoxia y otra en condiciones de hipoxia. Tras 24 h de incubación los insertos se trasladaron a placas portadoras limpias y cada uno de los insertos se incubó con una solución de dextrano conjugado con la sonda fluorescente isotiocionato de fluoresceína (FITC) (500 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EE.UU) diluida 1:400 en medio de cultivo, durante 30 min y protegidos de la luz. Esta solución fluorescente atraviesa la monocapa de células endoteliales y la fluorescencia resultante en los pocillos de la placa portadora fue empleada como indicador del grado de permeabilidad de la monocapa. La fluorescencia se midió a temperatura ambiente empleando un lector de placa (Varioskan®, Thermo Scientific, MA, EE.UU). Las λ_{ex} y de λ_{em} empleadas fueron ~492 nm y ~450 nm, respectivamente.

10 Fármacos y reactivos.

Los fármacos y reactivos empleados en los experimentos fueron los siguientes:

Kit de determinación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA), ácido valproico, anticuerpo primario β-actina policlonal anti-ratón, anticuerpos secundarios monoclonal anti-ratón o policlonal anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), antibiótico-antimicótico (composición por mL: 10000 U de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B), L-

arginina, β-mercaptoetanol, BAPTA-AM, cocktail de inhibidores de proteasa, cocktail de inhibidores de fosfatasas 3, sonda 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA), dimetilsulfóxido (DMSO), EGTA, sonda FITC-dextrano, forskolina (FSK), sal sódica de heparina de mucosa intestinal porcina, hidrocloruro de acetilcolina (Ach), hidrocloruro de fenilefrina, HEPES, N-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), nitroprusiato sódico, LY-294,002 clorhidrato, *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+}, sal cálcica de ionomicina, sal sódica de N^6, 2'-O-dibutiril 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (db-cAMP), sal sódica de 8-(4-clorofeniltio)-3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (pCPT-cAMP), sal trietilamónica de Rp-3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (Rp-cAMPs), seroalbúmina bovina deslipidizada (BSA), Tritón X-100, Tween-20, 4'-6-diamidinofenilindol (DAPI) y wortmanina de *Penicillium funiculosum*, suministrados por (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU).

Compuesto C, suplemento del factor de crecimiento para células endoteliales (ECGS), KN-93, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), persulfato amónico (PSA) y dodecilsulfato sódico (SDS), suministrados por Merck Millipore (Damstadt, Alemania).

Tampón RIPA, suero fetal bovino (FBS) empleado en células HCAEC, sustrato quimioluminiscente para el revelado de las membranas de *western blot (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate)* y kit para la retrotranscipción reversa previa a la PCR en tiempo real (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)*, sumistrados por Thermo Scientific (Waltham MA, EE. UU).

Medio RPMI-1640, penicilina/estreptomicina (empleada en células HCAEC) y L-glutamina, suministrados por Lonza (Breda, Holanda).

3', 5'- monofosfato cíclico de N^6-Benzoiladenosina (6-Bnz-cAMP), 3- [5- (tert-Butil) isoxazol- 3- il]- 2- [2- (3- chorofenil) hidrazono]- 3- oxopropanenitrilo (ESI-09) y 8-(4-clorofeniltio)-3',5'-monofosfato cíclico de 2'-O-metiladenosina monosódico hidratado (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP), suministrados por Biolog (Bremen, Alemania)

Seroalbúmina bovina fracción V (BSA), cóctel de inhibidores de proteasas (CompleteMini® protease inhibitor Tablet), marcador de peso molecular de ADN

(DNA molecular weight XIV) y enzima Taq polimerasa, suministrados por Roche (Manheim, Alemania).

Medio DMEM/F12, suero fetal bovino (FBS), tripsina-EDTA, sonda fluorescente fura-2 acetoximetiléster (fura-2 AM), kit de determinación de nitritos (*Measure-IT™ High-Sensitivity Nitrite Assay Kit),* extracto pituitario bovino y Trizol®, suministrados por Invitrogen (Paisley, Reino Unido).

Anticuerpos secundarios, AlexaFluor® 594 policlonal anti-conejo y el AlexaFluor® 488 policlonal anti-conejo (empleados en inmunofluorescencia), suministrados por Molecular Probes (Invitrogen, OR, EE.UU.).

Solución de bloqueo (*Odyssey® Blocking Buffer*; empleada en la inmunodetección de la expresión de proteínas mediante fluorescencia infrarroja), anticuerpos secundarios IRDye®800 policlonal anti-ratón o IRDye® 680 policlonal anti-conejo, suministrados por Li-COR Biosciences (NE, EE.UU).

Anticuerpos primarios eNOS policlonal anti-ratón, eNOS policlonal anti-conejo y eNOS pS1177 policlonal anti-ratón, suministrados por BD, Biosciences (San Jose, CA, EE.UU).

Anticuerpos primarios Arginasa II policlonal anti-conejo, PKA-RIIα policlonal anti-conejo y GADPH policlonal anti-ratón, proporcionados por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, EE.UU.).

Anticuerpo primario Epac-1 policlonal anti-ratón, Epac-2 policlonal anti-ratón, VASP policlonal anti-conejo y VE-cadherina policlonal anti-conejo, suministrados por Cell Signalling (Danvers, MA, EE.UU.).

Anticuerpo primario Epac-1 policlonal anti-conejo, suministrado por Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Kit de determinación de proteína *DC* protein assay, kit de determinación de proteína modificado de Lowry, solución 30% acrilamida/bis-acrilamida 29:1 y SYBR® Green supermix, suministrados por BioRad (Hercules, CA, EE.UU).

Enzima retrotranscriptasa de ratón (M-MLV-RT), iniciadores aleatorios e inhibidores de RNasa (RNasin® Plus; utilizados en la retrotranscripción previa a la PCR convencional) suministrados por Promega (Madison, Wi, EE. UU.).

Marcador de pesos moleculares de proteína para SDS-PAGE (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*), suministrado por Fermentas (Ontario, Canadá). Solución Accutase™, suministrada por PAA Laboratories (Austria). Citifluor AF1, suministrado por Agar Scientific (Essex, Reino Unido). DAF-2-DA, suministrado por Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU). Heparina (empleada en células HCAEC), suministrada por Leo Pharma (Amsterdam, Holanda). Fenoterol, suministrado por Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania).

2–S-amino-6-ácido Boronohexanoico (ABH) y Nω-hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA), proporcionados por el Dr. Harm. Maarsingh (Departamento de Farmacología Molecular, Universidad de Groningen, Holanda).

Ácido araquidónico (AA), ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA), butirato de sodio (Sb) y compuesto MG149, fueron proporcionados por el Dr. Frank Dekker (Departamento de Modulación Genética Farmacéutica, Universidad de Groningen, Holanda).

Las diluciones apropiadas de los fármacos anteriores se prepararon cada día inmediatamente antes de su uso en la solución fisiológica correspondiente a cada experimento, a partir de las siguientes soluciones stock concentradas y almacenadas a -20°C:

2–S-amino-6-ácido Boronohexanoico (ABH; 10 mM), ácido valproico (VPA; 100mM), L-arginina (100 mM), Compuesto C (10 mM), db-AMPc (100 mM), KN 93 (1mM), hidrocloruro de acetilcolina (Ach; 10 mM), hidrocloruro de fenilefrina (10 mM), Nω-hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA; 10mM), nitroprusiato sódico (100mM), p-CPT-cAMP (10 mM), 8-p-CPT-2'-O-Me-cAMP (10 mM) y Rp-cAMP (10 mM), en agua Mili-Q®.

Ácido araquidónico (AA; 100 mM), ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA; 100 mM), BAPTA-AM (10 mM), butirato de sodio (Sb; 10 mM), ESI-09 (10 mM), fenoterol (10 mM), forskolina (10 mM), ionomicina (1 mM), compuesto MG149 (10

mM), wortmanina (10 mM), en DMSO. La concentración final de DMSO no excedió el 0,01% (v/v) excepto para los experimentos realizados con ESI-09, debido a su baja solubilidad, cuya concentración final de DMSO fue un 1% (v/v).

Debido a la fotosensibilidad de las sondas fluorescentes (fura-2, DAF-2DA, DCF-DA, FITC-dextrano), de los anticuerpos secundarios (IRDye®800 policlonal anti-ratón, IRDye® 680 policlonal anti-conejo, AlexaFluor® 594 policlonal anti-conejo y AlexaFluor® 488 policlonal anti-conejo) y de algunos fármacos todos los experimentos en los que se emplearon estos compuestos fueron realizados en la oscuridad.

El resto de los compuestos químicos, incluyendo las sales utilizadas en la preparación de las diferentes soluciones fisiológicas, fueron de grado analítico.

11 Expresión y análisis estadístico de los Resultados

Los resultados mostrados en el texto y en las figuras se expresaron como el valor medio ± el error estándar de la media (e.e.m.), excepto en donde se especifique de otro modo. En el análisis estadístico se ha utilizado el test *t* de Student de dos colas para datos apareados o no apareados o el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del test *post hoc* de Bonferroni's o test *post hoc* de Dunnet´s, según procediese. Los valores $p < 0,05$ y $p < 0,01$ se han considerado estadísticamente significativos**.**

En los experimentos llevados a cabo en anillos de aorta precontraídos, las respuestas de relajación se expresan como el porcentaje de la contracción máxima (Emax = 100%) producida por la fenilefrina. Las curvas concentración-respuesta para los efectos vasorrelajantes de los distintos fármacos se analizaron utilizando el programa Origin™ 5.0 (Microcal Software Inc. Northampton, EE.UU.), que nos permite un ajuste sigmoideo, a partir del cual se realiza el cálculo de la CI_{50} (concentración de fármaco necesaria para provocar el 50% de relajación de la contracción inducida por el agente vasoconstrictor).

En los experimentos de fluorescencia en células individuales, la intensidad de fluorescencia emitida por cada célula se calculó a partir del número de píxeles incluidos en regiones delimitadas manualmente (ROI, *regions of interest*) mediante el programa Metafluor 7.1. La compensación de la fluorescencia de fondo se realizó por la substracción de la iluminación medida en un área de la imagen sin células. Los valores de fluorescencia del fura-2 y del DAF-2 se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia, y el valor basal fue normalizado a cero antes de la adicción de cualquier fármaco o vehículo para cada experimento. Los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ se muestran en términos de incremento del ratio de fluorescencia ($\Delta F_{340/380\ nm}$). Para el cálculo de los resultados se utilizaron únicamente los datos obtenidos a partir de células que respondían con un incremento de la concentración NO libre en respuesta al nitroprusiato sódico (100 µM) o con una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al ionóforo ionomicina (1 µM), según correspondiese, al final de los experimentos.

En los experimentos de inmunofluorescencia, la intensidad de fluorescencia para un determinado anticuerpo emitida por las células se calculó mediante el software Image J version 1.45s (National Institues of Health, MD, EE.UU). El cálculo de la fluorescencia total corregida para cada célula (CTCF, *corrected total cell fluorescence*) se calculó según la siguiente fórmula: *Integrated density* - (área de la célula seleccionada x promedio de la fluorescencia de fondo), donde el valor *Integrated density* indica el valor de intensidad de fluorescencia. Los valores resultantes se expresaron como % de intensidad o de reducción de la intensidad de fluorescencia respecto a los correspondientes valores control (100 % intensidad de fluorescencia).

En los experimentos de *western blot,* la cuantificación de las bandas antigénicas se realizó por densitometría mediante el software Image J version 1.45s (National Institues of Health, MD, EE.UU). En los experimentos realizados en células HCAEC, teniendo en cuenta que la expresión de β-actina no se ve modificada por la exposición a hipoxia, se utilizó el valor de la intensidad de las bandas de β-actina medido por densitometría correspondientes a una misma muestra para corregir los valores de las intensidades de las bandas. Para determinar los cambios en la

expresión por exposición a hipoxia de una determinada proteína, los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda de dicha proteína en condiciones de normoxia (valor 1).

En los experimentos de *western blot* realizados con el fin de determinar la activación de la eNOS por fosforilación en el residuo serina 1177 de la eNOS (p-eNOS), los valores de intensidad de las bandas de la p-eNOS fueron corregidos empleando el valor de la intensidad de las bandas de la eNOS correspondientes a la misma muestra (ratio p-eNOS /eNOS). Los valores de ratio p-eNOS /eNOS de las muestras con distintos tratamientos fueron normalizados con respecto al valor de la muestra control (valor 1).

En los experimentos de *western blot* realizados a partir de homogeneizados de aorta de rata, los valores de intensidad de banda para la Epac-1 y Epac-2 fueron corregidos respecto al valor para la intensidad de la banda de GADPH correspondiente a la misma muestra

En los experimentos de detección de EROS mediante citometría de flujo empleando sonda fluorescente DCFH-DA, se determinó la intensidad de fluorescencia de aquellas células comprendidas en una región previamente definida (parámetro de tamaño de célula determinado y de fluorescencia positiva para el DFCH) e igual para cada una de las muestras mediante el software WinList versión 6.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU). Al valor de fluorescencia obtenido para cada muestra se le restó el valor de autofluorescencia de las células (muestras no incubadas con DFCH-DA). Los cambios en la intensidad de fluorescencia se calcularon respecto al valor de la muestra control (valor normalizado a 1) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia.

En los experimentos de generación de NO en células HCAEC el cálculo de la concentración de nitritos (pM) se hizo interpolando los datos de fluorescencia obtenidos en la curva patrón construida con cantidades conocidas de nitrito de sodio. Los datos obtenidos fueron corregidos por la concentración de proteína (mg) para cada muestra. Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al valor de la muestra control (valor 1) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia.

En los experimentos de PCR en tiempo real o cuantitativa el análisis cuantitativo de la expresión génica se llevó a cabo en base al valor de ciclo umbral (C_T, *cycle treshold*). Este valor se obtiene al analizar la curva de amplificación de la PCR donde se representa la fluorescencia obtenida en cada ciclo de PCR y se define como el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR.

Para determinar los cambios en la expresión génica inducidos por la exposición a hipoxia se empleó el método de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta}C_T$ (Pfaffl, 2001):

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ gen referencia}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra hipoxia} - \Delta C_T \text{ muestra normoxia}$$

Como genes de referencia se emplearon la β-actina en las muestras procedentes de células HCAEC y 18S en retina aislada de ratón, ya que su expresión no se vio modificada tras la exposición a hipoxia. Los datos se expresaron como "fold change" o "nivel de cambio" respecto al correspondiente control

En los ensayos de permeabilidad endotelial en células HCAEC, los valores de fluorescencia de FITC-Dextrano obtenidos para cada muestra se normalizaron respecto al valor de fluorescencia de la muestra control (valor 1) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resultados

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Efectos de fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la contractilidad vascular

1.1 Efectos de la forskolina, el db-cAMP y el pCPT-cAMP sobre la contracción con fenilefrina

En los experimentos realizados en este trabajo, los anillos de aorta de rata carecen de actividad espontánea, tal y como se ha descrito previamente (Orallo, 1997; Orallo *et al.*, 2002). La fenilefrina (1 µM) produjo una contracción lenta y sostenida en los anillos de aorta de rata con y sin endotelio. Las tensiones máximas obtenidas fueron: 1,54 ± 0,07 g y 1,99 ± 0,11 g, respectivamente (n = 61; $p < 0,01$). Este efecto contráctil se mantuvo sin cambios significativos de tensión en los anillos control durante al menos 90 minutos.

La adición acumulativa de la forskolina (6-300 nM) relajó las contracciones inducidas por fenilefrina (1 µM) en anillos desprovistos de endotelio con una CI_{50} = 128,43 ± 11,11 nM (n = 7), mientras que en aquellos anillos intactos la potencia de relajación fue significativamente mayor (CI_{50}.= 51,17 ± 3,43 nM; n = 6; $p < 0,01$) (figura 21).

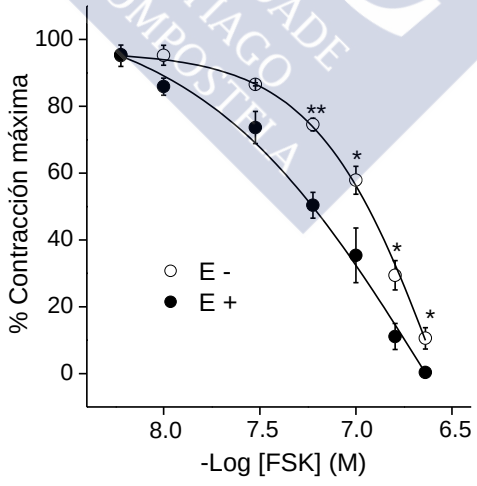

Figura 21. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina, (FSK, 6-300 nM) en anillos de aorta de rata con (E+) y sin endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos seis experimentos (*$p < 0,05$ o **$p < 0,01$ respecto a valores en presencia de endotelio).

La adición acumulativa de db-cAMP (1-200 µM), un análogo permeable celular del AMPc, relajó las contracciones inducidas por fenilefrina (1µM) en anillos desprovistos de endotelio con una CI_{50} = 106,52 ± 12,33 µM (n = 6; $p > 0,05$), mientras que en aquellos anillos intactos la potencia de relajación fue significativamente mayor CI_{50} = 42,92 ± 4,21 µM (n = 4; $p < 0,01$), (figura 22).

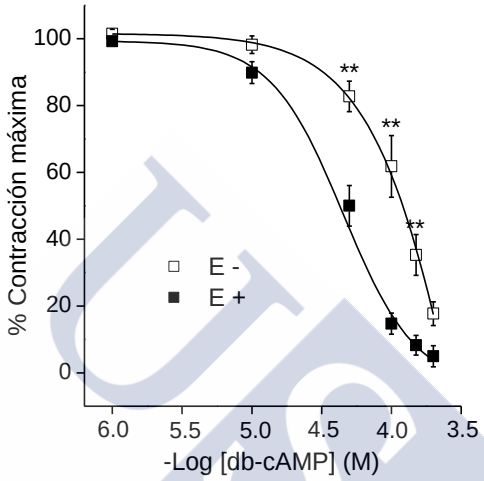

Figura 22. Curvas acumulativas concentración-relajación de db-cAMP (1-200 µM) en anillos de aorta de rata con (E+) y sin endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cuatro experimentos (*$p < 0,05$ o **$p < 0,01$ respecto a valores en presencia de endotelio).

El pCPT-cAMP se emplea como un fármaco análogo de AMPc, este fármaco activa a PKA, PKG y Epac. Asimismo, incrementa los niveles de GMPc por inhibición de la PDE V (ver Discusión).

La adición acumulativa del pCPT-cAMP (6nM-600 µM) relajó las contracciones inducidas por fenilefrina en anillos desprovistos de endotelio con una CI_{50} = 60,32 ± 5,02 µM mientras que en aquellos anillos intactos se obtuvo una CI_{50} = 4,96 ± 1,54 µM significativamente menor (n = 6; $p < 0,01$) (figura 23).

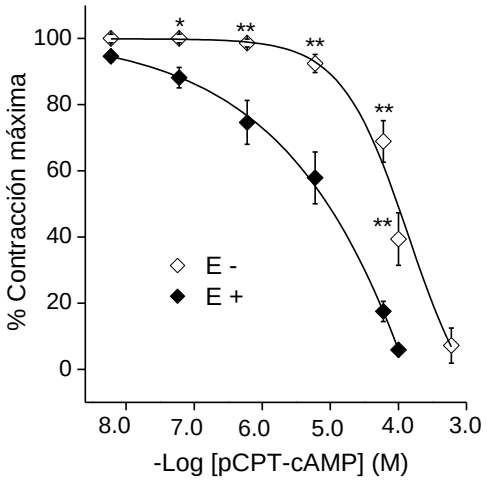

Figura 23. Curvas acumulativas concentración-relajación del pCPT-cAMP (6 nM-600 µM) en anillos de aorta de rata con (E+) y sin endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de seis experimentos (**p* < 0,05 o ***p* < 0,01 respecto a valores en presencia de endotelio).

1.2 Efecto de la inhibición de la PKA sobre la contracción con fenilefrina y sobre la vasorrelajación inducida por forskolina

La administración del inhibidor de la PKA, Rp-cAMPs (100 µM), sobre los anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina (1 µM) incrementó de forma significativa (*p* < 0,01) en un 10,71% ± 2,72 las contracciones inducidas por este agonista (valores de tensión máxima: 1,59 ± 0,11 g, y 1,76 ± 0,14 g, antes y después de la administración de Rp-cAMPs, respectivamente; n = 4; *p* < 0,01).

De la misma forma, en anillos desprovistos de endotelio la administración de Rp-cAMPs (100 µM) incrementó de forma significativa las contracciones inducidas por la fenilefrina (1 µM) en un 8,77% ± 2,53 (valores de tensión máxima: 1,89 ± 0,25 g y 2,03 ± 0,26 g, antes y después de la administración de Rp-cAMPs, respectivamente, n = 6; *p* < 0,01).

Tras la incubación con Rp-cAMPs (100 µM) durante 30 minutos, tiempo suficiente para que éste ejerza su efecto inhibidor máximo, se procedió a la adición acumulativa de forskolina (6-300 nM). En estas condiciones, en los anillos desprovistos endotelio se obtuvo una CI_{50} para la forskolina de 96,44 ± 19,38 nM (*n*

= 6; $p > 0,05$), que no difiere de forma significativa de la obtenida en ausencia del Rp-cAMPs (figura 24).

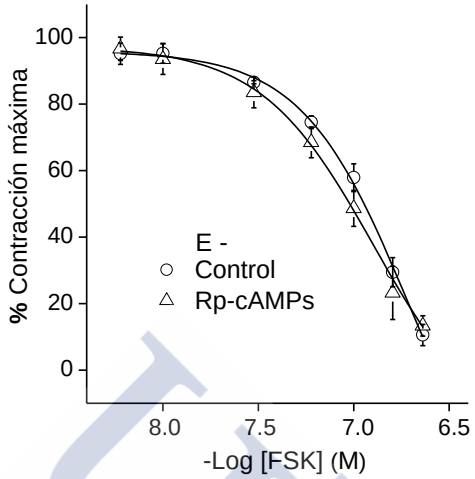

Figura 24. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina (FSK, 6-300 nM) en ausencia o en presencia de Rp-cAMPs (100 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cinco experimentos (*$p < 0,05$ con respecto a los valores en ausencia de Rp-cAMPs).

Se llevó a cabo el mismo procedimiento en anillos con endotelio intacto, obteniéndose una CI_{50} para la forskolina = 157,41 ± 11,81 nM (n = 5; $p < 0,01$), la cual difiere significativamente con respecto a la CI_{50} obtenida en ausencia del inhibidor de la PKA (figura 25). El efecto vasorrelajante inducido por la adición de concentraciones de forskolina 60 nM y 100 nM en anillos con endotelio intacto (% contracción máxima: 50,39 ± 3,88 y 35,37 ± 8,17, respectivamente) disminuyó significativamente tras la preincubación con Rp-cAMPs (% contracción máxima: 84,22 ± 13,22 y 76,99 ± 4,82, respectivamente (n = 5; $p < 0,01$). Sin embargo, la preincubación con Rp-cAMPs no modificó de forma significativa el efecto vasorrelajante inducido por concentraciones de forskolina menores de 60 nM o mayores de 100 nM de forma significativa.

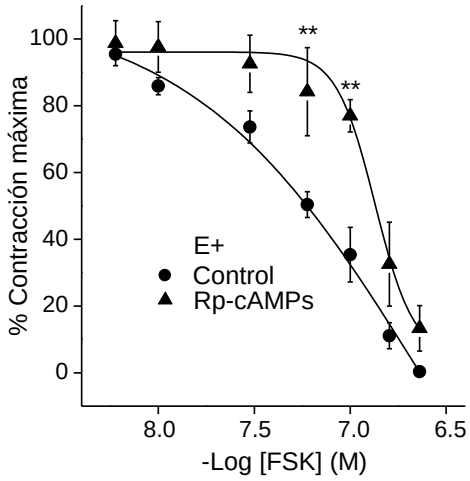

Figura 25. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina, (FSK, 6-300 nM) en presencia y en ausencia de Rp-cAMPs (100 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cinco experimentos (**p < 0,01 con respecto a los valores en ausencia de Rp-cAMPs).

1.3 Efecto de la activación de la PKA sobre la contracción con fenilefrina

Mediante el empleo del Rp-cAMPs hemos obtenido resultados que sugieren un papel destacado de la PKA en la relajación de los anillos con endotelio. Para confirmar esta posibilidad, se procedió a la adición acumulativa del 6-Bnz-cAMP (10-160 µM), un análogo del AMPc que activa selectivamente a la PKA (ver Discusión). Dicho fármaco relajó las contracciones inducidas por fenilefrina en anillos desprovistos de endotelio con una CI_{50} = 93,63 ± 2,66 µM, este efecto no fue modificado en anillos con endotelio intacto (CI_{50} = 89,34 ± 1,99; n = 4; p > 0,05) (figura 26).

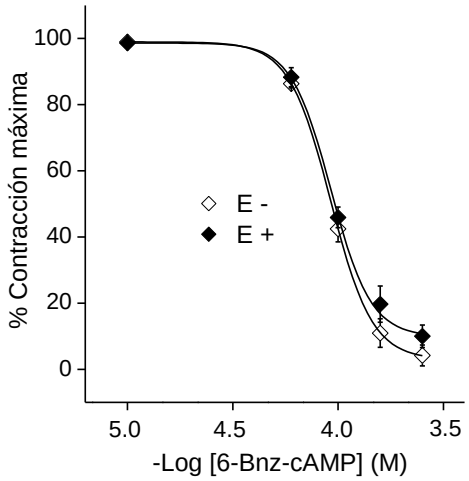

Figura 26. Curvas acumulativas concentración-relajación del 6-Bnz-cAMP (10-160 µM) en anillos de aorta de rata con (E+) y sin endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de cuatro experimentos.

1.4 Efecto de la activación de la Epac sobre la contracción con fenilefrina

Antes de proceder a los experimentos para medir los efectos de la activación de la Epac sobre la contractilidad de la aorta de rata inducida por fenilefrina, hemos demostrado, mediante técnicas estandarizadas de *western blot*, la expresión de la isoforma Epac-1 (~100 KDa) en las muestras preparadas a partir de homogeneizados de aorta de rata. Sin embargo, no hemos detectado ninguna banda para la isoforma Epac-2 (~115 KDa) en el peso molecular esperado (figura 27).

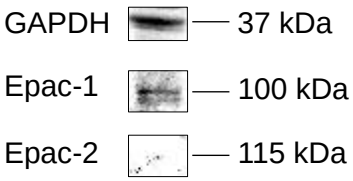

Figura 27. *Western Blot* representativo de la expresión de las isoformas de la proteína Epac en muestras preparadas a partir de homogeneizados de aorta de rata. GADPH se empleó como control de la técnica.

Para determinar el posible papel de la proteína Epac en el efecto vasorrelajante mediado por AMPc se empleó el 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP, un análogo del AMPc que activa selectivamente a dicha proteína.

La administración del 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP en anillos intactos y desprovistos de endotelio relajó de forma significativa las contracciones inducidas por fenilefrina (1µM), siendo este efecto mayor en anillos con endotelio intacto (% de relajación: 21,16 ± 2,23; n = 4 y 14,95 ± 1,35; n = 5 en anillos intactos y desprovistos de endotelio, respectivamente; n ≥ 4; $p < 0,05$ entre los valores con y sin endotelio y $p < 0,01$ respecto al control) (figura 28).

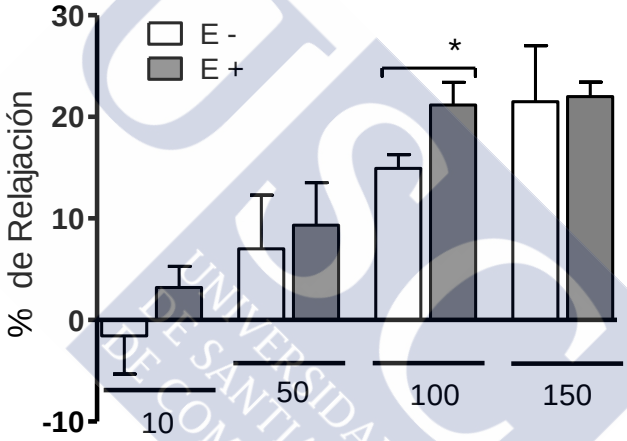

Figura 28. Efecto vasorelajante del 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (10-150 µM) en anillos de aorta de rata intactos (E+) y desprovistos de endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada barra representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de cuatro experimentos (*$p < 0,05$ respecto al correspondiente valor en presencia de endotelio).

Este efecto vasorelajante no se vió incrementado por la adición de concentraciones mayores de 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (150 µM) (% de relajación: 21,99 ± 1,43, y 21,50 ± 5,51; en anillos intactos y desprovistos de endotelio respectivamente, n = 4; $p > 0,05$). La adición de concentraciones menores de 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (10 y 50 µM) no relajó de forma significativa las contracciones inducidas por fenilefrina (1µM) en anillos intactos y desprovistos de endotelio (figura 28) (% de relajación del 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP, 10 µM: 3,19 ± 2,08 y -1,56 ±

3,77 en anillos intactos y desprovistos de endotelio, respectivamente; n = 3; p > 0,05) (% de relajación del 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP, 50 µM: 9,33 ± 4,18 y 7,01 ± 5,28 en anillos intactos y desprovistos de endotelio, respectivamente, n = 3; p > 0,05).

1.5 Efecto de la inhibición de la Epac sobre la contracción con fenilefrina y sobre la vasorrelajación inducida por forskolina

Para determinar la participación de la Epac en el efecto vasorelajante mediado por forskolina se procedió a la adicción de un nuevo inhibidor de la Epac, ESI-09 (1 µM) sobre los anillos precontraídos con fenilefrina (1 µM). El ESI-09 no modificó de forma significativa la contracción inducida por fenilefrina en los anillos intactos (% de incremento de la contracción 9,7 ± 10,03; n = 3; p > 0,05) o desprovistos de endotelio (3,1 ± 4,14; n = 4; p > 0,05). A continuación, se procedió a la adición acumulativa de forskolina (6-300 nM) obteniéndose una CI_{50} de 51,13 ± 16,84 (n = 3) en anillos intactos y una CI_{50} de 111,3 ± 11,77 (n = 4) en anillos desprovistos de endotelio, las cuales no difieren de los valores de CI_{50} obtenidos para la forskolina en ausencia de este inhibidor ($p < 0,05$ en ambos casos).

Una concentración superior de ESI-09 (10 µM) relajó las contracciones inducidas por fenilefrina de forma significativa en anillos desprovistos de endotelio (% de relajación: 71,50 ± 10, 82; n = 4; $p < 0,05$ respecto al % de relajación provocado por el correspondiente control) y en anillos intactos: 67,38 ± 15,79; n = 3; $p < 0,05$ respecto al % de relajación provocado por el correspondiente control). El valor máximo de relajación fue obtenido a los 30 minutos de la adición del ESI-09.

1.6 Efecto de la inhibición de la eNOS sobre la contracción con fenilefrina y sobre la vasorrelajación inducida por forskolina y db-cAMP

Para determinar la participación de la enzima eNOS en la vasorelajación inducida por la forskolina en anillos de aorta de rata, se procedió a la administración de L-NAME, un inhibidor de las sintasas de NO (ver Discusión).

En los anillos con endotelio intacto precontraídos con fenilefrina (1 µM), el L-NAME (100 µM) incrementó de forma significativa, en un 27,49 ± 5,48 %, las

contracciones inducidas por este agonista (valores de tensión máxima: 2,47 ± 0,14 g, y 3,10 ± 0,09 g antes y después de la administración de L-NAME, respectivamente; n = 9; $p < 0,01$).

En anillos desprovistos de endotelio, la administración de L-NAME (100 µM) no modificó de forma significativa las contracciones inducidas por la fenilefrina (1µM) (valores de tensión máxima: 1,87 ± 0,12 g y 2,12 ± 0,15 g, antes y después de la administración de L-NAME, respectivamente; $p > 0,05$; n = 12).

Tras la incubación con L-NAME (100 µM) durante 30 minutos, tiempo suficiente para que éste ejerza su efecto inhibidor máximo, se procedió a la adición acumulativa de forskolina (6-300 nM). En estas condiciones, en los anillos desprovistos endotelio se obtuvo una CI_{50} para la forskolina en presencia de L-NAME (100 µM) de 92,44 ± 22,48 nM (n = 6) que no difiere de forma significativa de la obtenida en ausencia del inhibidor ($p > 0,05$) (figura 29).

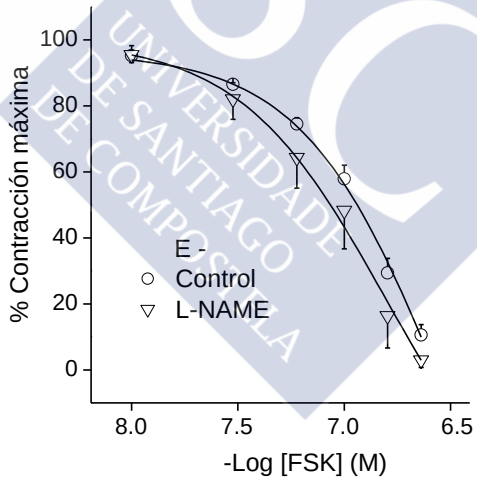

Figura 29. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina (FSK, 6-300 nM) en ausencia o en presencia de L-NAME (100 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio (E-) precontraidos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m (indicado por líneas verticales) de al menos cinco experimentos.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento en anillos con endotelio intacto, obteniéndose una CI_{50} para la forskolina = 68,14 ± 4,92 nM (n = 5), la cual difiere

significativamente (p < 0,01) con respecto a la CI_{50} obtenida en ausencia del inhibidor (figura 30). El efecto vasorrelajante inducido por la adición de concentraciones de forskolina 10 nM y 60 nM en anillos con endotelio intacto (% contracción máxima: 85,89 ± 2,56 y 50,39 ± 3,88, respectivamente) disminuyó significativamente tras la preincubación con L-NAME (100 µM) (% contracción máxima: 94, 26 ± 1,74 y 66,72 ± 4,28, respectivamente (n = 5; p < 0,05).

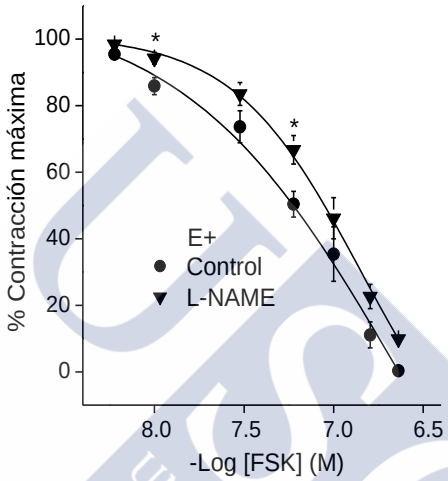

Figura 30. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina (FSK, 6-300 nM) en presencia y en ausencia de L-NAME (100 µM) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cinco experimentos. *p < 0,01 con respecto a los valores en ausencia de L-NAME.

En otra serie de experimentos, después de la incubación con L-NAME (100 µM) durante 30 minutos, se procedió a la adición acumulativa de db-cAMP (1-200 µM). En los anillos desprovistos endotelio se obtuvo una CI_{50} para el db-cAMP en presencia de L-NAME (100 µM) de 132,44 ± 6,81 µM (n = 5; p > 0,05), que no difiere de forma significativa de la obtenida en ausencia del inhibidor (figura 31).

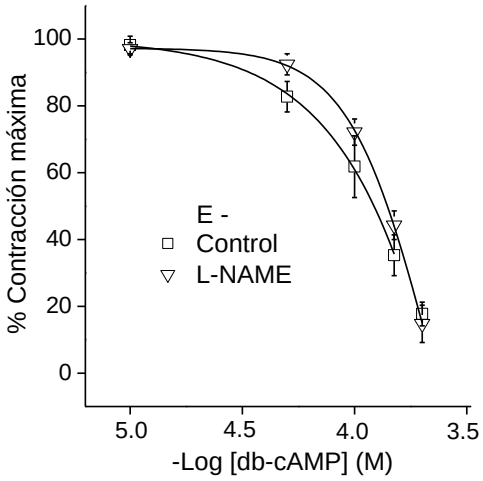

Figura 31. Curvas acumulativas concentración-relajación para el db-cAMP (1-200 µM) en ausencia o en presencia de L-NAME (100 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio (E-) precontraidos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de cinco experimentos.

En los anillos con endotelio se obtuvo una CI_{50} para el db-cAMP en presencia de L-NAME (100 µM) de 130 ± 25,70 µM (n = 4), que difiere de forma significativa de la obtenida en ausencia del inhibidor ($p < 0,01$). El efecto vasorrelajante inducido por la adición de db-cAMP (50, 100 µM) en anillos con endotelio intacto (% contracción máxima: 50,00 ± 6,08 y 14,74 ± 3,58, respectivamente) disminuyó significativamente tras la preincubación con L-NAME (% contracción máxima: 86, 24 ± 3,81 y 68,74 ± 13, 47, respectivamente; n = 4; $p < 0,01$). Sin embargo, la preincubación con L-NAME no modificó de forma significativa el efecto vasorrelajante inducido por concentraciones de db-cAMP menores de 50 µM o mayores de 100 µM (figura 32).

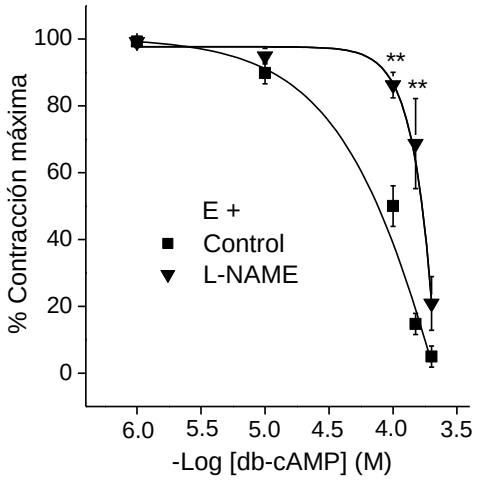

Figura 32. Curvas acumulativas concentración-relajación para el db-cAMP (1-200 µM) en ausencia o en presencia de L-NAME (100 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata con endotelio (E+) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de cinco experimentos (**p < 0,01 con respecto a los valores en ausencia de L-NAME).

1.7 Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la vasorrelajación inducida por la forskolina

Los resultados obtenidos en células HUVEC, sugieren que la ruta PI3K/Akt participa en la liberación de NO inducida por la forskolina. Por ello hemos empleado dos inhibidores de la PI3K, la wortmanina y el LY-294,002, para determinar su implicación en la vasorrelajación inducida por la forskolina en anillos de aorta de rata.

La administración del inhibidor wortmanina (100 nM) sobre los anillos con y sin endotelio precontraídos con fenilefrina (1 µM) no causó ninguna modificación en la contracción inducida por este agonista (% de incremento de la contracción: 0,7 ± 2,86 y 5,2 ± 1,88 en anillos intactos y desprovistos de endotelio, respectivamente; n = 5; p > 0,05).

Tras la incubación con wortmanina (100 nM) durante 30 minutos, se procedió a la adición acumulativa de la forskolina (6-300 nM). En estas condiciones, la wortmanina no modificó la CI_{50} de la forskolina en anillos intactos y desprovistos de

endotelio (CI_{50} = 46,20 ± 6, 51 y CI_{50} = 113,1 ± 13,25, respectivamente; n = 5; $p > 0,05$ con respecto a los valores en ausencia de wortmanina).

Una mayor concentración de wortmanina (200-500 nM) relajó las contracciones inducidas por fenilefrina (datos no mostrados). Siendo la wortmanina también un inhibidor de la MLCK (Nakanishi *et al.*, 1992; Takayama *et al.*, 1996, estos resultados podrían indicar una pérdida de su selectividad sobre la PI3K, por lo que no se continuaron los experimentos a esta concentración.

La administración del LY-294,002 (10 µM) sobre los anillos con y sin endotelio precontraídos con fenilefrina (1 µM) no causó ninguna modificación en la contracción inducida por este agonista (% de incremento de la contracción: -6,27 ± 6,05 y 5,1 ± 4,23 en anillos intactos y desprovistos de endotelio, respectivamente; n ≥ 3; $p > 0,05$).

Tras la incubación con LY-294,002 (10 µM) durante 30 minutos, se procedió a la adición acumulativa de forskolina (6-300 nM). En los anillos desprovistos endotelio se obtuvo una CI_{50} para la forskolina en presencia de LY-294,002 (10 µM) de 99,13 ± 18,43 µM (n = 4), que no difiere de forma significativa de la obtenida en ausencia del inhibidor ($p > 0,05$)(figura 33).

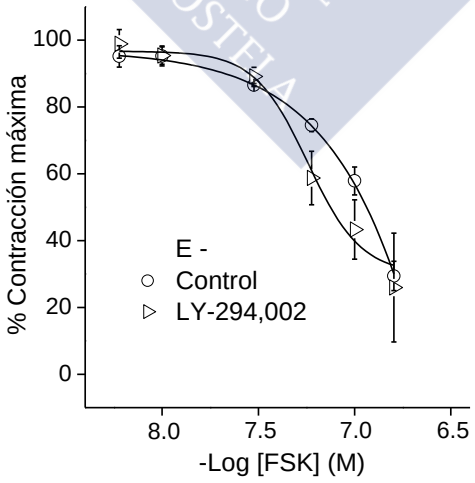

Figura 33. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina (FSK, 6-300 nM) en ausencia o en presencia de LY-294,002 (10 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m (indicado por líneas verticales) de tres experimentos.

En los anillos con endotelio se obtuvo una CI_{50} para el forskolina en presencia de LY-294,002 (10 µM) 95,74 ± 5,04 µM (n = 3), que difiere de forma significativa de la obtenida en ausencia del inhibidor ($p < 0,01$). El efecto vasorrelajante inducido por la adición de la forskolina a la concentración de 60 nM en anillos con endotelio intacto (% contracción máxima: 50, 39 ± 3,88) disminuyó significativamente tras la preincubación con LY-294,002 (% contracción máxima: 79, 43 ± 6,5 (n = 3; $p < 0,05$). Sin embargo, la preincubación con LY-294,002 no modificó de forma significativa el efecto vasorrelajante inducido por concentraciones de forskolina menores o mayores de 60 nM de forma significativa (figura 34).

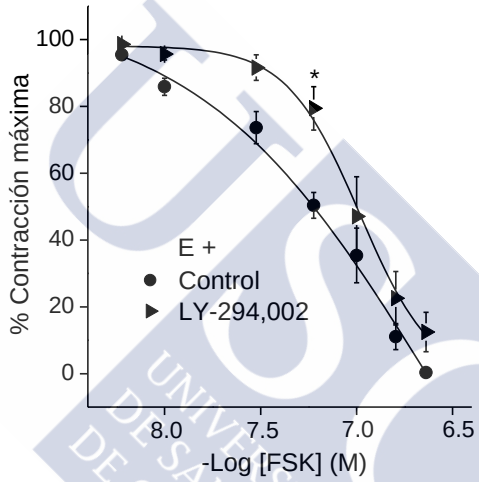

Figura 34. Curvas acumulativas concentración-relajación de la forskolina (FSK, 6-300 nM) en ausencia o en presencia de LY-294,002 (10 µM, 30 minutos) en anillos de aorta de rata con endotelio (E-) precontraídos con fenilefrina (1 µM). Cada punto representa la media ± e.e.m (indicado por líneas verticales) de tres experimentos. (*$p < 0,05$ con respecto a los valores en ausencia de LY-294,002).

2 Caracterización de la expresión de proteínas en células endoteliales

Mediante la técnica de RT-PCR se procedió a la determinación de ARN codificante para las proteínas PKA, Epac-1, Epac-2, Rap1 y de la enzima eNOS en células HUVEC.

Para ello, se aisló el ARN total de una muestra de células HUVEC empleando un sistema de columnas de intercambio iónico. Tras la retrotranscripción se procedió a la amplificación de los fragmentos de los distintos genes (PKA-RIIα, Epac-1, Epac-2, Rap1 y eNOS) empleando *primers* específicos de una secuencia de ADNc de la especie *H. sapiens*. Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa mediante electroforesis según lo descrito en el apartado 4.1 de Material y Métodos.

Tal y como se muestra en la figura 35, en las células HUVEC se observó una amplificación de los fragmentos de los genes de la PKA-RIIα (612 pb), Epac-1 (392 pb), Rap1 (345 pb) y eNOS (480 pb). Sin embargo, no se observó banda de ADNc de Epac-2 (649 pb) en este tipo celular.

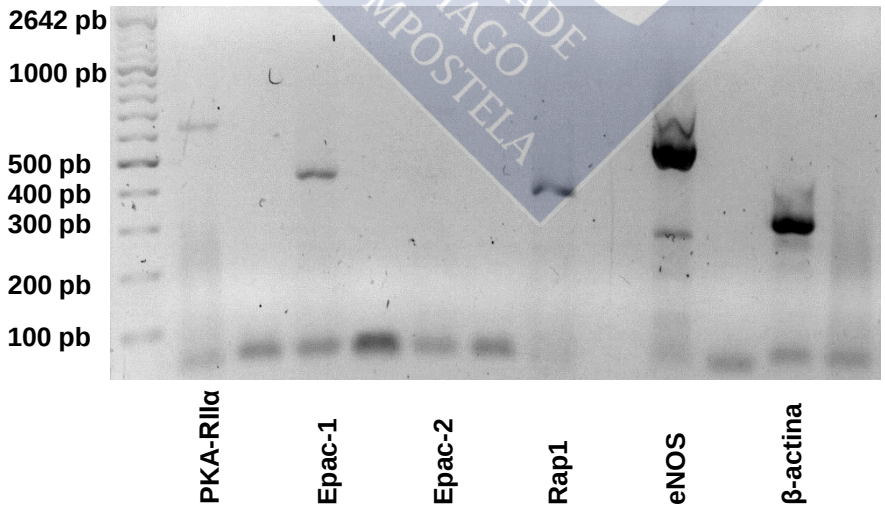

Figura 35. Gel de agarosa representativo con los productos de amplificación de los correspondientes fragmentos de los genes de PKA- RIIα, Epac-1, Epac-2, Rap1 y eNOS en células HUVEC. Las bandas no amplificadas corresponden a controles negativos para cada muestra.

3 Efecto de fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la homeostasis del NO en células endoteliales

3.1 Efecto de la forskolina, el db-cAMP, el pCPT-cAMP y de la activación de la PKA y la Epac sobre los niveles intracelulares de NO

Los incrementos de la concentración NO inducida por fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización en células HUVEC fueron estudiados mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real empleando la sonda fluorescente DAF-2-DA, sensible a las variaciones de la concentración de NO (ver apartado 5.3 de Material y Métodos). Los valores de fluorescencia basal antes de la adición de los correspondientes fármacos fueron normalizados a cero. En las células no tratadas (control) no se produjeron variaciones significativas (0,33 ± 0,52; n = 5; p > 0,05) en los valores de fluorescencia. La adición de los correspondientes vehículos (H_2O o DMSO) no provocó en ningún caso la modificación de la fluorescencia (datos no mostrados). Como control positivo para la medición de los niveles de NO intracelular en las células HUVEC se empleó nitroprusiato sódico (100 µM, datos no mostrados) (para registro representativo, ver figura 36).

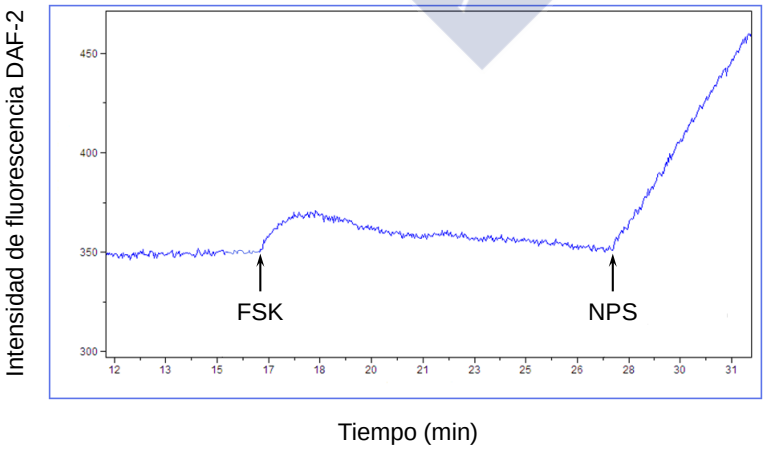

Figura 36. Registro representativo de incrementos de la concentración NO libre inducida por la aplicación de forskolina (FSK, 10 µM) y la posterior aplicación de nitroprusiato sódico (NPS, 100 µM) en una única célula HUVEC.

La aplicación de forskolina (10 µM), db-cAMP (100 µM) o pCPT-cAMP (100 µM) provocó un incremento significativo de NO libre intracelular (31,58 ± 4,51; 21,98 ± 3,95; 5,57 ± 0,67 unidades arbitrarias de fluorescencia, respectivamente; n ≥ 6; $p < 0,01$) (figura 36 y 37).

Asimismo, la administración de 6-Bnz-cAMP (300 µM) o de 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (100 µM) causó un incremento significativo de NO libre intracelular (13,71 ± 1,31 y 15,31 ± 3,16 unidades arbitrarias de fluorescencia, respectivamente; n ≥ 5; p < 0,01) (figura 37).

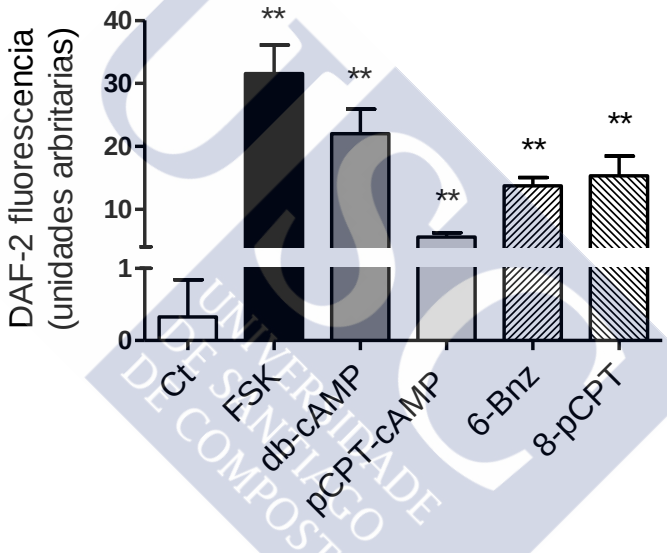

Figura 37. Incrementos de la concentración NO libre inducida por la forskolina (FSK), db-cAMP, pCPT-cAMP**,** 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (8-pCPT) Cada barra representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cinco experimentos (**$p < 0,01$ respecto al valor de fluorescencia basal antes de la adición del correspondiente fármaco).

3.2 Efecto de la inhibición de la eNOS sobre la liberación de NO intracelular inducida por forskolina

El papel de la eNOS en la liberación de NO inducida por forskolina en células HUVEC fue determinado mediante el empleo del inhibidor de la NOS, L-NAME. La preincubación de las células durante 10 minutos con L-NAME (100 µM) produjo un descenso de la fluorescencia basal (-11,28 ± 4,47 unidades arbitrarias de

fluorescencia) y un descenso significativo (9,78 ± 2,45 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 17; $p < 0,01$) en la liberación de NO inducida por la forskolina (10 µM) (figura 38).

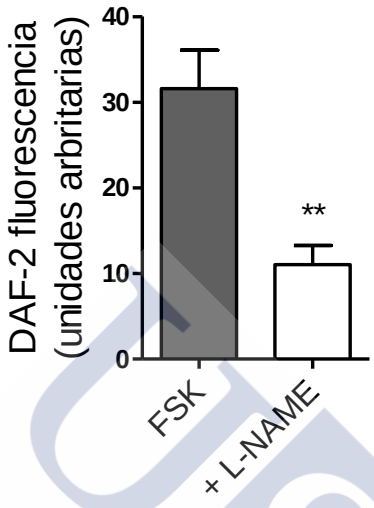

Figura 38. Efecto del L-NAME (100 µM) en la liberación de NO intracelular inducida por la forskolina (FSK) en células HUVEC. Cada barra representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos seis experimentos (**p < 0,01 respecto al valor de la FSK).

3.3 Efecto de la inhibición de la PKA y de la Epac sobre la liberación de NO intracelular inducida por forskolina

Con el fin de investigar la participación de la PKA o de la Epac en la liberación de NO intracelular inducida por forskolina en células HUVEC, se llevaron a cabo experimentos empleando Rp-cAMPs o ESI-09, inhibidores de dichas proteínas, respectivamente.

La preincubación de las HUVEC durante 10 minutos con Rp-cAMPs (10 µM) produjo un descenso de la fluorescencia basal (-8,72 ± 6,83 unidades arbitrarias de fluorescencia) y un descenso significativo en la liberación de NO intracelular inducida por la forskolina (10 µM) (18,12 ± 3,25 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 12; $p < 0,05$) (figura 39).

La preincubación de las HUVEC durante 10 minutos con ESI-09 (25 µM) provocó un descenso de la liberación de NO intracelular inducida por la forskolina (10 µM) (7,53 ± 1,32 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 4; $p < 0,01$) (figura 39).

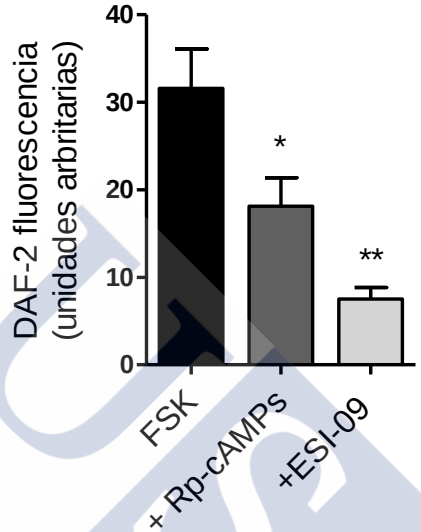

Figura 39. Efecto del Rp-cAMPs (10 µM) o del ESI-09 (25 µM) en la liberación de NO intracelular inducida por la forskolina (FSK) en células HUVEC. Cada barra representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cuatro experimentos (*p < 0,05 o **p < 0,01 respecto al valor de la FSK).

3.4 Evaluación de la participación del Ca^{2+} en la producción de NO inducida por AMPc

3.4.1 Efecto de la forskolina sobre los niveles intracelulares de NO en medio libre de Ca^{2+}

Se evaluó el efecto de la forskolina en la liberación de NO en células HUVEC en ausencia de Ca^{2+} extracelular y con restricción de Ca^{2+} libre intracelular mediante el empleo de una solución $S0Ca^{2+}$ a la que se le añadió un agente quelante de Ca^{2+}, BAPTA-AM (10 µM) (ver apartado 5.3 de Material y Métodos). En estas condiciones la aplicación de forskolina (10 µM) provocó un incremento significativo de NO libre intracelular (29,66 ± 3,75 unidades arbitrarias de fluorescencia; n =8; p < 0,01) que

no difiere del efecto de la forskolina obtenido en presencia de Ca^{2+} (31,58 ± 4,51 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 9; p > 0,05) (figura 40).

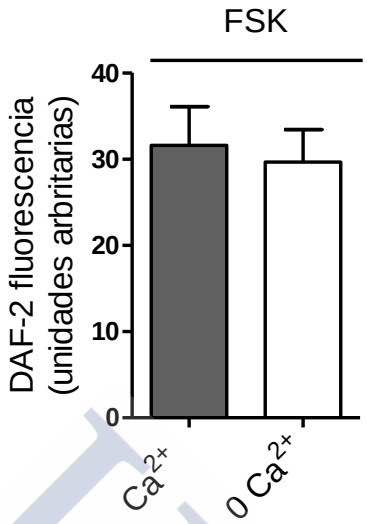

Figura 40. Incrementos de la concentración NO libre inducida por forskolina (FSK) en presencia de Ca^{2+} o en ausencia de Ca^{2+} ($0Ca^{2+}$) en células HUVEC. Cada barra representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos ocho experimentos (p > 0,05).

3.4.2 Efecto de la forskolina, el db-cAMP, el pCPT-cAMP y de la activación de la PKA y la Epac sobre sobre la $[Ca^{2+}]_c$ basal

Con el fin de investigar la participación de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal en la producción de NO inducida por fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización en células HUVEC se realizaron experimentos de microscopía de fluorescencia en tiempo real empleando la sonda fluorescente fura-2, sensible a las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ (ver apartado 5.3 de Material y Métodos).

En medio 1,5 mM de Ca^{2+}, el valor medio del ratio 340/380 nm, indicativo de la $[Ca^{2+}]_c$, en células HUVEC fue de 0,52 ± 0,03, n = 7.

La adición de los correspondientes vehículos (H_2O o DMSO) no provocó en ningún caso la modificación de la fluorescencia. Como control positivo para la medición de los incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ en las células HUVEC se empleó Ionomicina (1 µM, datos no mostrados) (para registro representativo, ver figura 41).

La preincubación de las células HUVEC con FSK (10 µM, n = 13) produjo un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal de 0,16 ± 0,03 (expresado como incremento del ratio de fluorescencia 340/380: ΔF340/380, p < 0,01 respecto al control) siendo la respuesta celular sólo de un 30,77% (figura 41 y 42).

La preincubación de las células con db-cAMP (100 µM, n = 6) o con pCPT-cAMP (100 µM, n = 8) produjo un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal de 0,14 ± 0,02 (33% de respuesta celular) y 0,13 ± 0,01 (25% de respuesta celular), respectivamente (ambos p < 0,01 respecto al control) (figura 41 y 42).

El tratamiento de las células con los activadores selectivos de la PKA (6-Bnz-cAMP; 300 µM) o de la Epac (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP; 100 µM) no modificó significativamente la $[Ca^{2+}]_c$ basal (n= 8 y n=5; p > 0,05 en ambos casos) (figura 41 y 42) .

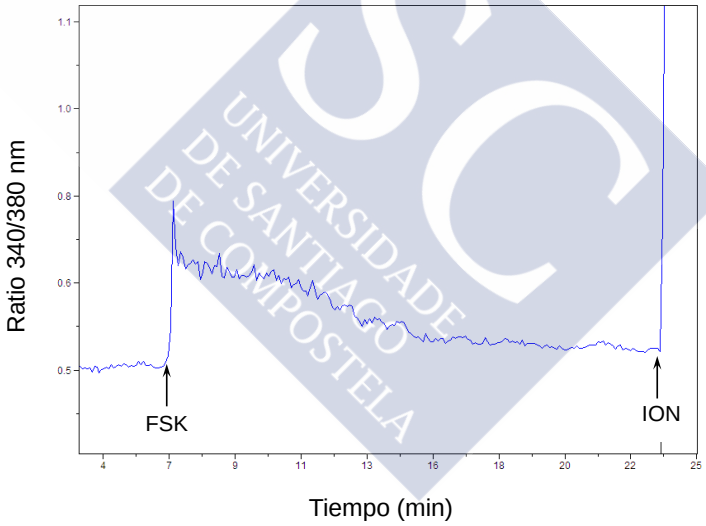

Figura 41. Registro representativo de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (expresado como $\Delta F_{340/380}$) en una células HUVEC en respuesta al tratamiento con forskolina (FSK) y posterior adición de ionomicina (ION).

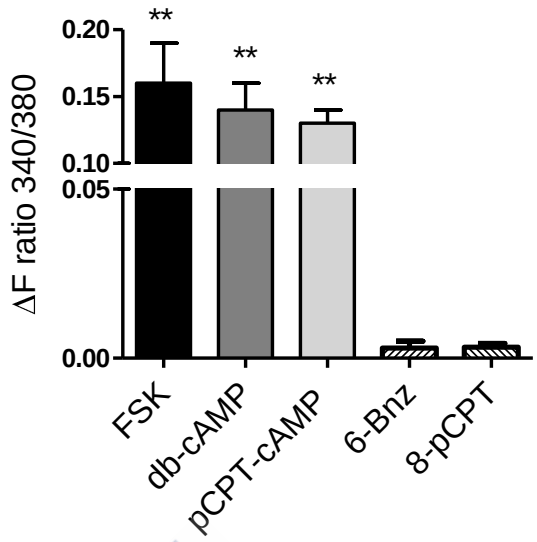

Figura 42. Efecto del tratamiento con forskolina (FSK), db-cAMP, pCPT-cAMP, 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (8-pCPT) sobre los niveles de Ca^{2+} basales (expresado como $\Delta F_{340/380}$) en células HUVEC. Cada barra representa la media ± e.e.m de, al menos, 5 valores; **p* < 0,05 respecto al valor basal.

3.5 Efecto de fármacos que modifican los niveles intracelulares de AMPc o que interfieren en sus rutas de señalización sobre la sobre la activación de la eNOS en células endoteliales

Mediante técnicas estandarizadas de *western blot* se evaluó el efecto del tratamiento durante treinta minutos con FSK (0,1µM, 1µM, 10 µM), Db-cAMP (100 µM), pCPT-cAMP (100 µM) y 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP (100 µM) sobre la activación de la eNOS por fosforilación en el residuo serina 1177 (p-eNOS). Los valores de intensidad de las bandas de la p-eNOS fueron normalizados por el valor de la intensidad de las bandas de la eNOS correspondientes a una misma muestra (ratio p-eNOS /eNOS).

En la figura 43 A, se representa el *blot* marcado con el anticuerpo anti-eNOS o con el anticuerpo anti-eNOS (p-eNOS) de muestras de los lisados totales de células HUVEC sin tratamiento (control) o con el correspondiente tratamiento.

El tratamiento con forskolina 1 µM (1,46 ± 0,10, n = 3; $p < 0,05$), pCPT-cAMP (1,42 ± 0,06; n = 3; $p < 0,05$) y 8-pCPT-cAMP (1,58 ± 0,16; n = 4; $p < 0,05$) incrementó de forma significativa el valor relativo de expresión de la p-eNOS (ratio p-

eNOS/eNOS). Por el contrario no se vió significativamente modificado tras el tratamiento durante 30 minutos con FSK 0,1 µM, FSK 1 µM y Db-cAMP (1,88 ± 0,56, 1,36 ± 0,43 y 1,13 ± 0,10 respectivamente; n ≥ 4; $p > 0,05$) (figura 43 B).

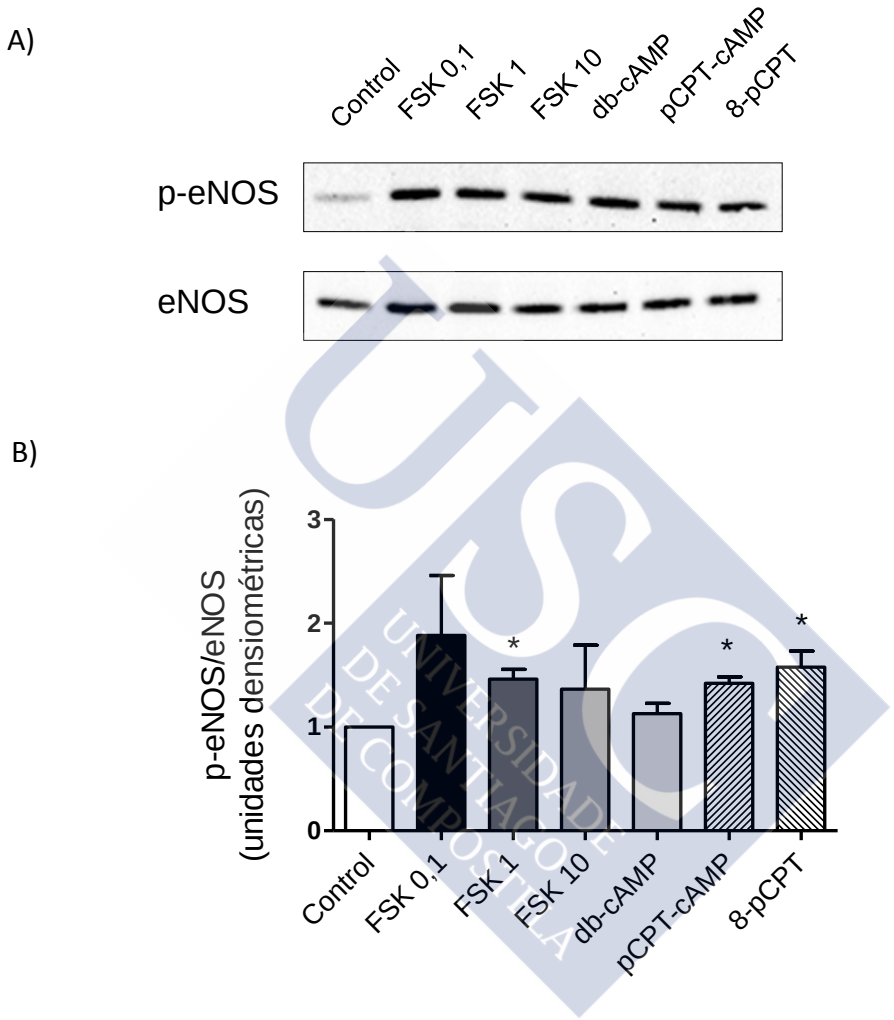

Figura 43. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico de el efecto del tratamiento durante 30 minutos con forskolina (FSK), db-cAMP, pCPT-cAMP u 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) sobre los niveles de expresión proteica de la NOSe fosforilada en la serina 1177 (p-eNOS) en células HUVEC. Los valores fueron corregidos por los valores de expresión proteica de la eNOS para cada tratamiento y normalizados respecto al valor del correspondiente control. Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales) (n ≥ 4; *$p < 0,05$ o **$p < 0,01$ respecto a los valores control).

3.6 Efecto de la inhibición de distintas cinasas implicadas en la fosforilación de la eNOS sobre la liberación de NO intracelular inducida por forskolina

Tras determinar la participación de la eNOS en la liberación de NO intracelular inducida por forskolina en las células endoteliales, se procedió a evaluar la participación de distintas cinasas en la activación de la eNOS por fosforilación en la serina 1177 (ver Discusión) mediante el empleo de inhibidores selectivos.

La preincubación de células HUVEC durante 10 minutos con wortmanina (500 nM), un inhibidor de la IP3K no modificó de forma significativa la fluorescencia basal (-16,97 ± 11,55 unidades arbitrarias de fluorescencia; $p > 0.05$) y provocó un descenso significativo en la liberación de NO inducida por la forskolina (10 µM) (12,88 ± 3,61 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 11; $p < 0,01$) (figura 44).

La preincubación de las células durante 10 minutos con el Compuesto C (1µM), un inhibidor de la AMPK, o con KN 93 (1 µM), un inhibidor de la CaMKII, produjo un aumento de la fluorescencia basal (52,29 ± 11,51 y 34,58 ± 17,76 unidades arbitrarias de fluorescencia, respectivamente, $p < 0,01$) y no afectó a la liberación de NO inducida por la forskolina (10 µM) (24,85 ± 5,18 y 39,44 ± 6,04 unidades arbitrarias de fluorescencia, respectivamente; n ≥ 4; $p > 0,05$) (figura 44).

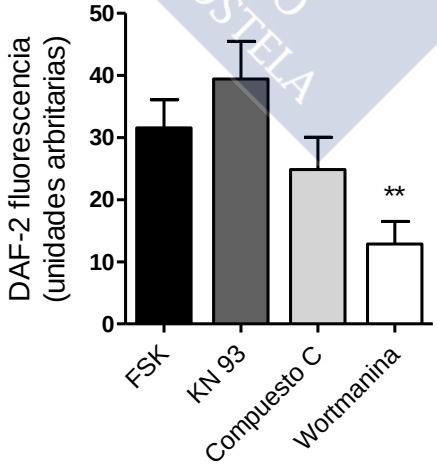

Figura 44. Efecto del KN 93 (1 µM), Compuesto C (1 µM) o de la wortmanina (500 nM) en la liberación de NO intracelular inducida por la forskolina (FSK) en células HUVEC. Cada barra representa la media ± e.e.m. (indicado por líneas verticales) de al menos cuatro experimentos (**$p < 0,01$ respecto al valor de la FSK).

4 Efecto de la exposición a hipoxia sobre el endotelio vascular

4.1 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la homeostasis de NO en las células endoteliales

Con la intención de estudiar el posible efecto de la hipoxia en la generación de NO en células endoteliales, se cuantificó la producción de NO en células HCAEC tras permanecer 24 h en condiciones de hipoxia (2% tensión parcial de O_2). De forma paralela, se mantuvieron cultivos de células HCAEC en condiciones de normoxia (95% tensión parcial de O_2) y se emplearon como control. Para la determinación de la producción de NO, se empleó un kit comercial de alta sensibilidad para la determinación de nitritos (apartado 7 de Material y Métodos).

Las células HCAEC, tras permanecer 24 h en condiciones de hipoxia, mostraron un descenso significativo de los niveles de NO (0,69 ± 0,11 nitritos pM/mg de proteína; n = 9; $p < 0,05$) respecto a los valores control obtenidos en condiciones de normoxia (figura 45).

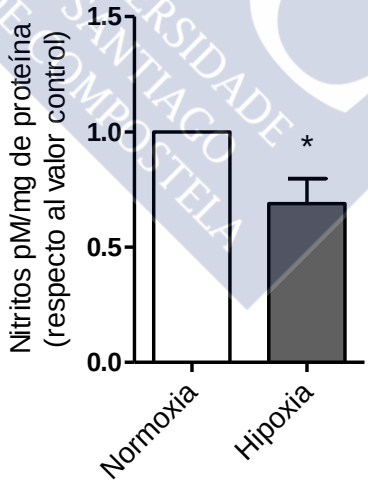

Figura 45. Generación de NO en células HCAEC en condiciones de normoxia y tras 24 h expuestas a hipoxia Los datos obtenidos fueron corregidos por la concentración de proteína (mg) para cada muestra y normalizados respecto al valor de la muestra control en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia (valor 1)**.** Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia); n = 9; *$p < 0.05$ respecto al valor obtenido en condiciones de normoxia).

4.2 Efecto de la exposición a hipoxia en la generación de EROs en las células endoteliales

El efecto de la hipoxia sobre la generación de EROs en células HCAEC fue determinado mediante citometría de flujo empleando la sonda fluorescente DCFH-DA (apartado 8 de Material y Métodos).

Tras la exposición de las células HCAEC a hipoxia durante 24 h, se observó un incremento significativo de la generación de EROs (1,55 ± 0,14 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 7; $p < 0,01$ respecto a las células cultivadas en condiciones de normoxia (figura 46). Como control positivo de la técnica se empleó H_2O_2 10 µM (datos no mostrados).

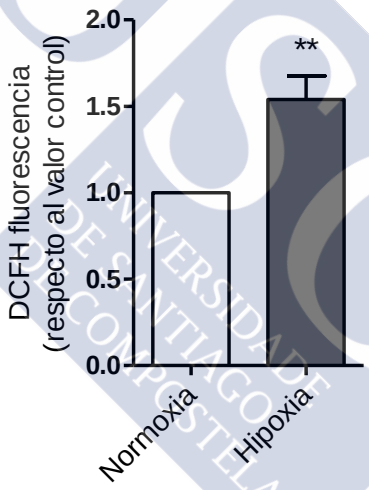

Figura 46. Generación de EROs en células HCAEC en condiciones de normoxia y tras 24 horas expuestas a hipoxia**.** Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al valor de fluorescencia para el DCFH obtenido (valor 1) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia); n = 7; ***P* < 0,01 respecto al valor obtenido en condiciones de normoxia).

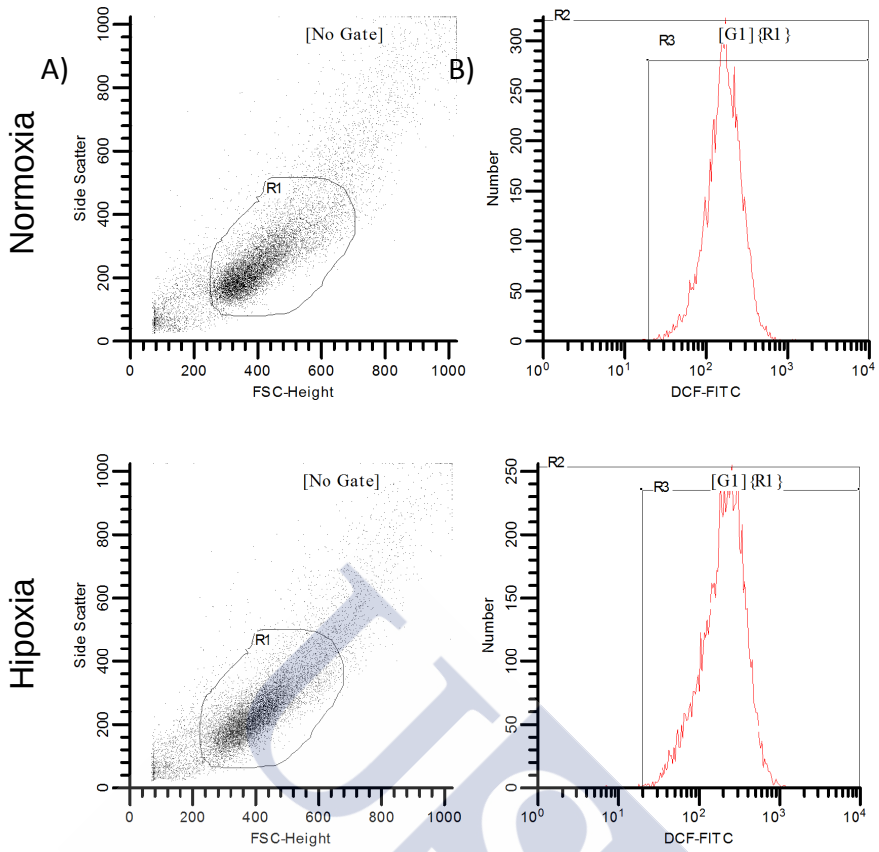

Figura 47. Imagen representativa de la determinación de la generación de EROs en células HCAEC en condiciones de normoxia (arriba) e hipoxia (abajo) con la sonda fluorescente DFCH-DA mediante citometría de flujo. A la izquierda se muestra un escatergrama (cada punto representa una célula) dónde se ha seleccionado una región (R1). A la derecha se representa un histograma de intensidad de fluorescencia del DCFH de las células de la región R1.

4.3 Efecto de la hipoxia sobre la expresión de la eNOSen las células endoteliales

Mediante técnicas estandarizadas de *western blot* se evaluaron los efectos de 24 h en condiciones de hipoxia sobre la expresión de la enzima eNOS en células HCAEC. En condiciones de normoxia, los *blots* realizados con los lisados celulares de estas células presentan una banda correspondiente a la enzima eNOS (~140 kDa) (figura 48 A). En células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia, la intensidad de dicha banda se vió significativamente disminuida (0,63 ± 0,08 unidades densiométricas; n = 3; $p < 0,05$; respecto a los valores en condiciones de normoxia) (figura 48 B).

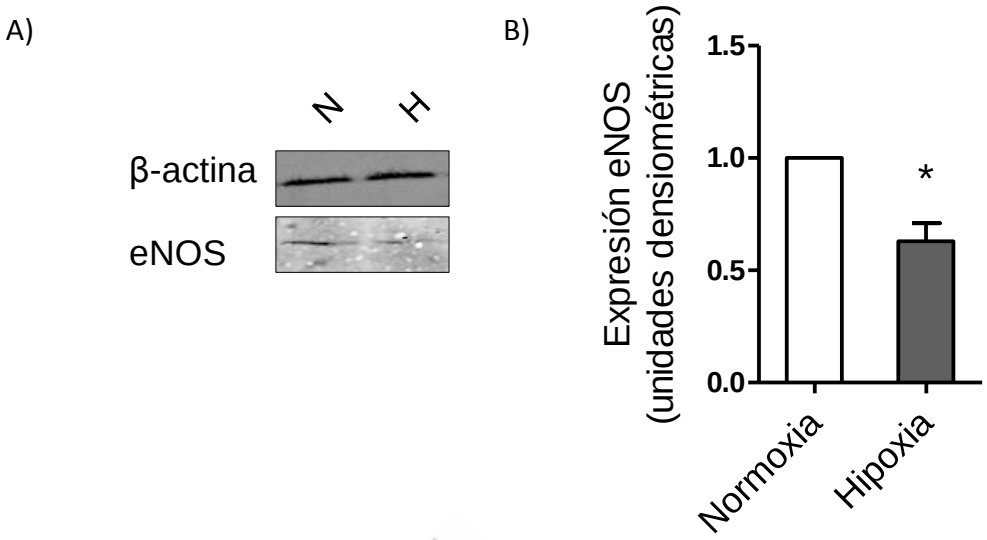

Figura 48. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico del efecto de 24 h de exposición a hipoxia sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la eNOS en células HCAEC. Los valores de expresión fueron corregidos respecto al valor de expresión de la β-actina para cada muestra. Los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda para normoxia (valor 1) Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia). (n = 3; **p* < 0,05 respecto al valor obtenido en condiciones de normoxia).

Asimismo, se determinó el efecto de la exposición a hipoxia durante 24 h en la expresión de la eNOS en HCAEC mediante inmunofluorescencia indirecta empleando un microscopio confocal (apartado 5.4 de Material y Métodos). Tal y como se observa en la figura 49 la intensidad de la señal de fluorescencia (fluorescencia roja) correspondiente al nivel de expresión de la proteína eNOS es significativamente menor en aquellas células que han permanecido en condiciones de hipoxia (% de reducción de la intensidad de fluorescencia: 30,76 ± 11,83; n ≥ 93; *p* < 0,05) comparado con las células que se mantuvieron en condiciones de normoxia.

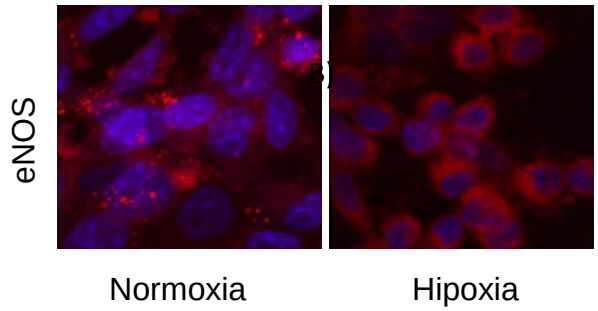

Figura 49. Imagen de microscopía de fluorescencia confocal de la inmunotinción para la proteína eNOS (fluorescencia roja) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia. La tinción del núcleo celular se realizó con 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI)(fluorescencia azul).

4.4 Efecto de la hipoxia sobre la expresión de las proteínas efectoras de AMPc en las células endoteliales

Mediante técnicas estandarizadas de *western blot* se evaluó el efecto de la exposición a hipoxia durante 24 h sobre la expresión proteica de la Epac y de la subunidad reguladora de la PKA-RIIα en células HCAEC.

Los *blots* realizados con los lisados celulares de las células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia presentaron una banda para la proteína Epac-1 (~100 kDa); isoforma mayoritaria en células endotelilales (figura 50 A). Sin embargo, el nivel de expresión de la Epac-1 fue reducido de forma significativa en las células HCAEC expuestas a condiciones de hipoxia (0,43 ± 0,07 unidades densiométricas; n = 5; $p < 0,01$ respecto a los valores obtenidos en condiciones de normoxia) (figura 50 B).

Estos resultados fueron confirmados mediante inmunofluorescencia directa empleado microscopía confocal. En las células expuestas a condiciones de hipoxia (24 h) la señal fluorescente de la Epac-1 (fluorescencia roja), y por lo tanto su nivel de expresión, es significativamente menor (% de reducción de la intensidad de fluorescencia: 55,28 ± 8,30; n ≥ 17; $p < 0,01$) en comparación con la señal obtenida en las células HCAEC en condiciones en normoxia (figura 51).

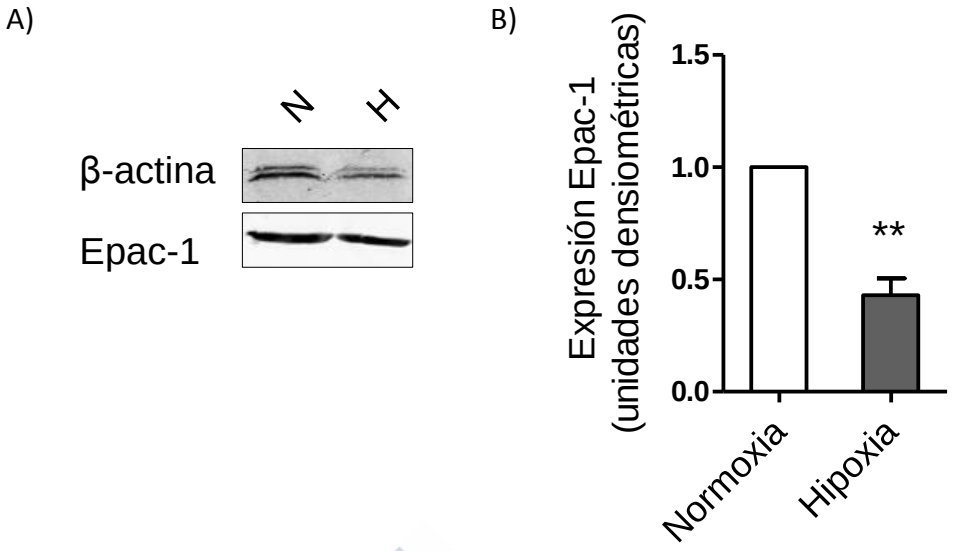

Figura 50. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico del efecto de 24 h de exposición a hipoxia sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la Epac-1 en células HCAEC. Los valores de expresión fueron corregidos respecto al valor de expresión de la β-actina para cada muestra. Los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda para normoxia (valor 1) Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia) (n = 5; $^{**}p < 0{,}01$ respecto al valor obtenido en condiciones de normoxia).

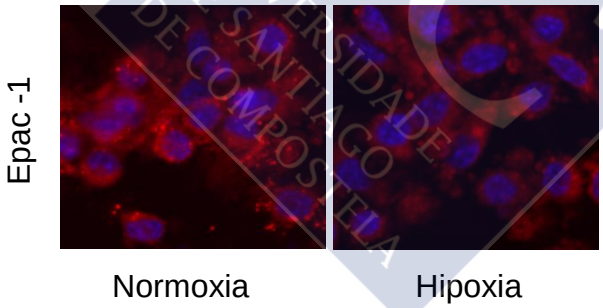

Figura 51. Imagen de microscopía de fluorescencia confocal de la inmunotinción para la proteína Epac-1 (fluorescencia roja) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia. La tinción del núcleo celular se realizó con 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI) (fluorescencia azul).

Mediante técnicas de *western blot* también se evaluó el efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión proteica de la isoforma Epac-2. Los lisados de células HCAEC mostraron una banda en el peso molecular esperado (~115 kDa) tras el marcaje de la membrana con diferentes anticuerpos primarios anti-Epac-2 humana (ver apartado 6 de Material y Métodos; datos no mostrados).

Siguiendo el mismo protocolo descrito para la Epac, se emplearon técnicas de *western blot* para determinar el efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de la subunidad reguladora de la PKA-RIIα. Los *blots* realizados con los lisados celulares de las células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia, presentaron una banda para la proteína PKA-RIIα (~50 kDa) (figura 52 A). Mediante el análisis de densiometría de la intensidad de las bandas para la PKA-RIIα, la exposición a hipoxia de las células HCAEC no modificó de forma significativa el nivel de la expresión de dicha proteína (0,7 ± 0,13 unidades densiométricas; n = 5; *p* = 0,07, respecto a los valores de expresión en condiciones de normoxia) (figura 52 B).

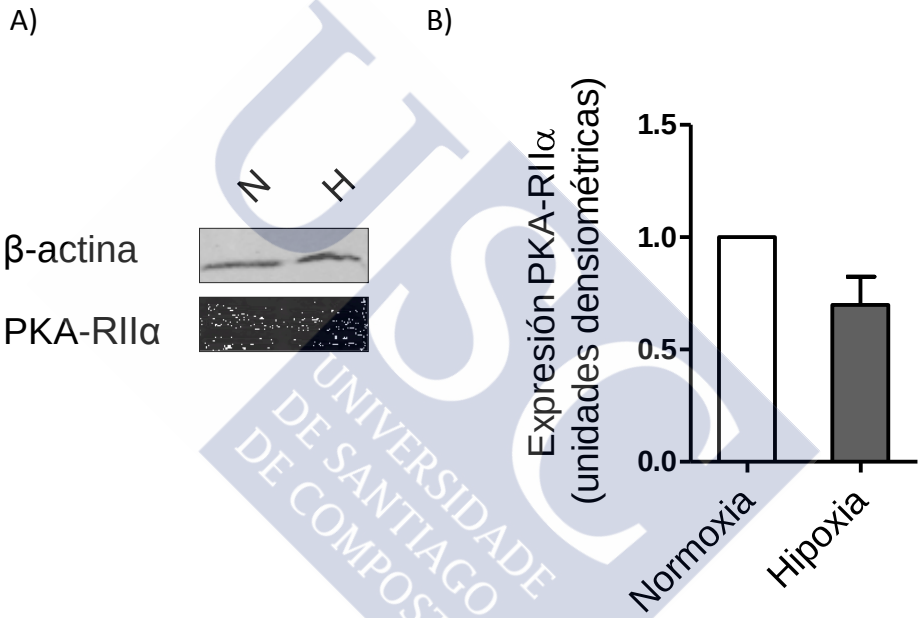

Figura 52. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico del efecto de 24 h de exposición a hipoxia sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la PKA-RIIα en células HCAEC. Los valores de expresión fueron corregidos respecto al valor de expresión de la β-actina para cada muestra. Los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda en condiciones de normoxia (valor 1). Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia) (n = 5; *p* = 0,07, respecto al valor en condiciones de normoxia).

Mediante inmunofluorescencia indirecta se determinó que la intensidad de la señal de fluorescencia (fluorescencia verde) correspondiente al nivel de expresión de la PKA-RIIα es significativamente menor en aquellas células que han permanecido en condiciones de hipoxia comparado con las células que se

mantuvieron en condiciones de normoxia (% de reducción de laintensidad de fluorescencia: 80,11 ± 13,71; n ≥ 16; $p < 0,01$) (figura 53).

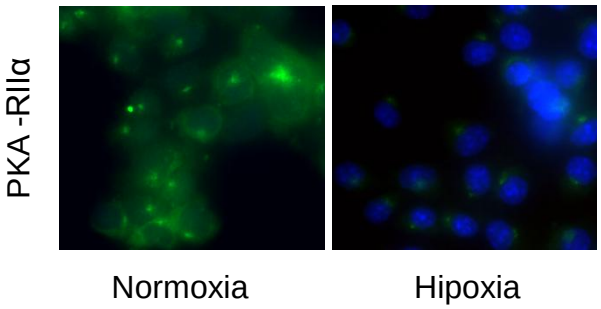

Figura 53. Imagen de microscopía de fluorescencia de la inmunotinción para la proteína PKA (RIIα) (fluorescencia verde) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia. La tinción del núcleo celular se realizó con 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI) (fluorescencia azul).

A la vista de estos resultados, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para confirmar si la reducción que provoca la exposición hipoxia en los niveles de expresión de la PKA-RIIα en células HCAEC es significativa.

Las células HCAEC mostraron una reducción significativa en el nivel relativo de ARNm codificante de la PKA-RIIα (*fold change*): 0,67 ± 0,12; n = 6; $p < 0,05$ respecto a los valores de expresión en condiciones de normoxia, confirmándose los resultados obtenidos en inmunofluorescencia.

4.5 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de las proteína arginasa en las células endoteliales

Con el fin de determinar la posible implicación de la enzima arginasa en la reducción de la expresión de la eNOS en condiciones de hipoxia se evaluó el efecto de la exposición a hipoxia durante 24 h sobre la expresión proteica de la arginasa II, (isoforma mayoritaria de ésta proteína en células endoteliales) mediante técnicas estandarizadas de *western blot*.

Los *blots* realizados con lisados celulares de células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia, presentaron una banda para la enzima arginasa II (~35-38 kDa) (figura 54 A). Las células expuestas a condiciones de hipoxia mostraron un incremento significativo del nivel de expresión de la arginasa II (2,03 ± 0,22 unidades densiométricas; n = 3; $p < 0,05$ respecto a los valores obtenidos en condiciones de normoxia) (figura 54 B).

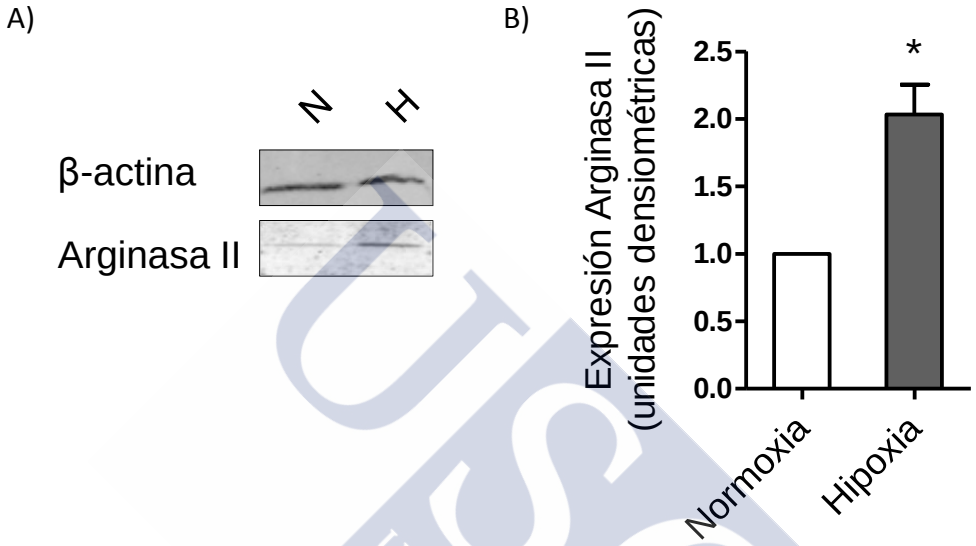

Figura 54. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico del efecto de 24 h de exposición a hipoxia sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la Arginasa II en células HCAEC. Los valores de expresión fueron corregidos respecto al valor de expresión de la β-actina para cada muestra. Los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda obtenida en condiciones de normoxia (valor 1) Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia) (n = 3; *$p <$ 0,05 respecto al valor en condiciones de normoxia).

Estos resultados fueron confirmados mediante inmunofluorescencia directa (figura 55). En estos experimentos, se observó un incremento de la señal fluorescente, correspondiente al nivel de expresión de la arginasa II, en aquellas células HCAEC expuestas a condiciones de hipoxia (16,64 ± 4,16 intensidad de fluorescencia), en comparación con las células que se mantuvieron en condiciones en normoxia (0,56 ± 4,16 intensidad de fluorescencia; n ≥ 8; $p < 0,01$).

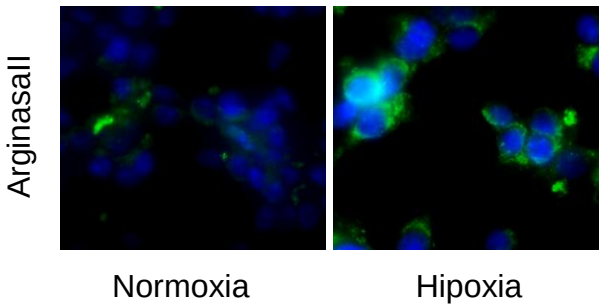

Figura 55. Imagen de microscopía de fluorescencia de la inmunotinción para la proteína arginasa II (fluorescencia verde) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia. La tinción del núcleo celular se realizó con 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI) (fluorescencia azul).

4.6 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de la proteína VE-cadherina en las células endoteliales

Mediante técnicas estandarizadas de *western blot* se evaluó el efecto de la exposición a hipoxia durante 24 h sobre la expresión proteica de la VE-cadherina. Los *blots* realizados con los lisados celulares de las células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia presentaron una banda para la proteína VE-cadherina (~130-140 kDa) (figura 56 A). Mediante el análisis de densiometría de la intensidad de las bandas, se determinó que la exposición a hipoxia de las células HCAEC no modificó de forma significativa el nivel de la expresión de la VE-cadherina (0,79 ± 0,02 unidades densiométricas; n = 5; $p < 0,01$ respecto a los valores obtenidos en condiciones de normoxia) (figura 56 B).

Mediante inmunofluorescencia directa, empleado microscopía confocal, no se observaron diferencias en la intensidad de la señal fluorescente correspondiente al nivel de expresión de la VE-cadherina entre las células HCAEC que se mantuvieron en condiciones en normoxia (100% de intensidad de fluorescencia) o de hipoxia (99,24 ± 20,99; n ≥8; $p > 0,05$).

Los resultados obtenidos mediante *western blot* fueron confirmados con ensayos de RT-PCR en tiempo real, en los que las células HCAEC mostraron una reducción significativa en el nivel relativo de ARNm codificante de la VE-cadherina (0,77 ± 0,08; n = 9; $p < 0,05$ respecto a los valores de expresión en condiciones de normoxia).

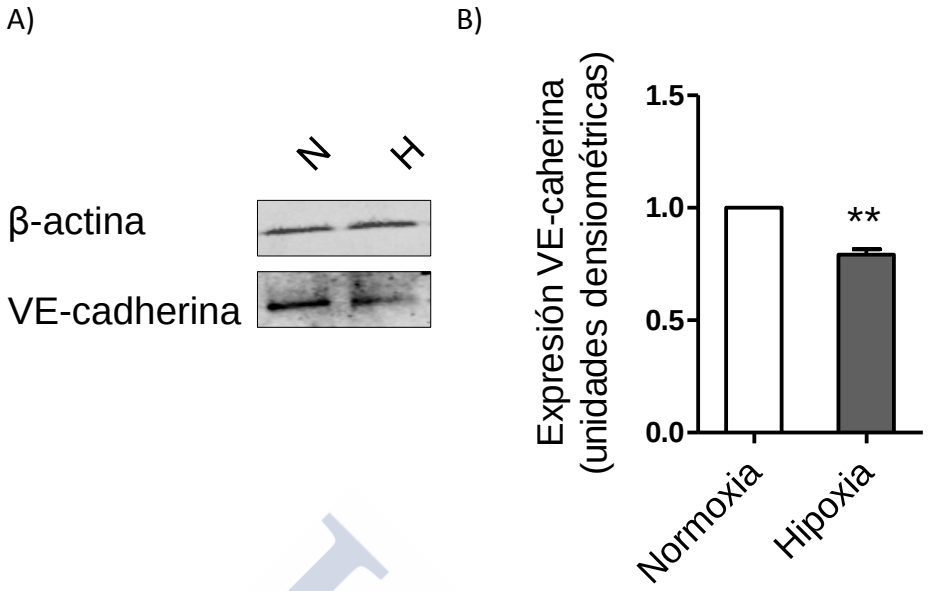

Figura 56. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico del efecto de 24 h de exposición a hipoxia sobre los niveles de expresión proteica (cuantificado por densitometría de las bandas) de la VE-cadherina en células HCAEC. Los valores de expresión fueron corregidos respecto al valor de expresión de la β-actina para cada muestra. Los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda en condiciones de normoxia (valor 1). Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia) (n = 5; $^{**}p < 0,01$ respecto al valor en normoxia).

4.7 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la permeabilidad de la barrera endotelial en las células endoteliales

El efecto de la hipoxia sobre la permeabilidad de la monocapa endotelial fue determinado en células HCAEC empleando como indicador del grado de permeabilidad una solución fluorescente de FITC-Dextrano (apartado 9 de Material y Métodos).

Tras la exposición a hipoxia durante 24 h, se observó un incremento significativo de la permeabilidad endotelial (2,24 ± 0,38 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 3; $p < 0,01$ respecto a las células cultivadas en condiciones de normoxia) (figura 57). Como control positivo de la técnica se midió la fluorescencia de FITC-Dextrano en aquellos insertos en los que no se sembraron células (datos no mostrados).

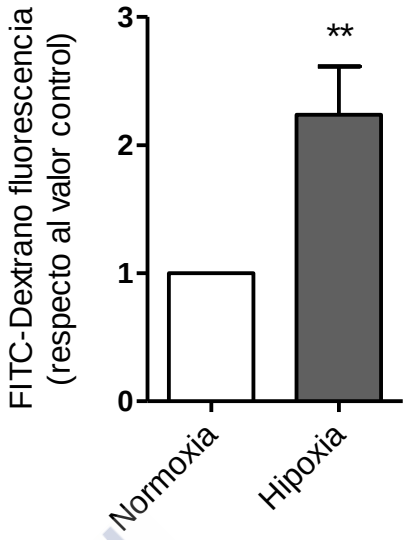

Figura 57. Permeabilidad de la monocapa endotelial en células HCAEC en condiciones de normoxia y tras 24 horas expuestas a hipoxia**.** Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al valor de fluorescencia para el FITC-Dextrano obtenido (valor 1) en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia Cada barra representa la media ± e.e.m. (línea vertical, condiciones de hipoxia); n = 3; ***p* < 0,01 respecto al valor obtenido en condiciones de normoxia).

4.8 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de la proteína Epac-1 en ratones modelo OIR

Mediante inmunofluorescencia indirecta se estudiaron los cambios en la expresión de la proteína Epac-1 en las retinas aisladas de los ratones modelo OIR (apartado 5.4 de Material y Métodos) durante la fase de hipoxia, edad P12 (6 h de exposición a hipoxia) y P13 (24 h de exposición a hipoxia), en el desarrollo de dicha retinopatía.

Los resultados obtenidos muestran una reducción en la intensidad de la señal de fluorescencia correspondiente al nivel de expresión proteica de la Epac-1 en la secciones de retina asilada de ratón modelo OIR a la edad P12 y edad P13 días (% reducción intensidad de fluorescencia 83,11 ± 4,7 y 71,70 ± 5,62 respectivamente, n=5; $p < 0,01$) comparado con los correspondientes ratones control (100% de intensidad de fluorescencia) (figura 58).

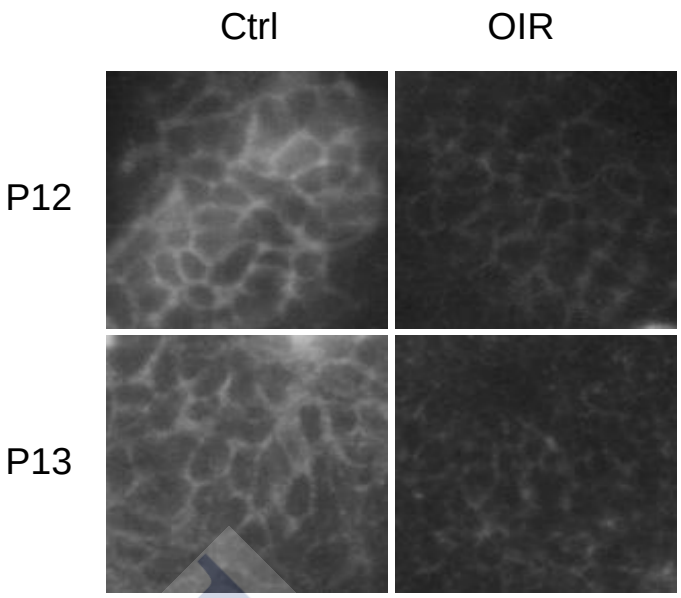

Figura 58. Imágenes representativas de la tinción inmunológica indirecta de la proteína Epac-1 en secciones de retina aislada de ratón modelo OIR y ratones control (Ctrl) de edad P12 y P13 días**.**

Estos resultados fueron confirmados mediante RT-PCR en tiempo real realizada a partir de ARN extraído de homogenados de retina aislada de ratón OIR y ratones control. Como se muestra en la figura 59, los niveles relativos de ARNm codificante de la Epac-1 se encuentran significativamente disminuidos en los homogenados de retina de los ratones OIR a edad P12 comparado con los ratones control (0,5 ± 0,13; n = 4; $p < 0.05$ con respecto al valor control P12 normalizado a 1). Asimismo, también se muestra una reducción de la expresión de la Epac-1 en ratones OIR a edad P13 comparado con los ratones control (0,54 ± 0,14; n = 5; $p < 0.05$ con respecto al valor control P13: 0,96 ± 0,09) (figura 59).

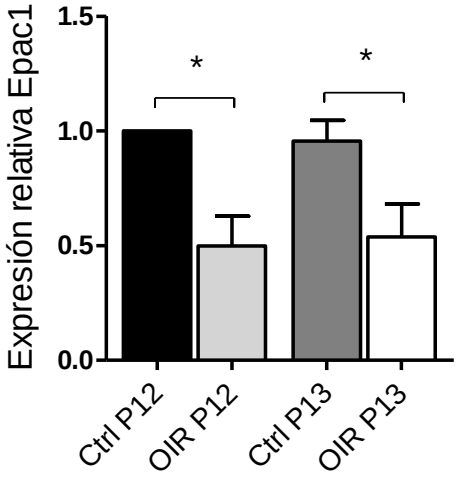

Figura 59. Niveles relativos de ARNm codificante de la Epac-1 en homogenado de retina de ratón modelo OIR y ratones control (Ctrl) de edad postnatal P12 y P13 días. Los valores de expresión fueron corregidos por los valores de expresión de la subunidadad ribosomal 18S para cada muestra y normalizados respecto al valor del control P12. Cada barra representa la media ± e.e.m (indicado por líneas verticales, excepto Ctrl P12) de al menos cuatro experimentos; *p < 0,05 con respecto al correspondiente control.

4.9 Efectos de fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la generación de NO y EROs en condiciones de normoxia y de hipoxia en las células endoteliales

En condiciones de normoxia la incubación de células HCAEC durante 24 h con fenoterol (1 µM), forskolina (10 µM), 6-Bnz-cAMP (300 µM) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) no indujo ningún cambio significativo en la generación de NO (nitritos pM/mg proteína: 1,02 ± 0,17; 0,78 ± 0,03; 0,91 ± 0,1 y 0,79 ± 0,1, respectivamente; n ≥ 5; p > 0,05 respecto al correspondiente control en presencia o ausencia de DMSO en condiones de normoxia) (figura 60).

En condiciones de hipoxia, la incubación con fenoterol (1µM) o con forskolina (1 µM) restauró los niveles de NO a valores obtenidos en condiciones de normoxia (nitritos pM/mg proteína: 0,93 ± 0,3 y 1,11 ± 0,31, respectivamente; n = 6). La incubación con 6-Bnz-cAMP (300 µM) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) indujo un incremento significativo en los niveles de NO: 1,62 ± 0,48 y 1,45 ± 0,44 nitritos

pM/mg de proteína, respectivamente (n ≥ 4; p < 0,05 respecto al control en condiciones de hipoxia) (figura 60).

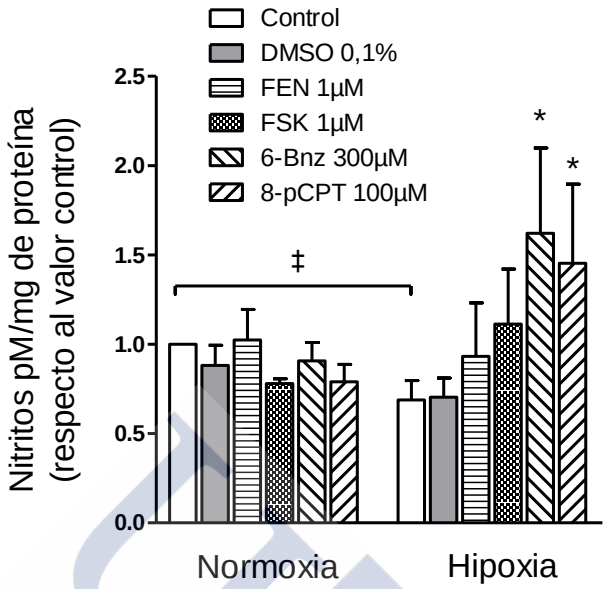

Figura 60. Efecto de la incubación con fenoterol (FEN), forskolina (FSK), 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (8-pCPT) sobre los niveles de NO en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia. Los datos obtenidos fueron corregidos por la concentración de proteína (mg) para cada muestra. Los valores obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1. Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control en normoxia) (n ≥ 4; *p < 0,05 respecto al valor control en hipoxia, ‡p < 0.05 entre los valores control en condiciones de normoxia e hipoxia

En condiciones de normoxia, la incubación durante 24 horas con fenoterol (1µM) o con forskolina (1 µM), 6-Bnz-cAMP (300 µM) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) no indujo ningún cambio significativo en los niveles de EROs (unidades arbitrarias de fluorescencia: 0,99 ± 0,1, 0,80 ± 0,08, 1,01 ± 0,18 y 1,05 ± 0,16, respectivamente; n ≥5; p > 0,05 respecto al correspondiente control en presencia o ausencia de DMSO en condiciones de normoxia) (figura 61).

En condiciones de hipoxia la preincubación con fenoterol (1 µM) no indujo ningún cambio en los niveles intracelulares de EROs: 1,49 ± 0,12 (n = 8, p > 0,05 con respecto al control con DMSO en condiciones de hipoxia) (figura 61). La incubación con forskolina (1µM); 6-Bnz-cAMP (300 µM) o 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) indujo un descenso significativo en los niveles intracelulares de EROs (unidades

arbitrarias de fluorescencia: 1,03 ± 0,13; 1,06 ± 0,09 y 0,85 ± 0,16, respectivamente (n ≥ 3; p < 0,05 respecto al correspondiente control en presencia o ausencia de DMSO en condiciones de hipoxia) (figura 61).

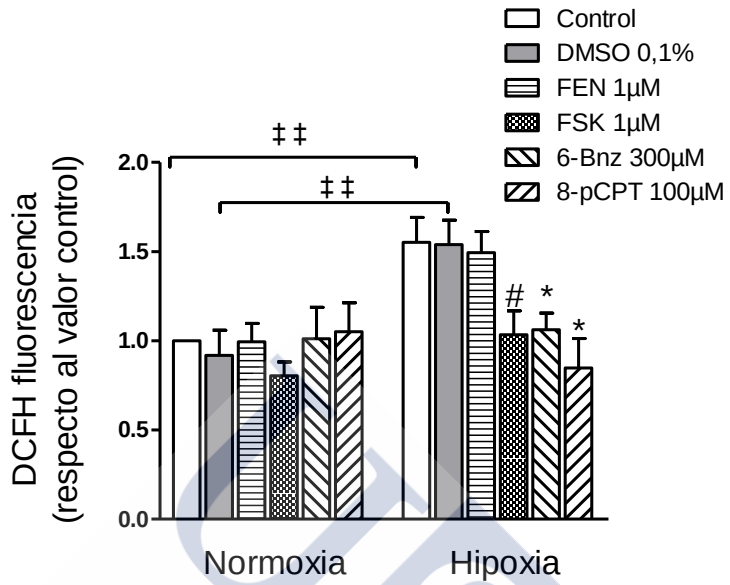

Figura 61. Efecto de la incubación con fenoterol (FEN), forskolina (FSK), 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (8-pCPT) sobre los niveles de EROs en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia y de hipoxia. Los valores de fluorescencia para el DCFH obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1. Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control en normoxia) (n ≥ 3; *p < 0,05 respecto a los valor control en hipoxia, #p < 0,05 respecto a los valores control con DMSO en condiciones de hipoxia, ‡‡p < 0,01 entre los valores control con o sin DMSO en condiciones de normoxia o hipoxia).

4.10 Efectos de fármacos que incrementan el AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la activación de la eNOS en las células endoteliales expuestas a hipoxia.

Mediante técnicas estandarizadas de *western blot* se evaluó el efecto de diversos fármacos que incrementan los niveles de AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la activación de la eNOS por fosforilación en su residuo serina 1177 (p-eNOS). Los valores de intensidad de las bandas de la p-eNOS fueron normalizados por el valor de la intensidad de las bandas de la eNOS correspondientes a una misma muestra (ratio p-eNOS /eNOS).

Las células HCAEC permanecieron en condiciones de hipoxia durante 23 h, tras lo cual se añadieron los distintos tratamientos: fenoterol (1 µM) forskolina (10 µM), 6-Bnz-cAMP (300 µM) y 8-pCPT-cAMP (100 µM). A continuación las células se mantuvieron 1 h más (hasta completar las 24 h) en condiciones de hipoxia. Ninguno de los tratamiento modificó los valores de expresión proteica de lae NOS (figura 62).

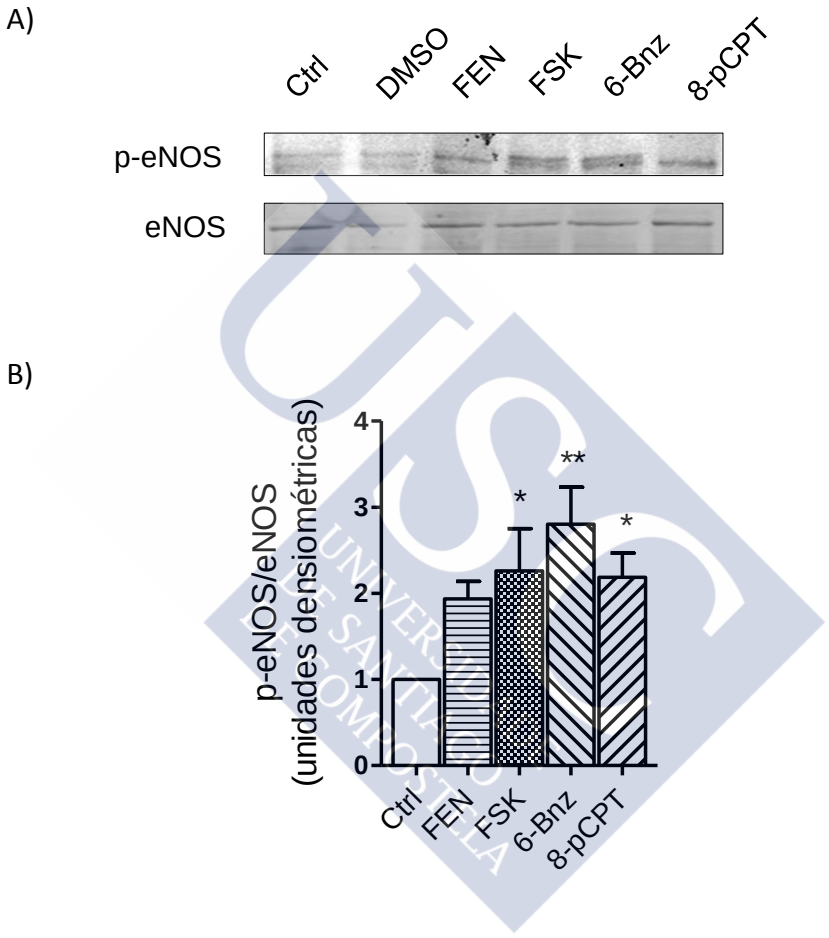

Figura 62. A) *Blot* representativo y B) análisis densiométrico del efecto del tratamiento durante 1 h con fenoterol (FEN), forskolina (FSK), 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) en células HCAEC expuestas a hipoxia durante 24 h sobre el ratio p-eNOS/eNOS. Los valores de ratio p-eNOS/eNOS de las muestras con distintos tratamientos fueron normalizados con respecto al valor del correspondiente control (valor 1). Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control) (n ≥ 4; **p* < 0,05 o ***p* < 0,01 respecto al valor control).

Los tratamientos con forskolina (2,26 ± 0,49; n = 4; $p < 0,05$), 6-Bnz-cAMP (2,8 ± 0,43; n = 4; $p < 0,01$) y 8-pCPT-cAMP (2,19 ± 0,28; n = 6; $p < 0,05$) incrementaron de forma significativa el valor relativo de expresión de la p-eNOS (ratio p-

eNOS/eNOS). Por el contrario, este valor no se vió significativamente modificado tras el tratamiento durante 1 h con fenoterol (1,93 ± 0,2; n = 4; $p > 0,05$) (figura 62).

4.11 Efectos de fármacos que incrementan los niveles de AMPc o que modifican sus rutas de señalización sobre la hiperpermealidad inducida por hipoxia en las células endoteliales

En condiciones de normoxia, la incubación de células HCAEC durante 24 h con fenoterol (1 µM), forskolina (10 µM), 6-Bnz-cAMP (300 µM) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) no indujo ningún cambio en la permeabilidad de la monocapa endotelial (unidades arbitrarias de fluorescencia: 1,16 ± 0,16; 0,87 ± 0,15; 1,11 ± 0,21 y 1,02 ± 0,12, respectivamente; n = 3; $p > 0,05$ respecto al correspondiente control en ausencia o en presencia de DMSO en condiciones de normoxia) (figura 63).

En condiciones de hipoxia, la incubación con forskolina (1 µM) redujo el incremento de la permeabilidad (1,26 ± 0,2 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 3 respecto al control con DMSO en condiciones de hipoxia). Por el contrario, la incubación con fenoterol (1µM) no modificó el incremento de permeabilidad de la monocapa endotelial inducido por la hipoxia (2,29 ± 0,34 unidades arbitrarias de fluorescencia; n = 3; $p > 0,05$ respecto al control con DMSO en condiciones de hipoxia).

En condiciones de hipoxia la incubación con 6-Bnz-cAMP (300 µM) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) redujo de forma significativa el incremento de permeabilidad inducido por la hipoxia (unidades arbitrarias de fluorescencia: 1,26 ± 0,22 y 1,21 ± 0,18, respectivamente; n = 3; $p < 0,05$ respecto al control en condiciones de hipoxia) (figura 64).

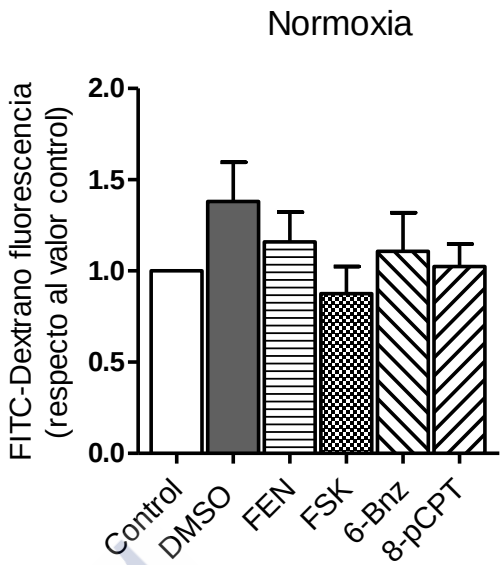

Figura 63. Efecto de la incubación con fenoterol (FEN), forskolina (FSK), 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (8-pCPT) sobre la permeabilidad de la monocapa de células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia. Los valores de fluorescencia para el FITC-Dextrano obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1. Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control) (n =·3)

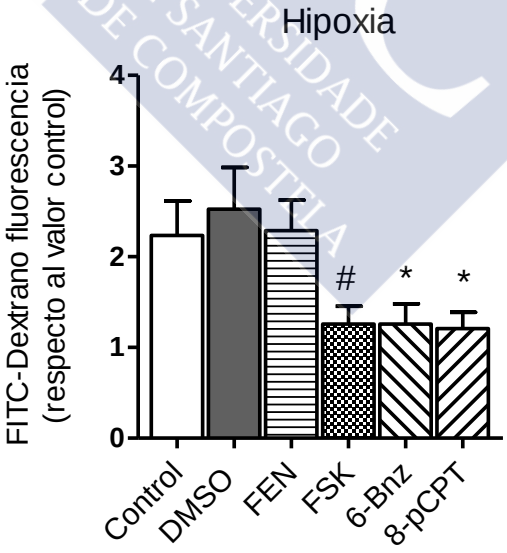

Figura 64. Efecto de la incubación con fenoterol (FEN), forskolina (FSK), 6-Bnz-cAMP (6-Bnz) u 8-pCPT-2'OMe-cAMP (8-pCPT) sobre la permeabilidad de la monocapa de células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia. Los valores de fluorescencia para el FITC-Dextrano obtenidos se expresaron respecto al valor control en normoxia (valor 1). Cada barra representa la media ± e.e.m.

(líneas verticales) (n =·3; *p < 0,05 respecto a los valor control en hipoxia, #p < 0,05 respecto a los valor control DMSO en condiciones de hipoxia).

4.12 Efectos de inhibidores de arginasa sobre los niveles de NO y ROS en condiciones de normoxia y de hipoxia en las células endoteliales

Con el fin de determinar el posible papel de la Arginasa en los cambios en los niveles de NO y EROs observado en condiciones de hipoxia, se procedió a incubar a las células HCAEC con inhibidores específicos de la Arginasa, el 2–S-amino-6-ácido Boronohexanoico (ABH) y el Nω-hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA).

En condiciones de normoxia, la incubación de las células HCAEC durante 24 h con ABH (10 µM) o con nor-NOHA (100 µM) no modificó de forma significativa los niveles de NO (nitritos pM/mg de proteína: 1,09 ± 0,55 y 0,74 ± 0,23; n ≥ 3; p > 0,05 respecto al control en normoxia). En condiciones de hipoxia, el ABH (10 µM) restauró los niveles de NO a valores obtenidos en condiciones de normoxia (nitritos pM/mg proteína: 1,12 ± 0,22 respecto al control en hypoxia). Por el contrario, la incubación con nor-NOHA (100 µM) no modificó los niveles de NO en condiciones de hipoxia 0,69 ± 0,14 nitritos pM/mg de proteína (n = 3; p > 0,05 respecto al control en hipoxia) (figura 65).

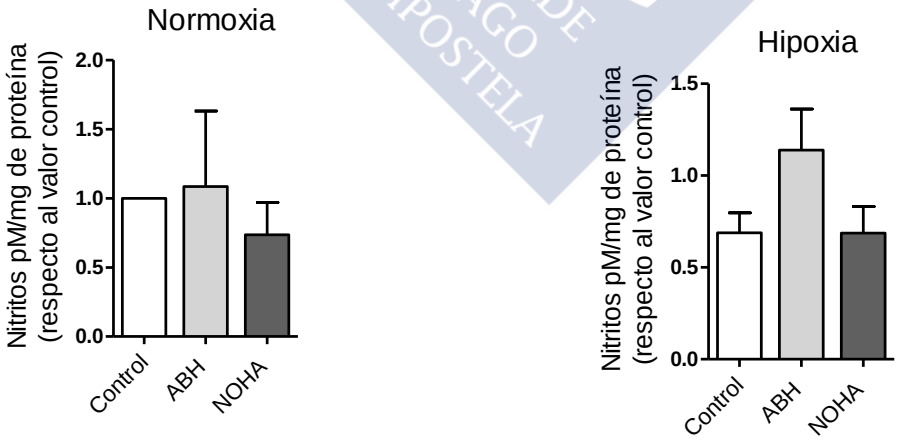

Figura 65. Efecto de la incubación con ABH (10 µM) y NOHA (100 µM) sobre los niveles de NO en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia (n ≥ 3). Los datos obtenidos fueron corregidos por la concentración de proteína (mg) para cada muestra. Los valores obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1**.** Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control en normoxia).

A continuación, mediante citometría de flujo empleando la sonda fluorescente DCFH-DA, se determinó el efecto del ABH (10 µM) sobre los niveles intracelulares de EROs en células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia y de normoxia. En ambos casos, la incubación durante 24 h con ABH (10 µM) no modificó los niveles de EROs (figura 66).

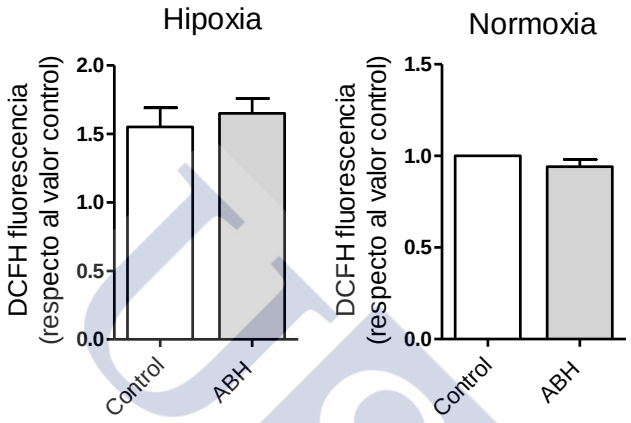

Figura 66. Efecto de la incubación con ABH (10µM) sobre los niveles de EROs en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia o de hipoxia (n = 5) Los valores de fluorescencia para el DCFH obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1**.** Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control en normoxia).

4.13 Efectos de inhibidores de HATs e inhibidores de HDACs sobre niveles de NO y ROS en condiciones de normoxia y de hipoxia en las células endoteliales

En esta serie de experimentos investigamos la posible implicación de las histonas acetil transferasas (HATs) y de las histonas deacetilasas (HDACs) en la generación de NO y de EROs en células endoteliales. Para ello, las células HCAEC fueron incubadas durante 24 h en condiciones de normoxia o de hipoxia con inhibidores de HATs: ácido araquidónico (AA) y MG149, así como con inhibidores de HDACs: ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA), butirato de sodio (Sb) y ácido valproico (VPA)

El tratamiento con AA (10 µM) o MG149 (10 µM) no mostró ningún efecto sobre la generación de NO en las células HAEC cultivadas en condiciones de normoxia (nitritos pM/mg de proteína: 0,77 ± 0,2 y 0,65 ± 0,07, respectivamente; n ≥ 4; $p > 0,05$; respecto al control con DMSO en condiciones de normoxia) (figura 67) o de hipoxia (nitritos pM/mg de proteína: 1,22 ± 0,35 y 1,53 ± 0,42, respectivamente; n ≥ 4; $p > 0,05$; respecto al control con DMSO en condiciones de hipoxia) (figura 68).

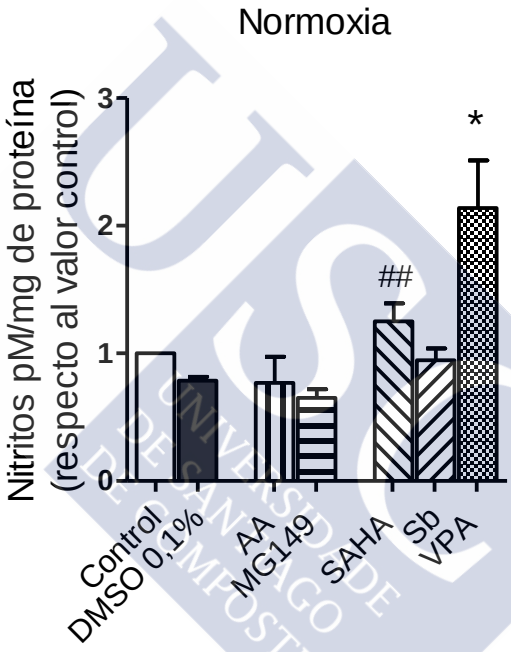

Figura 67. Efecto de la incubación con inhibidores de HATs: AA (10 µM) y MG149 (10 µM) o con inhibidores de HDACs: SAHA (10 µM), Sb (10 µM) y VPA (200 µM) sobre la generación de NO en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia. Los datos obtenidos fueron corregidos por la concentración de proteína (mg) para cada muestra. Los valores obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1 (n ≥ 4; ## $p < 0,01$ respecto a los valores control con DMSO 0,1% y *$p < 0.05$ respecto a los valores control). Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control).

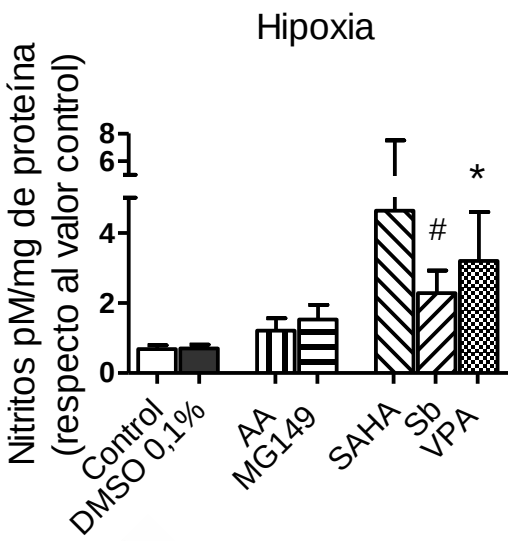

Figura 68. Efecto de la incubación con inhibidores de HATs: AA (10 µM) y MG149 (10 µM) o con inhibidores de HDACs: SAHA (10 µM), Sb (10 µM) y VPA (200 µM) sobre la generación de NO en células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia. Los datos obtenidos fueron corregidos por la concentración de proteína (mg) para cada muestra. Los valores obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1 (n ≥ 4; #p < 0,05 respecto a los valores control con DMSO 0,1% y *p < 0.05 respecto a los valores control). Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control).

Además, los niveles intracelulares de EROs no fueron modificados por dichos inhibidores en células cultivadas en condiciones de normoxia (unidades arbitrarias de fluorescencia: 1,05 ± 0,16 y 1,05 ± 0,16, para el AA y el MG149 respectivamente; n ≥ 5; p > 0,05; respecto al control con DMSO en condiciones de normoxia) o de hipoxia (unidades arbitrarias de fluorescencia: 1,20 ± 0,19 y 1,49 ± 0,23, para el AA y el MG149 respectivamente; n ≥ 3; p > 0,05 respecto al control con DMSO en condiciones de hipoxia) (figura 69 y 70).

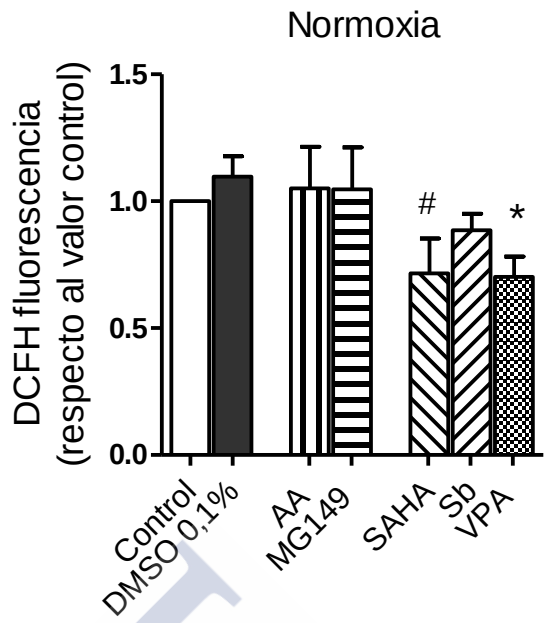

Figura 69. Efecto de la incubación con inhibidores de HATs: AA (10 µM) y MG149 (10 µM) y de los inhibidores de HDACs: SAHA (10 µM), Sb (10 µM) y VPA (200 µM) sobre la generación de EROs en células HCAEC cultivadas en condiciones de normoxia) Los valores de fluorescencia para el DCFH obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1 (n ≥ 4; #p < 0,05 respecto a los valores control con DMSO 0,1% y *p < 0.05 respecto a los valores control). Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales, excepto control).

Los inhibidores de HDACs, SAHA (10 µM) y VPA (200 µM) incrementaron de modo significativo la generación de NO en condiciones de normoxia. Los valores obtenidos fueron (nitritos pM/mg de proteína): 1,25 ± 0,14 (n = 4; p < 0,01); 2,14 ± 0,37 (n = 5; p < 0,05); (respecto al correspondiente control en presencia o ausencia de DMSO en condiciones de normoxia) para SAHA y VPA, respectivamente (figura 68). Sin embargo el Sb (10 µM) no modificó estos niveles de forma significativa (0,95 ± 0,14 nitritos pM/mg de proteína; n = 4; p > 0,05 respecto al control con DMSO en condiciones de normoxia) (figura 67).

En condiciones de hipoxia, los inhibidores de HDACS provocaron un incremento en la generación de NO. Los valores obtenidos fueron (nitritos pM/mg de proteína): 4,64 ± 2,87 (n = 4; p < 0,05); 2,28 ± 0,65 (n = 4; p < 0,05); 3,20 ± 1,4 (n = 4; p < 0,05) (respecto al correspondiente control en presencia o ausencia de DMSO en condiciones de hipoxia) para SAHA, Sb y VPA, respectivamente (figura 68).

En condiciones de normoxia, los inhibidores de HDACs, SAHA (10 µM), Sb (10 µM) y VPA (200 µM), provocaron un descenso en la generación intracelular de EROs. Los valores obtenidos fueron (unidades arbitrarias de fluorescencia): 0,71 ± 0,14 (n = 5; $p < 0,05$); 0,88 ± 0,06 (n = 5; $p > 0,05$); 0,70 ± 0,08 (n = 4; $p < 0,05$) (respecto al correspondiente control en presencia o ausencia de DMSO en condiciones de normoxia) para SAHA, Sb y VPA, respectivamente (figura 69). En condiciones de hipoxia ni el SAHA ni el Sb modificaron los niveles de EROs (unidades arbitrarias de fluorescencia: 1,40 ± 0,23 y 1,76 ± 0,63, respectivamente; n = 3; $p > 0,05$ respecto al control con DMSO en condiciones de hipoxia). Sin embargo, el VPA indujo un marcado descenso sobre los niveles de EROs (unidades arbitrarias de fluorescencia: 0,77 ± 0,12; n = 3; $p < 0,01$; respecto al control en condiciones de hipoxia) (figura 70).

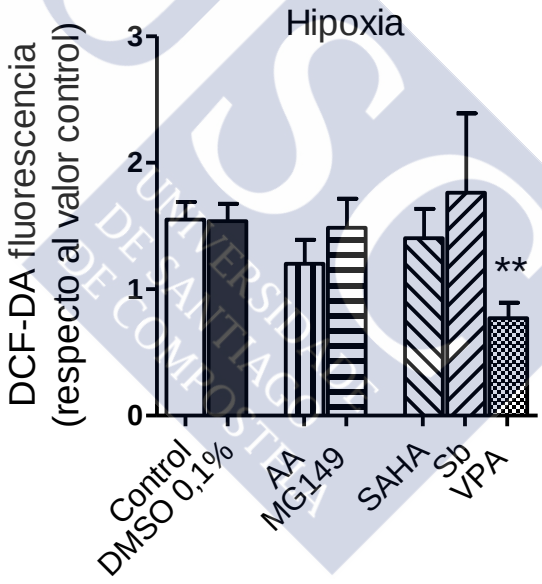

Figura 70. Efecto de la incubación con inhibidores de HATs: AA (10 µM) y MG149 (10 µM) o inhibidores de HDACs: SAHA (10 µM), Sb (10 µM) y VPA (200 µM) sobre la generación de EROs en células HCAEC cultivadas en condiciones de hipoxia) Los valores de fluorescencia para el DCFH obtenidos se expresaron respecto al valor control (células sin tratamiento en condiciones de normoxia) normalizado a 1**.** (#$p < 0,05$ respecto a los valores control con DMSO 0,1% y *$p < 0.05$ respecto a los valores control, n ≥ 3). Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Discusión

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Efectos vasorrelajantes del AMPc dependientes de endotelio

1.1 Importancia del endotelio en la relajación por forskolina/AMPc

Durante años persistió cierta controversia en cuanto a la participación del endotelio vascular en la vasodilatación inducida por el incremento de los niveles intracelulares de AMPc ($[AMPc]_i$). Diversos autores habían sugerido que dicha vasodilatación era independiente de la presencia de un endotelio funcional. Por ejemplo, se había descrito que la eliminación de esta capa celular no modificaba de forma significativa la relajación inducida por la forskolina, que incrementa la $[AMPc]_i$ por su capacidad activadora directa de la AC (Kamata *et al.*, 1989; Ouedraogo *et al.*, 1994) o que el AMPc endotelial no participaba en la regulación de la liberación de NO endotelial (Kuhn *et al.*, 1991). En contraposición, algunos autores habían sugerido que la acción vasodilatadora del AMPc era completamente dependiente del endotelio. Así, la capacidad de la isoprenalina y el salbutamol (ambos agonistas β-adrenérgicos que elevan la $[AMPc]_i$ via activación de la ruta proteína G_s/AC) o de la forskolina para dilatar la aorta de rata precontraída con noradrenalina se perdía completamente la eliminación del endotelio (Gray y Marshall, 1992). En la actualidad, es ampliamente aceptado que el endotelio vascular es parcialmente responsable del efecto vasodilatador del AMPc, aunque se mantiene la controversia en cuanto a la importancia de esta participación y en cuáles son los mecanismos subyacentes (Ferro *et al.*, 2004; Queen *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2003; Zieba *et al.*, 2011).

De acuerdo con experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, la vasodilatación directa, en ausencia de endotelio, inducida por concentraciones nanomolares de forskolina está mediada principalmente por un incremento de la $[AMPc]_i$ en las células musculares lisas vasculares (Cuíñas *et al.*, 2013). En el presente trabajo, nuestros experimentos empleando aorta de rata precontraída con fenilefrina demuestran que la relajación inducida por la forskolina o por el db-cAMP (análago del AMPc permeable a la membrana celular) posee un componente dependiente y otro independiente de endotelio, puesto que la presencia de endotelio potenció de forma significativa las relajaciones inducidas por ambos agentes. Este hecho sugiere un mayor efecto vasodilatador del AMPc en presencia de

endotelio, y concuerda con resultados descritos previamente por otros autores empleando la misma preparación (Delpy *et al.*, 1996).

Un estudio llevado a cabo con isoprenalina y forskolina concluyó que ambos fármacos eran capaces de relajar la pared vascular de la aorta de rata en un modo parcialmente dependiente de endotelio, a través de una activación de las proteínas PKA y PKG. Aunque la isoprenalina provocaba una clara vasodilatación dependiente de endotelio, la forskolina únicamente mostraba ese efecto cuando era administrado a dosis bajas (10, 100 nM) y dicha acción desaparecía cuando se utilizaban concentraciones más elevadas (1 µM) (Schäfer *et al.*, 2003). La posibilidad de que el efecto vasodilatador dependiente de endotelio desaparezca a dosis elevadas de forskolina está apoyada por el hecho de que la vasodilatación provocada por este agente (1 µM) en arteria de cola de rata no es modificada de forma significativa por la eliminación del endotelio (Ouedraogo *et al.*, 1994). En nuestros experimentos, tanto en los anillos intactos como en los desprovistos de endotelio, la relajación es completa cuando la forskolina se emplea a concentraciones ~300 nM, lo que sugiere que a partir de cierta $[AMPc]_i$ la presencia de endotelio no es determinante para su efecto vasodilatador.

1.2 Participación de la PKA en el efecto vasodilatador del AMPc

En los experimentos presentados en esta memoria, la relajación inducida por forskolina en los anillos de aorta desprovistos de endotelio no es modificada en presencia de Rp-cAMPs, un antagonista competitivo de los dominios fijadores de nucleótidos cíclicos de la PKA (de Wit *et al.*, 1984), lo cual indica que, en ausencia de endotelio, el efecto de la forskolina es debido a un mecanismo independiente de la activación de la ruta AMPc/PKA.

Sin embargo, el componente adicional, dependiente de endotelio, de la relajación inducida por la forskolina está mediado, al menos en parte, por la activación de la ruta AMPc/PKA en las células endoteliales puesto que, en nuestros experimentos, fue revertido tras la inhibición de la PKA con Rp-cAMPs. De hecho, en los anillos de aorta de rata tratados con este agente, el valor de la CI_{50} para la forskolina en

presencia de endotelio no difirió significativamente del obtenido en ausencia de endotelio. En concordancia, se ha descrito que la PKA participa en la vasorrelajación inducida por estimulación de los receptores β_2-adrenérgicos en la aorta de rata (Iranami *et al.*, 1996; Ferro *et al.*, 2004). Sin embargo, y contrariamente a los resultados aquí presentados, Kang *et al.* (2007) no encontraron efectos significativos del Rp-cAMPs sobre las contracciones inducidas por isoprenalina en aortas de rata con el endotelio intacto. Además, Ferro *et al.* (2004) sugieren que la PKA también participa de modo predominante en la relajación independiente de endotelio provocada por la estimulación de los receptores β_2-adrenérgicos. Es probable que las diferencias observadas en las distintas investigaciones se deban al empleo de distintos agentes para incrementar los niveles de AMPc.

Conviene destacar también que la aplicación de Rp-cAMPs provoca un incremento significativo de la contracción inducida por fenilefrina, aunque no induce contracciones por sí mismo en condiciones basales (datos no mostrados). Este efecto es similar en los anillos con o sin endotelio. Estos resultados sugieren que la ruta AMPc/PKA podría estar activada, al menos en parte, tras la administración de fenilefrina en las células del músculo liso y que dicha activación contrarresta parcialmente la contracción observada, para lo cual no es necesaria la presencia de un endotelio funcional. Algunos autores habían descrito que la fenilefrina puede potenciar la síntesis de AMPc (Etgen y Petitti, 1987; LeSage *et al.*, 2004). Sin embargo, en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, la fenilefrina no modificó la $[AMPc]_i$ basal en células musculares lisas de aorta de rata, aunque sí potenció los incrementos de la $[AMPc]_i$ inducidos por forskolina o rolipram, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) (Cuíñas *et al.*, 2013).

Para verificar que la activación de la PKA induce un efecto vasodilatador dependiente de endotelio hemos evaluado, por primera vez, el potencial efecto relajante de la aorta de rata del 6-Bnz-cAMP, un activador selectivo de la PKA (Zieba *et al.*, 2011). La activación de la PKA por el 6-Bnz-cAMP fue confirmada en experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, en los que se muestra su capacidad para inducir la fosforilación de la proteína VASP (datos no mostrados), un substrato selectivo de la PKA, en homogeneizados de aorta de rata.

El 6-Bnz-cAMP relajó de modo significativo, y con una potencia similar, las contracciones inducidas por fenilefrina en los anillos de aorta intactos o desprovistos de endotelio. Este hecho sugiere que, de acuerdo con estudios previos, la activación de la PKA relaja directamente el músculo liso vascular (Waldron y Cole, 1999), aunque estos datos también indican que el componente dependiente de endotelio de la relajación inducida por forskolina no es mediada por la PKA, en claro contraste con nuestros resultados empleando Rp-cAMPs expuestos con anterioridad.

Es interesante destacar que, en una serie de experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, el pCPT-cAMP, un fármaco empleado por numerosos autores como activador selectivo de la PKA en las células musculares lisas de la aorta de rata (ver, i.e., Yokoyama *et al.*, 2008) y en otras preparaciones experimentales (ver, i.e., Zambon *et al.*, 2011), relajó de forma significativa las contracciones inducidas por fenilefrina con mayor potencia en presencia de un endotelio funcional. Se podría interpretar que estos resultados confirman la participación de la PKA en la relajación dependiente de endotelio inducida por la forskolina. Sin embargo, la selectividad de este compuesto ha sido cuestionada ya que se ha descrito su capacidad para activar la PKG (Sandberg *et al.*, 1991) y la Epac (Rehmann *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2003) así como para inhibir la PDE V (Connolly *et al.*, 1992).

Así pues, con los datos de que disponemos, no podemos explicar la razón de esta aparente contradicción entre nuestros resultados empleando 6-Bnz-cAMP y los obtenidos con Rp-cAMPs. Cabe la posibilidad de que algunos de los mecanismos de señalización activados tras el incremento de la $[AMPc]_i$ module de algún modo la actividad de la PKA, y que estos efectos estén ausentes cuando la PKA es directamente estimulada por el 6-Bnz-cAMP. En todo caso, se precisarían más experimentos para confirmar esta posibilidad.

1.3 Participación de la Epac en el efecto vasodilatador del AMPc

El incremento de la $[AMPc]_i$ tras la activación de la AC por la forskolina podría relajar el músculo liso vascular por otras rutas de señalización diferentes a la de la activación de la PKA. Se ha descrito que los incrementos de la $[AMPc]_i$ en el músculo

vascular podrían activar otras proteínas como la PKG (Lincoln *et al.*, 1990; Haynes *et al.*, 1992) o la Epac (hoy en día es aceptado que muchos de los efectos causados por los agentes que incrementan el AMPc son atribuibles a la ruta mediada por esta última proteína; Schmidt *et al.*, 2007; Metrich *et al.*, 2010; ver Revisión Bibliográfica). Además el AMPc podría activar de forma directa dos tipos de canales catiónicos de la membrana plasmática: los CNG y los HCN (Craven y Zagotta, 2006; ver Revisión Bibliográfica).

En lo concerniente a la participación de las proteínas Epac en el efecto vasodilatador del AMPc, hemos estudiado en primer lugar la expresión de las isoformas Epac-1 y Epac-2 en nuestras preparaciones. Nuestros resultados muestran que la Epac-1, pero no la Epac-2, está expresada en las células HUVEC, en concordancia con resultados previos publicados por Fang y Olah (2007).Los experimentos de *western blot* presentados aquí demuestran la presencia de Epac-1, pero no de Epac-2 en los homogeneizados de aorta torácica de rata, lo cual corrobora los resultados obtenidos por Purves *et al.* (2009). Además, las células musculares lisas de aorta de rata contienen ARNm para ambas isoformas de la Epac (Cuíñas *et al.*, 2011; Yokoyama *et al.,* 2008). Por último, la presencia de Epac-1 y, en menor medida de Epac-2, ha sido demostrada en dichas células junto con las proteínas efectoras de la Epac, Rap1a y Rap 1b (Hewer *et al.*, 2011).

Para estudiar los efectos de la activación selectiva de la Epac hemos empleado el fármaco 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP. La ausencia de activación de la PKA por este agente fue confirmada en experimentos de *western blot* realizados en nuestro laboratorio, en los que se demuestra su incapacidad para fosforilar la proteína VASP en homogeneizados de aorta de rata (datos no mostrados). Aunque en el presente trabajo no hayamos realizado experimentos para demostrar la selectividad del 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP para activar la Epac, otros grupos de investigación habían demostrado previamente dicha selectividad en distintas preparaciones, incluyendo el músculo liso de aorta de rata y empleando concentraciones incluso más elevadas que las utilizadas aquí (Roscioni *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2013).

La activación selectiva de la Epac con 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP relaja, con menor efectividad que la forskolina, los anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina

tanto en ausencia como en presencia de endotelio, siendo el efecto más marcado en este último caso. Este hecho sugiere que la Epac ejerce un efecto vasorrelajante directo en los miocitos vasculares y que, además, el componente dependiente de endotelio de la relajación inducida por AMPc puede ser en parte mediado por la activación de esta proteína. En buena correlación con estos resultados, nuestros experimentos de *imaging* mostraron que la activación de la Epac incrementa la liberación de NO por las células endoteliales. Además, el incremento de la liberación de NO inducido por la forskolina es reducido de modo significativo en presencia de ESI-09, un nuevo inhibidor de la Epac, permeable a la membrana celular, que es capaz de bloquear la activación de la Rap1 y la fosforilación de la Akt mediadas por la Epac (Almahariq *et al.*, 2013).

De forma sorprendente, y contrariamente a los resultados previstos, la inhibición de la Epac con ESI-09 relajó de forma significativa los anillos de aorta de rata tanto en presencia como en ausencia de endotelio. Aunque la concentración de trabajo a la que hemos utilizado este inhibidor se ha descrito como capaz de inhibir de forma selectiva la actividad de la Epac (Almahariq *et al.*, 2013), nuestros resultados deberían ser interpretados con cautela, debido a la poca experiencia de uso de este nuevo fármaco. De hecho, un estudio más reciente sugiere que el ESI-09 podría no actuar de forma totalmente selectiva sobre la Epac y que además posee propiedades desestabilizantes y desnaturalizadoras de proteínas (Rehmann, 2013).

Por otro lado, se ha descrito que la brefeldina-A, una lactona antibiótica de origen fúngico habitualmente empleada como inhibidor del transporte proteico en células de mamíferos (Nebenführ *et al.*, 2002), puede inhibir la actividad de la Epac, y algunos autores han empleado este fármaco con esa finalidad en diversos modelos celulares vasculares, incluyendo HUVEC (Ansurudeen *et al.*, 2009). En nuestro laboratorio hemos comprobado que la brefeldina-A tiende a disminuir la CI_{50} de la relajación provocada por FSK en anillos desprovistos de endotelio (datos no mostrados). Aparentemente, estos resultados confirman un posible efecto relajante directo de la Epac. Sin embargo, las múltiples acciones de este fármaco y su poca selectividad (se ha llegado a sugerir que no ejerce un efecto directo sobre la Epac;

Rehmann, 2013) aconsejan también precaución a la hora de interpretar nuestros resultados.

Se había descrito con antelación que la activación selectiva de la Epac podía relajar los anillos de aorta de rata, aunque sin profundizar en una posible dependencia del endotelio de dicho efecto (Sukhanova *et al.*, 2006). Posteriormente, otros autores habían demostrado la capacidad de los activadores de la Epac para relajar de modo directo diversos tipos de músculo liso vascular y no vascular (Roscioni *et al.*, 2011; Zieba *et al.*, 2011). Además, en concordancia con nuestros resultados, se ha descrito recientemente que la activación de la Epac con 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP induce un efecto vasodilatador dependiente de endotelio en arterias mesentéricas de rata, debido a una activación de canales de potasio y de la NOS (Roberts *et al.*, 2013). En cualquier caso, el presente trabajo es el primero en demostrar que la activación de la Epac induce un efecto vasorrelajante dependiente de endotelio en una arteria de gran calibre.

2 Efectos del AMPc en la biosíntesis de NO endotelial

2.1 Participación del NO en la relajación dependiente de endotelio inducida por el AMPc

La liberación de NO inducida por un incremento de la $[AMPc]_i$ había sido sugerida previamente por otros autores. Así, Delpy *et al.* (1996) demostraron que el desplazamiento hacia la derecha de la curva de relajación inducida por la forskolina que tiene lugar cuando se elimina el endotelio es reproducido por la acción del azul de metileno, un inhibidor de la GC. Este hecho fue considerado por dichos autores como indicativo de que el efecto endotelial de la forskolina podría ser mediado, en parte, por una liberación de NO.

Mediante experimentos de *imaging* con células endoteliales, hemos podido comprobar que tanto la forskolina como el db-AMPc inducen un incremento significativo (~30% y ~22 %, respectivamente) en la fluorescencia de la sonda DAF-2, lo cual es un indicador directo de un incremento en la generación de NO (Kojima *et al.*, 1998; Rathël *et al.*, 2003). Se ha descrito previamente que la forskolina es capaz de aumentar los niveles de AMPc en HUVEC a concentraciones de 1-100 µM (Lincoln *et*

al., 1990; Bundey y Insel, 2006; Ouedraogo *et al.*, 2006; Campos-Toimil *et al.*, 2008), similares a las empleadas en el presente trabajo.

En concordancia con nuestros resultados, la forskolina también incrementa la producción de NO en células endoteliales de aortas humanas (Hashimoto *et al.*, 2006) y la colforsina, un análogo de la forskolina produce una liberación de NO en cultivos de células endoteliales de aorta de rata (Mori e*t al.*, 1999). Además, Schäfer *et al.*, (2003) habían sugerido que la activación de la ruta del AMPc es necesaria para la completa activación de la formación de NO endotelial. Por su parte Kessler y Lugnier (1995) demostraron que el incremento de los niveles de AMPc (mediante inhibición de las PDEs) en células endoteliales tratadas con L-arginina (sustrato de la eNOS), provoca un aumento de los niveles de GMPc, lo que sugiere una posible activación de la ruta del NO por parte del AMPc.

Por el contrario, empleando células endoteliales de aorta bovina, Kuhn *et al.*, (1991) encontraron que los nucleótidos cíclicos no influían en la formación o en la liberación de NO.

Uno de los mecanismos subyacentes a través de los cuales el incremento de la $[AMPc]_i$ en las células endoteliales podría provocar un aumento de la síntesis y liberación de NO podría ser la activación de la eNOS. De hecho, se había descrito que entre los efectos derivados de una elevación de la $[AMPc]_i$ en el endotelio podría encontrarse la estimulación de la actividad de la eNOS (Butt *et al.*, 2000; Zhang y Hintze, 2001). Confirmando esta hipótesis, en nuestros experimentos con células HUVEC (en las cuales demostramos previamente la expresión de eNOS mediante RT-PCR), el incremento en la fluorescencia de la sonda DAF-2 producido por la forskolina, indicativo de la generación de NO, fue reducido drásticamente en presencia de L-NAME, un inhibidor selectivo de la eNOS (Rees *et al.*, 1990). Este hecho concuerda con resultados previos descritos por otros autores, que mostraban una activación de la eNOS en las células HUVEC tras la estimulación de receptores β-adrenérgicos y, por tanto, tras un incremento de la $[AMPc]_i$ (Ferro *et al.*, 1999; Queen *et al.*, 2006).

Por otro lado, nuestros experimentos de contracción-relajación en aorta de rata también sugieren que los agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ pueden activar la eNOS, dando lugar a una mayor liberación de NO, que contribuye al efecto vasodilatador

dependiente de endotelio del AMPc. En dichos experimentos, los valores de la CI_{50} para la forskolina retornaron a valores próximos a los obtenidos en ausencia de endotelio tras el tratamiento con L-NAME. De modo similar, el componente dependiente de endotelio de la vasodilatación producida por el db-cAMP fue eliminado por completo en presencia del inhibidor de la eNOS. Empleando también aorta de rata y en concordancia con nuestros resultados, Toyoshima *et al.* (1998) describieron que la eliminación de las células endoteliales o el tratamiento con L-NAME podía disminuir las respuestas relajantes provocadas por diversos agentes que incrementan el AMPc en la aorta de rata. Además, en anillos de aorta de rata con endotelio, la estimulación de receptores β-adrenérgicos induce relajación a través de un mecanismo mediado por la vía AMPc/NO (Ferro *et al.*, 2004; Gray and Marshall, 1992) y existen evidencias de que el L-NAME inhibe la relajación de las relajaciones inducidas por isoprenalina en esta preparación (Isenovic *et al.*, 2002).

2.2 Participación de las proteínas PKA y Epac en la activación de la eNOS inducida por el AMPc

La mayor parte de los resultados de los que tenemos constancia, incluyendo los aquí presentados, concuerdan con que el incremento de la $[AMPc]_i$ en el endotelio contribuye a una mayor síntesis y liberación de NO, por un efecto potenciador sobre la actividad de la eNOS. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, no está definida la ruta a través de la cual el AMPc provoca dicho efecto.

Diversos indicios apuntan a una participación de la PKA en la estimulación de la eNOS tras los incrementos de la $[AMPc]_i$. Como hemos comentado anteriormente, en el presente trabajo hemos comprobado que la inhibición específica de la PKA con Rp-cAMPs disminuye de forma significativa la relajación inducida por forskolina, y que dicho efecto aparece únicamente en presencia de un endotelio intacto. Por ello, hemos querido profundizar en el estudio de la implicación de la PKA en el efecto vasodilatador dependiente del endotelio del AMPc. Como paso previo, hemos llevado a cabo experimentos de RT-PCR, los cuales demostraron la expresión de la PKA-RIIα en nuestras células HUVEC. A continuación, mediante experimentos de *imaging* en dichas

células, hemos observado que la síntesis de NO inducida por la forskolina fue inhibida de forma significativa por el Rp-cAMPs y la activación selectiva de la PKA con 6-Bnz-cAMP incrementó la liberación basal de NO. También el pCPT-cAMP incrementa, aunque en menor medida, la síntesis de NO en las células HUVEC aunque, como hemos comentado anteriormente, la selectividad de este fármaco para activar la PKA ha sido ampliamente cuestionada. Estos resultados, junto con los descritos en apartados anteriores sugieren que los efectos relajantes vasculares inducidos por la forskolina y el subsiguiente incremento de $[AMPc]_i$ son mediados, al menos parcialmente, por la generación de NO tras la activación de la ruta AMPc/PKA en el endotelio.

Resultados previos descritos por otros autores también apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, el H-89, otro inhibidor de la PKA, también es capaz de inhibir la actividad eNOS inducida en HUVEC tras la estimulación de adrenoceptores β_2 con salbutamol (Queen *et al*., 2006). Sin embargo, la selectividad del H-89 sobre la PKA está ampliamente cuestionada (Murray, 2008). Además, la activación de la PKA y de la ruta de la PI3K/Akt participan en la dilatación dependiente del NO inducida por estimulación de β-adrenoceptores en anillos de aorta de rata (Ferro *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, la activación específica de la AC con forskolina incrementa de forma significativa la fosforilación de la eNOS en el residuo Ser 1177 (esta fosforilación es considerada un indicador de la activación de la eNOS así como el más importante de todos los residuos de fosforilación en la regulación de esta enzima; Fleming y Busse, 2003; Dudzinsky *et al.*, 2006; Mount *et al.*, 2007), sin modificar la expresión total de dicha enzima en las células HUVEC. Este efecto es reproducido por el tratamiento de las células con el pCPT-cAMP, que como hemos comentado puede activar otros substratos además de la PKA. Sin embargo el tratamiento con db-cAMP no modifica dicha fosforilación de la eNOS.

En concordancia, se ha publicado que el flavonoide quercetina fosforila la eNOS en el residuo Ser 1179 (especie bovina) a través de un mecanismo mediado por la ruta AMPc/PKA, incrementando de ese modo la producción de NO con la subsiguiente vasodilatación (Li *et al.*, 2012). También el cilostazol y la forskolina provocan un incremento de la producción de NO por fosforilación de la Ser 1177 y defosforilación de la Thr 495 mediante la estimulación de las vías AMPc/PKA y PI3K/Akt en células

endoteliales de aorta humana (Hashimoto *et al.*, 2006). Además, la fosforilación de la eNOS en los residuos Ser 1177 o Ser 633 por la PKA puede incrementar la actividad de la eNOS (Mount *et al.*, 2007) y la PKA activada tras un incremento de AMPc podría fosforilar la eNOS dando lugar a un incremento de su actividad (Balligand *et al.*, 2009).

En vista de lo expuesto, consideramos probada la participación de la PKA en la activación de la eNOS durante la relajación dependiente de endotelio inducida por el AMPc. Sin embargo, apenas existen estudios que sugieran o descarten una posible participación de la Epac en dicho proceso. Como hemos discutido con anterioridad, únicamente nuestros resultados de contractilidad en aorta de rata y de *imaging* en células HUVEC, junto con los obtenidos por Roberts *et al.* (2013) en arterias mesentéricas de rata, sugieren que el componente endotelial de la relajación inducida por AMPc puede ser mediado parcialmente por la activación de la Epac, que daría lugar a un aumento de la liberación de NO.

Para confirmar una posible participación de la Epac en la activación de la eNOS, hemos estudiado previamente su expresión en células HUVEC, así como la de su principal efector la proteína Rap 1 (ver Revisión Bibliográfica). Nuestros experimentos de RT-PCR demuestran la presencia de una banda de ADNc para la Epac-1 y para la Rap 1, pero no para la Epac-2.

A continuación, hemos medido los efectos del activador de Epac, 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP, sobre la fosforilación de la eNOS en células HUVEC. Al igual que sucedía con la PKA, la activación selectiva de la Epac con dicho agente es capaz de fosforilar la eNOS en el residuo Ser 1177. En concordancia con nuestros resultados, Namkoong *et al.* (2009) demostraron que el 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP provoca la fosforilación de la eNOS en la Ser 1177 en células HUVEC mediante la activación de la ruta IP3K/Akt.

Estos resultados sugieren una activación de la eNOS por parte de la Epac, hipótesis apoyada por nuestros experimentos de *imaging*, en los cuales, como ya comentamos anteriormente, la activación de la Epac con 8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP induce de por sí una liberación de NO por las células HUVEC y la inhibición de la Epac con ESI-09 atenúa la generación de NO inducida por la forskolina.

En resumen, la activación de la PKA y, probablemente, también la de la Epac es un paso necesario para la activación de la eNOS tras un incremento de la $[AMPc]_i$.

2.3 Implicación de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal en la producción de NO inducida por AMPc

Un gran número de procesos dependientes del endotelio que contribuyen a la regulación del tono vascular dependen de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ en las células endoteliales. De hecho, la síntesis y liberación de factores vasoactivos, tales como el NO, la PGI_2, diversas ET, el factor de von Willebrand o las variaciones en la permeabilidad endotelial son dependientes de incrementos de incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ provocados por diferentes agonistas (Lin *et al.*, 2000; Nilius y Droogmans, 2001; Tiruppathi *et al.*, 2006; Fleming y Busse, 2003; Pollock *et al*., 1995). Por ello, resulta evidente que las sustancias que pueden interferir en la homeostasis del Ca^{2+} en las células endoteliales pueden potencialmente influir en la producción y liberación de factores endoteliales, en especial del NO, debido a la sensibilidad al Ca^{2+} de la eNOS, y por tanto contribuir a la regulación del tono vascular. De hecho, en las células endoteliales, el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ puede provocar la activación de la eNOS por diversas vías, entre las que se encuentra una fosforilación de esta enzima en el residuo Ser 1177 (Dudzinski *et al.*, 2007; Mount *et al*., 2007). En todo caso, conviene recordar que dicho residuo también puede ser fosforilado en ausencia de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ (Mount *et al*., 2007).

En las células endoteliales el AMPc puede influenciar de forma directa o indirecta la $[Ca^{2+}]_c$ mediante la regulación de la movilización y de la entrada de Ca^{2+} (Kwan *et al*., 2009). Por otro lado, se ha publicado que diversos agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ pueden provocar un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en el músculo liso vascular (Takuwa *et al.*, 1988; Lincoln *et al.*, 1990; Cuíñas *et al.*, 2011). Por ello hemos pensado que, de existir un efecto de este tipo en las células endoteliales, éste podría participar en la activación de la eNOS. Para comprobar esta posibilidad hemos llevado a cabo experimentos de *imaging* con fura-2 para monitorizar las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ basal en respuesta a agentes que incrementan el AMPc empleando células endoteliales humanas tipo HUVEC.

En nuestros experimentos, la forskolina o el db-cAMP provocaron un incremento medible de la $[Ca^{2+}]_c$ basal únicamente en un bajo porcentaje de las células estudiadas (30% y 25%, respectivamente). Además, los activadores selectivos de la PKA (6-Bnz-cAMP) y de la Epac (8-pCPT-2'-*O*-Me-cAMP) no modificaron de forma significativa la $[Ca^{2+}]_c$ basal. Aun así, conviene tener presente que nuestras condiciones experimentales podrían ser insuficientes para detectar pequeños incrementos de Ca^{2+}, especialmente si estos se producen en áreas celulares muy específicas ricas en eNOS, como pueden ser las caveolas (Butt *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos sugieren que la activación de la eNOS podría tener lugar, al menos en parte, por una modificación de la señalización cálcica endotelial y que ese efecto no estaría mediado por una activación separada de la PKA o de la Epac. Sin embargo, una activación conjunta de ambas proteínas si podría provocar incrementos la $[Ca^{2+}]_c$ similares a los provocados por la forskolina, tal y como sucede en los miocitos vasculares (datos sin publicar). Por otra parte, se ha publicado que los canales CNG juegan un importante papel en la entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas β-adrenérgicos (Kwan *et al.*, 2009), por lo que los incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ provocados por la forskolina en nuestros experimentos podría estar mediados por la activación de estos canales. Serán necesarios nuevos experimentos para confirmar o descartar estas posibilidades.

Para verificar la posible dependencia del Ca^{2+} del incremento en la generación de NO inducida por forskolina se realizaron una serie de experimentos, empleando la sonda DAF-2, para medir la liberación de NO por células HUVEC en total ausencia de Ca^{2+} (solución externa carente de Ca^{2+} y en presencia de BAPTA como agente quelante). Los resultados obtenidos no apoyan la necesidad de un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ como vía para la generación de NO por el AMPc, ya que en dichas condiciones la forskolina es capaz de potenciar la generación de NO de modo similar al que lo hace en presencia de Ca^{2+}.

En definitiva, es posible que el incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por el AMPc no sea de una intensidad suficiente como para generar aumentos notables del NO, o que estos aumentos se vean compensados por la activación de la eNOS por diferentes vías en ausencia total de Ca^{2+}.

2.4 Participación de diversas cinasas en la activación de la eNOS inducida por el AMPc

Como hemos comentado anteriormente, la fosforilación del residuo Ser 1177 por diversos estímulos es considerada un indicador principal de la activación de la eNOS y puede ser catalizada por diversas proteínas cinasas, dependiendo del estímulo aplicado (ver revisión Bibliográfica). Por ello, hemos llevado a cabo experimentos de *imaging* para determinar la influencia de diversas cinasas implicadas en la fosforilación de la Ser 1177 (Mount *et al.*, 2007) sobre la liberación de NO inducida por la forskolina en células HUVEC.

Una de las cinasas estudiadas fue la CaMKII. El hecho de que la actividad de esta proteína sea dependiente de Ca^{2+} nos sirvió además para comprobar si el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por la forskolina, descrito en el apartado anterior, podría tener algún papel en el incremento de la generación de NO inducido por este agente. En nuestros experimentos, el KN 93, inhibidor selectivo de la CaMKII, no modificó de forma significativa la liberación de NO inducida por la forskolina, en concordancia con los resultados obtenidos en ausencia de Ca^{2+} externo y citoplasmático, en los que la generación de NO por la forskolina sucedía independientemente de la presencia de Ca^{2+}. Así pues, los incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ provocados por el incremento de AMPc parecen insuficientes para incrementar la generación de NO endotelial.

Por otro lado, diversos autores han demostrado que las cinasas PI3K y AMPK participan en la fosforilación de la Ser 1177 de la eNOS inducida por agentes que incrementan el AMPc (Tanano *et al.,* 2013; Hashimoto *et al.,* 2006; Zhang y Hintze, 2006), por lo que también hemos examinado su posible implicación en la liberación de NO provocada por la forskolina.

En nuestros experimentos la inhibición de la PI3K con wortmanina sí reduce la liberación de NO en células HUVEC tratadas con forskolina, lo que sugiere una implicación de esta cinasa en la activación de la eNOS por el AMPc. En concordancia, Ferro *et al.* (2004) demostraron la implicación de esta ruta en la generación de NO inducida por isoprenalina, que incrementa los niveles intracelulares de AMPc, en aorta de rata.

Sin embargo, en nuestros experimentos de contractilidad, la relajación de la aorta de rata provocada por las forskolina no fue modificada de forma significativa por la preincubación con wortmanina cuando se emplearon concentraciones a las cuales este agente mantiene su selectividad sobre la PI3K, aunque sí redujo dicha relajación a concentraciones a las cuales comienza a perder su selectividad, actuando también sobre la MLCK (Nakanishi *et al.*, 1992). Para descartar o confirmar el posible papel de la PI3K en la generación de NO inducido por la forskolina, se empleó otro inhibidor selectivo de la PI3K, el LY-294,002. Este agente redujo de modo significativo la relajación inducida por forskolina únicamente en la aorta con endotelio. En conjunto, estos resultados sugieren que la ruta PI3K/Akt está implicada en la vasorrelajación dependiente de endotelio inducida por la forskolina mediante la liberación de NO endotelial.

En nuestros resultados también hemos observado que la inhibición de la liberación de NO provocada por la wortmanina es potenciada por la inhibición de la PKA con Rp-cAMP (datos no mostrados). Tal efecto podría ser indicativo de que la ruta de la PI3K/Akt actúa de modo independiente de la PKA. Teniendo en cuenta los resultados expuestos en el apartado 2.2 de esta sección, dónde demostramos que la Epac participa en la liberación de NO inducida por la forskolina, dicha proteína podría activar la ruta de la PI3K/Akt dando lugar a la fosforilación de la Ser 1177 de la eNOS, tal y como han sugerido Namkoong *et al.* (2009). Sin embargo serían necesarios más experimentos para confirmar dicha posibilidad.

Contrariamente a la wortmanina, el compuesto C, inhibidor selectivo de la AMPK, no modificó de manera significativa la generación de NO inducida por la forskolina en las células HUVEC, descartando una participación de dicha cinasa en la generación de NO inducida por la forskolina.

3 Efecto de la exposición a hipoxia sobre el endotelio vascular

3.1 Efecto de la exposición a hipoxia sobre la generación de NO y EROs en las células endoteliales

Se ha descrito que las células endoteliales son relativamente resistentes a la hipoxia (Ten y Pinsky, 2002). Sin embargo, muchas de las alteraciones que el déficit de oxígeno provoca en la función vascular se deben a una alteración de la señalización en las células endoteliales (Ostergaard *et al*., 2007). Entre los procesos endoteliales susceptibles de ser alterados en condiciones de hipoxia se encuentra la producción de NO, aunque persiste cierta controversia en el modo en que es afectada dicha producción y en los mecanismos subyacentes.

Uno de los objetivos planteados en el presente trabajo ha consistido en determinar los efectos de la hipoxia sobre la producción de NO en el endotelio. Los resultados que aquí presentamos demuestran que la exposición a condiciones de hipoxia crónica (24 h, 2% O_2) disminuye de forma significativa la concentración de nitritos y, por tanto, la generación de NO, en células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) con respecto a la que tiene lugar en condiciones de normoxia.

La disminución observada en los niveles de producción de NO tras la hipoxia podría deberse a una modificación de los niveles de expresión de la enzima eNOS. De hecho, nuestros experimentos de *western blot* demuestran un descenso significativo de dicha expresión en las células HCAEC sometidas a condiciones de hipoxia crónica. Además, mediante estudios de inmunofluorescencia empleando microscopía confocal, hemos podido confirmar una reducción significativa en la expresión de la eNOS en las células HCAEC tras un déficit de oxígeno durante 24 h.

Nuestros resultados coinciden con los publicados anteriormente por diversos autores. Así, empleando diferentes modelos de células endoteliales, se ha descrito una disminución de la expresión de la eNOS, de la actividad de la eNOS y/o de la generación de NO (Liao *et al*., 1995; McQuillan *et al*., 1994; Ostergaard *et al*., 2007; Phelan y Faller, 1996; Takemoto *et al.*, 2002; Jin *et al.,* 2000; Laufs *et al.*, 1997; Fish *et al.*, 2007; Fish *et al.*, 2010).

De igual forma, en diferentes lechos vasculares sometidos a condiciones de hipoxia se ha observado una disminución de la vasorrelajación inducida por acetilcolina (Furchgott y Zawadzki, 1980) y, por lo tanto, de la producción de NO (Adnot *et al*., 1991; Shaul *et al*., 1993; Murata *et al*., 2002), así como una disminución de la expresión de la eNOS (Ziesche *et al.*, 1993; Toporsian, 2000; Pearce *et al*., 2006).

Sin embargo, de forma contraria a nuestros resultados, otros autores han descrito un incremento en la expresión de la eNOS y/o en la producción de NO en condiciones de hipoxia en diferentes modelos de células endoteliales *in vitro* (Arnet *et al*., 1996; Hoffmann *et al*., 2001; Chen y Meyrick, 2004; Coulet *et al*., 2003; Min *et al*., 2006) y en experimentos realizados *ex vivo* (Fleming y Busse, 1989) o *in vivo* (Quilan *et al*., 2000; Le Cras *et al*., 1998). Por último, otros autores no han observado modificaciones en la expresión de la eNOS tras la exposición a hipoxia crónica en arteria pulmonar de rata (Murata *et al.,* 2001).

Estas discrepancias podrían deberse a las diferentes condiciones experimentales empleadas por los diversos autores. En este sentido, un factor decisivo parece ser el tiempo de duración de la hipoxia. En nuestros experimentos, las células fueron expuestas a condiciones de hipoxia crónica (24 h). En concordancia, la mayor parte de autores que emplearon tiempos de hipoxia iguales o superiores a 24 h detectaron también un descenso en la expresión de la eNOS y/o en la producción de NO. Por el contario, cuando el tiempo de exposición a hipoxia fue menor de 24 h, se detectó un incremento en dichos parámetros (Chen y Meyrick, 2004; Coulet *et al*., 2003).

Además, en los efectos de la hipoxia sobre la expresión de la eNOS y la generación de NO también podría influir el modelo de célula endotelial empleado. En aquellos experimentos *in vitro* en los cuales la hipoxia provoca un descenso de la expresión de la eNOS y/o de la producción de NO fueron empleadas mayoritariamente células endoteliales de origen humano (McQuillan *et al*., 1994; Ostergaard *et al*., 2007; Takemoto *et al.*, 2002; Jin *et al.,* 2000; Laufs *et al.*, 1997; Fish *et al.*, 2007; Fish *et al.*, 2010) al igual que en el presente trabajo. Por el contrario, en los experimentos que emplean células de origen animal (bovino y porcino), la expresión de la eNOS y/o la producción de NO se vió incrementada por el déficit de oxígeno (Arnet *et al*., 1996; Hoffmann *et al*., 2001; Chen y Meyrick, 2004; Min *et al*., 2006). En cuanto a los

experimentos realizados *in vivo*, los resultados obtenidos podrían estar también influenciados por el flujo sanguíneo y por el *shear stress* endotelial (Ostergaard *et al.*, 2007).

Por otro lado, un incremento en la producción de EROs puede afectar a los niveles de NO. De hecho, los aniones superóxido reaccionan con el NO inactivándolo y formando peroxinitritos e incrementan también el estrés oxidativo, contribuyendo de ese modo a alterar la función de las células endoteliales (Dudzinski *et al*., 2006). Además, se ha descrito que en las células endoteliales sometidas a condiciones de hipoxia tiene lugar aumento de la generación de EROs (Miyata *et al.*, 2010; Pearsltein *et al.*, 2002; Steiner *et al*., 2002).

En vista de lo anterior, mediante el empleo de la sonda fluorescente DCFH-DA en experimentos de citometría de flujo, hemos determinado la producción de EROs en células HCAEC en condiciones de hipoxia crónica. De ese modo investigamos una posible implicación de las EROs en la disminución de la generación de NO en condiciones de hipoxia.

Nuestros resultados indican que las células cultivadas en condiciones de hipoxia crónica muestran un aumento significativo de la producción de EROs, en comparación con aquellas células cultivadas en condiciones de normoxia. Ello sugiere que la disminución de la producción de NO, acompañada de un incremento de la producción de EROs, podría indicar que, tras la hipoxia, la eNOS se encuentra en un estado disfuncional o de "desacoplamiento". Este estado, en el cual la eNOS genera aniones superóxido en lugar de NO, se puede producir por una disminución de la biodisponibilidad del sustrato l-arginina o del cofactor BH_4 (Li y Shah, 2004; Forstermann y Munzel, 2006).

3.1.1 Papel del AMPc y de sus proteínas efectoras en los efectos de la hipoxia sobre la generación de NO y EROs endoteliales

Como hemos discutido en los apartados 2.1 y 2.2 de esta sección, los agentes que incrementan el AMPc y los activadores directos de las proteínas efectoras de AMPc, PKA y Epac, provocan un incremento de la síntesis de NO en la células

endoteliales humanas. En el presente trabajo hemos querido, además, estudiar la participación del AMPc y de sus proteínas efectoras en la alteración de la producción de NO y de EROs endoteliales que tiene lugar en condiciones de hipoxia.

Apenas existen estudios acerca del efecto de la hipoxia sobre la expresión de las proteínas efectoras de AMPc. Por ello, hemos querido determinar, en primer lugar, si la exposición a hipoxia modifica dicha expresión en las células HCAEC. Mediante técnicas de *western blot* y microscopía confocal de inmunofluorescencia hemos observado una disminución significativa del nivel de expresión de la Epac-1. Por otra parte, la Epac-2 no fue detectada en nuestros experimentos con estas células, por lo que no hemos podido realizar un estudio sobre su expresión. En cuanto a la PKA-RIIα se observó una disminución significativa de la expresión de proteína mediante microscopía de inmunofluorescencia y una disminución significativa de los niveles de ARNm mediante RT-PCR en células HCAEC expuestas 24 h de hipoxia.

Este es, a nuestro entender, el primer estudio que demuestra este efecto de la exposición a hipoxia sobre la expresión de la proteína Epac en células endoteliales aisladas. Con anterioridad, se había descrito que los niveles de Epac-1 y Epac-2, así como del ARNm para estas proteínas, están regulados a la baja en pacientes con hipertensión pulmonar y en rata con hipertensión pulmonar inducida por macrotolin (Murray *et al*., 2009). En el desarrollo de la hipertensión pulmonar está involucrada una etapa de hipoxia y, por ello, la pérdida de expresión de la Epac en condiciones de hipoxia podría contribuir al desarrollo de esta patología (Schmidt *et al*., 2013).

En lo referente a la PKA, diversos estudios concuerdan con el descenso en su expresión encontrado en nuestros experimentos. Así, Grammas *et al*. (1998) observaron un descenso en la actividad de la PKA en células endoteliales cerebrales expuestas a anoxia. También Bolon *et al*. (2005) describieron un descenso de la actividad de esta proteína en células endoteliales microvasculares de ratón. Por el contrario, Zhang *et al*. (2010) observaron un aumento de dicha actividad en células endoteliales bovinas de aorta sometidas a hipoxia, que disminuyó con la reoxigenación.

En otra serie de experimentos, hemos comprobado que la presencia de dos agentes que incrementan la $[AMPc]_i$, fenoterol (un agonista β_2 adrenérgico) y

forskolina, revierte el descenso que se produce en la biosíntesis de NO en las células HCAEC sometidas a condiciones de hipoxia crónica. Estos resultados concuerdan con los descritos por Pottecher *et al.* (2006), en los que la producción de NO es incrementada por el tratamiento con formoterol (también agonista β_2 adrenérgico) en células sometidas a hipoxia/reoxigenación.

En vista de lo anterior, es posible que la hipoxia provoque un descenso en la $[AMPc]_i$, que podría ser causante, al menos en parte, de los niveles disminuidos de NO en las células sometidas a hipoxia. Esta hipótesis está apoyada por resultados previos de otros autores, en los que la exposición a hipoxia causó un descenso en los niveles de AMPc en las células endoteliales y ha sido atribuido a una disminución de la actividad de AC (Zund *et al*., 1996; Ogawa *et al*., 1990; Ten y Pisnky, 2002).

Por otro lado, la activación selectiva de la PKA con 6-Bnz-cAMP o de la Epac con 8-pCPT-2'OMe-cAMP causó un incremento significativo la dicha generación de NO con respecto a la observada en condiciones de normoxia y a los controles en condiciones de hipoxia. Curiosamente, este incremento se produce a pesar de la disminución producida por la hipoxia en los niveles de expresión de ambas proteínas.

Que los agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ o los activadores de sus proteínas efectoras no provoquen un incremento de la generación de NO en condiciones de normoxia parece contradecir los resultados descritos en células endoteliales tipo HUVEC en las cuales, como hemos descrito anteriormente, dichos agentes provocan incrementos significativos del NO liberado. Sin embargo, creemos que esta diferencia se debe al tiempo de incubación de 24 h en los experimentos con HCAEC frente a la medición en tiempo real desde el momento de la aplicación del fármaco en el caso de los experimentos con HUVEC. De hecho, los incrementos prolongados (> 8h) de AMPc provocan una regulación a la alta de las PDE encargadas de degradarlo, como es el caso de la PDE4 en las células HUVEC (Campos-Toimil *et al.,* 2008), acelerando así su velocidad de degradación y revirtiendo algunos de los efectos observados a corto plazo (< 2 min). Este mecanismo compensador podría estar alterado o funcionando de diferente manera en condiciones de hipoxia crónica.

Teniendo en cuenta estos resultados y que el incremento de la $[AMPc]_i$ activa la eNOS por medio de las proteínas PKA y de la Epac en las células HUVEC (ver apartado

2.2 de esta sección), hemos comprobado los efectos del fenoterol, la forskolina, el 6-Bnz-cAMP y el 8-pCPT-2'OMe-cAMP sobre la fosforilación de la Ser 1177 de la eNOS (p-eNOS) en las células HCAEC sometidas a condiciones de hipoxia.

Nuestros experimentos muestran que el valor relativo de expresión de la p-eNOS (ratio p-eNOS/eNOS) fue significativamente incrementado, tras el tratamiento con forskolina, 6-Bnz-cAMP y 8-pCPT-2'OMe-cAMP. Sin embargo, no se vio significativamente modificado tras el tratamiento durante 1 h con fenoterol, aunque se observó una clara tendencia al incremento. A nuestro entender, este es el primer estudio que demuestra una posible activación de la eNOS por el AMPc en células endoteliales sometidas a condiciones de hipoxia. Dicha activación podría ser mediada por la PKA y la Epac, en concordancia con los resultados obtenidos para células HUVEC en condiciones de normoxia.

Paralelamente, hemos estudiado la implicación del AMPc y de sus proteínas efectoras en el incremento en la generación de EROs inducido por la hipoxia. La incubación de las células HCAEC con fenoterol, forskolina, 6-Bnz-cAMP y 8-pCPT-2'OMe-cAMP no modificó en ningún caso la producción de EROs tras 24 h en condiciones de normoxia. Sin embargo, el empleo de los activadores de PKA-RIIα y Epac y de la forskolina, aunque no de fenoterol, produjo un descenso significativo de la producción de EROs en condiciones de hipoxia.

Estos resultados sugieren que el incremento de NO inducido por estos fármacos podría actuar neutralizando el incremento anormal de las EROs durante la hipoxia. Aunque el NO puede actuar como oxidante bien directamente o bien a través de una interacción con radicales de oxígeno para fomar peroxinitritos, su actuación fundamental es como antioxidante (Wink *et al.,* 1995). Que el NO actúe como oxidante o antioxidante viene determinado por el ambiente local del tejido. En aquellas situaciones dónde la carga oxidante es alta desempeña un papel antioxidante, neutralizando superóxidos y otras EROs (Dweik, 2005). En situaciones de hipoxia/reperfusión, el NO protege del daño endotelial, al inhibir la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica (Li y Jackson, 2002) y bloquear la formación de radicales hidroxilo (Wink *et al*., 1993).

En concordancia con nuestros resultados, Pottecher *et al*. (2006) demostraron que el incremento de la $[AMPc]_i$ con formoterol reduce el incremento de la producción de EROs inducido por hipoxia/reoxigenación, en parte debido a un incremento de la producción de NO. Que en nuestros experimentos no hayamos obtenido efectos significativos mediante el empleo de fenoterol puede deberse al diferente modelo experimental empleado, ya que el nivel de EROs generado por la reperfusión es generalmente mayor que el producido por la hipoxia.

En relación con lo anterior, el daño endotelial inducido por las EROs tras la isquemia/reperfusión provoca un descenso de la $[AMPc]_i$ y el empleo de agentes que incrementan la $[AMPc]_i$ reduce significativamente ese daño (Shimura *et al.*,1999). Además, el empleo de 8-pCPT-2'OMe-cAMP reduce la producción de EROs en la reperfusión tras hipoxia en daño renal (Stokman *et al.*, 2011).

En conjunto, todos estos resultados sugieren un potencial interés clínico del incremento de la $[AMPc]_i$ y de la activación de sus rutas de señalización en patologías que cursen con daño tisular por incremento de las EROs.

3.1.2 Participación de la enzima arginasa en los efectos de la hipoxia sobre la generación de NO y EROs endoteliales

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la actividad de la eNOS está fuertemente influenciada por la enzima arginasa, puesto que ambas enzimas emplean el sustrato l-arginina (Vanhoutte, 2008). Además, en diferentes desórdenes asociados a situaciones de hipoxia, se ha observado una reducción del transporte de l-arginina, un descenso del metabolismo de la l-arginina vía eNOS en el endotelio y un incremento de la expresión de la enzima arginasa II (Krause *et al*., 2012; Prieto *et al*., 2011; Casanello *et al.*, 2009; Huynch *et al.,* 2006; Jin *et al.,* 2010). En vista de estos antecedentes, hemos analizado el papel de la arginasa en la alteración de la producción de NO y EROs en células endoteliales expuestas a hipoxia.

En primer lugar, mediante técnicas estandarizadas de *western blot* y microscopía de inmunofluorescencia, hemos observado que la hipoxia induce un aumento de la expresión de la arginasa II, isoforma mayoritaria en las células endoteliales (Prieto *et*

al., 2011). Estos resultados coinciden con los anteriormente descritos por otros autores en células endoteliales (Kruse *et al.*, 2012; Prieto *et al.,* 2011).

En nuestros experimentos, la incubación de las células HCAEC con ABH, un inhibidor selectivo de la arginasa, revirtió la disminución en la generación de NO en condiciones de hipoxia a valores similares a los de normoxia, lo que sugiere que la activación de esta enzima podría estar implicada en la reducción de la generación de NO debida a la hipoxia en este modelo celular. En concordancia con nuestros resultados, Prieto *et al.* (2011) describieron que la inhibición de la arginasa era efectiva para restaurar los niveles de NO en condiciones de hipoxia en las células endoteliales. Sin embargo, el empleo de otro inhibidor de la arginasa, nor-NOHA, no modificó la generación de NO en condiciones de hipoxia, aunque es probable que las diferencias observadas se deban a que el nor-NOHA es un inhibidor menos potente y específico que el ABH (Steppan *et al.*, 2013).

Por otro lado, los inhibidores de arginasa no modificaron la generación de EROs en condiciones de normoxia ni redujeron de forma significativa el aumento de EROs observado en condiciones de hipoxia. Este resultado parece indicar que la inhibición de la arginasa, en nuestro modelo experimental, descartaría al desacoplamiento de la eNOS como causa del incremento en la generación de EROs debido a una menor disponibilidad de l-arginina. En este sentido, se ha descrito que el incremento de la producción de EROs en condiciones de hipoxia se origina en la mitocondria (Murphy, 2009; Pearlstein *et al.*; 2002), por lo tanto, este hecho también parece descartar la implicación de un estado disfuncional de la eNOS.

3.1.3 Papel de la acetilación de histonas en los efectos de la hipoxia sobre la generación de NO y EROs endoteliales

La disminución en la generación de NO que tiene lugar en condiciones de hipoxia ha sido atribuida también a una disminución en la transcripción de la eNOS (Fish *et al*., 2010). La estructura de la cromatina de la eNOS y, por tanto, su transcripción está regulada por la actividad de las enzimas HATs y HDACs. Como ya hemos descrito en detalle en el apartado 3.2 de la Revisión Bibliográfica, la hipoxia provoca una

modulación de la estructura de la cromatina, que está asociada con una disminución de la transcripción de la eNOS. En concreto se produce una disminución de la acetilación de las histonas H3 y H4 del promotor proximal de la eNOS. Por otra parte, también se ha descrito que, en condiciones de hipoxia, existe una regulación a la alta de HDACs y una regulación a la baja de HATs (Islam y Medelson, 2006).

En vista de estos antecedentes hemos empleado inhibidores específicos de HATs y HDACs, con el fin de determinar su participación en la regulación de la expresión de la eNOS y, por lo tanto, en la generación de NO y/o EROs.

En las células HCAEC, los inhibidores específicos de la HAT, ácido araquidónico y MG-149, no modificaron los niveles de generación de EROs ni de NO, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Durante la hipoxia, las HATs se encuentran reguladas a la baja, lo que parece justificar esta falta de efecto. Por otra parte, debido a que las histonas del promotor de la eNOS ya se encuentran acetiladas en condiciones de normoxia, podría ser que la inhibición de HATs no revierta esa acetilación, por lo que tampoco se observaría efecto en dichas condiciones.

Sin embargo, la incubación con inhibidores específicos de HDACs sí produjo efectos destacables: el VPA produjo una disminución significativa de los niveles de EROs y un aumento de los niveles de NO en ambas condiciones (normoxia e hipoxia); por su parte, el SAHA produjo una disminución significativa de los niveles de EROs y un aumento de los niveles de NO en condiciones de normoxia, mientras que en condiciones de hipoxia se observó una clara tendencia a la disminución de los niveles de EROs y un aumento de los niveles de NO, aunque dichos efectos no fueron significativos; por último, el Sb únicamente produjo un aumento significativo de los niveles de NO en hipoxia.

La deacetilación de histonas suele estar asociada a una represión de la transcripción (ver Revisión Bibliográfica). Además, y de forma contraria a nuestros resultados, ha sido publicado que la inhibición de las HDACs puede regular a la baja la expresión de la eNOS en las células endoteliales, aunque, paradójicamente, los mismos autores también observaron que el TSA, otro inhibidor de las HDACs, activa directamente al promotor de la eNOS (Rossig *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2005). En concordancia con nuestros resultados, estos mismos autores describieron

posteriormente que el empleo de TSA produce un efecto dual: una regulación a la baja o la alta de la eNOS, dependiendo del tiempo de incubación y de la dosis administrada (Gan *et al.*, 2006).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las HDACs participan en la regulación de la expresión de la eNOS en las células endoteliales. Sin embargo, la actividad de dichas enzimas parece no estar influenciada por las condiciones de hipoxia.

3.2 Efecto de la hipoxia sobre la barrera endotelial. Papel del AMPc y de sus efectores PKA y Epac

En la Revisión Bibliográfica, hemos abordado el tema de cómo la hipoxia altera la función de la barrera endotelial, provocando un aumento de su permeabilidad. Asimismo, hemos descrito los trabajos de diferentes autores que sugieren un papel para el AMPc en la regulación de dicha barrera, mediante la activación de sus dos efectores más destacados, la PKA y la Epac, que pueden actuar de forma independiente o en sinergia a través de diversos mecanismos. En vista de ello, hemos pretendido profundizar en el conocimiento del mecanismo que provoca las alteraciones de la barrera endotelial en condiciones de hipoxia crónica en las células HCAEC y un posible papel de la señalización del AMPc en dichas alteraciones.

En primer lugar, nuestros experimentos demuestran un incremento significativo de la permeabilidad en la monocapa de células HCAEC sometida a 24 h de exposición a hipoxia. En concordancia, numerosos estudios ya habían demostrado que la hipoxia altera la función de la barrera endotelial provocando un incremento de la permeabilidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Ogawa *et al*., 1990; Partridge, 1995; An *et al*., 2005; Aslam *et al.,* 2013; Lai *et al.,* 2011; Ali *et al*., 1999).

Las uniones adherentes desempeñan un importante papel en la regulación de permeabilidad y en la integridad de la barrera endotelial (Aslam *et al*., 2013). La principal proteína estructural de estas uniones adherentes es la proteína VE-cadherina (Rudini y Dejana, 2008), y se ha demostrado que el uso de anticuerpos de bloqueo contra ella incrementa la permeabilidad del endotelio (Gulino *et al*., 1998).

Mediante técnicas de western blot y RT-PCR hemos observado que la exposición a hipoxia crónica disminuyó de forma significativa los niveles de expresión de proteína y de ARNm de la VE-cadherina. Ello es indicativo de que la disminución de la permeabilidad de la barrera endotelial debida a la hipoxia podría estar mediada, al menos en parte, por este mecanismo. Resultados similares habían mostrado que la exposición a hipoxia reduce la presencia de VE-caherina en las adhesiones célula-célula (Aslam *et al*., 2013; Torii *et al*., 2007) y también disminuye su expresión (Eguchi *et al*., 2006). Sin embargo, aunque las observaciones de otros autores concuerdan con una dispersión de la VE-cadherina en las uniones celulares tras exposición a hipoxia, sus experimentos no detectaron una modificación de su expresión (Lai *et al*., 2011; Wojciak-Stotharch *et al*., 2005).

En lo referente al AMPc y sus rutas de señalización, nuestros experimentos de permeabilidad endotelial con células HCAEC mostraron que, en condiciones de normoxia, ni los fármacos que incrementan los niveles de este nucleótido (formoterol y forskolina) ni los activadores directos de la PKA (6-Bnz-cAMP) y de la Epac (8-pCPT-2'OMe-cAMP) alteran dicha permeabilidad. En aparente contradicción, se había descrito que el empleo de distintos agentes que incrementan los niveles de AMPc (forskolina, db-cAMP, 3-isobutil-1-metilxantina (un inhibidor no específico de PDE), isoprotenerol y una combinación de forskolin y rolipram) o la activación selectiva de Epac y PKA reducen la permeabilidad vascular basal e incrementa la función de la barrera endotelial (Cullere *et al.,* 2005; Fukuhara *et al.* 2005; Kooistra *et al*., 2005; Lorenowicz *et al*., 2008). De modo similar a lo que ya comentamos con anterioridad al hablar de la modificación de la generación de NO en condiciones de normoxia (ver apartado 3.1.1 de esta sección), esta diferencia podría ser debida al tiempo de incubación de 24 h en nuestros experimentos con HCAEC frente a tiempos de 15-30 min en los experimentos de los otros autores indicados.

Por otro lado, la forskolina, el 6-Bnz-cAMP y el 8-pCPT-2'OMe-cAMP disminuyeron de forma significativa el incremento de la permeabilidad medido en condiciones de hipoxia, lo que sugiere un papel para el AMPc y en el mantenimiento de una adecuada funcionalidad de la barrera endotelial a través de sus efectores PKA y Epac. En concordancia con nuestros resultados, el db-cAMP previene el aumento de

permeabilidad inducido por hipoxia (Yan *et al*., 1997; Ogawa *et al*., 1990). Además, el empleo de la toxina pertussis eleva los niveles de AMPc y previene el paso excesivo de solutos en las células endoteliales en situación hipoxia (Yan *et al*., 1997; Ogawa *et al*., 1990). En la misma línea, el empleo de dexametasona contrarresta el exceso de permeabilidad inducido por la hipoxia en parte previniendo el declive de la actividad de la AC en estas circunstancias, con el consiguiente incremento los niveles de AMPc (Ogawa *et al.*, 1992). La recuperación de los niveles de AMPc provocada por el calycosin, un isoflalvonoide derivado de *Astragali Radix*, podría ser la causa de la protección que ejerce este agente en el empeoramiento de la barrera endotelial debido a la hipoxia (Fan *et al*., 2003). Por último, el cilostazol, un inhibidor de la PDE3 que aumenta la concentración de AMPc, atenuó la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia/reoxigenación en células HUVEC, al preservar la organización del citoesqueleto de actina y de las proteínas de unión, aunque sin preservar la distribución de la VE-cadherina (Torii *et al.*, 2006).

El efecto de disminución de la permeabilidad endotelial mediado por la activación de la PKA observado aquí concuerda con lo descrito previamente por otros autores, quienes describieron que la activación de la PKA tipo I o de la PKA tipo II bloquea el aumento de dicha permeabilidad inducido por hipoxia (Yan *et al*., 1997; Ogawa *et al*., 1990). En este sentido, el empleo de cilostazol en células endoteliales de microvasos humanos expuestas a la privación de oxígeno-glucosa previene del deterioro de la barrera endotelial al promover la expresión de la VE-cadherina a través de la vía AMPc/PKA (Ishiguro *et al.*, 2011).

En relación a una implicación de la Epac en la prevención de la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia/reoxigenación en la barrera endotelial, como sugieren nuestros experimentos, apenas existen estudios en la literatura. Empleando 8-pCPT-2'OMe-cAMP en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, Baumer *et al.* (2008) habían sugerido un que la activación de la Rac1 contribuía al efecto estabilizador de membrana del AMPc, un efecto mediado en parte por la activación de la vía Epac/Rap1. De forma similar, Aslam *et al.* (2013) describieron recientemente que el empleo de 8-pCPT-2'OMe-cAMP, activador selectivo de la Epac previene, vía activación de la Rac1, la pérdida de actina periférica y de VE-cadherina en

las uniones célula-célula y suprime la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia/reoxigenación en células endoteliales de aorta porcina. Además, Stokman *et al.* (2011) habían descrito que la activación farmacológica de la Epac preserva las adhesiones celulares manteniendo la función de barrera de la monocapa epitelial en células epiteliales renales del túbulo proximal expuestas a hipoxia in vitro.

Aunque nosotros no hemos estudiado los mecanismos por los cuales la PKA y la Epac podrían contrarrestar la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia, diversos efectos descritos previamente para estas proteínas podrían estar implicados. Por ejemplo, la PKA contarresta la hiperpermeabilidad al promover la desfosforilación de la MLC y, por tanto, atenua la contracción de la actomiosina, dando lugar a relajación endotelial (Sayner, 2011; Schmidt *et al.*, 2013). Asimismo, la Epac actúa en sinergia con la PKA disminuyendo la fosforilación de la MLC y ambas proteínas inhiben la vía de la Rho/ROCK (que contribuye a la contracción de la actomiosina, ver Revisión Bibliográfica) frente agentes que provocan hiperpermeabilidad (Sayner, 2011; Schmidt *et al.*, 2013). Además, la activación de la vía Epac/Rap1 reduce la permeabilidad vascular mediante la acumulación de moléculas de unión como la cadherina VE en los contactos célula-célula y reorganiza la actina cortical contribuyendo a la estabilización de la barrera endotelial (Metrich *et al.*, 2010) y la activación de la Epac1 contrarresta la permeabilidad inducida por VEGF (Fukuhara *et al.,* 2005).

Por otra parte, el incremento de NO inducido por la PKA y Epac descrito en el presente trabajo también podría contribuir al efecto protector de estas proteínas frente a la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia. De hecho, el NO contribuye a reducir la permeabilidad inducida por hipoxia de las monocapas de células endoteliales (Kolluru *et al.*, 2008). Además, el tratamiento con nitritos suprime la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia y fortalece las uniones adherentes mediadas por VE-cadherina en células HUVEC (Lai *et al.,* 2011). Mediante experimentos *in vivo*, empleando pez cebra como modelo, estos mismos autores describieron que los nitritos protegen a los vasos sanguíneos de la fuga vascular inducida por hipoxia (Lai *et al.*, 2011). Sin embargo, y en contra de nuestra hipótesis, hay que tener en cuenta que los niveles elevados de NO pueden provocar un incremento de permeabilidad endotelial (Vadenbroucke *et al.*, 2008).

3.3 Efecto de la retinopatía inducida por oxígeno en la expresión de la Epac-1 en la retina de ratón

Como ya hemos descrito en al apartado 4.3 de la Revisión Bibliográfica, el modelo OIR (retinopatía inducida por oxígeno) descrito por Smith *et al*. (1994b) es ampliamente utilizado para el estudio de retinopatías isquémicas, como son la retinopatía de la prematuridad o la retinopatía diabética (Grimm y Willmann, 2012). Entre las complicaciones que se producen en las retinopatías isquémicas como consecuencia de la fase hipóxica se incluye el edema macular, el cual se produce como resultado de la neovascularización y ruptura de la barrera hemato-retiniana (ver Revisión Bibliográfica).

Diversos autores han demostrado que la barrera hemato-retiniana, compuesta de células endoteliales capilares retinianas (barrera hemato-retiniana interior) y de células epiteliales pigmentarias retinianas (barrera hemato-retiniana exterior), incrementa su permeabilidad en el modelo OIR en diferentes condiciones experimentales (Huang *et al*., 2011; Tian *et al*., 2012; Zhan *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2005).

No se conoce con exactitud si un déficit en la síntesis de AMPc está implicado en el incremento de permeabilidad de la barrera hemato-retiniana. Zink *et al.* (1995) publicaron que el tratamiento con agonistas de receptores β reduce la permeabilidad en células endoteliales de retina bovina mediante un incremento de los niveles de AMPc. Además Wittchen *et al.* (2013) publicaron que la activación de vía Epac/Rap1 fortalece la barrera epitelial pigmentaria de la retina frente a la alteración que se produce en la degeneración macular. Recientemente Ishizuka *et al.* (2013) demostraron que el tratamiento con cilostazol, un inhibidor de la PDE3, previene la hiperpermeabilidad en un modelo de isquemia en retina de ratón.

Por ello, hemos considerado de interés estudiar los niveles de expresión de la Epac-1 en ojos de modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR). En primer lugar, mediante técnicas de inmunotinción, hemos observado una disminución en los niveles de expresión de Epac-1 en los ratones modelo OIR con respecto a los ratones control: esta disminución tiene lugar concretamente a la edad postnatal 12 y 13 días, cuando la retina de los ratones ha permanecido expuesta a hipoxia 6 h y 24 h,

respectivamente. A continuación, mediante experimentos de RT-PCR, hemos observado que los niveles de ARNm de la Epac-1 se encontraban significativamente disminuidos en ratones OIR en comparación con los ratones control. Ambos resultados sugieren una posible implicación de esta proteína en las alteraciones inducidas por hipoxia en el desarrollo de la retinopatía.

Uno de los posibles mecanismos implicados podría estar relacionado con la reducción que provoca la activación de la Epac-1 en la hiperpermeabilidad inducida por el VEGF (Fukuhara *et al*., 2005). De hecho, este factor desempeña un papel destacado en la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia (Kaur *et al.,* 2007) y en el incremento de la permeabilidad vascular retiniana en la retinopatía isquémica (Zhang *et al*., 2004b; Hammes *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha descrito que la hipoxia en la retina incrementa la actividad de los receptores β y de las AC y disminuye la actividad de la PKA (Dal Monte *et al*., 2012; 2013). El bloqueo por agonismo de receptores β con propranolol e isoprotenerol en la retina de ratones modelo OIR reduce los niveles de VEGF y la neovascularización. Aunque estos antecedentes parecen contradictorios, nuestros resultados confirman que la ruta de señalización del AMPc y, en concreto, la regulación a la baja de la Epac-1 podría estar implicada en los cambios inducidos por hipoxia en OIR.

Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. La relajación de los anillos de aorta de rata inducida por agentes que incrementan el AMPc posee un componente dependiente y otro independiente de la presencia de un endotelio intacto.
2. Los agentes que incrementan el AMPc en las células endoteliales provocan, por medio de la activación de las proteínas PKA y Epac, una activación de la eNOS, con el consiguiente aumento de la liberación de NO, que contribuye a la relajación dependiente de endotelio inducida por este nucleótido cíclico.
3. La ruta PI3K/Akt participa en la vasorrelajación dependiente de endotelio inducida por la forskolina mediante la potenciación de la liberación de NO endotelial.
4. Las cinasas AMPK y CaMKII no están implicadas en la liberación de NO endotelial inducida por la forskolina.
5. Los agentes que incrementan el AMPc provocan un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$. basal en un bajo porcentaje de las células endoteliales, un efecto no mediado por la activación independiente de la PKA o de la Epac. La liberación de NO inducida por la forskolina en las células endoteliales es independiente de dicho aumento de la $[Ca^{2+}]_c$.
6. La activación de la PKA o de la Epac participa en el componente vasodilatador directo, independiente de endotelio, de la vasorrelajación inducida por agentes que incrementan el AMPc.
7. La hipoxia crónica (24 h, 2% O_2) provoca un descenso en la liberación de NO en las células endoteliales, acompañada de una disminución de la expresión de la eNOS y un incremento en la generación de EROs.
8. La hipoxia crónica provoca un incremento de la expresión de la enzima arginasa II en las células endoteliales. Según los resultados obtenidos con el inhibidor ABH, la activación de la arginasa está implicada en la reducción de la generación de NO debida a la hipoxia. La inhibición de la arginasa no modificó el incremento de EROs inducido por hipoxia, lo que descarta un estado disfuncional de la eNOS por una menor disponibilidad de L-arginina como causa del dicho incremento.
9. Las enzimas HADCs participan en la regulación de la eNOS, incrementando los niveles de NO y disminuyendo los de EROs, independientemente de las condiciones

de oxigenación de las células endoteliales. En nuestras condiciones de experimentación, las enzimas HATs no participan en la regulación de los niveles de NO ni de EROs en las células endoteliales, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.

10. La hipoxia crónica provoca una disminución de la expresión de las proteínas efectoras de AMPc, PKA y Epac en las células endoteliales. En la retina aislada de los ratones modelo OIR durante la fase de hipoxia (6 h y 24 h de exposición a hipoxia) se produce una disminución en los niveles de expresión de la Epac-1.
11. En las células endoteliales expuestas a condiciones de hipoxia, el incremento de AMPc mediante forskolina y la activación directa de la PKA o de la Epac activan la eNOS, dando lugar a una mayor liberación NO, que neutraliza el incremento anormal de las EROs durante la hipoxia.
12. La hipoxia crónica altera la función de la barrera endotelial al provocar un incremento de la permeabilidad de la monocapa endotelial y un descenso de la expresión de la VE-cadherina. El incremento de AMPc contrarresta la hiperpermeabilidad inducida por hipoxia, contribuyendo al mantenimiento de una adecuada funcionalidad de la barrera endotelial a través de sus efectores PKA y Epac.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bibliografía

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Adamson RH, Ly JC, Sarai RK, Lenz JF, Altangerel A, Drenckhahn D, *et al*. Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008 Mar;294(3):H1188-96.

Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. J Clin Invest 1991 Jan;87(1):155-162.

Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+}-dependent regulation of vascular tone. J Anesth 2007a;21(2):220-231.

Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. J Anesth 2007b;21(2):232-242.

Alasbahi RH, Melzig MF. Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. Pharmazie 2012 Jan;67(1):5-13.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.

Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS, Hynes KL, Schumacker PT, Gewertz BL. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. Am J Physiol 1999 Nov;277(5 Pt 1):L1057-65.

Almahariq M, Tsalkova T, Mei FC, Chen H, Zhou J, Sastry SK, *et al*. A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. Mol Pharmacol 2013 Jan;83(1):122-128.

An SS, Pennella CM, Gonnabathula A, Chen J, Wang N, Gaestel M, *et al*. Hypoxia alters biophysical properties of endothelial cells via p38 MAPK- and Rho kinase-dependent pathways. Am J Physiol Cell Physiol 2005 Sep;289(3):C521-30.

Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. Mol Cell Endocrinol 2009 Mar 5;300(1-2):66-70.

Arnet UA, McMillan A, Dinerman JL, Ballermann B, Lowenstein CJ. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. J Biol Chem 1996 Jun 21;271(25):15069-15073.

Aslam M, Schluter KD, Rohrbach S, Rafiq A, Nazli S, Piper HM, *et al*. Hypoxia-reoxygenation-induced endothelial barrier failure: role of RhoA, Rac1 and myosin light chain kinase. J Physiol 2013 Jan 15;591(Pt 2):461-473.

Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. Circ Res 1996 May;78(5):750-758.

Baillie GS. Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. FEBS J 2009 Apr;276(7):1790-1799.

Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. Physiol Rev 2009 Apr;89(2):481-534.

Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. Histochem Cell Biol 2008 Jun;129(6):765-778.

Baumer Y, Spindler V, Werthmann RC, Bunemann M, Waschke J. Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. J Cell Physiol 2009 Sep;220(3):716-726.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. Physiol Rev 2004 Jul;84(3):869-901.

Beall A, Bagwell D, Woodrum D, Stoming TA, Kato K, Suzuki A, *et al*. The small heat shock-related protein, HSP20, is phosphorylated on serine 16 during cyclic nucleotide-dependent relaxation. J Biol Chem 1999 Apr 16;274(16):11344-11351.

Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F,Jr, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, *et al*. Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. Free Radic Biol Med 2004 Dec 1;37(11):1885-1894.

Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. Nat Rev Mol Cell Biol 2002 Sep;3(9):710-718.

Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. Pharmacol Rev 2006 Sep;58(3):488-520.

Birukova AA, Birukov KG, Smurova K, Adyshev D, Kaibuchi K, Alieva I, *et al*. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. FASEB J 2004a Dec;18(15):1879-1890.

Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Usatyuk P, Liu F, Kaibuchi K, *et al*. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. J Cell Physiol 2004b Oct;201(1):55-70.

Birukova AA, Zagranichnaya T, Alekseeva E, Bokoch GM, Birukov KG. Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection. J Cell Physiol 2008 Jun;215(3):715-724.

Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, Alekseeva E, Chen W, Jacobson JR, *et al*. Prostaglandins PGE_2 and PGI_2 promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. Exp Cell Res 2007 Jul 1;313(11):2504-2520.

Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, Poirier C, Verin AD. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability. J Cell Physiol 2009 Dec;221(3):750-759.

Bolon ML, Ouellette Y, Li F, Tyml K. Abrupt reoxygenation following hypoxia reduces electrical coupling between endothelial cells of wild-type but not connexin40 null mice in oxidant- and PKA-dependent manner. FASEB J 2005 Oct;19(12):1725-1727.

Borland G, Smith BO, Yarwood SJ. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. Br J Pharmacol 2009 Sep;158(1):70-86.

Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. J Clin Invest 1990 Feb;85(2):587-590.

Bovill EG, van der Vliet A. Venous valvular stasis-associated hypoxia and thrombosis: what is the link? Annu Rev Physiol 2011;73:527-545.

Boyde A. Confocal optical microscopy. Microsc. Anal 1988 Jan; 7-13.

Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. Cell Signal 2011 Aug;23(8):1257-1266.

Bundey RA, Insel PA. Adenylyl cyclase 6 overexpression decreases the permeability of endothelial monolayers via preferential enhancement of prostacyclin receptor function. Mol Pharmacol 2006 Nov;70(5):1700-1707.

Bundey RA, Insel PA. Quantification of adenylyl cyclase messenger RNA by real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem 2003 Aug 15;319(2):318-322.

Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, *et al*. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. J Biol Chem 2000 Feb 18;275(7):5179-5187.

Campos-Toimil M, Keravis T, Orallo F, Takeda K, Lugnier C. Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca^{2+} responses in endothelial cells. Br J Pharmacol 2008 May;154(1):82-92.

Casanello P, Krause B, Torres E, Gallardo V, Gonzalez M, Prieto C, *et al*. Reduced l-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. Placenta 2009 Jul;30(7):625-633.

Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L, *et al*. Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through

hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011 Jun;31(6):1411-1420.

Chan CK, Vanhoutte PM. Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium. Acta Pharmaceutica Sinica B 2013 Feb;3(1):1-7.

Chen JX, Meyrick B. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. Lab Invest 2004 Feb;84(2):182-190.

Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008 Jul;40(7):651-662.

Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK, *et al*. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. J Biol Chem 2003 Sep 12;278(37):35394-35402.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, *et al*. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998 May 15;91(10):3527-3561.

Claxton S, Fruttiger M. Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration. Exp Eye Res 2003 Sep;77(3):305-311.

Comerford KM, Lawrence DW, Synnestvedt K, Levi BP, Colgan SP. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. FASEB J 2002 Apr;16(6):583-585.

Connolly BJ, Willits PB, Warrington BH, Murray KJ. 8-(4-Chlorophenyl)thio-cyclic AMP is a potent inhibitor of the cyclic GMP-specific phosphodiesterase (PDE VA). Biochem Pharmacol 1992 Dec 15;44(12):2303-2306.

Cooper DM. Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. Biochem Soc Trans 2005 Dec;33(Pt 6):1319-1322.

Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, *et al*. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. J Cell Biol 1999 Dec 27;147(7):1569-1582.

Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. J Biol Chem 2003 Nov 21;278(47):46230-46240.

Craven KB, Zagotta WN. CNG and HCN channels: two peas, one pod. Annu Rev Physiol 2006;68:375-401.

Cuíñas A, Elies J, Orallo F, Campos-Toimil M. Cyclic AMP relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated in part by decrease of depletion of intracellular Ca^{2+} stores and inhibition of capacitative calcium entry. Vascul Pharmacol 2013 Jan;58(1-2):98-104.

Cuíñas A., Elíes J., Orallo F., Campos-Toimil M. Expression and distribution of protein kinase A and Epac proteins in vascular smooth muscle cells. Effect of cAMP-elevating agents. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol 2011 Sep;109: 35-36.

Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Luscinskas FW, Mayadas TN. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. Blood 2005 Mar 1;105(5):1950-1955.

Dal Monte M, Casini G, la Marca G, Isacchi B, Filippi L, Bagnoli P. Eye drop propranolol administration promotes the recovery of oxygen-induced retinopathy in mice. Exp Eye Res 2013 Jun;111:27-35.

Dal Monte M, Martini D, Latina V, Pavan B, Filippi L, Bagnoli P. Beta-adrenoreceptor agonism influences retinal responses to hypoxia in a model of retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012 Apr 24;53(4):2181-2192.

de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. J Biol Chem 2000 Jul 7;275(27):20829-20836.

de Wit RJ, Hekstra D, Jastorff B, Stec WJ, Baraniak J, Van Driel R, *et al*. Inhibitory action of certain cyclophosphate derivatives of cAMP on cAMP-dependent protein kinases. Eur J Biochem 1984 Jul 16;142(2):255-260.

Delpy E, Coste H, Gouville AC. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. Br J Pharmacol 1996 Oct;119(3):471-478.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature 1999 Jun 10;399(6736):601-605.

Doebele RC, Schulze-Hoepfner FT, Hong J, Chlenski A, Zeitlin BD, Goel K, *et al*. A novel interplay between Epac/Rap1 and mitogen-activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5 (MEK5/ERK5) regulates thrombospondin to control angiogenesis. Blood 2009 Nov 12;114(20):4592-4600.

Dora KA. Coordination of vasomotor responses by the endothelium. Circ J 2010 Feb;74(2):226-232.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2006;46:235-276.

Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. Cardiovasc Res 2007 Jul 15;75(2):247-260.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995 May;146(5):1029-1039.

Dweik RA. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! Thorax 2005 Apr;60(4):265-267.

Edwards G, Weston AH. EDHF -- are there gaps in the pathway? J Physiol 2001 Mar 1;531(Pt 2):299.

Eguchi R, Naitou H, Kunimasa K, Ayuzawa R, Fujimori Y, Ohashi N, *et al*. Proteomic analysis of hypoxia-induced tube breakdown of an in vitro capillary model composed of HUVECs: potential role of p38-regulated reduction of HSP27. Proteomics 2008 Jul;8(14):2897-2906.

Etgen AM, Petitti N. Mediation of norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation by adrenergic receptors in hypothalamic and preoptic area slices: effects of estradiol. J Neurochem 1987 Dec;49(6):1732-1739.

Fan Y, Wu DZ, Gong YQ, Zhou JY, Hu ZB. Effects of calycosin on the impairment of barrier function induced by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Eur J Pharmacol 2003 Nov 14;481(1):33-40.

Fang Y, Olah ME. Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1). J Pharmacol Exp Ther 2007 Sep;322(3):1189-1200.

Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. Clin Sci (Lond) 2009 Jul 16;117(4):139-155.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. Br J Pharmacol 2004 Oct;143(3):397-403.

Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, *et al*. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. Br J Pharmacol 1999 Apr;126(8):1872-1880.

Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C, *et al*. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. J Biol Chem 2005 Jul 1;280(26):24824-24838.

Fish JE, Matouk CC, Yeboah E, Bevan SC, Khan M, Patil K, *et al*. Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2007 May 25;282(21):15652-15666.

Fish JE, Yan MS, Matouk CC, St Bernard R, Ho JJ, Gavryushova A, *et al*. Hypoxic repression of endothelial nitric-oxide synthase transcription is coupled with eviction of promoter histones. J Biol Chem 2010 Jan 8;285(2):810-826.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003 Jan;284(1):R1-12.

Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. Cardiovasc Res 1999 Aug 15;43(3):532-541.

Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation 2006 Apr 4;113(13):1708-1714.

Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. Physiol Rev 2011 Apr;91(2):651-690.

Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. Angiogenesis 2007;10(2):77-88.

Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, *et al*. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. Mol Cell Biol 2005 Jan;25(1):136-146.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980 Nov 27;288(5789):373-376.

Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth 2004 Jul;93(1):105-113.

Gan Y, Shen YH, Utama B, Wang J, Coselli J, Wang XL. Dual effects of histone deacetylase inhibition by trichostatin A on endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2006 Feb 3;340(1):29-34.

Gan Y, Shen YH, Wang J, Wang X, Utama B, Wang J, *et al*. Role of histone deacetylation in cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2005 Apr 22;280(16):16467-16475.

Garthwaite J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. Mol Cell Biochem 2010 Jan;334(1-2):221-232.

Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. Nat Cell Biol 2006 Nov;8(11):1223-1234.

Gebremedhin D, Lange AR, Lowry TF, Taheri MR, Birks EK, Hudetz AG, *et al*. Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. Circ Res 2000 Jul 7;87(1):60-65.

Giardina JB, Green GM, Rinewalt AN, Granger JP, Khalil RA. Role of endothelin B receptors in enhancing endothelium-dependent nitric oxide-mediated vascular relaxation during high salt diet. Hypertension 2001 Feb;37(2 Part 2):516-523.

Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. J Clin Hypertens (Greenwich) 2012 Apr;14(4):198-205.

Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2010;50:355-375.

Goeckeler ZM, Wysolmerski RB. Myosin phosphatase and cofilin mediate cAMP/cAMP-dependent protein kinase-induced decline in endothelial cell isometric tension and myosin II regulatory light chain phosphorylation. J Biol Chem 2005 Sep 23;280(38):33083-33095.

Grammas P, Moore P, Cashman RE, Floyd RA. Anoxic injury of endothelial cells causes divergent changes in protein kinase C and protein kinase A signaling pathways. Mol Chem Neuropathol 1998 Feb;33(2):113-124.

Gray DW, Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. Br J Pharmacol 1992 Nov;107(3):684-690.

Grimm C, Willmann G. Hypoxia in the eye: a two-sided coin. High Alt Med Biol 2012 Sep;13(3):169-175.

Gu X, El-Remessy AB, Brooks SE, Al-Shabrawey M, Tsai NT, Caldwell RB. Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. Am J Physiol Cell Physiol 2003 Sep;285(3):C546-54.

Gu X, Samuel S, El-Shabrawey M, Caldwell RB, Bartoli M, Marcus DM, *et al*. Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002 Feb;43(2):496-502.

Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, *et al*. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. J Biol Chem 1998 Nov 6;273(45):29786-29793.

Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1989;29:213-239.

Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. Diabetes 1998 Mar;47(3):401-406.

Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 Dec 15;88(24):11555-11558.

Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. Atherosclerosis 2006 Dec;189(2):350-357.

Hastie LE, Patton WF, Hechtman HB, Shepro D. H2O2-induced filamin redistribution in endothelial cells is modulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. J Cell Physiol 1997 Sep;172(3):373-381.

Haynes J,Jr, Robinson J, Saunders L, Taylor AE, Strada SJ. Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilation. Am J Physiol 1992 Feb;262(2 Pt 2):H511-6.

Herrmann J, Lerman A. The endothelium: dysfunction and beyond. J Nucl Cardiol 2001 Mar-Apr;8(2):197-206.

Hewer RC, Sala-Newby GB, Wu YJ, Newby AC, Bond M. PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. J Mol Cell Cardiol 2011 Jan;50(1):87-98.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) 1993 Sep;11(9):1026-1030.

Ho JJ, Man HS, Marsden PA. Nitric oxide signaling in hypoxia. J Mol Med (Berl) 2012 Mar;90(3):217-231.

Hoffmann A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. J Cell Physiol 2001 Jul;188(1):33-44.

Houslay MD, Baillie GS, Maurice DH. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. Circ Res 2007 Apr 13;100(7):950-966.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. Mol Cell Biol 2003 Dec;23(24):9361-9374.

Huang H, Van de Veire S, Dalal M, Parlier R, Semba RD, Carmeliet P, *et al*. Reduced retinal neovascularization, vascular permeability, and apoptosis in ischemic retinopathy in the absence of prolyl hydroxylase-1 due to the prevention of hyperoxia-induced vascular obliteration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011 Sep 29;52(10):7565-7573.

Hulten LM, Levin M. The role of hypoxia in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 2009 Oct;20(5):409-414.

Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. Clin Exp Pharmacol Physiol 2006 Jan-Feb;33(1-2):1-8.

Insel PA, Ostrom RS. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. Cell Mol Neurobiol 2003 Jun;23(3):305-314.

Iranami H, Hatano Y, Tsukiyama Y, Maeda H, Mizumoto K. A beta-adrenoceptor agonist evokes a nitric oxide-cGMP relaxation mechanism modulated by adenylyl cyclase in rat aorta. Halothane does not inhibit this mechanism. Anesthesiology 1996 Nov;85(5):1129-1138.

Isenovic E, Walsh MF, Muniyappa R, Bard M, Diglio CA, Sowers JR. Phosphatidylinositol 3-kinase may mediate isoproterenol-induced vascular relaxation in part through nitric oxide production. Metabolism 2002 Mar;51(3):380-386.

Ishiguro M, Suzuki Y, Mishiro K, Kakino M, Tsuruma K, Shimazawa M, *et al*. Blockade of phosphodiesterase-III protects against oxygen-glucose deprivation in endothelial cells by upregulation of VE-cadherin. Curr Neurovasc Res 2011 May;8(2):86-94.

Ishizuka F, Shimazawa M, Egashira Y, Ogishima H, Nakamura S. Cilostazol prevents retinal ischemic damage partly via inhibition of tumor necrosis factor-α-induced nuclear factor-kappa B/activator protein-1 signaling pathway. Pharma Res Per 2013 Oct; 1 (1).

Islam KN, Mendelson CR. Permissive effects of oxygen on cyclic AMP and interleukin-1 stimulation of surfactant protein A gene expression are mediated by epigenetic mechanisms. Mol Cell Biol 2006 Apr;26(8):2901-2912.

Jin HG, Yamashita H, Nagano Y, Fukuba H, Hiji M, Ohtsuki T, *et al*. Hypoxia-induced upregulation of endothelial small G protein RhoA and Rho-kinase/ROCK2 inhibits eNOS expression. Neurosci Lett 2006 Nov 6;408(1):62-67.

Jin Y, Calvert TJ, Chen B, Chicoine LG, Joshi M, Bauer JA, *et al*. Mice deficient in Mkp-1 develop more severe pulmonary hypertension and greater lung protein levels of arginase in response to chronic hypoxia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010 May;298(5):H1518-28.

Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther 1989 Jun;249(3):890-894.

Kang KB, van der Zypp A, Majewski H. Endogenous nitric oxide attenuates beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aorta. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007 Jan-Feb;34(1-2):95-101.

Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. Intensive Care Med 2001 Jan;27(1):19-31.

Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. Physiol Rev 2002 Jul;82(3):769-824.

Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Ling EA. Increased vascular permeability and nitric oxide production in response to hypoxia in the pineal gland. J Pineal Res 2007 Apr;42(4):338-349.

Kayyali US, Pennella CM, Trujillo C, Villa O, Gaestel M, Hassoun PM. Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2. J Biol Chem 2002 Nov 8;277(45):42596-42602.

Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. Br J Pharmacol 2012 Mar;165(5):1288-1305.

Kessler T, Lugnier C. Rolipram increases cyclic GMP content in L-arginine-treated cultured bovine aortic endothelial cells. Eur J Pharmacol 1995 Jul 18;290(2):163-167.

Khazaei M, Moien-Afshari F, Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. Pathophysiology 2008 Jun;15(1):49-67.

Kiely DG, Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man. Cardiovasc Res 1997 Feb;33(2):378-386.

Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. Cell 2007 Sep 21;130(6):1032-1043.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, *et al*. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal Chem 1998 Jul 1;70(13):2446-2453.

Kolluru GK, Tamilarasan KP, Rajkumar AS, Geetha Priya S, Rajaram M, Saleem NK, *et al*. Nitric oxide/cGMP protects endothelial cells from hypoxia-mediated leakiness. Eur J Cell Biol 2008 Mar;87(3):147-161.

Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. Annu Rev Physiol 2010;72:463-493.

Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003 Aug;285(2):L434-42.

Kooistra MR, Corada M, Dejana E, Bos JL. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. FEBS Lett 2005 Sep 12;579(22):4966-4972.

Kopperud R, Christensen AE, Kjarland E, Viste K, Kleivdal H, Doskeland SO. Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. J Biol Chem 2002 Apr 19;277(16):13443-13448.

Krause BJ, Prieto CP, Munoz-Urrutia E, San Martin S, Sobrevia L, Casanello P. Role of arginase-2 and eNOS in the differential vascular reactivity and hypoxia-induced endothelial response in umbilical arteries and veins. Placenta 2012 May;33(5):360-366.

Kuhn M, Otten A, Frolich JC, Forstermann U. Endothelial cyclic GMP and cyclic AMP do not regulate the release of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide from bovine aortic endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther 1991 Feb;256(2):677-682.

Kwan HY, Huang Y, Yao XQ, Leung FP. Role of cyclic nucleotides in the control of cytosolic Ca^{2+} levels in vascular endothelial cells. Clin Exp Pharmacol Physiol 2009 Apr 27.

Lai YC, Pan KT, Chang GF, Hsu CH, Khoo KH, Hung CH, *et al*. Nitrite-mediated S-nitrosylation of caspase-3 prevents hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction. Circ Res 2011 Dec 9;109(12):1375-1386.

Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. Curr Opin Cell Biol 1997 Oct;9(5):674-682.

Lange C, Ehlken C, Stahl A, Martin G, Hansen L, Agostini HT. Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2009 Sep;247(9):1205-1211.

Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem 1997 Dec 12;272(50):31725-31729.

Le Cras TD, Tyler RC, Horan MP, Morris KG, Tuder RM, McMurtry IF, *et al*. Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase expression in the adult rat lung. J Clin Invest 1998 Feb 15;101(4):795-801.

LeSage GD, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Marucci L, Roskams T, *et al*. Alpha-1 adrenergic receptor agonists modulate ductal secretion of BDL rats via Ca^{2+}- and PKC-dependent stimulation of cAMP. Hepatology 2004 Nov;40(5):1116-1127.

Leung YK, Du J, Huang Y, Yao X. Cyclic nucleotide-gated channels contribute to thromboxane A_2-induced contraction of rat small mesenteric arteries. PLoS One 2010 Jun 14;5(6):e11098.

Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol 2002 Feb;282(2):C227-41.

Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004 Nov;287(5):R1014-30.

Li PG, Sun L, Han X, Ling S, Gan WT, Xu JW. Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and PKA-dependent mechanism. Pharmacology 2012;89(3-4):220-228.

Li QF, Wang XR, Yang YW, Lin H. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1alpha. Cell Res 2006 Jun;16(6):548-558.

Liao JK, Zulueta JJ, Yu FS, Peng HB, Cote CG, Hassoun PM. Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. J Clin Invest 1995 Dec;96(6):2661-2666.

Lin S, Fagan KA, Li KX, Shaul PW, Cooper DM, Rodman DM. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca^{2+} entry. J Biol Chem 2000 Jun 16;275(24):17979-17985.

Lincoln TM, Cornwell TL, Taylor AE. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1990 Mar;258(3 Pt 1):C399-407.

Lirk P, Hoffmann G, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2002 Mar;1(1):89-108.

Liu SM, Magnusson KE, Sundqvist T. Microtubules are involved in transport of macromolecules by vesicles in cultured bovine aortic endothelial cells. J Cell Physiol 1993 Aug;156(2):311-316.

Lorenowicz MJ, Fernandez-Borja M, Kooistra MR, Bos JL, Hordijk PL. PKA and Epac1 regulate endothelial integrity and migration through parallel and independent pathways. Eur J Cell Biol 2008 Oct;87(10):779-792.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 Nov;193(1):265-275.

Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. Pharmacol Ther 2006 Mar;109(3):366-398.

Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. Circ Res 2008 Apr 25;102(8):873-887.

McGiff JC, Quilley J. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and Epoxyeicosatrienoic Acids and Blood Pressure. Curr Opin Nephrol Hypertens 2001 Mar;10(2):231-237.

McGillem LL and Garcia JG. Role of the Endothelial Cell Cytoskeleton in Microvascular Function. Microvascular research : biology and pathology 2006 Nov: 247–54.

McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. Am J Physiol 1994 Nov;267(5 Pt 2):H1921-7.

Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. Physiol Rev 2006 Jan;86(1):279-367.

Metrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. Pflugers Arch 2010 Mar;459(4):535-546.

Michel JJ, Scott JD. AKAP mediated signal transduction. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2002;42:235-257.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. Pflugers Arch 2010 May;459(6):807-816.

Min J, Jin YM, Moon JS, Sung MS, Jo SA, Jo I. Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells. Hypertension 2006 Jun;47(6):1189-1196.

Miyata T, Takizawa S, van Ypersele de Strihou C. Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. Am J Physiol Cell Physiol 2011 Feb;300(2):C226-31.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991 Jun;43(2):109-142.

Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. Cell Mol Life Sci 2012 Jan;69(2):247-266.

Mori K, Hayabuchi Y, Kuroda Y, Nakaya Y, Tsuchiya K, Moritoki H. Age-related endothelium-dependent vascular relaxation in rat thoracic aorta in response to colforsin. Pediatr Int 1999 Dec;41(6):673-681.

Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. J Clin Invest 1995 Dec;96(6):2676-2682.

Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. J Mol Cell Cardiol 2007 Feb;42(2):271-279.

Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Rinaldi G, Said M, de Cingolani GC, Mattiazzi A. Endoplasmic reticulum contribution to the relaxant effect of cGMP- and cAMP-elevating agents in feline aorta. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000 Jun;278(6):H1856-65.

Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. J Biol Chem 2002 Nov 15;277(46):44085-44092.

Murata T, Yamawaki H, Hori M, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Hypoxia impairs endothelium-dependent relaxation in organ cultured pulmonary artery. Eur J Pharmacol 2001 Jun 1;421(1):45-53.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J 2009 Jan 1;417(1):1-13.

Murray F, Suda RY, Kwon O, Li X, Remillard CV, Thistlethwaite PA, *et al*. Decreased Expression and Activity of Epac (Exchange Protein Directly Activated by cAMP) in Pulmonary Arterial Hypertension. American Thoracic Society International Conference Abstracts 2009 April 1:A1804.

Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. Sci Signal 2008 Jun 3;1(22):re4.

Murray F. The interplay of multiple molecular and cellular components is necessary for compartmentalization of cAMP. Focus on "Assessment of cellular mechanisms contributing to cAMP compartmentalization in pulmonary microvascular endothelial cells". Am J Physiol Cell Physiol 2012 Mar 15;302(6):C837-8.

Nakanishi S, Kakita S, Takahashi I, Kawahara K, Tsukuda E, Sano T, *et al*. Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. J Biol Chem 1992 Feb 5;267(4):2157-2163.

Namkoong S, Kim CK, Cho YL, Kim JH, Lee H, Ha KS, *et al*. Forskolin increases angiogenesis through the coordinated cross-talk of PKA-dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling. Cell Signal 2009 Jun;21(6):906-915.

Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, Robinson DG. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. Plant Physiol 2002 Nov;130(3):1102-1108.

Nelson CP, Rainbow RD, Brignell JL, Perry MD, Willets JM, Davies NW, *et al*. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K^+ channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res 2011 Sep 1;91(4):694-702.

Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. Am J Physiol 1990 Jul;259(1 Pt 1):C3-18.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. Am J Physiol 1995 Apr;268(4 Pt 1):C799-822.

Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiol Rev 2001 Oct;81(4):1415-1459.

Noda K, Zhang J, Fukuhara S, Kunimoto S, Yoshimura M, Mochizuki N. Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles

through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. Mol Biol Cell 2010 Feb 15;21(4):584-596.

Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. J Cell Biol 2000 Aug 7;150(3):567-580.

Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, *et al*. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. Am J Physiol 1992 Mar;262(3 Pt 1):C546-54.

Ogawa S, Shreeniwas R, Brett J, Clauss M, Furie M, Stern DM. The effect of hypoxia on capillary endothelial cell function: modulation of barrier and coagulant function. Br J Haematol 1990 Aug;75(4):517-524.

Orallo F. Study of the in vivo and in vitro cardiovascular effects of a hydralazine-like vasodilator agent (HPS-10) in normotensive rats. Br J Pharmacol 1997 Aug;121(8):1627-1636.

Orallo F, Caamiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. Mol Pharmacol 2002;61:294-302.

Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. J Exp Med 2006 Nov 27;203(12):2703-2714.

Ostergaard L, Stankevicius E, Andersen MR, Eskildsen-Helmond Y, Ledet T, Mulvany MJ, *et al*. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007 Nov;293(5):H2894-903.

Ostrom RS, Liu X, Head BP, Gregorian C, Seasholtz TM, Insel PA. Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. Mol Pharmacol 2002 Nov;62(5):983-992.

Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, Fuchsel L, Motoshima H, Mahadev K, *et al*. Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. Diabetes 2006 Jun;55(6):1840-1846.

Ouedraogo S, Stoclet JC, Bucher B. Effects of cyclic AMP and analogues on neurogenic transmission in the rat tail artery. Br J Pharmacol 1994 Feb;111(2):625-631.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988 Jun 16;333(6174):664-666.

Pape D, Beuchard J, Guillo P, Allain H, Bellissant E. Hypoxic contractile response in isolated rat thoracic aorta: role of endothelium, extracellular calcium and endothelin. Fundam Clin Pharmacol 1997;11(2):121-126.

Parnell E, Smith BO, Palmer TM, Terrin A, Zaccolo M, Yarwood SJ. Regulation of the inflammatory response of vascular endothelial cells by EPAC1. Br J Pharmacol 2012 May;166(2):434-446.

Partridge CA. Hypoxia and reoxygenation stimulate biphasic changes in endothelial monolayer permeability. Am J Physiol 1995 Jul;269(1 Pt 1):L52-8.

Pavan B, Biondi C, Dalpiaz A. Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. Drug Discov Today 2009 Oct;14(19-20):982-991.

Pearce WJ, Williams JM, Hamade MW, Chang MM, White CR. Chronic hypoxia modulates endothelium-dependent vasorelaxation through multiple independent mechanisms in ovine cranial arteries. Adv Exp Med Biol 2006;578:87-92.

Pearlstein DP, Ali MH, Mungai PT, Hynes KL, Gewertz BL, Schumacker PT. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002 Apr 1;22(4):566-573.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001 May 1;29(9):e45.

Phelan MW, Faller DV. Hypoxia decreases constitutive nitric oxide synthase transcript and protein in cultured endothelial cells. J Cell Physiol 1996 Jun;167(3):469-476.

Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, Naka Y, Chen JX, Connolly ES,Jr, *et al*. Hypoxia and modification of the endothelium: implications for regulation of vascular homeostatic properties. Semin Cell Biol 1995 Oct;6(5):283-294.

Pohl U, Busse R. Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. Am J Physiol 1989 Jun;256(6 Pt 2):H1595-600.

Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. FASEB J 1995 Sep;9(12):1196-1204.

Pottecher J, Cheisson G, Huet O, Laplace C, Vicaut E, Mazoit JX, *et al*. Beta2-adrenergic agonist protects human endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury in vitro. Crit Care Med 2006 Jan;34(1):165-172.

Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. Microvasc Res 2009 Jan;77(1):53-63.

Predescu SA, Predescu DN, Malik AB. Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007 Oct;293(4):L823-42.

Predescu SA, Predescu DN, Timblin BK, Stan RV, Malik AB. Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. Mol Biol Cell 2003 Dec;14(12):4997-5010.

Prieto CP, Krause BJ, Quezada C, San Martin R, Sobrevia L, Casanello P. Hypoxia-reduced nitric oxide synthase activity is partially explained by higher arginase-2 activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelium. Placenta 2011 Dec;32(12):932-940.

Purves GI, Kamishima T, Davies LM, Quayle JM, Dart C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. J Physiol 2009 Jul 15;587(Pt 14):3639-3650.

Qiao J, Huang F, Lum H. PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003 Jun;284(6):L972-80.

Queen LR, Ji Y, Xu B, Young L, Yao K, Wyatt AW, *et al*. Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. J Physiol 2006 Oct 15;576(Pt 2):585-594.

Quinlan TR, Li D, Laubach VE, Shesely EG, Zhou N, Johns RA. eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 Oct;279(4):L641-50.

Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J Biol Chem 1958 Jun;232(2):1065-1076.

Rathel TR, Leikert JJU, Vollmar AM, Dirsch VM. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. Biol Proced Online 2003;5:136-142.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 1990 Nov;101(3):746-752.

Rehmann H. Epac-inhibitors: facts and artefacts. Sci Rep 2013 Oct 23;3:3032.

Rehmann H, Arias-Palomo E, Hadders MA, Schwede F, Llorca O, Bos JL. Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. Nature 2008 Sep 4;455(7209):124-127.

Rehmann H, Das J, Knipscheer P, Wittinghofer A, Bos JL. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. Nature 2006 Feb 2;439(7076):625-628.

Rehmann H, Schwede F, Doskeland SO, Wittinghofer A, Bos JL. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. J Biol Chem 2003 Oct 3;278(40):38548-38556.

Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, *et al*. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. J Biol Chem 2004 Sep 3;279(36):37982-37996.

Roberts OL, Dart C. cAMP signalling in the vasculature: the role of Epac (exchange protein directly activated by cAMP). Biochem Soc Trans 2014 Feb;42(1):89-97.

Roberts OL, Kamishima T, Barrett-Jolley R, Quayle JM, Dart C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca^{2+}-sensitive K^{+} channels in rat mesenteric artery. J Physiol 2013 Oct 15;591(Pt 20):5107-5123.

Roscioni SS, Kistemaker LE, Menzen MH, Elzinga CR, Gosens R, Halayko AJ, *et al*. PKA and Epac cooperate to augment bradykinin-induced interleukin-8 release from human airway smooth muscle cells. Respir Res 2009 Sep 29;10:88-9921-10-88.

Roscioni SS, Maarsingh H, Elzinga CR, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, *et al*. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. J Cell Mol Med 2011 Jul;15(7):1551-1563.

Rose RJ, Liu H, Palmer D, Maurice DH. Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. Br J Pharmacol 1997 Sep;122(2):233-240.

Rossig L, Li H, Fisslthaler B, Urbich C, Fleming I, Forstermann U, *et al*. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. Circ Res 2002 Nov 1;91(9):837-844.

Rudini N, Dejana E. Adherens junctions. Curr Biol 2008 Dec 9;18(23):R1080-2.

Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. Cell Mol Life Sci 2003 Jun;60(6):1135-1157.

Salinthone S, Tyagi M, Gerthoffer WT. Small heat shock proteins in smooth muscle. Pharmacol Ther 2008 Jul;119(1):44-54.

Sampedro A, de los Toyos JR, Martínez-Nistal A. Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría. : Universidad de Oviedo, Servicio de Publicaciones; 1995.

Sandberg M, Butt E, Nolte C, Fischer L, Halbrugge M, Beltman J, *et al*. Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole- 3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCl-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. Biochem J 1991 Oct 15;279 (Pt 2)(Pt 2):521-527.

Sands WA, Woolson HD, Milne GR, Rutherford C, Palmer TM. Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. Mol Cell Biol 2006 Sep;26(17):6333-6346.

Sayner SL. Emerging themes of cAMP regulation of the pulmonary endothelial barrier. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011 May;300(5):L667-78.

Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Munzel T, Walter U, *et al*. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. Biochem Pharmacol 2003 Feb 1;65(3):397-405.

Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. Pharmacol Rev 2013 Feb 27;65(2):670-709.

Schmidt M, Sand C, Jakobs KH, Michel MC, Weernink PA. Epac and the cardiovascular system. Curr Opin Pharmacol 2007 Apr;7(2):193-200.

Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. J Leukoc Biol 2008 Mar;83(3):536-545.

Scott A, Fruttiger M. Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina. Eye (Lond) 2010 Mar;24(3):416-421.

Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. Am J Physiol Cell Physiol 2006 Nov;291(5):C803-16.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. Trends Mol Med 2001 Aug;7(8):345-350.

Serban DN, Nilius B, Vanhoutte PM. The endothelial saga: the past, the present, the future. Pflugers Arch 2010 May;459(6):787-792.

Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. Am J Respir Cell Mol Biol 2008 Aug;39(2):127-132.

Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. Annu Rev Physiol 2002;64:749-774.

Shaul PW, Wells LB, Horning KM. Acute and prolonged hypoxia attenuate endothelial nitric oxide production in rat pulmonary arteries by different mechanisms. J Cardiovasc Pharmacol 1993 Dec;22(6):819-827.

Shen B, Cheng KT, Leung YK, Kwok YC, Kwan HY, Wong CO, *et al*. Epinephrine-induced Ca^{2+} influx in vascular endothelial cells is mediated by CNGA2 channels. J Mol Cell Cardiol 2008 Sep;45(3):437-445.

Shen Q, Wu MH, Yuan SY. Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability. Cell Health Cytoskelet 2009 Jul 1;2009(1):43-50.

Shimura H, Yamaguchi M, Kuzume M, Matsumiya A, Matsumoto T, Sakai H, *et al*. Prevention of reactive oxygen-induced endothelial cell injury by blocking its process. Eur Surg Res 1999;31(5):390-398.

Shivanna M, Rajashekhar G, Srinivas SP. Barrier dysfunction of the corneal endothelium in response to TNF-alpha: role of p38 MAP kinase. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010 Mar;51(3):1575-1582.

Shivanna M, Srinivas SP. Microtubule stabilization opposes the (TNF-alpha)-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. Exp Eye Res 2009 Dec;89(6):950-959.

Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. Front Biosci 1997 Jul 1;2:d331-42.

Smith GC, Coleman RA, McGrath JC. Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus. J Pharmacol Exp Ther 1994a Oct;271(1):390-396.

Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, *et al*. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994b Jan;35(1):101-111.

Stangherlin A, Zaccolo M. Phosphodiesterases and subcellular compartmentalized cAMP signaling in the cardiovascular system. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012 Jan;302(2):H379-90.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. Medicina (Kaunas) 2003;39(4):333-341.

Steiner DR, Gonzalez NC, Wood JG. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in the microvascular response to systemic hypoxia. J Appl Physiol (1985) 2002 Oct;93(4):1411-1418.

Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, *et al*. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. J Biol Chem 1999 Mar 19;274(12):8039-8045.

Steppan J, Nyhan D, Berkowitz DE. Development of Novel Arginase Inhibitors for Therapy of Endothelial Dysfunction. Front Immunol 2013 Sep 17;4:278.

Stokman G, Qin Y, Genieser HG, Schwede F, de Heer E, Bos JL, *et al*. Epac-Rap signaling reduces cellular stress and ischemia-induced kidney failure. J Am Soc Nephrol 2011 May;22(5):859-872.

Sukhanova IF, Kozhevnikova LM, Popov EG, Podmareva ON, Avdonin PV. Activators of Epac proteins induce relaxation of isolated rat aorta. Dokl Biol Sci 2006 Nov-Dec;411:441-444.

Sukhanova IF, Kozhevnikova LM, Popov EG, Podmareva ON, Avdonin PV. Activators of Epac proteins induce relaxation of isolated rat aorta. Dokl Biol Sci 2006 Nov-Dec;411:441-444.

Takayama M, Ozaki H, Karaki H. Effects of a myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin, on cytoplasmic Ca^{2+} levels, myosin light chain phosphorylation and force in vascular smooth muscle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1996 Jul;354(2):120-127.

Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation 2002 Jul 2;106(1):57-62.

Takuwa Y, Takuwa N, Rasmussen H. The effects of isoproterenol on intracellular calcium concentration. J Biol Chem 1988 Jan 15;263(2):762-768.

Tanano I, Nagaoka T, Omae T, Ishibazawa A, Kamiya T, Ono S, *et al*. Dilation of porcine retinal arterioles to cilostazol: roles of eNOS phosphorylation via cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase and potassium channels. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013 Feb 19;54(2):1443-1449.

Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiol Rev 2004 Jan;84(1):137-167.

Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. Trends Pharmacol Sci 1988 Aug;9(8):272-274.

Ten VS, Pinsky DJ. Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. Curr Opin Crit Care 2002 Jun;8(3):242-250.

Tian XF, Xia XB, Xu HZ, Xiong SQ, Jiang J. Caveolin-1 expression regulates blood-retinal barrier permeability and retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy. Clin Experiment Ophthalmol 2012 Jan-Feb;40(1):e58-66.

Tilley DG, Maurice DH. Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4 activities and levels are regulated by cyclic AMP in vivo. Mol Pharmacol 2002 Sep;62(3):497-506.

Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Ca^{2+} signaling, TRP channels, and endothelial permeability. Microcirculation 2006 Dec;13(8):693-708.

Toporsian M, Govindaraju K, Nagi M, Eidelman D, Thibault G, Ward ME. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia in vivo. Circ Res 2000 Mar 31;86(6):671-675.

Torii H, Kubota H, Ishihara H, Suzuki M. Cilostazol inhibits the redistribution of the actin cytoskeleton and junctional proteins on the blood-brain barrier under hypoxia/reoxygenation. Pharmacol Res 2007 Feb;55(2):104-110.

Toyoshima H, Nasa Y, Hashizume Y, Koseki Y, Isayama Y, Kohsaka Y, *et al*. Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol 1998 Oct;32(4):543-551.

Triggle CR, Dong H, Waldron GJ, Cole WC. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): species and tissue heterogeneity. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999 Feb;26(2):176-179.

Tsang MC, Lo AC, Cheung PT, Chung SS, Chung SK. Perinatal hypoxia-/ischemia-induced endothelin-1 mRNA in astrocyte-like and endothelial cells. Neuroreport 2001 Jul 20;12(10):2265-2270.

Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. Ann N Y Acad Sci 2008 Mar;1123:134-145.

Vane JR, Botting RM. Regulatory mechanisms of the vascular endothelium: an update. Pol J Pharmacol 1994 Nov-Dec;46(6):499-421.

Vanhoutte PM. Arginine and arginase: endothelial NO synthase double crossed? Circ Res 2008 Apr 25;102(8):866-868.

Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. Circ J 2003 Jul;67(7):572-575.

Voelkel NF, Mizuno S, Bogaard HJ. The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2013 Apr 1;304(7):L457-65.

Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K^+ channels by endothelium-derived relaxing factors. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999 Feb;26(2):180-184.

Wang Q, Patton WF, Chiang ET, Hechtman HB, Shepro D. Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases, and protein phosphatases. J Cell Biochem 1996 Sep 1;62(3):383-396.

Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. Nat Rev Immunol 2007 Jun;7(6):467-477.

Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol Rev 2005 Oct;85(4):1159-1204.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF,Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol 2003 Oct 1;42(7):1149-1160.

Willoughby D, Cooper DM. Organization and Ca^{2+} regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. Physiol Rev 2007 Jul;87(3):965-1010.

Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. Toxicol Lett 1995 Dec;82-83:221-226.

Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Nov 1;90(21):9813-9817.

Wittchen ES, Nishimura E, McCloskey M, Wang H, Quilliam LA, Chrzanowska-Wodnicka M, *et al*. Rap1 GTPase activation and barrier enhancement in rpe inhibits choroidal neovascularization in vivo. PLoS One 2013 Sep 10;8(9):e73070.

Wittchen ES, Worthylake RA, Kelly P, Casey PJ, Quilliam LA, Burridge K. Rap1 GTPase inhibits leukocyte transmigration by promoting endothelial barrier function. J Biol Chem 2005 Mar 25;280(12):11675-11682.

Wojciak-Stothard B, Tsang LY, Haworth SG. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005 Apr;288(4):L749-60.

Woodrum DA, Brophy CM, Wingard CJ, Beall A, Rasmussen H. Phosphorylation events associated with cyclic nucleotide-dependent inhibition of smooth muscle contraction. Am J Physiol 1999 Sep;277(3 Pt 2):H931-9.

Wu MH. Endothelial focal adhesions and barrier function. J Physiol 2005 Dec 1;569(Pt 2):359-366.

Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. J Biol Chem 2001 Apr 20;276(16):12645-12653.

Yan SF, Ogawa S, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6. Kidney Int 1997 Feb;51(2):419-425.

Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, *et al*. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008 Oct;295(4):H1547-55.

Yuan SY, Rigor RR. Regulation of Endothelial Barrier Function. 2010.

Zaccolo M. Spatial control of cAMP signalling in health and disease. Curr Opin Pharmacol 2011 Dec;11(6):649-655.

Zaccolo M, Di Benedetto G, Lissandron V, Mancuso L, Terrin A, Zamparo I. Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signalling. Biochem Soc Trans 2006 Aug;34(Pt 4):495-497.

Zambon AC, Wilderman A, Ho A, Insel PA. Increased expression of the pro-apoptotic protein BIM, a mechanism for cAMP/protein kinase A (PKA)-induced apoptosis of immature T cells. J Biol Chem 2011 Sep 23;286(38):33260-33267.

Zhang KY, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D, Gillette S, *et al*. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. Mol Cell 2004a Jul 23;15(2):279-286.

Zhang SX, Ma JX, Sima J, Chen Y, Hu MS, Ottlecz A, *et al*. Genetic difference in susceptibility to the blood-retina barrier breakdown in diabetes and oxygen-induced retinopathy. Am J Pathol 2005 Jan;166(1):313-321.

Zhang SX, Sima J, Shao C, Fant J, Chen Y, Rohrer B, *et al*. Plasminogen kringle 5 reduces vascular leakage in the retina in rat models of oxygen-induced retinopathy and diabetes. Diabetologia 2004b Jan;47(1):124-131.

Zhang X, Hintze TH. cAMP signal transduction cascade, a novel pathway for the regulation of endothelial nitric oxide production in coronary blood vessels. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 May;21(5):797-803.

Zhang XP, Hintze TH. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006 Jun;290(6):H2376-84.

Zhang YL, Tavakoli H, Chachisvilis M. Apparent PKA activity responds to intermittent hypoxia in bone cells: a redox pathway? Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010 Jul;299(1):H225-35.

Zieba BJ, Artamonov MV, Jin L, Momotani K, Ho R, Franke AS, *et al*. The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity. J Biol Chem 2011 May 13;286(19):16681-16692.

Ziesche R, Petkov V, Williams J, Zakeri SM, Mosgoller W, Knofler M, *et al*. Lipopolysaccharide and interleukin 1 augment the effects of hypoxia and inflammation in human pulmonary arterial tissue. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Oct 29;93(22):12478-12483.

Zink S, Rosen P, Lemoine H. Micro- and macrovascular endothelial cells in beta-adrenergic regulation of transendothelial permeability. Am J Physiol 1995 Nov;269(5 Pt 1):C1209-18.

Zund G, Nelson DP, Neufeld EJ, Dzus AL, Bischoff J, Mayer JE, *et al*. Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Jul 9;93(14):7075-7080.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ENGLISH SUMMARY

Introduction

There are no doubts about the physiological importance of the endothelium, the cell monolayer that covers the inner lining of blood vessels. In addition to constituting a semi-permeable barrier between the blood system and the extravascular space, regulating the contents of plasma fluids and transport of different substances, the endothelium plays a crucial role in the control of many important functions in vascular homeostasis (Khazaei *et al.*, 2008). Among these functions it is worth mentioning its participation in the regulation of vascular tone of the underlying smooth muscle cells through the release of various vasoactive molecules including nitric oxide (NO), prostacyclin or endothelium-derived hyperpolarizing factor and contacting factors such as endothelin (Dora, 2010; Galley and Webster, 2004; Serban *et al.*, 2010; Giles *et al.*, 2012).

3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is an ubiquitous second messenger that plays an important role in the regulation of many processes and functions in endothelial cells in physiological and pathological conditions (including the regulation of vascular tone, endothelial barrier function, angiogenesis, etc.) (Sukhanova *et al.,* 2006; Roscioni *et al.,* 2011; Zieba *et al.,* 2011, Schmidt *et al.*, 2013; Sayner, 2011; Metrich *et al*., 2010).

In particular, the role of cAMP in the relaxation blood vessels has been, and continues to be, a prominent object of study in the pharmacology and physiology of the cardiovascular system. Although for many years it was thought that vascular smooth muscle relaxation induced by cAMP occurred independently from a functional endothelial layer, it is now generally accepted that the endothelium also participates in this process (Ferro *et al.*, 1994; Queen *et al.*, 2006; Schäefer *et al.* 2003; Zieba *et al.*, 2011). Previously, several authors have suggested that the vasorelaxation mediated by increased cAMP in the endothelium could be due to a release of NO after activating the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Butt *et al.*, 2000; Zhang and Hintze, 2001), however the underlying mechanisms are not yet fully understood.

Until recently, it was believed that the AMPc exerted their effects almost exclusively through the activation of protein kinase A (PKA) with the exception of a direct modulation of cyclic nucleotide-gated ion channels. However the identificaction of the alternative cAMP target Epac (exchange protein directly activated by cAMP) has demonstrate its participation in several of the effects induced by cAMP elevating agents previously attributed to the activation of the PKA (Gloerich and Bos, 2010; Schmidt *et al.*, 2013). Therefore, the discovery of Epac has opened new horizons in the research field of cAMP and its signaling pathways.

In addition, several evidences support the existence of a crosstalk between cAMP and Ca^{2+} signaling pathways (Kwan *et al.*, 2009). Ca^{2+} is involved in the regulation of wide variety of endothelium-dependent processes, including the regulation of vascular tone (Fleming and Busse, 2003). Indeed, in response to increases in the concentration of cytoplasmic Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$), endothelial cells synthesize and release several vasoactive factors such as NO, and eNOS activity is highly sensitive to changes in $[Ca^{2+}]_c$ (Dudzinsky and Michel, 2007; Mount *et al*., 2007).

On the other hand, due to the multifunctionality of the endothelial monolayer, it is understandable that an alteration of it could be involved in the origin of several pathologies. In recent years, it has become apparent that endothelial dysfunction is a key event in the pathophysiologic changes which occur in the beginning and progression of the lesions induced by several factors, including hypoxia.

Hypoxia is a reduction in the normal level of oxygen tension and occurs during the development of several vascular diseases, such as atherosclerosis, pulmonary hypertension, venous thrombosis and retinopathy (Hulten and Levin, 2009; Voelkel *et al.*, 2013; Bovill and Vliet, 2011; Grimm and Willmann, 2012). In response to hypoxia, the endothelium exhibits multiple structural and functional abnormalities that may further contribute to the pathogenesis of these diseases. It is widely recognized that hypoxia is associated with increased endothelial permeability (Ten and Pinsky, 2002), impairment of vasodilation (Pinsky *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2013) and increment in oxidative stress (Pearlstein *et al.*, 2002). The mechanisms involved in the vascular response to hypoxia are complex and not fully understood (Chan and Vanhoutte, 2013). Some of these responses are due to activation of hypoxia-induced transcription

through the action of several key transcription factors, however, other events are considered too fast to be the result of a transcription process.

Since cAMP levels are diminished under hypoxia (Ogawa *et al.*, 1990; Ten y Pinsky, 2002; Karimova y Pinsky, 2001), an alteration in the signaling pathways of this nucleotide may be involved in the endothelial dysfunction induced by low oxygen tension.

In light of these reports, we have believed that it would be of interest to conduct a study of the endothelium-dependent vasorelaxant effects induced by cAMP. We have focused on the involvement of PKA and Epac proteins in these effects and the influence of the cAMP in the biosynthesis of endothelial NO through a possible activation of eNOS (by elevation of $[Ca^{2+}]_c$ or by the action of various protein kinases). In a complementary way, we have investigated whether the conditions of hypoxia may alter the effects of the cAMP on eNOS and NO synthesis, on the production of reactive oxygen species (ROS) and on the endothelial barrier function.

Bearing in mind the above considerations, in the present work we have established the following aims:

1. To study the contribution of the endothelium to the vasorelaxant effect of drugs that increase intracellular cAMP concentrations or interfere with its signaling pathways, focusing on the involvement of PKA and Epac proteins in this effect.

2. To investigate the role of NO synthesis in the cAMP-induced vasorelaxation and the effect of drugs that increase cAMP or interfere with its signaling pathways on eNOS activity.

3. To study the participation of several kinases involved in the activation of eNOS on endothelial NO release and on the vasorelaxation induced by cAMP.

4. To investigate the possible involvement of an increase in basal $[Ca^{2+}]_c$ on endothelial NO production induced by cAMP.

5. To study the effect of hypoxia on endothelial synthesis of NO and ROS and on the endothelial barrier function, as well as the involvement of cAMP and its signaling pathways in this effect.

6. To study the effect of hypoxia on the expression of various proteins (PKA, Epac, eNOS, arginase and VE-cadherin) in endothelial cells and evaluate changes in the expression of Epac-1 during the hypoxic stage of a mice model of oxygen-induced retinopathy.

7. To study the involvement of arginase, histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) enzymes on endothelial synthesis of NO and ROS under hypoxic conditions.

Given the important role of cAMP in regulating various endothelial functions, we consider that the present work has a very important practical interest. Therefore, the study of the pathways activated by this cyclic nucleotide under physiological and hypoxic conditions represent a first step towards a better understanding of multiple vascular pathologies in which there is an alteration of the endothelial function. All this may serve as a basis for the proposal of new therapeutic strategies against these diseases.

Materials and methods

1. Animals and ethical approval

Male Wistar-Kyoto (WKY) rats (Iffa-Credo) weighing 200-350 g were used throughout this study. They were housed, cared for and acclimatized (before the experiments) as previously indicated (Orallo *et al.*, 2000.) For experiments, rats were killed by CO_2 inhalation and exsanguinated. All experimental protocols were approved by the bioethics committee of the University of Santiago de Compostela (Spain) and the bioethics committee for research (CEIC) of the Xunta de Galicia (Spain).

C57BL/6J mice (Charles River, Sulzfelt, Germany) were used throughout the study. All experimental procedures were performed according to the guidelines of the statement for animal experimentation issued by the Association for Research in Vision and Opthalmology and were approved by the local board for animal care (Medical Facculty Mannheim, Germany).

2. Oxygen-induced retinopathy mouse model

To investigate Epac-1 expression during the hypoxic stages of retinopathy, we used the established Oxigen-induced retinapathy (OIR) model as previosly described (Smith *et al.*, 1994b). Briefly, mice at postnatal day (P) 7 were exposed to hyperoxia (75% oxygen) in an incubation chamber (Stuart Scientific, Redhill, UK) with their nursing mothers for 5 days and then returned to ambient air (relative hypoxic environment). Unexposed control mice were kept at ambient air and used as a control group. Mice were sacrificed at P12 (6h hypoxia) and P13 (24h hypoxia) and the retinas isolated as described previously (Hammes *et al.* 1991).

3. Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC-C, a spontaneously transformed cell line) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC 1730-CRL; Rockville, MD, USA). The cells were grown in DMEM/F12 medium (Gibco-Life Technologies) supplemented with endothelial cell growth supplement (0.03 mg/ml) (Billerica,MA, USA), heparin (0.1 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), antibiotic-antimicotic (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,25 µg/ml amphotericin) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) (Gibco-Life Technologies). Cells were maintained at 37 °C with 5% CO_2 in air and used for experimentation between passages 2 and 15. The passage number did not alter cell response

Human coronary artery endothelial cells (HCAEC; Lonza, Breda, The Netherlands) cultured in Endothelial Cell Medium containing RPMI1640, L-glutamine (2mM), Penicillin/Streptomycin (1%; all Lonza, Breda, The Netherlands), Bovine Pituitary Extract (20µg/ml; Invitrogen/Life Technologies, Bleiswijk, The Netherlands), heparin (5U/ml; Leo Pharma, Amsterdam, The Netherlands) and FBS (20%; Thermo Scientific, Waltham, MA). When appropriate, confluent HCAEC were serum starved for 2h and incubated with appropriate treatment. Parallel cell cultures were maintained under normoxic (21% oxygen tension) and hypoxic conditions (2% oxygen tension) for 24 h prior to experiments.

4. Contraction-relaxation studies in isolated rat thoracic aorta rings

For contraction-relaxation experiments, ~4 mm long rat thoracic aortic rings were transferred into an organ bath containing Krebs bicarbonate solution (KBS) at 37 °C (composition in mM: NaCl 119, KCl 4.7, $CaCl_2.2H_2O$ 1.5, $MgSO_4.7H_2O$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25, EDTA-Na_2 0.03, glucose 11; pH 7.4), oxygenated with carbogen (95% O_2 + 5% CO_2), following the protocol previously described (Cuiñas *et al.*, 2013). In some rings, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with a cotton bud moistened with KBS.

Aortic rings were then equilibrated at a resting tension of 2 g for at least 1 h, during which KBS was replaced every 15 min. Thereafter, a contraction was induced by the addition of phenylephrine (1 µM). Once the contraction stabilized, a single concentration of acetylcholine (1 µM) was added to the bath in order to assess the endothelial integrity of the preparations. The endothelium was considered to be intact when this drug elicited a vasorelaxation >50% of the maximal contraction obtained. In rubbed rings, the absence of endothelium was confirmed by the absence of acetylcholine relaxant actions.

After assessing the presence or absence of functional endothelium, vascular tissues were allowed to recuperate for at least 1 h during which KBS was replaced every 15 min, before any experiment protocol was started.

In the experiments carried out in pre-contracted rat aortic rings, relaxant responses are expressed as a percentage of the maximal contraction (Emax = 100%) produced by the phenylephrine. In cumulative experiments, sigmoidal concentration–response curves for the vasorelaxant effects of the drugs were fitted using the program Origin™ 7.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, USA), with an estimation of IC50 values (i.e. concentrations inducing 50% relaxation) for phenylephrine-induced contractions.

5. Convencional RT-PCR

Isolation of RNA from HUVEC was performed using a silica column system with the NucleoSpin RNA (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel GmbH and Co KG, Germany).

For retrotranscription-PCR (RT-PCR) experiments, 2 µg of total RNA (per PCR-tube, 25 µL) was mixed with random hexamers (0.5 µg), recombinant retrotrancriptase M-MLV-RT (1000 U, Promega Madison, Wi, USA.), 10 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), retrotranscription buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl2, 50 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol, pH 8.5), and RNase inhibitors (40 U/µL, Promega Madison, Wi, USA) and heated 1 h at37 °C. PCR was carried out with 1 µl of retrotranscription product mixed with PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl2, 50 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol, pH 8.5), 0.16 mM each dNTP, 0.4 µM primers (see primers list in table 4) and 1 U of Taq DNA polymerase (Roche, Manheim, Alemania). Extension reaction was performed according to standars protocol. Each cDNA sample was resolved by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide and bands were visualized under a UV lamp (Fluo-Chem FC2 MultiImage II; Alpha Innotech).

6. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA from HCAEC cells and from OIR mouse retinas was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA) according to manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry (NanoDrop Technologies Thermo Scientific, MA, USA). Next, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed in cDNA using the ReverAid™ First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific, MA, USA) according to manufacturer's instructions. PCR reactions were carried out using the VIAA-7 detection system (Applied Byosystem, CA, USA) and amplifications were performed using SYBR Green PCR master Mix (BioRad, CA, USA). Gene –specific primers (Biolegio, The Netherlands) are shown in table 5. Each reaction was performed in triplicate and cycle threshold (Ct) values were determined and normalized against β-actin or ribosomal subunit 18S CT values. Relative gene expression was calculated using the ΔΔCt method (Pfaffl, 2001). Data was expressed as fold change *versus* control.

7. NO and Ca^{2+} imaging in isolated HUVEC

HUVEC were seeded at ~1,500 cells/cm^2 in 35 mm glass-bottom Petri dishes (World Precision Instruments Ltd, London, UK) and kept in culture for 48 h before the

experiments. Cells were then incubated for 60 min at 37°C in normal bathing solution (composition in mM: NaCl 140, KCl 5, $CaCl_2.2H_2O$ 1.5, $MgCl_2$ 2, HEPES 10, glucose 11; pH 7.4) containing L-arginine (100 µM) and DAF-2 diacetate (DAF-2-DA, 5 µM) (Cayman Chemical Ann Arbor, MI, USA) to measure intracellular NO or containing fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM, 2,5 µM) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) to measure the cytosolic Ca^{2+} concentration. Cells were then gently washed twice with normal bathing solution and allowed to rest for > 15 min in the incubator.

Next, cells were placed on an inverted light microscope and excited at 490 ± 10 nm (40 ms exposure time) for DAF-2-DA loaded cells and dual excited at 340 ± 10 and 380 ± 10 nm (100 ms exposure time) for FURA-AM loaded cells. Emitted fluorescence was collected through a 510 ± 20 nm emission filter and measured with an intensified CCD camera (Rolera XR Monofast 1394 cooled, QImaging, Surrey, Canada). Fluorescent images were generated at 5 s intervals, using 2 averaged images at each wavelength, and digitally stored for later analysis with MetaFluor software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA).

Depending on the protocol to be followed, in some experiments a solution of free Ca^{2+} ($S0Ca^{2+}$; composition in mM: NaCl 140, KCl 5, MgCl2 2, EGTA 10, HEPES 10, glucose 11, pH 7.4) was used and prior to experiments and a chelating agent of Ca^{2+}, the BAPTA-AM (10 µM) was added.

For incubation periods, drugs (or vehicle controls) were added in volumes of 1 to 10 µL to a final incubation volume of 1 ml of bathing solution. In some experiments, the NO donor sodium nitroprusside (100 µM) or ionomycin (100 µM) was used as a positive control for the technique. All procedures and experiments were performed at room temperature to minimize compartmentalization and cell extrusion of the fluorescent dye.

In imaging experiments, for each isolated HUVEC, the fluorescence emitted was averaged from pixels within manually outlined cell areas. Background compensation was performed by subtracting the illumination from an area of the image which contained no cells. DAF-2 fluorescence and fura-2 values are expressed as arbitrary fluorescence units and the basal value before the addition of either drugs or vehicle was normalized to zero for each individual cell.

8. Immunoblot analysis

Inmunoblot analysis were used to determine Epac-1, Epac-2, VE-cadherin, PKA-RIIα, Arginase II, eNOS, phosphoylated eNOS in serine 1177 (p-eNOS), VASP and phosphorylated VASP, in HUVEC, HCAEC (in normoxic and hypoxic conditions) or rat thoracic aorta homogenates. For p-eNOS determination cells were incubated with appropriate treatment for 30 min or 1 h prior experiments.

HUVEC or HCAEC cells were washed in cold PBS and scraped using in RIPA lysis buffer buffer (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Triton-X-100 1 %, sodium deoxycholate 0.5% and SDS 0.1%; pH 8.0) supplemented with protease cocktail inhibitor (MiniComplete, Roche, Germany or Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EE.UU) and phosphatase cocktail inhibitor (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EE.UU) when appropriate.

In a second set of experiments, rat thoracic aortas to investigate Epac-1 and Epac-2 protein expression were washed in ice-cold PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized in RIPA lysis buffer supplemented with protease inhibitor cocktail.

For VASP phosphorylation studies, the aortas were incubated in KBS with vehicle (control) or the appropriate drug for 10 min at 37 °C. Then, the aortas were washed in ice-cold PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized in Tris-Triton lysis buffer (composition in mM: 100 NaCl, 10 Tris–HCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS; pH 7.4) supplemented with proteinase and phosphatase inhibitor cocktail.

Next, all samples of tissue lysates were sonicated and centifugued at 14.000 g for 20 min/4 °C. Protein concentrations were determined using bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or *DC* protein assay, (BioRad CA, USA), according to manufacter's protocol.

Samples containing 30 µg of protein were loaded on a SDS-Page gel (8-12%) for electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane according to standard protocols. Membranes were incubated overnight with specific primary antibody (see Table S.1) and infrared IRDye®-labelled secondary antibodies (Li-COR Biosciences, NE, USA) or horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were used for detection. Bands were visualized using the Odissey®

Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences, NE, USA) or by enhanced chemiluminescence using the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Densitometry was performed using Image J version 1.45s (National Institues of Health, MD, USA). Bands were normalized to β-actin or GADPH.

Target	Source	Dilution	Secondary antibody
β-Actin	Sigma-Aldrich	1:2000	mouse
GADPH	Santa Cruz Biotechnology,	1:1000	mouse
eNOS	BD Transduction Laboratories	1:500	mouse/rabbit
p-eNOS	Cell Signalling/BD Transduction	1:500	mouse/rabbit
Epac 1	Cell Signaling	1:500	mouse/rabbit
Epac-2	Cell Signaling	1:500	mouse/rabbit
VE-Cadherin	Cell Signalling	1:500	rabbit
VASP	Cell Signalling	1:500	rabbit

Table S.1. List of primary antibodies used for inmunoblot analysis.

9. Immunofluorescence microscopy

HCAEC were cultivated in 8-well Lab-Tek® chamber slides (Nunc, IL, USA) until 80% confluence was reached. Next, cells were incubated under normoxic or hypoxic conditions for 24 h. Subsequently, samples were fixed in 2% PFA in PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 20 min and permeabilized with 0,3% Triton-X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min. Samples were washed with 0.05% Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS, blocked in 2% BSA for 10 min and incubated with rabbit polyclonal primary antibodies to human Epac-1, eNOS, VE-cadherin, PKA-RIIα and Arginase II (see antibodies list in table 6) diluted in 2%BSA/PBS respectively,

overnight at 4 °C. Samples were washed and incubated with Alexa Fluor® 594 or Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Molecular Probes/Invitrogen, OR, USA) diluted 1:5000 DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS with a 10% natural human serum, 1h at room temperature. Stained samples were mounted in Citifluor AF1 (Agar Scientific, UK). To Epac-1 and eNOS determination cells were examined under a Leica TCS SP8 (Leica Mycrosystems, Germany) laser scanning fluorescence confocal microscope using a 63x/1.40 oil immersion objective. To PKA-RIIα and Arginase II determination cells were examined under a Leica DMRXA (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) fluorescence microscope using a 40x oil immersion objective.

In a second set of experiments retinas from OIR and control mice were cut in sections (4 µm), fixed with acetone for 20 min and rehydrated with PBS. Next, samples were blocked in 2% BSA (Roche, Manheim, Germany) in PBS for 15 min and incubated with primary rabbit polyclonal antibodies to mouse (RαM) Epac-1 (Abcam, Cambridge, UK), diluted 1:100 in 2% BSA/PBS, overnight at 4 °C. Samples were washed in 0,05% Tween-20 in PBS and incubated with Alexa Fluor® 594 - conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Molecular Probes/Invitrogen, OR, USA) diluted 1:500 in 2%BSA/PBS, for 1h at room temperature. Stained samples were mounted in Citifluor AF1 (Agar Scientific, UK) and visualized using a Zeiss AxioObserver Z1 fluorescence microscope using an imaging software TissueFAXs (Tissuegnostics Gmbh, Vienna, Austria).

Image J software (Version 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD) was used for quantification of corrected total cell fluorescence (CTCF). The corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated as integrated density − (area of selected cell × mean fluorescence of background reading). The results were expressed as % of fluorescence intensy or % of reduction of fluorescence intensity with respect to control values (100% fluorescence intensity).

10. Nitrite determination

HCAEC were grown in a gelatin-coated 24-well plates until near confluence was reached. Next, cells were serum-starved for 2 hours prior appropriate treatment Sodium nitroprussiate (100 µM) was used as positive control of the technique. Then, cells were incubated at 37 °C for 24 h under normoxic (95% O_2) or hypoxic (2% O_2) conditions. Afterwards, nitrite levels (a stabile marker of NO production) were quantified using the Measure-iT ™ High-Sensitivity Nitrite Assay Kit (Molecular Probes, OR, USA) according to manufacturer's protocol. The fluorescence in the supernatants was measured with excitation and emission wavelengths of 365 and 450 nm respectively. To determine the unknown nitrite concentration of the samples, standard curves were constructed with different amount of a nitrite standard product provided in the commercial kit. Results were corrected per mg of protein using the BCA protein assay, according to manufacter's protocol and were expressed as fold change *versus* indicated control values normalized to 1.

11. ROS determination

HCAEC were grown in a gelatin-coated 6-well plates until near confluence was reached. Next, cells were serum-starved for 2 hours prior appropriate treatment. Then, cells were incubated at 37 °C for 24 h under normoxic (95 %O_2) or hypoxic (2% O_2) conditions. As a positive control of the thecnique H_2O_2 (10 µM) was added 30 min before start the experiment.

Afterwards, cells were incubated for 10 min in dark with 50 µM 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) wich penetrates the cells, where it is hydrolysed by intracellular esterase activity and turns to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) upon oxidation by ROS. Cells were dissociated using Accutase™ solution (PAA Laboratories, Austria), pelleted by centrifugation and resuspended in PBS. The generation of intracellular ROS were determined by flow cytometry on the FACS Calibur, and WinList version 6.0 software was used for analysis (both BD Biosciences, CA, USA). DCFH fluorescence was monitorized with excitation

and emission wavelengths of 488 and 530 nm respectively. Data were expressed as fold change *versus* indicated control values normalized to 1.

12. Permeability assay

The *in vitro* vascular permeability assay was performed in a 24-well receiver plate (Nunc™ Carrier Plate System, Thermo Scientific, MA, USA) with 24 permeable cell culture inserts (Nunc™ Polycarbonate membrane cell culture inserts Thermo Scientific, MA, USA).

HCAEC were grown in the cell culture inserts for 72 h or until the endothelial monolayer was formed. Next, cells were incubated with appropriate treatment Inserts without cells were used as positive control of the technique. Then, cells were incubated at 37 °C for 24 h under normoxic (95 %O_2) or hypoxic (2% O_2) conditions.

Afterwards, (FITC)-Dextran (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted 1:400 in endothelial cell medium was added on top of the cells for 30 min in dark with 500mg/mL, allowing it to permeate through the cell monolayer. The extent of permeability can be determined by measuring the fluorescence of the receiver plate well solution. The fluorescence was measured with excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm respectively. Data were expressed as fold change *versus* indicated control values normalized to 1.

13. Drugs

Acetylcholine chloride, N6,2'–O-dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (db-cAMP), dimethyl sulfoxide (DMSO), forskolin, ionomicin, L-arginine hydrochloride, Nω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), L-phenylephrine hydrochloride, LY-294,002, Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate triethylammonium salt hydrate (Rp-cAMPs), sodium nitroprusside, valproic acid and wortmanin were purchased from (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3- [5- (tert.-butyl)isoxazol-3- yl]- 2- [2- (3-chlorophenyl) hydrazono]-3-oxopropanenitrile (ESI-09), 8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (pCPT-cAMP), 8-(4-chlorophenylthio)-2'–O-methyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-pCPT-2'–O-MecAMP) and N6-benzoyladenosine- 3', 5'-cyclic monophosphate (6-BnzcAMP) were purchased from BIOLOG Life Science Institute (Bremen, Germany).

Fenoterol, was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Compound C and KN 93 were purchased from Merck Millipore (Germany).

2–S-amino-6- Boronohexanoic acid (ABH) and Nω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) were suministrated by Dr. Harm Maarsingh (Department of Molecular Pharmacology, University of Groningen, The Netherlands).

Araquidonic acid (AA), MG 149, sodium butyrate (Sb) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) were suministrated by Dr.Frank Dekker (Department of Pharmaceutical Gene Modulation University of Groningen, The Netherlands).

Other specific materials used in the different tests were purchased from suppliers indicated in the corresponding references provided in the Materials and methods section.

14. Data presentation and statistical analysis

Unless otherwise stated, results are expressed as mean ± SEM. Significant differences between two means ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) were determined by Student's two-tailed *t* test for paired or unpaired data or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Dunnett's *post-hoc* test, where appropriate.

Results

1. Effects of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on vascular contractility

To examine the effects of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on vascular contractility we have performed contraction–relaxation studies in isolated rat thoracic aorta rings in the presence or ausence of a functional endothelium.

1.1 Effects of endothelium removal on forskolin- and db-cAMP-induced relaxation in phenylephrine-precontracted aortic rings

Cumulative addition of forskolin (6–300 nM), an adenylyl cyclase activator, relaxed phenylephrine induced contractions with higher potency in aortic rings with a functional endothelium (Fig. 21), suggesting that there is an endothelium-dependent and an endothelium-independent component in the vasorelaxation induced by forskolin. Similarly, cumulative addition of dibutyryl cAMP (db-cAMP), a cell-permeant cAMP analogue, (1–200 µM) significantly relaxed phenylephrine-induced contractions with higher potency in aortic rings with a functional endothelium (Fig. 22).

Moreover, pCPT-cAMP (6nM-600 µM) a cAMP analogue, wich activates PKA, Epac and PKG and inhibits PDE V, significantly relaxed phenylephrine-induced contractions with higher potency in aortic rings with a functional endothelium (Fig. 23).

1.2 Effects of eNOS inhibition on the vasorelaxant action of forskolin and db-cAMP in phenylephrine-precontracted aortic rings

Application of the selective eNOS inhibitor L-NAME (100 µM) to phenylephrine pre-contracted endothelium-intact rings significantly increased contraction. However, L-NAME did not significantly modify the phenylephrine-induced contractions in endothelium denuded rings. After 30 min in the presence of L-NAME (100 µM), the IC50 for forskolin and for db-cAMP was significantly increased in intact (Fig. 30 and Fig. 32), but it was not affected in endothelium denuded rings (Fig. 29 and Fig. 31),

suggesting that NO synthesis participates in the endothelial component of the forskolin and db-cAMP induced vasorelaxation.

1.3 Effects of PKA inhibition on the vasorelaxant action of forskolin and effects of PKA stimulation in phenylephrine-precontracted aortic rings

Application of the selective PKA inhibitor Rp-cAMPs (100 µM) to phenylephrine pre-contracted endothelium-intact and endothelium-denuded rings significantly increased contraction. After 30 min in the presence of Rp-cAMPs (100 µM), the IC50 for forskolin was significantly increased in intact rings (Fig. 25), but it was not affected in endothelium-denuded rings (Fig. 24) .

The cumulative administration of 6-Bnz-cAMP (10–160 µM), a selective PKA activator, significantly relaxed phenylephrine-induced contractions, an effect that was not modified by endothelium removal (Fig. 26). The activation of PKA by 6-Bnz-cAMP was confirmed by its ability to induce the phosphorylation of the protein VASP, a selective substrate for PKA, in rat aortic homogenates (data not shown).

1.4 Effects of Epac inhibition on the vasorelaxant action of forskolin and effects of Epac stimulation in phenylephrine-precontracted aortic rings

Our Western blot experiments demonstrate the expression of Epac-1 isoform (~100 kDa) in rat aortic homogenates while no band for Epac-2 isoform was detected at the predicted molecular weight (~115 kDa) (Fig. 27).

Application of ESI-09 (1 µM), a new inhibitor of Epac, did not significantly modify the phenylephrine-induced contractions in endothelium-intact and endothelium-denuded rings. After 30 min in the presence of ESI-09 (1 µM), the IC50 for forskolin was not affected in intact and in endothelium-denuded rings.

Application of higher concentration of ESI-09 (10 µM) significantly relaxed phenylephrine-induced contractions in endothelium-intact and endothelium-denuded rings.

Application of the selective activator of Epac, 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP (100 µM) relaxed phenylephrine-induced contractions with a higher potency in rings with a functional endothelium. This vasorelaxant effect was not increased by the addition of higher concentrations of 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP. Lower concentrations of 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP (10, 50 µM) did not cause a significant relaxant effect (Fig. 28). The absence of PKA activation by 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP was confirmed by the lack of phosphorylation of VASP in rat aortic homogenates treated with this agent (data not shown).

1.5 Effects of PI3K inhibition on the vasorelaxant action of forskolin and effects of PI3K stimulation in phenylephrine-precontracted aortic rings

Application of wortmanin (100 nM), an inhibitor of PI3K, did not significantly modify the phenylephrine-induced contractions in endothelium-intact and endothelium-denuded rings. After 30 min in the presence of wortmanin (100 nM) the IC50 for forskolin was not modified in endothelium-intact and denuded rings. The addition of higher concentrations (200-500 nM) of wortmanin realaxed phenylephrine-induced contractions (data not shown). Wortmannin also inhibits MLCK, (Nakanishi *et al*., 1992, Takayama *et al*., 1996) these results could indicate a loss of selectivity for PI3K.

Next, we used another inhibitor of PI3K, LY-294,002. Application of LY-294,002 (10 µM), did not significantly modify the phenylephrine-induced contractions in endothelium-intact and endothelium-denuded rings.

After 30 min in the presence of LY-294,002 (10 µM) the IC50 for forskolin was significantly increased in intact rings (Fig. 34), but it was not affected in endothelium-denuded rings (Fig. 33) .

2. Protein expression in endothelial cells

By RT-PCR we proceeded to the determination of coding RNA for proteins PKA-RIIα, Epac-1, Epac-2, Rap1 and eNOS in HUVEC cells. Our results in HUVEC cells show an

amplification of gene fragments for PKA-RIIα, Epac-1, Rap1 and eNOS. However, no cDNA band for Epac-2 was observed in this cell type (Fig. 35).

3. Effect of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on NO homeostasis in endothelial cells

We have examine the effects of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on NO in isolated HUVEC using an imaging system with the NO-sensitive fluorescent probe DAF-2.

The administration of forskolin (10 µM), db-cAMP (100 µM) and pCPT-cAMP (100 µM) triggered a significant increase in fluorescence emission from DAF-2-loaded isolated HUVEC. This increment in DAF-2 fluorescence was also observed by the administration of the selective activators of PKA, 6-Bnz-cAMP (300 µM), and Epac, 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP (100 µM) (Fig. 37). A 10 min preincubation of HUVEC with L-NAME (100 µM), Rp-cAMPs (10 µM) or ESI-09 (25 µM) significantly reduced the 10 µM forskolin-induced increase in DAF-2 fluorescence (Fig. 38 and Fig. 39).

4 Effect of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on the activation of eNOS in endothelial cells

In order to study the implication of cAMP signalling in the regulation of eNOS activity, phosphorylation of eNOS at serine 1177 (p-eNOS), which has been show to increase NO synthesis, was determined using immunoblot analysis. The relative amount of p-eNOS was significantly increased after treatment with forskolin (1µM), pCPT-cAMP (100 µM) and 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP (100 µM). However the treatment with db-cAMP (100 µM) did not exert a significant effect (Fig. 43).

5. Effect of inhibition of various kinases involved in the activation of eNOS in the forskolin-induced release of intracellular NO

Based in evidences reported by various authors that implicate different kinases in the activation of eNOS by phosphorylation at serine 1177, we assessed their participation on the forskolin-induced release of intracellular NO by employing selective inhibitors.

A 10 min preincubation of HUVEC with wortmanin (500 nM) significantly reduced the 10 µM forskolin-induced increase in DAF-2 fluorescence. The preincubation with KN 93 (1µM), an inhibitor of CaMKII or Coumpound C (1µM), an inhibitor of AMPK did not modified the 10 µM forskolin-induced increase in DAF-2 fluorescence (Fig. 44).

6 Effect of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on the basal $[Ca^{2+}]_c$ in endothelial cell.

We have examine the effects of drugs that increase cAMP or modify its signaling pathways on $[Ca^{2+}]_c$ in isolated HUVEC using an imaging system with the Ca^{2+}-sensitive fluorescent probe fura-2.

The administration of forskolin (10 µM), db-cAMP (100 µM) and pCPT-cAMP (100 µM) triggered a significant increase in fluorescence emission from fura-2-loaded isolated HUVEC in a ~30% of cells. However, the administration of 6-Bnz-cAMP (300 µM) and 8-pCPT-2'–O-Me-cAMP (100 µM) did not induced an increase in fura-2 fluorescence (Fig. 42).

7. Effect of forskolin on intracellular levels of NO in free Ca^{2+} medium

In order to investigate if the increment of the $[Ca^{2+}]_c$ contributes in the forskolin-induced NO release, we have determined the effect of forskolin in the release of NO (using the fluorescent probe DAF-2) in HUVEC cells in the absence of extracellular Ca^{2+} and with restriction of free intracellular Ca^{2+}. The 10 µM forskolin-induced increase in DAF-2 fluorescence was unchanged when a solution free Ca^{2+} containing the chelating agent of Ca^{2+}, BAPTA-AM (10 µM) was added (Fig. 40).

8. Effect of chronic hypoxia in NO and ROS production in endothelial cells

HCAEC cells were exposed to a 2% oxygen tension for 24 h (chronic hypoxia). Next, to examine the effect of 24h exposition to hypoxia on NO production, nitritite levels in the supernatants were determined using a commercial kit. In paralallell experiments we determined intracellular ROS production by flow cytometry analysis using the fluorescent probe DCFH. Compared with cells cultured in normoxia, hypoxia-exposed HCAEC showed a significantly decrease in NO byosinthesis (Fig.45).and basal ROS levels were significantly augmented (Fig.46).

In order to determine the reason of decreased generation of NO caused by hypoxia, immunoblotting and immunofluorescent stainings were used to examine eNOS protein expression in HCAEC. After 24 h exposition of HCAEC to hypoxia, eNOS protein levels were significantly reduced compared to cells cultured in normoxic conditions (Fig. 48 and Fig. 49).

9. Role of arginase on NO/ROS imbalance induced by chronic hypoxia in endothelial cells

Various studies have demonstrated that eNOS activity is strongly influenced by the enzyme arginase, since both enzymes employ the substrate L-arginine. First, using standard western blotting techniques and immunofluorescence microscopy, we have found that hypoxia induces increased expression of arginase II (Fig. 54 and Fig. 55), majority isoform in endothelial cells (Prieto *et al.*, 2011). To determine wheter hypoxia-induced NO/ROS imbalance could be due to an increase in arginase expression, we have incubated HCAEC cells with two different arginase inhibitors ABH (10 µM) and nor-NOHA (100 µM) for 24 h. The treatment with ABH in HCAEC-hypoxia exposed restored NO levels to normoxic values, although this effect was not significant. The treatment with ABH did not modify NO and ROS levels under normoxic conditions. Meanwhile the nor-NOHA did not modify NO and ROS levels under normoxic and hypoxic conditions (Fig. 65 and Fig. 66).

10. Effect of HATs and HDCAs inhibition on NO/ROS imbalance induced by chronic hypoxia in endothelial cells

The chromatin structure of eNOS, and therefore its transcription, is regulated by the activity of histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) enzymes.

In this set of experiments we investigated the possible involvement of these enzymes on NO/ROS imbalance induced by hypoxia. The treatment with the HAT inhibitors: AA (10 μM) or MG149 (10 μM) did not modify NO and ROS levels under normoxic and hypoxic conditions (Figs 67, 68, 69 and 70).

However, the incubation with specific inhibitors of HDACs caused remarkable effects: Valproic acid (VPA, 200 μM) has induced a significant reduction of ROS levels and a significant increase of NO levels in both conditions (normoxia and hypoxia); meanwhile, the treatment with SAHA (10 μM) resulted in a significant reduction of ROS levels and in an increment of NO levels in normoxic conditions, whereas under hypoxia showed a clear trend towards a descent of ROS levels and an incrementent of NO levels, although these effects were not significant. Finally, Sb (10 μM) only caused a significant increase in the levels of NO in hypoxia (Figs 67, 68, 69 and 70).

11. Effect of chronic hypoxia in Epac and PKA expression in endothelial cells

Since it is widely reported that cAMP, by its effector proteins PKA and Epac, is involved in the regulation of various endothelial functions, we have considered of interest determine the effect of hypoxia on the expression of these proteins. Using immunofluorescence microscopy, western blotting techniques or RT-PCR analysis we have found that hypoxia induce a decrease in Epac-1 (Fig. 50 and Fig. 51). and PKA-RIIα (Fig. 51 and Fig. 52). Epac-2 was not detected by western blot analysis, so we have not performed expression studies.

12. Hypoxia reduces Epac-1 levels in the OIR mice retina

In this set of experiments we have studied the expression levels of Epac-1 in the isolated retina from a mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR). First, by immunostaining techniques, we have observed a decrease in the levels of expression of Epac-1 in OIR mice on postnatal (P) days 12 (6 h hypoxia) and 13 (24 h hypoxia) compared to control mice (Fig. 58). Corraborately, using RT-PCR experiments, we found that mRNA levels of Epac-1 at P12 and P13 were significantly decreased in OIR mice compared to control (Fig. 59).

13. cAMP signalling counteract NO/ROS imbalance induced by chronic hypoxia through eNOS phosphorylation in endothelial cells

Next, based on data suggesting a role for cAMP signalling in NO biosynthesis, we have performed wester blot analysis to determine eNOS activation by phosphorylation in serine 1177 (p-eNOS) in HCAEC exposed to hypoxia treated with fenoterol (1µM), forskolin (10 µM), 6-Bnz-cAMP (100 µM) and 8-pCPT-2'OMe-cAMP (100 µM) for 24 h.

The treatment with forskolin, 6-Bnz-cAMP and 8-pCPT-2'OMe-cAMP significantly increased the relative amount of p-eNOS. However, treatment with fenoterol did not show a significant effect on eNOS activation (Fig. 62).

We next examined the effect of these drugs in nitrite production. In accordance with the previous results, in HCAEC hypoxia-exposed, treatment with fenoterol and forskolin restored NO levels to normoxic values. Moreover, 6-Bnz-cAMP and 8-pCPT-2'OMe-cAMP significantly increased NO production under hypoxic conditions (Fig. 60).

In line with these data, forskolin, 6-Bnz-cAMP and 8-pCPT-2'OMe-cAMP significantly disminished hypoxia-induced ROS overproduction (Fig. 61). However, treatment with fenoterol did not show a significant effect on ROS levels. None of these treatments modify NO and ROS levels under normoxic conditions (Fig. 60 and Fig. 61).

14. Effect of chronic hypoxia in endothelial barrier function

In oder to determine the effect of chronic hypoxia on endothelial barrier function we have performed *in vitro* permeability assays. HCAEC-hypoxia exposed showed a significant increase in endothelial permeability compared with normoxic cells (Fig. 57). Furthermore, VE-cadherin expression determined by inmunobloting and inmunofluorescent assays was significantly decreased under hypoxic conditions compared with normoxia (Fig. 56).

15. cAMP signalling counteract chronic hypoxia-induced hyperpermeabilty in endothelial cells

The role of cAMP in endothelial barrier function has been suggested previously by several authours. In this work we have examined the effect of fenoterol (1µM), forskolin (10 µM), 6-Bnz-cAMP (100 µM) and 8-pCPT-2'OMe-cAMP (300 µM) in the hyperpermeability induce by chronic hypoxia in HCAEC.

The treatment with forskolin, 6-Bnz-cAMP and 8-pCPT-2'OMe-cAMP significantly reduced the increased permeability induced by hypoxia (Fig. 64). Conversely, fenoterol did not exert a significant effect. None of these treatments modify the vascular permeability of the endothelial monolayer (Fig. 63).

Conclusions

1. The relaxation of rat aortic rings induced by agents that increase cAMP are mediated by both an endothelium-dependent and an endothelium-independent effect.

2. The agents that increase cAMP in endothelial cells cause activation of eNOS through the activation of PKA and Epac proteins, thereby increasing NO release, which contributes to the endothelium-dependent relaxation induced by this cyclic nucleotide.

3. The PI3K/Akt pathway participates in the endothelium-dependent vasorelaxation induced by forskolin by enhancement of endothelial NO release.

4. The AMPK and CaMKII kinases and are not involved in endothelial NO release induced by forskolin.

5. Agents that increase cAMP cause a rise in basal $[Ca^{2+}]_c$. in a low percentage of endothelial cells, an effect that is not mediated by the independent activation of PKA or Epac. The NO release induced by forskolin in endothelial cells is independent of an increase in $[Ca^{2+}]_c$.

6. Activation of PKA or EPAC participates in the endothelial-independent, direct vasorelaxation induced by cAMP-increasing agents.

7. Chronic hypoxia (24 h, 2% O_2) results in a decrease in the release of NO in endothelial cells, accompanied by decreased eNOS expression and increased ROS generation.

8. Chronic hypoxia causes increased expression of the enzyme arginase II in endothelial cells. According to the results obtained with the inhibitor ABH, arginase activation is involved in the reduction of NO generation due to hypoxia. Arginase inhibition did not alter the increased ROS induced by hypoxia, which rules out a dysfunctional state of eNOS by reduced availability of L-arginine as a cause of the increase.

9. The HADCs enzymes are involved in the regulation of eNOS by increasing NO and decreasing EROs levels, regardless of the conditions of oxygenation of the endothelial cells. In our experimental conditions, the HATs enzymes are not involved in regulating the NO and ROS levels in endothelial cells under normoxic or hipoxic conditions.

10. Chronic hypoxia causes a decrease in the expression of the cAMP protein effectors, PKA and Epac, on endothelial cells. In the isolated retina from OIR mice model there is a decrease in the expression levels of Epac-1 during the hypoxic stage (6 h and 24 h of exposure to hypoxia).

11. In endothelial cells exposed to hypoxic conditions, the increase of $[cAMP]_i$ induced by forskolin, and the direct activation of PKA or Epac, activate eNOS, resulting in increased NO release, which neutralizes the abnormal increase of ROS during hypoxia.

12. Chronic hypoxia alters the endothelial barrier function by increasing the permeability of the endothelial monolayer and decreasing the expression of VE-cadherin. The cAMP rise counteracts hypoxia-induced hyperpermeability through its effectors PKA and Epac.

Vascular Pharmacology 60 (2014) 95–101

Contents lists available at ScienceDirect

Vascular Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vph

PKA and Epac activation mediates cAMP-induced vasorelaxation by increasing endothelial NO production

Verónica García-Morales, Andrea Cuíñas, Jacobo Elíes [1], Manuel Campos-Toimil *

Farmacología Cardiovascular y Plaquetaria, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 May 2013
Received in revised form 13 January 2014
Accepted 17 January 2014

Keywords:
Cyclic AMP
Protein kinase A
Epac proteins
Endothelium
eNOS

ABSTRACT

Vascular relaxation induced by 3′,5′-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is both endothelium-dependent and endothelium-independent, although the underlying signaling pathways are not fully understood. Aiming to uncover potential mechanisms, we performed contraction–relaxation experiments on endothelium-denuded and intact rat aorta rings and measured NO levels in isolated human endothelial cells using single cell fluorescence imaging. The vasorelaxant effect of forskolin, an adenylyl cyclase activator, was decreased after selective inhibitor of protein kinase A (PKA), a cAMP-activated kinase, or L-NAME, an endothelial nitric oxide synthase (eNOS) inhibitor, only in intact aortic rings. Both selective activation of PKA with 6-Bnz-cAMP and exchange protein directly activated by cAMP (Epac) with 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP significantly relaxed phenylephrine-induced contractions. The vasorelaxant effect of the Epac activator, but not that of the PKA activator, was reduced by endothelium removal. Forskolin, dibutyryl cAMP (a cAMP analogue), 6-Bnz-cAMP and 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP increased NO levels in endothelial cells and the forskolin effect was significantly inhibited by inactivation of both Epac and PKA, and eNOS inhibition. Our results indicate that the endothelium-dependent component of forskolin/cAMP-induced vasorelaxation is partially mediated by an increase in endothelial NO release due to an enhanced eNOS activity through PKA and Epac activation in endothelial cells.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

3′,5′-Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is an ubiquitous second messenger that plays an important role in the regulation of vascular tone. Several mechanisms have been proposed to explain its direct, endothelium-independent vasorelaxant effects, including a decrease of cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_c$) via different pathways, a reduction of the sensitivity of contractile filaments to $[Ca^{2+}]_c$, or an activation of certain K^+ channel subtypes (for detailed review see, e.g., [1,3,26]). Although for many years it was thought that vascular smooth muscle relaxation induced by cAMP occurred independently from a functional endothelial layer, it is now generally accepted that the endothelium also participates in this process, although the underlying mechanisms are not yet fully understood [14,31,38,45].

It is now established that several of the effects induced by cAMP-elevating agents that were considered to be mediated by the activation of cyclic-AMP protein kinase (PKA) are attributable to the activation of the alternative cAMP target Epac (exchange protein directly activated by cAMP) in different cell types [17,36,39]. Despite the plethora of studies on this subject, the specific roles of PKA and Epac have not been extensively investigated in vascular smooth muscle relaxation [25,39].

In light of these reports and with the aim of further investigating the contribution of the endothelium to the vasorelaxant effects of cAMP, we examined the vasorelaxant effects of forskolin, an adenylyl cyclase activator, on isolated rat aortic rings in the presence and in the absence of a functional endothelium. Previous reports indicate that forskolin significantly elevates $[cAMP]_i$ both in rat aortic myocytes [4,8] and in human endothelial cells [5]. Here, we have investigated a potential role of PKA and Epac in the vasorelaxant effects of forskolin by using selective activators and inhibitors of both proteins. We also studied the role of NO synthesis in cAMP-induced vasorelaxation by inhibiting endothelial NO synthase (eNOS) with the selective inhibitor N_ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; [33]) in rat aortic rings and by performing

Abbreviations: $[Ca^{2+}]_c$, cytoplasmic Ca^{2+} concentration; cAMP, 3′,5′-cyclic adenosine monophosphate; DAF-2, 4,5-diaminofluorescein; DAF-2-DA, 4,5-diaminofluorescein diacetate; db-cAMP, dibutyryl cyclic AMP; DMSO, dimethyl sulfoxide; eNOS, endothelial NO synthase; Epac, exchange protein directly activated by cAMP; FBS, fetal bovine serum; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; KBS, Krebs bicarbonate solution; L-NAME, N_ω-nitro-L-arginine methyl ester; PKA, cyclic-AMP protein kinase.

* Corresponding author at: Departamento de Farmacoloxía, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 881815006; fax: +34 981594595.
E-mail address: manuel.campos@usc.es (M. Campos-Toimil).
[1] Current address: Division of Cardiovascular and Diabetes Research, Faculty of Medicine, University of Leeds, Leeds, UK.

1537-1891/$ – see front matter © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2014.01.004

imaging experiments in isolated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) using 4,5-diaminofluorescein (DAF-2).

2. Materials and methods

2.1. Animals and ethical approval

Male Wistar–Kyoto (WKY) rats (Iffa-Credo) weighing 200–350 g were used throughout this study. They were housed, cared for and acclimatized (before the experiments) as previously indicated [29]. For experiments, rats were killed by CO_2 inhalation and exsanguinated. All experimental protocols were approved by the bioethics committee of the University of Santiago de Compostela (Spain) and the bioethics committee for research (CEIC) of the Xunta de Galicia (Spain).

2.2. Contraction–relaxation studies in isolated rat thoracic aorta rings

For contraction–relaxation experiments, ~4 mm long rat thoracic aortic rings were transferred into an organ bath containing Krebs bicarbonate solution (KBS) at 37 °C (composition in mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.5 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2 KH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, 0.03 EDTA-Na_2, 11 glucose; pH 7.4), oxygenated with carbogen (95% O_2 + 5% CO_2), following the protocol previously described [8]. In some rings, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with a cotton bud moistened with KBS.

Aortic rings were then equilibrated at a resting tension of 2 g for at least 1 h, during which KBS was replaced every 15 min. Thereafter, a contraction was induced by the addition of phenylephrine (1 μM). Once the contraction stabilized, a single concentration of acetylcholine (1 μM) was added to the bath in order to assess the endothelial integrity of the preparations. The endothelium was considered to be intact when this drug elicited a vasorelaxation >50% of the maximal contraction obtained. In rubbed rings, the absence of endothelium was confirmed by the absence of acetylcholine relaxant actions.

After assessing the presence or absence of functional endothelium, vascular tissues were allowed to recuperate for at least 1 h during which KBS was replaced every 15 min, before any experiment protocol was started.

2.3. Western blot

To investigate Epac-1 and Epac-2 protein expression, rat thoracic aortas were washed in ice-cold Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS), snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized in RIPA lysis buffer (composition in mM: 150 NaCl, 50 Tris–HCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS; pH 8.0) supplemented with proteinase inhibitor cocktail. For VASP phosphorylation studies, the aortas were incubated in KBS with vehicle (control) or the appropriate drug for 10 min at 37 °C. Then, the aortas were washed in ice-cold PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized in Tris-Triton lysis buffer (composition in mM: 100 NaCl, 10 Tris–HCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS; pH 7.4) supplemented with proteinase and phosphatase inhibitor cocktail.

Tissue lysates were sonicated and centrifuged at 14,000 *g* for 20 min at 4 °C. Protein concentrations were determined using bicinchoninic acid (BCA) protein assay, according to the manufacturer's protocol.

Western blot experiments were performed as previously described [12]. Samples containing 30 μg of total protein were loaded on an SDS-PAGE gel (8%) for electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane according to standard protocols. Subsequently, membranes were blocked for 30 min at room temperature in blocking buffer (3% bovine serum albumin, 0.2% Tween 20 in Tris-buffered solution) and incubated overnight at 4 °C with specific primary antibodies: mouse anti-Epac-1 (1:500), mouse anti-Epac-2 (1:500), mouse anti-GAPDH (1:1000), and rabbit-anti-VASP (1:500, which recognizes both phosphorylated VASP and non-phosphorylated VASP), diluted in blocking buffer, overnight at 4 °C. Membranes were washed and then incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000) for 1 h at room temperature. Bands were detected by enhanced chemiluminescence using the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). GAPDH was used as a protein loading control.

2.4. NO imaging in isolated HUVEC

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC-C, a spontaneously transformed cell line) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC 1730-CRL; Rockville, MD, USA). This cell line is a pure population of cells that preserve established endothelial cell characteristics [16].

Cell culture and NO imaging experiments were performed as previously described in detail [11]. Briefly, the cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with endothelial cell growth supplement (0.03 mg/ml), heparin (0.1 mg/ml), antibiotics/antimycotic (100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 0.25 μg/ml amphotericin B) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Cells were maintained at 37 °C with 5% CO_2 in air and used for experimentation between passages 2 and 15. The passage number did not alter cell response. For imaging experiments, HUVEC were seeded at ~1500 cells/cm^2 in 35 mm glass-bottom Petri dishes (World Precision Instruments Ltd., London, UK) and kept in culture for 48 h before the experiments. Cells were then incubated for 60 min at 37 °C in normal bathing solution (composition in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1.5 $CaCl_2.2H_2O$, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 11 glucose; pH 7.4) containing L-arginine (100 μM) and DAF-2 diacetate (DAF-2-DA, 5 μM), which penetrates cells, where it is hydrolysed by intracellular esterase activity to DAF-2, a NO-sensitive fluorescent dye [23]. Cells were then gently washed twice with normal bathing solution and allowed to rest for >15 min in the incubator. Cells loaded with DAF-2-DA were placed on an inverted light microscope and excited at 490 ± 10 nm (200 ms exposure time). Emitted fluorescence was collected through a 510 ± 20 nm emission filter and measured with an intensified CCD camera (Rolera XR Monofast 1394 cooled, QImaging, Surrey, Canada). Fluorescent images were generated at 5 s intervals, using 2 averaged images at each wavelength, and digitally stored for later analysis with MetaFluor software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA).

For incubation periods, drugs (or vehicle controls) were added in volumes of 1 to 10 μl to a final incubation volume of 1 ml of bathing solution. In some experiments, the NO donor sodium nitroprusside was used as a positive control for the technique. All procedures and experiments were performed at room temperature to minimize compartmentalization and cell extrusion of the fluorescent dye.

2.5. Data presentation and statistical analysis

Unless otherwise stated, results shown in the text and figures are expressed as mean ± S.E.M. Significant differences between two means ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) were determined by Student's two-tailed *t* test for paired or unpaired data or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post-hoc* test, where appropriate.

In the experiments carried out in pre-contracted rat aortic rings, relaxant responses are expressed as a percentage of the maximal contraction (E_{max} = 100%) produced by the phenylephrine. In cumulative experiments, sigmoidal concentration–response curves for the vasorelaxant effects of the drugs were fitted using the program Origin™ 7.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, USA), with an estimation of IC_{50} values (i.e. concentrations inducing 50% relaxation) for phenylephrine-induced contractions.

In imaging experiments, for each isolated HUVEC, the fluorescence emitted was averaged from pixels within manually outlined cell areas. Background compensation was performed by subtracting the

illumination from an area of the image which contained no cells. DAF-2 fluorescence values are expressed as arbitrary fluorescence units and the basal value before the addition of either drugs or vehicle was normalized to zero for each individual cell.

2.6. Drugs, chemicals and media

Acetylcholine chloride, antibiotics/antimycotic (penicillin G, streptomycin), BCA protein assay, N^6,2′–O-dibutyryladenosine 3′,5′-cyclic monophosphate sodium salt (db-cAMP), dimethyl sulfoxide (DMSO), forskolin, heparin, L-arginine hydrochloride, N_ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), L-phenylephrine hydrochloride, Rp-adenosine 3′,5′-cyclic monophosphorothioate triethylammonium salt hydrate (Rp-cAMPs), phosphatase inhibitor cocktail-3 and sodium nitroprusside were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Complete mini protease inhibitor tablet (proteinase inhibitor cocktail) was purchased from Roche (Manheim, Germany). DMEM/F12 medium, Dulbecco's PBS and FBS were purchased from Gibco-Life Technologies. 4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2-DA) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Endothelial cell growth supplement was from Millipore Corporation, (Billerica, MA, USA). 3- [5- (tert.-butyl)isoxazol-3- yl]- 2- [2- (3-chlorophenyl) hydrazono]-3-oxopropanenitrile (ESI-09), 8-(4-chlorophenylthio)-2′–O-methyladenosine 3′,5′-cyclic monophosphate (8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP) and N6-benzoyladenosine- 3′, 5′-cyclic monophosphate (6-Bnz-cAMP) were from BIOLOG Life Science Institute (Bremen, Germany). All other chemicals were of analytical grade.

The following antibodies were used: mouse anti-Epac-1, mouse anti-Epac-2 and rabbit-anti-VASP from Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, MA, USA); mouse anti-GAPDH from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Sta. Cruz, CA, USA); horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibody from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Other specific materials used in the different tests were purchased from suppliers indicated in the corresponding references provided in the Materials and methods section.

Stock solutions of the following compounds were prepared and stored at −20 °C as follows: acetylcholine chloride (10 mM), db-cAMP (100 mM), ESI-09 (10 mM), L-arginine hydrochloride (100 mM), L-NAME (10 mM), 6-Bnz-cAMP (100 mM), 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP (100 mM), phenylephrine hydrochloride (10 mM), sodium nitroprusside (100 mM) in distilled water; forskolin (10 mM) and Rp-cAMPs (10 mM) in DMSO. From these stock solutions, appropriate dilutions in physiological buffer were freshly prepared for each experiment. DAF-2-DA was diluted daily in physiological buffer from a commercial solution (1.12 mM) in 100% DMSO. The final concentration of DMSO never exceeded 0.1%. Control groups received treatment with the vehicle alone.

For imaging experiments, appropriate precautionary measures were taken throughout the procedure to avoid degradation and extensive photobleaching due to the photosensitivity of the DAF-2-DA molecule.

3. Results

3.1. Effects of endothelium removal on forskolin- and db-cAMP-induced relaxation in phenylephrine-precontracted aortic rings

A single addition of phenylephrine (1 μM) induced a sustained contraction of rat aortic rings. The maximal tension (g) reached was 1.54 ± 0.07 (n = 61) and 1.99 ± 0.11 (n = 61) for rings with or without endothelium, respectively ($P < 0.01$). This contractile effect was maintained without significant tension changes in control rings for at least 90 min.

Cumulative addition of forskolin (6–300 nM) relaxed phenylephrine-induced contractions with higher potency in aortic rings with a functional endothelium (IC_{50} = 51.17 ± 3.43 nM, n = 6 and IC_{50} = 128.43 ± 11.11 nM, n = 7, for rings with or without endothelium, respectively; $P < 0.01$) (Fig. 1a), suggesting that there is an endothelium-dependent and an endothelium-independent component in the vasorelaxation induced by forskolin. Similarly, cumulative addition of dibutyryl cAMP (db-cAMP), a cell-permeant cAMP analogue, (1–200 μM) significantly relaxed phenylephrine-induced contractions with higher potency in aortic rings with a functional endothelium (IC_{50} = 42.92 ± 4.21 μM, n = 4 and IC_{50} = 106.52 ± 12.33 μM, n = 6, for rings with or without endothelium, respectively; $P < 0.01$) (Fig. 1b).

3.2. Effects of PKA inhibition on the vasorelaxant action of forskolin and effects of PKA stimulation in phenylephrine-precontracted aortic rings

After 30 min in the presence of Rp-cAMPs (100 μM), the IC_{50} for forskolin was significantly increased in intact rings (Fig. 2), but it was not affected in endothelium-denuded rings (IC_{50} = 157.41 ± 11.81 nM, n = 5 and IC_{50} = 96.44 ± 19.38 nM, n = 6, for rings with or without endothelium, respectively; $P < 0.01$ and $P > 0.05$ with respect to the values obtained in the absence of Rp-cAMPs).

The cumulative administration of 6-Bnz-cAMP (10–160 μM), a selective PKA activator, significantly relaxed phenylephrine-induced contractions, an effect that was not modified by endothelium removal (IC_{50} = 93.63 ± 2.66 μM, n = 4 and 89.34 ± 1.99 μM, n = 4, for rings with or without endothelium, respectively, $P > 0.05$) (Fig. 3).

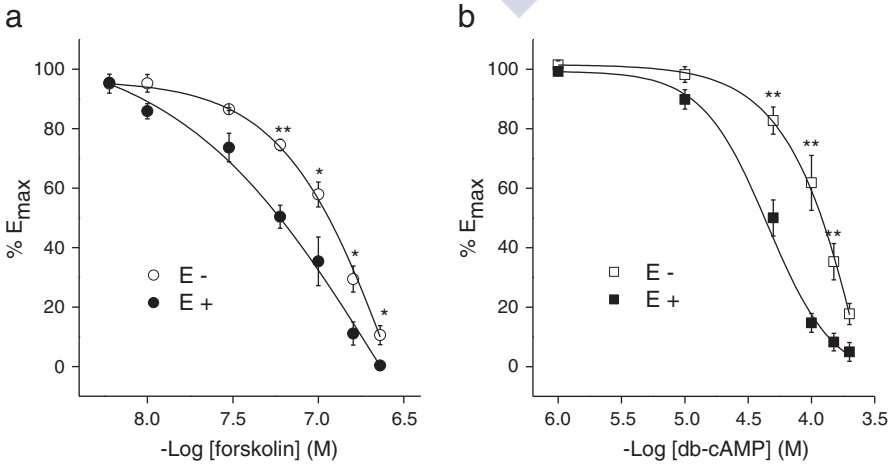

Fig. 1. Cumulative concentration–relaxation curves for a) forskolin (6–300 nM) and b) db-cAMP (1–200 μM) in intact (E+) and endothelium-denuded (E−) rat aortic rings precontracted with 1 μM phenylephrine (E_{max} = maximal contraction, considered as 100%). Each point represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of at least 5 experiments. Level of statistical significance: $^{**}P < 0.01$ or $^{*}P < 0.05$ as compared to intact rings.

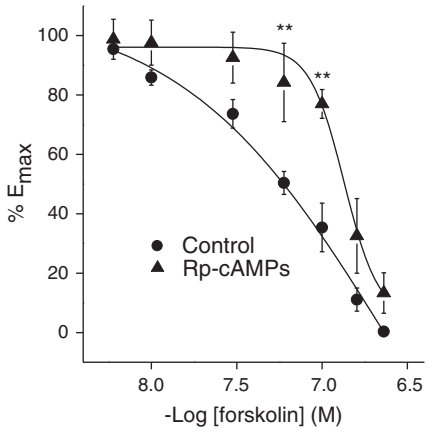

Fig. 2. Effects of Rp-cAMPs (100 μM, 30 min preincubation) on the cumulative concentration–relaxation curves for forskolin (6–300 nM) in intact rat aortic rings precontracted with 1 μM phenylephrine (E_{max} = maximal contraction, considered as 100%). Each point represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of at least 6 experiments. Level of statistical significance: $^{**}P < 0.01$ as compared to control values.

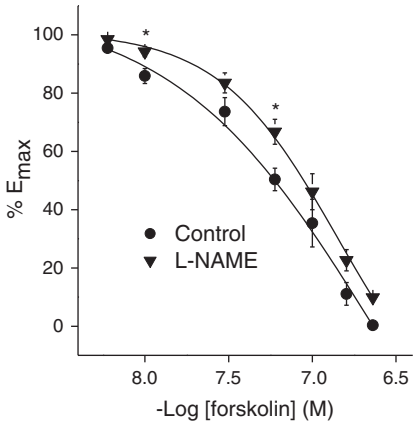

Fig. 4. Effects of L-NAME (100 μM, 30 min preincubation) on the cumulative concentration–relaxation curves for forskolin (6–300 nM) in intact rat aortic rings precontracted with 1 μM phenylephrine (E_{max} = maximal contraction, considered as 100%). Each point represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of at least 6 experiments. Level of statistical significance: $^{*}P < 0.05$, as compared to intact rings.

The activation of PKA by 6-Bnz-cAMP was confirmed by its ability to induce the phosphorylation of the protein VASP, a selective substrate for PKA, in rat aortic homogenates (data not shown).

3.3. *Effects of eNOS inhibition on the vasorelaxant action of forskolin and db-cAMP in phenylephrine-precontracted aortic rings*

Application of the selective eNOS inhibitor L-NAME (100 μM) to phenylephrine pre-contracted endothelium-intact rings significantly increased contraction (27.49 ± 5.48%): the maximal tension reached (g) was 2.47 ± 0.14 and 3.10 ± 0.09 before and after L-NAME exposure, respectively, n = 9; $P < 0.01$. However, L-NAME did not significantly modify the phenylephrine-induced contractions in endothelium-denuded rings: the maximal tension reached (g) was 1.87 ± 0.12 and 2.12 ± 0.15 before and after L-NAME exposure, respectively, n = 12; $P > 0.05$.

After 30 min in the presence of L-NAME (100 μM), the IC_{50} for forskolin was significantly increased in intact rings (IC_{50} = 68.14 ± 4.92 nM, n = 5, $P < 0.01$ with respect to the value obtained in the absence of L-NAME) (Fig. 4), but it was not affected in endothelium-denuded rings (IC_{50} = 92.44 ± 22.48 nM, n = 6; $P > 0.05$ with respect to the value obtained in the absence of L-NAME), suggesting that NO synthesis participates in the endothelial component of the forskolin-induced vasorelaxation.

A similar effect was observed on the vasorelaxant action of db-cAMP: a 30 min preincubation with L-NAME (100 μM) did not significantly modify the vasorelaxant effects of db-cAMP in the absence of endothelium (IC_{50} = 132.44 ± 6.81 μM, n = 5, $P > 0.05$ with respect to the value obtained in the absence of L-NAME), but it significantly reduced these effects in the presence of endothelium (IC_{50} = 130.00 ± 25.70 μM, n = 4, $P < 0.01$ with respect to the value obtained in the absence of L-NAME).

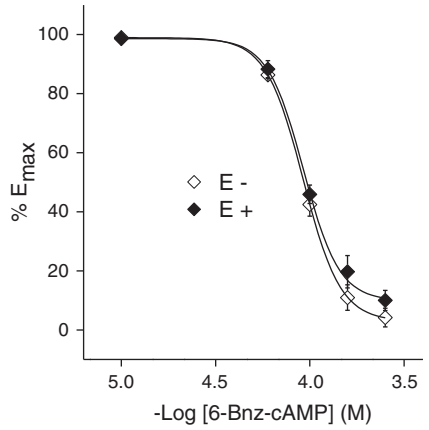

Fig. 3. Cumulative concentration response curves for 6-Bnz-cAMP (10–160 μM) in intact (E+) and endothelium-denuded (E−) rat aortic rings precontracted with 1 μM phenylephrine (E_{max} = maximal contraction, considered as 100%). Each point represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of 4 experiments.

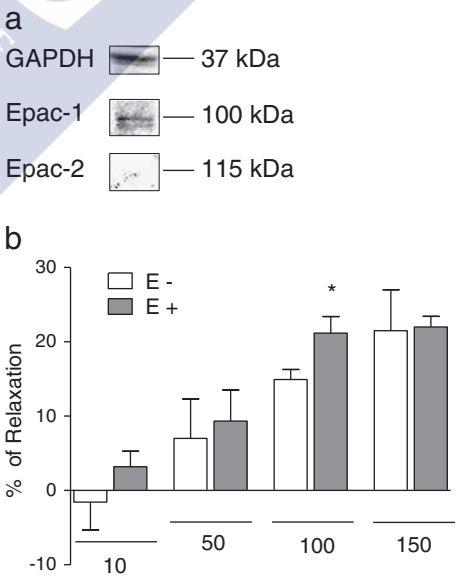

Fig. 5. a) Representative Western blot showing Epac-1 expression in the intact aorta. Epac-2 was not detected at the predicted molecular weight. GADPH was used as a loading control. b) Vasorelaxant effect of 8-pCPT-2′-O-Me-cAMP (Epac activator, 10–150 μM) in intact (E+) and endothelium-denuded (E−) rat aortic rings precontracted with 1 μM phenylephrine. Each bar represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of 4 experiments. Level of statistical significance: $^{*}P < 0.05$ versus the corresponding value without endothelium.

3.4. Effects of Epac stimulation on phenylephrine-precontracted aortic rings

Our Western blot experiments demonstrate the expression of Epac-1 isoform (~100 kDa) in rat aortic homogenates (Fig. 5a), while no band for Epac-2 isoform was detected at the predicted molecular weight (~115 kDa). Application of the selective activator of Epac, 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP (100 μM) relaxed phenylephrine-induced contractions with a higher potency in rings with a functional endothelium (% of relaxation: 21.16 ± 2.23, n = 4 and 14.93 ± 1.35, n = 5; for rings with or without endothelium, respectively; $P < 0.01$ with respect to control values and $P < 0.05$ between them). This vasorelaxant effect was not increased by the addition of higher concentrations of 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP (150 μM; % of relaxation: 21.99 ± 1.43, n = 4 and 21.50 ±5.51, n = 4; for rings with or without endothelium, respectively). Lower concentrations of 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP (10, 50 μM) did not cause a significant relaxant effect (Fig. 5b). The absence of PKA activation by 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP was confirmed by the lack of phosphorylation of VASP in rat aortic homogenates treated with this agent (data not shown).

3.5. DAF-2 fluorescence emission in HUVEC

The administration of forskolin (10 μM) and db-cAMP (100 μM) triggered a significant increase in fluorescence emission from DAF-2-loaded isolated HUVEC (Fig. 6a), (31.58 ± 4.51 and 21.98 ± 3.95 DAF-2 fluorescence arbitrary units, respectively, n ≥ 10, $P < 0.01$ with respect to basal fluorescence values). This increment in DAF-2 fluorescence was also observed (Fig. 6a) by the administration of the selective activators 6-Bnz-cAMP (300 μM) and 8-pCPT-2′–*O*-Me-cAMP (100 μM) (13.71 ± 1.31; 15.31 ± 3.16 DAF-2 fluorescence arbitrary units, respectively, n ≥ 5, $P < 0.01$ with respect to basal fluorescence values).

A 10 min preincubation of HUVEC with L-NAME (100 μM), Rp-cAMPs (10 μM) or ESI-09 (25 μM) significantly reduced (18.12 ± 3.25, $P < 0.05$; 11.03 ± 2.25, $P < 0.01$; 7.53 ± 1.32, $P < 0.01$; DAF-2 fluorescence arbitrary units, respectively, n ≥ 4) the 10 μM forskolin-induced increase in DAF-2 fluorescence (Fig. 6b).

4. Discussion

In this study, the presence of a functional endothelium significantly potentiated forskolin-induced relaxations, indicating that the vasorelaxant effects of this agent in rat aortic rings are mediated both by an endothelium-dependent and an endothelium-independent effect, which is concordant with previous reports using the same preparation [10,38].

The additional endothelium-dependent component of the relaxation induced by forskolin appears to be mediated by PKA activation in endothelial cells, since, in our experiments it was reversed in the presence of Rp-cAMPs, a competitive antagonist of the cyclic-nucleotide-binding domains on PKA [9]. In accordance with these data, it has been reported that PKA participates in the endothelium-dependent vasorelaxation induced by stimulation of β_2-adrenergic receptors in rat aorta and the subsequent increase in $[cAMP]_i$ via G_s protein/adenylyl cyclase activation [14,21].

In order to verify that PKA activation induces an endothelium-dependent vasorelaxant effect, we have evaluated, for the first time, the potential vasorelaxant effects of 6-Bnz-cAMP, a selective PKA activator [45] in rat aortic rings. 6-Bnz-cAMP significantly relaxed endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings precontracted with phenylephrine with similar potency. This suggests that, in accordance with previous studies, PKA activation directly relaxes vascular smooth muscle [42], although these data also suggest that the endothelium-dependent component of the forskolin-induced relaxation is not mediated by PKA, in clear contrast to our results with Rp-cAMP. Interestingly, in a series of experiments performed in our laboratory, pCPT-cAMP, which has been considered as a selective PKA activator in rat aortic smooth muscle cells (see, e.g., [43]) and in other experimental models (see, e.g., [44]), significantly relaxed phenylephrine-induced contractions with a higher potency in the presence of a functional endothelium (unpublished data). However, the selectivity of this compound has been questioned, since it has been described that it also can activate both cyclic GMP dependent protein kinase [37] and Epac [6,34].

With the data we have, we cannot explain the reason for this apparent contradiction between our results using 6-Bnz-cAMP and those using Rp-cAMPs. It is possible that some of the signaling mechanisms activated downstream of cAMP-increases modulate PKA activity, and these effects were absent when PKA is directly stimulated with 6-Bnz-cAMP, but more experiments are needed in order to confirm this possibility.

The results obtained in the presence of L-NAME, a selective eNOS inhibitor, suggest that the endothelial component of the forskolin-induced relaxation involves an increase in NO synthesis. In fact, in our contraction–relaxation experiments, the IC_{50} for forskolin was returned by L-NAME to values close to those obtained in the absence of

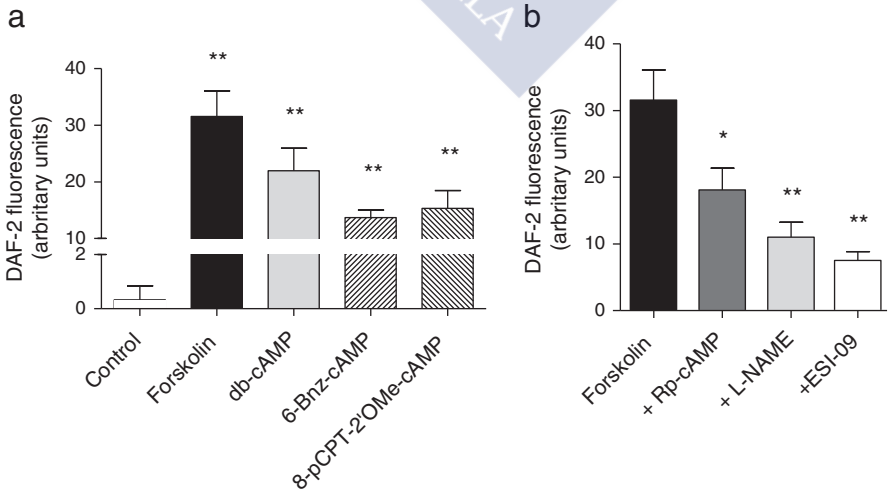

Fig. 6. a) Increases in DAF-2 fluorescence (indicative of NO release) in HUVEC cells induced by the administration of vehicle (control), forskolin (10 μM), db-cAMP (100 μM), 6-Bnz-cAMP (PKA activator, 300 μM) or 8-pCPT-2′–O-Me-cAMP (Epac activator, 100 μM) Each bar represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of at least 5 experiments. Level of statistical significance: $^{**}P < 0.01$ versus the corresponding basal values before the addition of the drugs or the vehicle (which are normalized to zero for each individual cell). b) Reduction of the increase in DAF-2 fluorescence induced by forskolin after 10 min incubation with Rp-cAMPs (10 μM), L-NAME (100 μM) or ESI-09 (25 μM). Each bar represents the mean ± S.E.M. (indicated by vertical lines) of at least 12 experiments. Level of statistical significance: $^{*}P < 0.05$ or $^{**}P < 0.01$ versus the forskolin-induced increase.

endothelium. Similarly, the endothelium-dependent component of the vasorelaxation induced by db-cAMP was completely absent in the presence of the eNOS inhibitor.

The cAMP-induced release of NO has also been suggested by other authors. For example, [41] reported that relaxant responses of rat aorta to several cAMP-elevating agents were blunted by the removal of endothelial cells or treatment with L-NAME. In endothelium-intact rat aortic rings, stimulation of β-adrenoceptors induces relaxation through a cAMP/NO mediated mechanism [14,18] and further evidence indicates that L-NAME inhibits isoprenaline-induced relaxation [22].

Our imaging results in endothelial cells show that both forskolin and db-cAMP induced a significant increase (~30% and ~22%, respectively) in DAF-2 fluorescence, and therefore an increase in NO generation [23,32]. The effect of forskolin was strongly reduced in the presence of L-NAME, which is concordant with previous reports which showed eNOS activation in HUVEC after stimulation of β-adrenoceptors [15,31]; similarly our results suggest that forskolin-induced relaxation is mediated by eNOS activation. Importantly, forskolin was also reported to increase NO production in human aortic endothelial cells [19]. Furthermore, colforsin, a forskolin analogue, releases NO from cultured rat aortic endothelial cells [27]. In addition, [38] suggested that the activation of cAMP pathway is necessary for the full activation of endothelial NO formation.

Taken together, this evidence suggests that the forskolin/cAMP vasorelaxant effects are partially mediated by NO release after activation of the cAMP/PKA pathway in the endothelial cell layer. Supporting this hypothesis, the forskolin-induced NO generation in HUVEC was inhibited by Rp-cAMPs and the activation of PKA with 6-Bnz-cAMP also increased basal NO release. Moreover in HUVEC, the eNOS activity induced by the β_2-adrenoceptor agonist salbutamol was significantly inhibited by H-89, another selective PKA inhibitor [31]. The activation of PKA and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt has been suggested to participate in the NO-dependent vasorelaxation of rat aortic rings induced by β-adrenoceptor stimulation [14]. More recently, it has been shown that the flavonoid quercetin phosphorylates eNOS at Ser1179 via a cAMP/PKA mediated pathway to enhance the production of NO and promote vasodilation [24]. Also, phosphorylation of eNOS at Ser1177 or Ser663 by PKA may increase eNOS activity [28].

Regarding the participation of Epac in the cAMP vasorelaxant effect, it has been previously reported that Epac-1, but not Epac-2, is expressed in HUVEC ([13]; unpublished data). Here, we demonstrate the presence of Epac-1, but not Epac-2 in rat aortic homogenates, which corroborate the results of [30] in Wistar rat aortic homogenates. Also, rat aortic smooth muscle cells contain mRNA for both Epac isoforms [7,43]. Furthermore, Hewer et al. [20] have shown that Epac-1 and, to a lesser extent, Epac-2 are expressed in rat aortic smooth muscle cells, together with the Epac effector proteins Rap1a and Rap1b.

Here, we demonstrate that the selective Epac activator 8-pCPT-2′O-Me-cAMP relaxes phenylephrine pre-contracted aortic rings both in the absence and in the presence of endothelium, with the effect being greater in the latter. This suggests that Epac exerts a direct vasorelaxant effect on vascular myocytes and that the endothelium-dependent vasorelaxant effect of cAMP may also be mediated in part by activation of this protein. In correlation with this, our imaging experiments showed that Epac activation enhances NO release from HUVEC and potentiates the NO release induced by PKA activation. Furthermore, the forskolin-induced increase in NO release is significantly reduced in the presence of ESI-09, a membrane-permeant Epac inhibitor. Surprisingly, and contrary to the expected outcome, inhibition of Epac with ESI-09 significantly relaxed phenylephrine-precontracted endothelium-denuded or intact aortic rings (data not shown). Although the working concentration at which this inhibitor was used is expected to inhibit only Epac activity [2], these results should be evaluated with caution, due to the very limited experience of use of this drug.

In a previous report, [40] demonstrated that selective Epac activation relaxes rat aortic rings; however, the authors did not explore whether this effect was endothelium-dependent or due to a direct effect of Epac in aortic myocytes. In recent years, other authors have described the ability of Epac activators to directly relax several types of vascular and non-vascular smooth muscle preparations [36,45]. Supporting our results, very recently a similar effect in rat mesenteric arteries has been described, in which activation of Epac with 8-pCPT-2′O-Me-cAMP induces endothelial-dependent relaxation via activation of potassium channels and NOS [35]. Even so, the present work is, to our knowledge, the first to demonstrate an endothelium-dependent vasorelaxant effect of Epac in a large artery.

4.1. Conclusions

Our results suggest that, in the presence of a functional endothelium, the vasorelaxant effects of forskolin/cAMP are mediated, at least in part, by enhanced eNOS activity through PKA and Epac activation in endothelial cells, leading to an increased NO release.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación*, Spain (SAF2010-22051) and *Xunta de Galicia*, Spain (INCITE08PXIB203092PR). VGM and JE were supported by a *FPU* predoctoral scholarship from the *Ministerio de Educación*, Spain. We are very grateful to Dr. Ernesto Cano for his technical advice on Western blot experiments with rat aortic homogenates.

References

[1] Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. J Anesth 2007;21:232–42.
[2] Almahariq M, Tsalkova T, Mei FC, Chen H, Zhou J, Sastry SK, et al. A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. Mol Pharmacol 2013;83:122–8.
[3] Bruce JI, Straub SV, Yule DI. Crosstalk between cAMP and Ca^{2+} signaling in non-excitable cells. Cell Calcium 2003;34:431–44.
[4] Bundey RA, Insel PA. Adenylyl cyclase 6 overexpression decreases the permeability of endothelial monolayers via preferential enhancement of prostacyclin receptor function. Mol Pharmacol 2006;70:1700–7.
[5] Campos-Toimil M, Keravis T, Orallo F, Takeda K, Lugnier C. Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca^{2+} responses in endothelial cells. Br J Pharmacol 2008;154:82–92.
[6] Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK, et al. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. J Biol Chem 2003;278:35394–402.
[7] Cuíñas A, Elíes J, Orallo F, Campos-Toimil M. Expression and distribution of protein kinase A and Epac proteins in vascular smooth muscle cells. Effect of cAMP-elevating agents. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011;109:35–6. http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00773.x.
[8] Cuíñas A, Elíes J, Orallo F, Campos-Toimil M. Cyclic AMP relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated in part by decrease of depletion of intracellular Ca^{2+} stores and inhibition of capacitative calcium entry. Vascul Pharmacol 2013;58:98–104.
[9] de Wit RJ, Hekstra D, Jastorff B, Stec WJ, Baraniak J, Van Driel R, et al. Inhibitory action of certain cyclophosphate derivatives of cAMP on cAMP-dependent protein kinases. Eur J Biochem 1984;142:255–60.
[10] Delpy E, Coste H, Gouville AC. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. Br J Pharmacol 1996;119:471–8.
[11] Elíes J, Cuíñas A, García-Morales V, Orallo F, Campos-Toimil M. *Trans*-resveratrol simultaneously increases cytoplasmic Ca^{2+} levels and nitric oxide release in human endothelial cells. Mol Nutr Food Res 2011;55:1237–48.
[12] Elíes J, Cuíñas A, MacDougall DA, Leiro J, Campos-Toimil M. *Trans*-resveratrol down-regulates caveolin-1, up-regulates endothelial NO synthase and reduces their interaction in vascular smooth muscle and endothelial cells. Food Biosci 2013;1:31–8.
[13] Fang Y, Olah ME. Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1). J Pharmacol Exp Ther 2007;322:1189–200.
[14] Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. Br J Pharmacol 2004;143:397–403.
[15] Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, et al. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. Br J Pharmacol 1999;126:1872–80.
[16] Gifford SM, Grummer MA, Pierre SA, Austin JL, Zheng J, Bird IM. Functional characterization of HUVEC-CS: Ca^{2+} signaling, ERK 1/2 activation, mitogenesis and vasodilator production. J Endocrinol 2004;182:485–99.

[17] Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2010;50:355–75.
[18] Gray DW, Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. Br J Pharmacol 1992;107:684–90.
[19] Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. Atherosclerosis 2006;189:350–7.
[20] Hewer RC, Sala-Newby GB, Wu YJ, Newby AC, Bond M. PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. J Mol Cell Cardiol 2011;50:87–98.
[21] Iranami H, Hatano Y, Tsukiyama Y, Maeda H, Mizumoto K. A beta-adrenoceptor agonist evokes a nitric oxide-cGMP relaxation mechanism modulated by adenylyl cyclase in rat aorta. Halothane does not inhibit this mechanism. Anesthesiology 1996;85:1129–38.
[22] Isenovic E, Walsh MF, Muniyappa R, Bard M, Diglio CA, Sowers JR. Phosphatidylinositol 3-kinase may mediate isoproterenol-induced vascular relaxation in part through nitric oxide production. Metabolism 2002;51:380–6.
[23] Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal Chem 1998;70:2446–53.
[24] Li PG, Sun L, Han X, Ling S, Gan WT, Xu JW. Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and PKA-dependent mechanism. Pharmacology 2012;89:220–8.
[25] Métrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. Pflugers Arch 2010;459:535–46.
[26] Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. Cell Mol Life Sci 2012;69:247–66.
[27] Mori K, Hayabuchi Y, Kuroda Y, Nakaya Y, Tsuchiya K, Moritoki H. Age-related endothelium-dependent vascular relaxation in rat thoracic aorta in response to colforsin. Pediatr Int 1999;41:673–81.
[28] Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. J Mol Cell Cardiol 2007;42:271–9.
[29] Orallo F, Rosa E, García-Ferreiro T, Campos-Toimil M, Cadavid MI, Loza MI. Cardiovascular effects of ketanserin on normotensive rats in vivo and in vitro. Gen Pharmacol 2000;35:95–105.
[30] Purves GI, Kamishima T, Davies LM, Quayle JM, Dart C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. J Physiol 2009;587:3639–50.
[31] Queen LR, Ji Y, Xu B, Young L, Yao K, Wyatt AW, et al. Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. J Physiol 2006;576:585–94.
[32] Räthel TR, Leikert JJ, Vollmar AM, Dirsch VM. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. Biol Proced Online 2003;5:136–42.
[33] Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 1990;101:746–52.
[34] Rehmann H, Schwede F, Døskeland SO, Wittinghofer A, Bos JL. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. J Biol Chem 2003;278:38548–56.
[35] Roberts OL, Kamishima T, Barrett-Jolley R, Quayle JM, Dart C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca2 +-sensitive K+ channels in rat mesenteric artery. J Physiol 2013;591:5107–23.
[36] Roscioni SS, Maarsingh H, Elzinga CR, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, et al. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. J Cell Mol Med 2011;15:1551–63.
[37] Sandberg M, Butt E, Nolte C, Fischer L, Halbrügge M, Beltman J, et al. Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole- 3′,5′-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCl-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. Biochem J 1991;279:521–7.
[38] Schäfer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Münzel T, Walter U, et al. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. Biochem Pharmacol 2003;65:397–405.
[39] Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. Pharmacol Rev 2013;65:670–709.
[40] Sukhanova IF, Kozhevnikova LM, Popov EG, Podmareva ON, Avdonin PV. Activators of Epac proteins induce relaxation of isolated rat aorta. Dokl Biol Sci 2006;411:441–4.
[41] Toyoshima H, Nasa Y, Hashizume Y, Koseki Y, Isayama Y, Kohsaka Y, et al. Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol 1998;32:543–51.
[42] Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K^+ channels by endothelium-derived relaxing factors. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999;26:180–4.
[43] Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, et al. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008;295:H1547–55.
[44] Zambon AC, Wilderman A, Ho A, Insel PA. Increased expression of the pro-apoptotic protein BIM, a mechanism for cAMP/protein kinase A (PKA)-induced apoptosis of immature T cells. J Biol Chem 2011;286:33260–7.
[45] Zieba BJ, Artamonov MV, Jin L, Momotani K, Ho R, Franke AS, et al. The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity. J Biol Chem 2011;286:16681–92.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA