



FACULTADE DE FARMACIA
Departamento de Farmacología

**EFFECTOS DE LOS ISÓMEROS DEL RESVERATROL
SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO Y DEL
ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS VASCULARES**

TESIS DOCTORAL
Jacobo Elíes Gómez
Santiago de Compostela, 2009



Universidade de Santiago de Compostela
Facultade de Farmacia
Departamento de Farmacología

EFECTOS DE LOS ISÓMEROS DEL RESVERATROL SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO Y DEL ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS VASCULARES

Memoria experimental para optar al
grado de Doctor en Farmacia
presentada por Jacobo Elíes Gómez

Jacobo Elíes Gómez

Santiago de Compostela, 29 de junio 2009



DEPARTAMENTO DE FARMACOLÓGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

CAMPUS UNIVERSITARIO SUR.
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA
TEL: 981547139 FAX: 981594595

DON FRANCISCO ORALLO CAMBEIRO, CATEDRÁTICO DE FARMACOLÓGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y **DON MANUEL CAMPOS TOIMIL**, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

INFORMAN:

Que la memoria titulada “Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares” elaborada por el licenciado en Farmacia D. Jacobo Elfés Gómez, ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia bajo su dirección.

Y considerando que se encuentra concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste, expiden y firman el presente informe en Santiago de Compostela a 29 de junio de 2009.

Fdo.: Francisco Orallo Cambeiro.

Fdo.: Manuel Campos Toimil.

La presente memoria ha sido realizada gracias a la financiación otorgada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, la *Consellería de Educación e Ordenación Universitaria* de la *Xunta de Galicia*, Fondos de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Sanidad y Política Social del Gobierno de España y la Beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de la presente Memoria Experimental:

A mis directores y tutores, el Dr. Francisco Orallo y el Dr. Manuel Campos – “Paco y Manolo”- por su dedicación, confianza, formación durante todo este proceso y sobre todo por haberme guiado en todo momento. Tengo la suerte de poder decir que me han ayudado mucho en el terreno científico como en el personal.

A todos mis compañeros y profesores del Departamento de Farmacología, que siempre me han apoyado y con los que he compartido tantas horas de trabajo, alguna charla, las pipetas y muchas comidas calentadas en el microondas... En especial a Andrea, Mati, Dolo, Carlos, Ana, Rocío y Silvia. Tengo la suerte de que algunos, son además muy buenos amigos.

Al Dr. José Leiro y al Dr. Juan Alberto Arranz del Departamento de Parasitología por su inestimable ayuda y orientación en los experimentos llevados a cabo en su laboratorio.

Al Dr. Eugenio Uriarte y al Dr. Elías Quezada, por habernos facilitado uno de los fármacos de estudio, el *cis*-resveratrol, compuesto que ellos mismos obtuvieron en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela.

Al Dr. Ezequiel Álvarez y al Dr. Ignacio Verde de la Universidade da Beira Interior, por los experimentos realizados sobre los efectos electrofisiológicos del resveratrol.

Al Dr. Eduardo Iribarnegaray del Departamento de Química Física por prestarme el refractómetro con el que he realizado las medidas de la concentración de sacarosa.

Ao persoal técnico da Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e ao Desenvolvemento Tecnolóxico, en especial a Merche e a Raquel que tanto me axudaron cos experimentos de microscopía confocal e electrónica.

I also would like to thank to all the people from the Department of Pharmacology of the University of Cambridge. To Dr. Colin W. Taylor to give me the chance to join to his lab. To my labmates Emily, Eva, Sriram, Karlos, Steve, Gargi, Francis and Yi. To my friends Ana, Marianela, David, and Nana.

A mis amigos Diego, Noa, Anne, Vicente y María con los que he compartido tan buenos momentos y me han apoyado incondicionalmente.

A toda mi familia, especialmente a mi madre y a mi hermana, por apoyarme desde el principio en esta aventura de formación académica; por compartir mis ilusiones y estar siempre a mi lado, a pesar de la distancia.

A mi madre.

A mi familia.

ABREVIATURAS

5-HETE: ácido-5-hidroxi-6,8,11,14-eicosatetraenoico

A7r5: miocito vascular liso de línea

AC: adenilil ciclasa

Ach: acetilcolina

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

Akt: proteína cinasa B o Akt

AMPc: 3'-5' monofosfato cíclico de adenosina

AMPK: proteína cinasa activada por AMP

ANG II: angiotensina II

AR_{α1}: receptor adrenérgico α1

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AT₂: receptor de ANG II de tipo 2

AVP: [Arg⁸]-vasopresina

BH₄: tetrahidrobiopterina

BSA: seroalbúmina bovina

[Ca²⁺]_i: concentración intracelular de calcio libre

cADPR: difosfato de adenosina ribosa cíclica

CaM: calmodulina

CaMKII: cinasa II dependiente de Ca²⁺-calmodulina

Cav: proteína caveolina

CAV: gen de la caveolina

CCE: entrada capacitativa de Ca²⁺

CICR: liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺

CIF: factor de entrada de Ca²⁺

CPA: ácido ciclopiazónico

COX: ciclooxigenasa

CRAC: canales de Ca²⁺ activados por liberación de Ca²⁺

e-RSV: *cis*-3,4',5-trihidroxiestilbeno o *cis*-resveratrol

CSD: dominio andamio de la caveolina

DAF-2: 4,5-diaminofluoresceína

DAG: diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenil indol

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

EC₅₀: concentración de fármaco que induce el 50% de la respuesta máxima

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

e.e.m.: error estándar de la media

eNOS: sintetasa de óxido nítrico endotelial

ER: receptor estrogénico

FBS: suero fetal bovino

FITC: isocianato de fluoresceína

GC: guanilil ciclasa

GPI: glucofosfatidilinositol

GPCR: receptores acoplados a proteínas G

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HUVEC: célula endotelial de vena de cordón umbilical humano

I_{Ca(L)}: corriente de Ca²⁺ a través de VOCC de tipo L

iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible

IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato

KO: *knockout*

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MAPK: cinasa de proteínas activadas por agentes mitógenos

MβCD: metil-β-ciclodextrina

MP: membrana plasmática

MPTP: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

NADH: dinucleótido de nicotinamida adenina

NADPH: dinucleótido fosfato de β -nicotinamida adenina reducido	S0Ca²⁺: solución extracelular tamponada sin Ca ²⁺
NFκB: factor nuclear <i>kappa</i> B	SDS: dodecil sulfato sódico
NIF: nifedipina	SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
nNOS: sintetasa de óxido nítrico neuronal	SERCA: Ca ²⁺ -ATPasa del RE
NO[•]: óxido nítrico	SKF 96365: clorhidrato de 1-(β -[3-(4-metoxifenil)propoxi]-4-metoxifenetil)-1H-imidazol
NOS: sintetasa de óxido nítrico	SMOCC: canales operados por segundos mensajeros
NPC: poro nuclear	SOCC: canales operados por depleción
NPS: nitroprusiato sódico	SN: solución normal (1,5 mM Ca ²⁺)
NSCC: canales catiónicos no selectivos	SR-B: receptor <i>scavenger</i> B
PG: prostaglandina	TBE: tampón Tris borato EDTA
PI3K: cinasa del 3-fosfatidilinositol	TEM: microscopía electrónica de transmisión
PKA: proteína cinasa A	TMB-8: clorhidrato de 8-(dietilamino) octil 3,4,5-trimetoxibenzoato
PKC: proteína cinasa C	TP: tapsigargina
PLC: fosfolipasa C	TRP: canal receptor transitorio de potencial
PLN: proteína fosfolamban	<i>t</i>-RSV: <i>trans</i> -3,4',5-trihidroxiestilbeno o <i>trans</i> -resveratrol
PMCA: ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática	TxA₂: tromboxano A ₂
RASMC: células musculares lisas de aorta de rata	V₁: receptor de vasopresina de tipo 1
RE: retículo endoplasmático	VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
ROCC: canales de Ca ²⁺ operados por receptor	VOCC: canales de Ca ²⁺ operados por voltaje
ROS: especies reactivas del oxígeno	WKY: <i>Wistar Kyoto</i>
RWPC: del inglés <i>Red Wine Polyphenol Compounds</i>	
RSV: resveratrol	
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa	
RTK: receptores tirosina cinasa	
RyR: receptor de rianodina	

ÍNDICE

ÍNDICE

Justificación y Objetivos	3
Revisión Bibliográfica	7
1. <i>El resveratrol</i>	9
1.1. Características químicas del resveratrol	12
1.2. Fuentes de resveratrol en la dieta humana	15
1.3. Metabolismo y disponibilidad	15
1.4. Efectos farmacológicos del resveratrol	16
1.4.1. Efectos antiinflamatorios	17
1.4.2. Efectos cardioprotectores	18
1.4.3. Efectos vasorrelajantes	20
1.4.4. Efectos antitumorales	23
2. <i>La homeostasis cálcica en células vasculares</i>	25
2.1 Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$	28
2.1.1 Entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática	28
2.1.2 Liberación de Ca^{2+} almacenado	34
2.2 Mecanismos de descenso de la $[Ca^{2+}]_i$	37
2.2.1 Salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática	37
2.2.2 Recaptación de Ca^{2+} por parte de los reservorios	38
2.3 Papel de la mitocondria y el núcleo en la homeostasis cálcica	38
2.4 Microdominios de regulación cálcica	41
3. <i>Las caveolas en el sistema cardiovascular</i>	45
3.1 Características generales de las caveolas	46
3.1.1 Descubrimiento y morfología	46
3.1.2 Distribución celular	47
3.1.3 Propiedades bioquímicas	48
3.2 Las caveolinas	49
3.2.1 La caveolina recubre las caveolas	49
3.2.2 La familia genética de la caveolina	50
3.2.3 Caracterización de la caveolina	51
3.3 Papel funcional de las caveolas y las caveolinas	56
3.3.1 Transporte vesicular	57
3.3.2 Homeostasis del colesterol	59
3.3.3 Señalización celular	60
3.4 Métodos para el estudio de las caveolas	64
3.5 Fisiopatología relacionada con las caveolas	65
4. <i>La homeostasis del óxido nítrico</i>	67
4.1 Actividad biológica del NO^{\bullet} en el sistema vascular	67
4.2 Estructura y función de la NOS <i>in vitro</i>	69
4.3 Activación de la eNOS en caveolas endoteliales	71

Materiales y métodos	79
1. <i>Animales de experimentación</i>	81
2. <i>Cultivo primario de células musculares lisas de aorta de rata</i>	82
3. <i>Cultivos de líneas celulares</i>	83
4. <i>Microscopía de epifluorescencia</i>	84
5. <i>Subfraccionamiento celular para el estudio de las caveolas</i>	89
6. <i>Microscopía confocal</i>	92
7. <i>Microscopía electrónica de transmisión</i>	94
8. <i>Retrotranscripción-PCR</i>	95
9. <i>Co-inmunoprecipitación</i>	98
10. <i>Liberación de NO[•] por células HUVEC en monocapa</i>	99
11. <i>Evaluación de la actividad de la eNOS in vitro</i>	100
12. <i>Fármacos y reactivos</i>	101
13. <i>Expresión y análisis estadístico de los resultados</i>	103
Resultados	105
1. <i>Caracterización de las células de cultivo primario</i>	107
2. <i>Efectos del RSV sobre la homeostasis cálcica</i>	111
2.1. <i>Efectos del c-RSV y del t-RSV sobre la [Ca²⁺]_i basal</i>	111
2.2. <i>Efectos del Ni²⁺, la NIF y el SKF 96365 sobre el aumento de la [Ca²⁺]_i inducido por el c-RSV y el t-RSV</i>	112
2.3. <i>Interferencias sobre los aumentos de la [Ca²⁺]_i inducidos por la TP y el RSV</i>	113
2.3.1. <i>Efectos del RSV sobre la [Ca²⁺]_i tras la administración de TP</i>	113
2.3.2. <i>Efectos de la TP sobre la [Ca²⁺]_i tras la administración de c-RSV o t-RSV</i>	115
2.4. <i>Efectos del c-RSV y el t-RSV sobre la [Ca²⁺]_i basal en ausencia de Ca²⁺ extracelular</i>	117
2.5. <i>Interferencias entre la TP y el RSV en el aumento de la [Ca²⁺]_i en ausencia de Ca²⁺ extracelular</i>	118
2.6. <i>Efectos del TMB-8 sobre los aumentos de la [Ca²⁺]_i inducidos por c-RSV, t-RSV y TP</i>	119
2.7. <i>Efectos del RSV sobre la respuesta a agonistas de GRPC en células A7r5</i>	121
2.7.1. <i>Caracterización de la respuesta cálcica a la AVP y a la ANG II</i>	121
2.7.2. <i>Efectos de la preincubación con los isómeros del RSV sobre la respuesta cálcica inducida por la AVP y la ANG II</i>	123
2.7.3. <i>Efectos de la aplicación de los isómeros del RSV en la fase de meseta de la respuesta cálcica de AVP o ANG II</i>	126
2.7.4. <i>Efectos del RSV sobre la respuesta cálcica inducida por AVP o ANG II en ausencia de Ca²⁺ extracelular</i>	128
2.8. <i>Efectos del RSV sobre la respuesta cálcica de la rianodina y la cafeína en A7r5</i>	132

2.9. Efectos del RSV sobre la respuesta a K ⁺ isotónico	132
3. <i>Efectos del RSV sobre la homeostasis del NO[•]</i>	137
3.1. Expresión de la eNOS en células vasculares	137
3.2. El <i>t</i> -RSV potencia la expresión de eNOS en células vasculares	140
3.3. Evaluación de la actividad de la eNOS <i>in vitro</i>	143
3.4. Efectos del <i>t</i> -RSV sobre la [Ca ²⁺] _i y los niveles intracelulares de NO [•] en células HUVEC	144
4. <i>Efectos del RSV sobre la integridad de las caveolas</i>	149
4.1. Proteínas localizadas en los microdominios caveolares	149
4.2. Interacciones entre proteínas a nivel caveolar	155
4.3. Efectos del RSV sobre la expresión de cav-1	159
Discusión	165
Conclusiones	193
Bibliografía	197
Anexos (Summary, Conclusions and Publications enclosed)	225

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El uso de las plantas medicinales se remonta al inicio de la historia del hombre, donde, de forma empírica, fue descubriendo cuáles eran beneficiosas y podían ser utilizadas en la dieta o para curar y cuáles eran tóxicas. El primer texto escrito sobre el uso de plantas medicinales, datado en torno a 3000 años AC, aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los sumerios. Otros documentos de diferentes culturas de la Edad Antigua nos dan una idea del grado de conocimiento que tenían de las plantas medicinales: Papiro de Ebers (Egipto, 1700 años AC), libro de Pen Tsao (China, 1000 años AC), código de Hamurabi (Babilonia 772 años AC), etc.

El nacimiento de la Farmacología en la segunda mitad del siglo XIX y su progresivo desarrollo, debido en buena parte a los productos procedentes de plantas (curare, alcaloides aislados, etc.), permitió la investigación de preparados vegetales (extractos, fracciones aisladas, principios activos) en modelos biológicos, contribuyendo a explicar los efectos de las mismas.

La síntesis de la urea en 1828, marcó el inicio de la etapa de la química de síntesis que alcanzó un espectacular desarrollo en la primera mitad del siglo XX, con la aparición de numerosos fármacos que relegaron las plantas medicinales de la terapéutica. A partir de los años 60 resurge en occidente el interés del público y los científicos por la medicina tradicional, como demuestra el número creciente de investigaciones realizadas en los últimos años. Así, en la actualidad, el mundo vegetal desempeña un importante papel en el desarrollo de nuevos fármacos. Es muy habitual tomar como modelo un principio activo natural, o bien una parte de la molécula, para desarrollar derivados semisintéticos con el objetivo de mejorar la seguridad y la eficacia de dicho principio activo.

Una de las líneas de trabajo que viene desarrollando nuestro grupo de investigación desde hace varios años, en colaboración con el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, consiste en el aislamiento, la síntesis, la evaluación farmacológica y el estudio de mecanismos de

acción de compuestos de origen natural y sintético con potencial actividad sobre el sistema cardiovascular. La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado dentro de esta línea de trabajo y se centra en la evaluación farmacológica del resveratrol (RSV), un estilbeno natural que se presenta de forma abundante en el vino.

Desde principios del siglo XX se han hecho estudios químicos de la planta *Vitis vinifera*. La base científica de los citados estudios se fundamenta en el fenómeno conocido como la *Paradoja Francesa*, fenómeno al que la comunidad científica y del público en general, han prestado últimamente considerable atención y que ha despertado gran interés en el ámbito cardiovascular. Se trata de encontrar la causa de por qué la población gala y otras regiones mediterráneas presentan una menor incidencia de enfermedades coronarias que el resto de la población, pese a dietas ricas en grasas. El vino es un componente esencial de la dieta mediterránea y diversos autores han demostrado una correlación entre la menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y el consumo de vino (fundamentalmente de vino tinto).

Como los efectos beneficiosos y protectores del vino son totalmente independientes de su contenido en alcohol, a lo largo de estos últimos años se han llevado a cabo intensas investigaciones para identificar los principios activos responsables. Aunque dichos principios activos todavía no se conocen, posiblemente debido a la compleja mezcla de sustancias presentes en el vino con efectos opuestos sobre el sistema cardiovascular y sanguíneo, existen varias moléculas candidatas, entre las que se encuentran diversos compuestos de naturaleza polifenólica. Ello hace que el vino y las bebidas relacionadas constituyan una buena fuente para la búsqueda de nuevos fármacos con potencial actividad sobre dichos sistemas.

Así, se han aislado compuestos procedentes de hojas, frutos y otras partes de la planta *V. Vinifera* de diferentes clases químicas. Entre estos compuestos destacan los fenólicos, y en concreto, dentro de los no flavonoides, los estilbenos. Al grupo de los estilbenos pertenece el RSV, tanto en la forma isomérica *cis* como en la *trans*.

Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios farmacológicos se han centrado en el isómero *trans* (*t*-RSV), que ha demostrado tener una amplia variedad de actividades biológicas, entre las que se encuentran aquellas relacionadas con los efectos preventivos a nivel cardiovascular como, por ejemplo, una marcada actividad

vasorrelajante. Sin embargo, la actividad farmacológica del *c*-RSV está mucho menos estudiada, probablemente debido a que este isómero, al contrario que el *t*-RSV, no se encuentra disponible de forma comercial. De ahí nuestro interés en dilucidar si dicho isómero presenta similares propiedades, o si por el contrario, posee una actividad diferente con respecto a la forma *trans*.

Con estos antecedentes, hemos creído que resultaría de interés la realización de un estudio sobre los efectos del RSV en la homeostasis del Ca^{2+} y del óxido nítrico (NO^{\bullet}) en células vasculares, tanto miocitos de músculo liso como endoteliales. El Ca^{2+} y el NO^{\bullet} son dos de los mediadores celulares más importantes en el sistema cardiovascular, participando en la regulación una amplia variedad de procesos fisiológicos (contracción muscular, vasodilatación, proliferación y apoptosis celular, etc.). Las alteraciones en su homeostasis pueden estar implicadas en el origen de diversas enfermedades del sistema cardiovascular.

Además, mientras se llevaba a cabo la fase experimental reflejada en la presente memoria, otros grupos de investigación publicaron una serie de artículos relacionados con el tema de estudio y que facilitan la interpretación de los resultados obtenidos. En este sentido, los trabajos sobre la actividad del RSV a nivel caveolar (relacionados también con la homeostasis cálcica y del NO^{\bullet}), fueron de gran ayuda a la hora de elaborar diseños experimentales.

En base a ello, en el presente trabajo se pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los isómeros del RSV actúan en el sistema vascular, con la intención de explicar algunos de los efectos cardioprotectores atribuidos al RSV y al consumo regular de vino tinto en general. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Realizar el primer estudio comparativo detallado acerca de los efectos de los isómeros del RSV sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal y sobre la respuesta cálcica inducida por agonistas de receptores específicos o por despolarización con elevada concentración de K^+ en las células musculares lisas de aorta de rata.
2. Determinar si el *t*-RSV y el *c*-RSV presentan diferentes acciones farmacológicas a nivel de la homeostasis cálcica en los miocitos vasculares

o si, por el contrario, la diferencia entre sus efectos es únicamente de tipo cuantitativo.

3. Investigar por primera vez si el *t*-RESV provoca cambios en la señalización cálcica en las células endoteliales humanas y si sus efectos se traducen en una modificación de la biosíntesis y liberación de NO• a partir de dichas células.
4. Estudiar los microdominios caveolares presentes en diversos tipos de células vasculares (musculares lisas y endoteliales), las proteínas en ellos presentes, y como el *t*-RSV afecta a la distribución e interacción entre dichas proteínas. En este sentido nos centraremos de manera especial en dos proteínas que participan de modo decisivo en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺ y del NO•: los receptores de IP₃ y la sintetasa de NO•, respectivamente.

Consideramos que este trabajo de investigación tiene un interés práctico (sanitario) muy importante, ya que las investigaciones que nos proponemos realizar pueden reportar los siguientes beneficios:

1. Obtener valiosa información para el diseño y síntesis química de nuevos derivados con mayor potencial terapéutico.
2. Facilitar a la industria farmacéutica el desarrollo y la introducción de nuevos fármacos con índice terapéutico más elevado (más eficaces y menos tóxicos). Aportar nuevas soluciones al tratamiento y la prevención de patologías cardiovasculares.
3. Justificar la búsqueda de nuevas fuentes dietéticas de estilbenos alternativas al vino, útiles en la protección frente a la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. El resveratrol

El resveratrol (RSV) es un polifenol natural, con estructura de estilbeno, que presenta una amplia variedad de actividades biológicas. A pesar de que el RSV estaba presente en preparados medicinales, tales como el *darakchasava* o el *manakka*, hace más de 2000 años (Paul *et al.*, 1999); su estructura química no fue caracterizada hasta el año 1940, cuando Takaoka logró aislarlo de las raíces de *Veratrum grandiflorum* (Takaoka, 1940).

En la década de los sesenta, Nonomura descubrió que el RSV era el principal principio activo del *ko-jo-kon* (Nomomura *et al.*, 1963), un preparado de uso común en la medicina tradicional oriental a base de raíces secas de *Polygonum cuspidatum*. En el año 1976 se describió su presencia en la piel de la uva (Langcake y Pryce, 1976).

A finales de los ochenta, los doctores Serge Renaud y Robert Ellison, en base a diferentes estudios epidemiológicos, pusieron de manifiesto la baja tasa de mortalidad por enfermedades coronarias entre la población gala y otras regiones mediterráneas en comparación con la población norteamericana, a pesar de que los dos grupos se caracterizan por presentar un consumo relativamente elevado en el aporte lipídico de la dieta. Este fenómeno fue bautizado con el nombre de “paradoja francesa”.

Hasta la década de los noventa tan sólo existían unos pocos estudios sobre este compuesto. Algunos de estos trabajos tratan sobre los efectos del RSV y otros estilbenos de origen natural sobre el metabolismo lipoproteico en ratas y ratones (Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1983).

En noviembre de 1991, durante la emisión de un programa del canal de televisión CBS, “60 minutes”; se difundió la conocida “Paradoja Francesa” que tuvo una importante repercusión mediática. En el programa se señaló que el consumo regular y moderado de vino era una característica diferencial entre la población gala y la norteamericana y que este factor podría ser el responsable de la baja mortalidad

coronaria (un extracto de este programa referido al RSV, puede verse en la web: <<http://www.youtube.com/watch?v=njm1LkXP2sg>>).

Un año más tarde, se descubrió que el vino tinto contenía una cantidad relativamente elevada de RSV (Siemann y Creasy, 1992) y se planteó que este compuesto podría ser el responsable del efecto cardioprotector asociado al consumo moderado de vino (Renaud y de Lorgeril, 1992). De hecho, gran parte de los estudios que se llevaron a cabo para evaluar este efecto confirmaron que existe una relación entre el consumo moderado de vino tinto y la salud cardiovascular (Soleas *et al.*, 1997b). La mayoría de los resultados de estas investigaciones concluyeron que el RSV podría ser el responsable, al menos en parte, de los beneficios cardiovasculares atribuidos al consumo de vino (Andriambelison *et al.*, 1998) y muchos estudios pusieron de manifiesto propiedades del RSV que podrían estar implicadas en la prevención de enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis, la aterosclerosis y la hipertensión (Orallo *et al.*, 2002; Bradamante *et al.*, 2004; Hao y He, 2004; Dong y Ren, 2004; Delmas *et al.*, 2005; Burjonrappa y Fujise, 2006).

La figura 1 muestra gráficamente el aumento exponencial que se viene produciendo en el número de artículos científicos publicados relacionados con el estudio de la actividad biológica del RSV, destacándose los acontecimientos más importantes que se han producido en el ámbito científico de este polifenol. Nótese que la Paradoja Francesa y el descubrimiento de la presencia del RSV en el vino coinciden con el inicio del crecimiento exponencial en el número de artículos publicados del RSV. Entre estos acontecimientos se incluye la publicación de las primeras evidencias del potencial efecto antineoplásico del RSV (Jang *et al.*, 1997) y la capacidad de este compuesto para modular la expresión de genes implicados en la longevidad celular (Howitz *et al.*, 2003), que conjuntamente, han contribuido a aumentar, todavía más, la popularidad en el ámbito científico y a situar al RSV en el conocimiento de la sociedad en general.

Por lo tanto, podría decirse que en los últimos 20 años se han descrito claras evidencias *in vivo* de los beneficios cardiovasculares que aporta el consumo de RSV; incluso teniendo en cuenta que gran parte de los estudios *in vivo* emplean extractos que contienen RSV, vino u otras fuentes dietéticas de RSV, pero no únicamente este

compuesto aislado (Soleas *et al.*, 1997a; Dell'Agli *et al.*, 2004; Alarcón de la Lastra y Villegas, 2005).

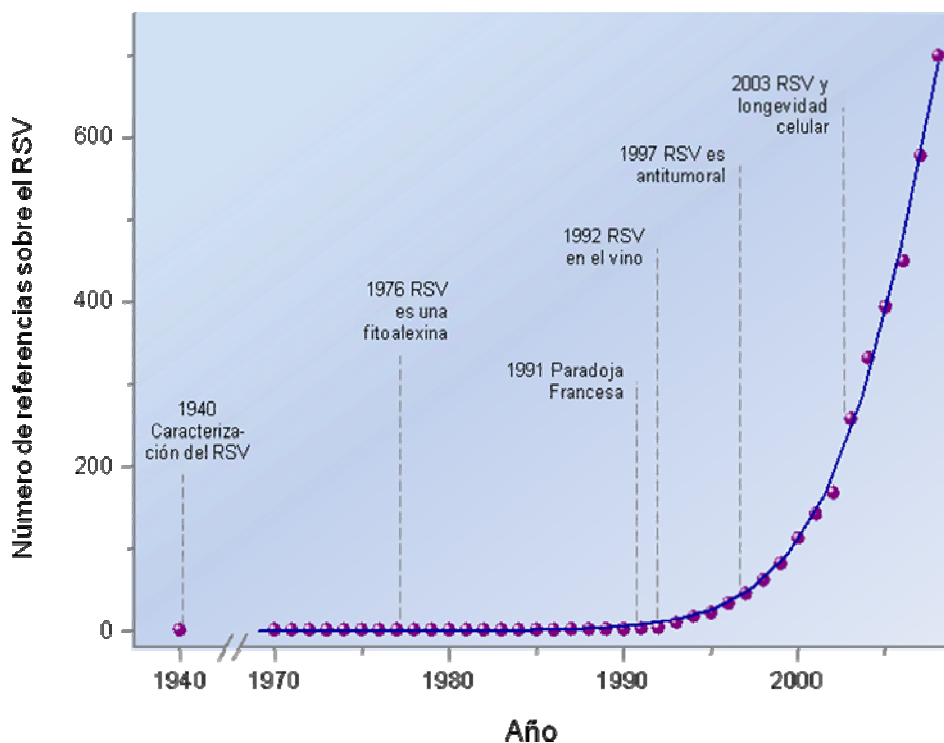


Figura 1. Número de referencias del RSV registradas en el motor de búsqueda PubMed en relación al año de publicación. La búsqueda se realizó empleando la palabra clave “resveratrol”. La gráfica muestra el ajuste sigmoideal (línea azul) del número de artículos identificados para cada año (puntos en púrpura) tras la creación de la base de datos Medline en 1963.

Es importante destacar que la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha han considerado únicamente al isómero *trans* (*t*-RSV), probablemente debido a que sólo este isómero se encuentra disponible de forma comercial y a que la presencia del isómero *cis* (*c*-RSV) en el vino fue descubierta más tarde (Jeandet *et al.*, 1993). En consecuencia, los conocimientos relativos a la actividad farmacológica que se tienen del *c*-RSV son mucho menores.

1.1. Características químicas del resveratrol

El RSV se encuentra ampliamente extendido en la naturaleza y se conocen multitud de análogos sintéticos o naturales, así como los isómeros, aductos, derivados y conjugados de éstos (Aggarwal *et al.*, 2004). Su estructura base consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forman el 3,4',5-trihidroxiestilbeno (peso molecular: 228,25 g/mol). Este doble enlace es el responsable de las formas isoméricas *cis* y *trans* del RSV (Figura 2). Sin embargo, el isómero *trans* es la forma más estable desde el punto de vista estérico (Trela y Waterhouse, 1996).

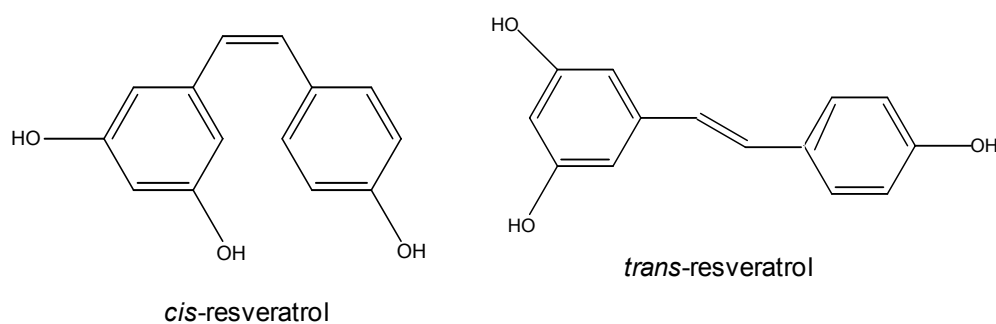


Figura 2. Estructuras químicas del *cis*-3,4',5-trihidroxiestilbeno (*cis*-resveratrol) y del *trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno (*trans*-resveratrol).

Combinando las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución con espectrofotometría ultravioleta (HPLC/UV) es posible separar los dos isómeros del RSV empleando etanol como solvente, ya que presentan distintas longitudes de onda de absorbancia máxima: 308 nm para el *t*-RSV y 288 nm para el *c*-RSV (Trela y Waterhouse, 1996). Además, ambos isómeros pueden identificarse claramente por resonancia magnética nuclear (Deak y Falk, 2003). El *t*-RSV es un sólido blanco con un punto de fusión de 253-255 °C, mientras que el *c*-RSV es un aceite. Los dos isómeros presentan una baja solubilidad en agua, pero son solubles en etanol y dimetilsulfóxido (DMSO).

Trela y Waterhouse estudiaron la estabilidad del RSV bajo diferentes condiciones y demostraron que el *t*-RSV es estable durante meses cuando se protege de la luz y no se somete a pHs alcalinos. El *c*-RSV es extremadamente fotosensible, pero permanece estable en la oscuridad a temperatura ambiente durante más de un

mes cuando se prepara en una solución de etanol al 50% en concentraciones comprendidas entre 5,3-52,8 μM (Trela y Waterhouse, 1996).

El RSV pertenece al grupo de las fitoalexinas, sustancias químicas de bajo peso molecular capaces de inhibir el progreso de ciertas infecciones y cuya acumulación en las plantas se produce por interacción de éstas con los microorganismos; es decir, su producción es consecuencia de un mecanismo de resistencia a los parásitos y otras condiciones adversas (Siemann y Creasy, 1992; Bavaresco *et al.*, 1999; Cassidy *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2000).

Para que una fitoalexina esté implicada en la resistencia a la enfermedad ha de cumplir una serie de requisitos: i) debe estar presente en aquellas partes de la planta invadidas por el patógeno; ii) tiene que encontrarse en concentraciones elevadas para inhibir el crecimiento del patógeno *in vivo*; iii) ha de acumularse el tiempo adecuado para que puedan observarse los efectos protectores; y iv) los cambios de concentración en la planta deben corresponderse con cambios en la susceptibilidad al patógeno.

El *t*-RSV cumple todos los requisitos anteriores (Hart, 1981), al igual que los derivados oligoméricos de éste (las viniferinas), sintetizados en las hojas de *V. vinifera* cuando la planta se infecta con *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* o *Uncinola necator*, o bien cuando se expone a radiación UV. Las hojas sanas de la planta *V. vinifera* carecen de *t*-RSV y de sus derivados, mientras que éstos abundan en la parte leñosa de la planta. Además, el *t*-RSV está presente en la piel de los frutos (uvas) y en las semillas.

La síntesis del *t*-RSV en las uvas se inicia con la biotransformación de la fenilalanina y tiene lugar mediante la condensación de una molécula de cumaril-CoA con tres de malonil-CoA, reacción catalizada por la resveratrol sintetasa, una enzima que pertenece a la familia de las estilbeno sintetisas (Figura 3).

Las plantas de la familia de las vitáceas poseen otra enzima, la chalcona sintetasa, que con la misma estequiometría que la resveratrol sintetasa (pero liberando tres moléculas de CO_2 en lugar de cuatro) da lugar a la chalcona naringenina, compuesto del que deriva la familia de los flavonoides (taninos y antocianos). Estos últimos son los responsables de la pigmentación y del sabor amargo de la piel de las uvas (Soleas *et al.*, 1997a).

Tanto la chalcona sintetasa como la resveratrol sintetasa son enzimas polipeptídicos de las plantas pertenecientes a la superfamilia de las chalconas sintetetas. Ambas enzimas son homodímeros de subunidades idénticas de 43 KDa y utilizan las mismas moléculas precursoras e igual mecanismo de reacción para crear un intermediario tetrapeptídico común. Posteriormente, cada enzima deberá conferir a este intermediario una conformación plegada diferente para facilitar la reacción de ciclación que origine la chalcona naringenina, o bien el *t*-RSV (Yamaguchi *et al.*, 1999).

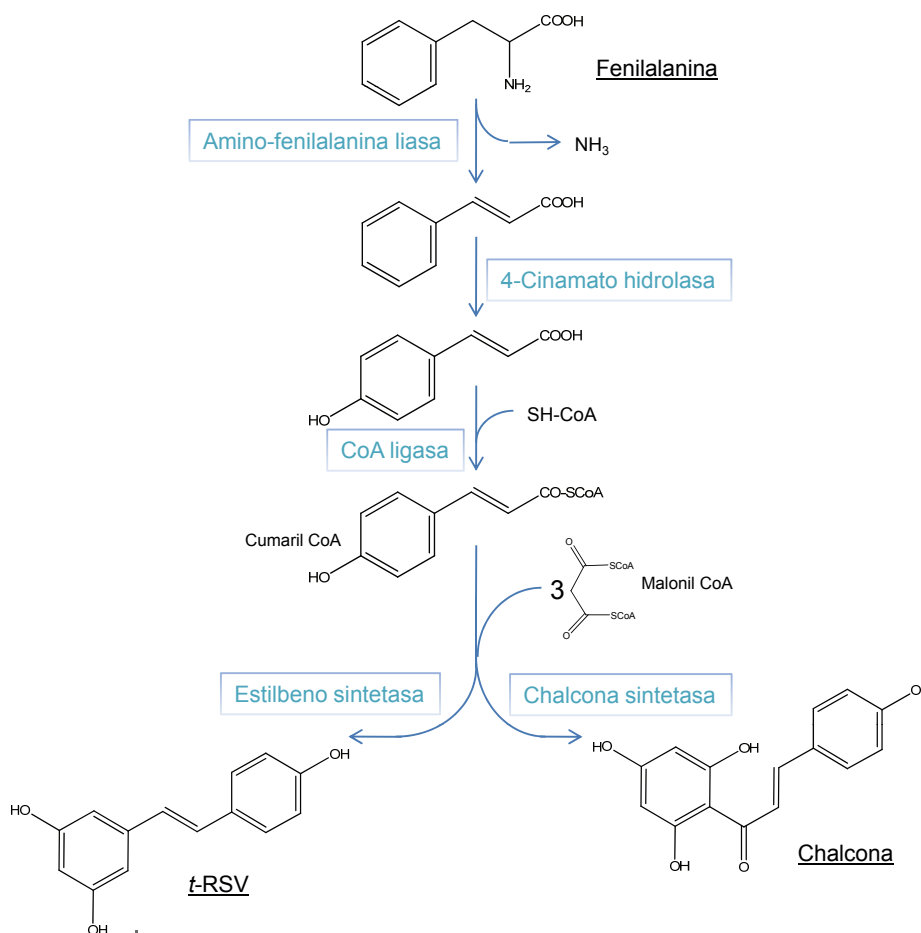


Figura 3. Biosíntesis del *t*-RSV y chalcona (metabolito precursor de la síntesis de los flavonoides) a partir del aminoácido fenilalanina en *V. vinifera* (Lanz *et al.*, 1991; Jeandet *et al.*, 2002).

La obtención del *c*-RSV a partir de *t*-RSV consiste en una fotorreacción con luz UV a la que se somete este último (Cantos *et al.*, 2000). La síntesis del *c*-RSV mediante este método se describe con detalle en un trabajo publicado por nuestro laboratorio (Leiro *et al.*, 2004).

1.2. Fuentes de resveratrol en la dieta humana

El *t*-RSV es un componente natural presente en el vino, fundamentalmente en el vino tinto (Siemann y Creasy, 1992; Soleas *et al.*, 1997b), pues para la elaboración de éste se emplea la uva entera, mientras que para la elaboración de vinos blancos, la piel, las semillas y parte de las flores (peciolos) se eliminan después de la extracción del jugo de las uvas. Aunque en la mayoría de los estudios el *c*-RSV no ha sido identificado en el extracto de uva (Palomino *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2002), en el vino están presentes los dos isómeros del RSV, siendo el *t*-RSV la forma más abundante (Gu *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2002). La síntesis del *c*-RSV probablemente ocurra durante el proceso de vinificación, sin llegar a alcanzar los niveles de concentración del isómero *trans* en el vino.

El RSV también está presente en multitud de frutos propios de la dieta humana, tales como arándanos, grosellas (*Vaccinium spp.*), moras (*Morus spp.*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*) y otras especies vegetales (*Cassia*, *Picea* y *Pinus spp.* entre otras) (Soleas *et al.*, 1997a; Sato *et al.*, 2000; Aggarwal *et al.*, 2004). La forma más abundante en la que se presentan los dos isómeros del RSV en la naturaleza es unida a azúcares simples, formando glucósidos, y su concentración en las plantas depende de numerosas variables. La humedad (el clima en general) y la presión fúngica son dos de los factores más importantes que influyen en el contenido de RSV en la vid (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Ferrero *et al.*, 1998). Además, como ya explicamos antes, el RSV es un compuesto que actúa como fungicida y su síntesis es inducida por infecciones causadas por diversos microorganismos. Otros factores que pueden influir en el contenido de RSV pueden ser la variedad de vid y el origen geográfico. No es objeto de este trabajo el describir los mecanismos que inducen la biosíntesis del RSV, aunque este tema ha sido tratado en detalle en la siguiente bibliografía (Soleas *et al.*, 2000; Delaunois *et al.*, 2009).

1.3. Metabolismo y biodisponibilidad

La biodisponibilidad y el metabolismo del RSV han sido ampliamente estudiados tanto en ratas como en humanos. Su eficacia depende de su absorción y metabolismo. Tras una administración oral se detectaron cantidades elevadas de RSV

en heces, orina y bilis, pero también en plasma, riñones, hígado, estómago e intestino (Jang *et al.*, 1997; Soleas *et al.*, 2002; Wenzel y Somoza, 2005; Wenzel *et al.*, 2005) que son los órganos donde la biodisponibilidad es mayor. Al igual que sucede con otros polifenoles de la dieta, el RSV sufre las reacciones de metabolización de fase II (conjugación) en el hígado, que principalmente dan lugar a la formación de los metabolitos glucurónidos (*trans*-resveratrol-3-O-glucurónido) y sulfatos (*trans*-resveratrol-3-sulfato, *trans*-resveratrol-4'-sulfato, *trans*-resveratrol-3,5-disulfato, *trans*-resveratrol-3,4'-disulfato y *trans*-resveratrol-3,4',5-trisulfato) (Soleas *et al.*, 2002; Wenzel y Somoza, 2005; Wenzel *et al.*, 2005). No hay indicios de que el RSV sufra reacciones de metabolización de fase I, dado que se ha localizado su estructura intacta en ciertos órganos (Vitrac *et al.*, 2003). La mayoría de los investigadores coinciden en la baja biodisponibilidad del RSV en plasma y tejidos (Wenzel y Somoza, 2005); sin embargo, Abd El-Mohsen y colaboradores demostraron que el ³H-*t*-RSV fue la forma mayoritaria en hígado, pulmones, corazón y cerebro tras una administración oral (Abd El-Mohsen *et al.*, 2006).

Cabría esperar que una dieta rica en grasas favoreciese la absorción y la biodisponibilidad del RSV, ya que se trata de un compuesto lipofílico. Sin embargo, Vitaglione y colaboradores demostraron que la absorción del RSV contenido en el vino administrado por vía oral en humanos es independiente del contenido de lípidos en la dieta (Vitaglione *et al.*, 2005).

A pesar de su baja biodisponibilidad, el RSV ha demostrado presentar actividades cardioprotectoras (Wu *et al.*, 2001; Das y Maulik, 2006) y antitumorales en ratas (Udenigwe *et al.*, 2008), aunque no se ha encontrado acumulación del estilbeno en los tejidos enfermos, donde necesariamente debe producirse la actividad (van Ginkel *et al.*, 2007).

1.4. Efectos farmacológicos del resveratrol

Actualmente, la comunidad científica muestra un gran interés por el RSV dado que presenta una amplia variedad de actividades biológicas como la antioxidante, la antiinflamatoria, la vasorrelajante, la antiagregante plaquetaria, la estrogénica, la anticancerígena y la antimicrobiana. En las páginas siguientes nos centraremos en

aquellas actividades y efectos farmacológicos relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares (para una revisión más exhaustiva, ver Campos-Toimil *et al.*, 2008). Los efectos farmacológicos principales derivados de estas actividades pueden resumirse en efectos antiinflamatorios, cardioprotectores, y vasorrelajantes. En la última parte de este apartado comentaremos brevemente los efectos antitumorales que han hecho del RSV una molécula con potencial terapéutico conocida no sólo a nivel científico, sino también por la sociedad en general.

1.4.1. Efectos antiinflamatorios

La inflamación es un fenómeno de respuesta inmune que tiene lugar tras una lesión o infección de un tejido y consiste en una actividad aumentada de los leucocitos que producen y liberan especies reactivas del oxígeno (ROS), leucotrienos y enzimas proteolíticas lisosomales capaces de producir daño vascular e influir en la activación de las plaquetas y las células endoteliales. Una inflamación puede ser el origen de multitud de enfermedades diferentes, tales como la aterosclerosis, el cáncer o enfermedades autoinmunes. La inflamación juega un papel clave en la aterosclerosis, pues contribuye desde el primer momento al estancamiento de lípidos oxidados y otros elementos en el seno de los vasos sanguíneos. Recientemente, conforme aumentan los conocimientos relativos a la fisiopatología de la aterosclerosis, se ha descubierto que los procesos inflamatorios median las fases fisiológicas de esta enfermedad cardiovascular (Vidavalur *et al.*, 2006; Das y Maulik, 2006). La actividad antiinflamatoria del *t*-RSV podría estar relacionada con el papel de éste en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Jang *et al.*, 1999; Fremont, 2000).

Se ha descrito que el *t*-RSV inhibe la liberación de las ROS y disminuye las funciones trombogénicas de los leucocitos (Rotondo *et al.*, 1998). En cultivo de fibroblastos se ha observado que el *t*-RSV suprime la producción de las ROS y que este efecto está relacionado con una disminución en la síntesis de ácido araquidónico (Andriambelason *et al.*, 1998a) y la posterior formación de prostaglandinas (PGs) (Martínez y Moreno, 2000).

Cavallaro *et al.* (2003) han demostrado que el *t*-RSV inhibe la generación de $O_2^{\bullet-}$ en los neutrófilos humanos estimulados, pero es inefectivo cuando estas células

se encuentran en estado de reposo. Además, disminuye la producción de ácido hipocloroso (HOCl) y de óxido nítrico (NO^{*}). Esto contribuye a su papel protector en patologías tales como la inflamación y el cáncer.

Los principales sistemas enzimáticos implicados en la síntesis de mediadores proinflamatorios tales como el ácido 5-hidroxi-6,8,11,14-eicosatetraenoico (5-HETE), el tromboxano A₂ (TxA₂), las prostaglandinas (PG) y el ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico (HTT) son los relacionados con la actividad de la ciclooxigenasa (COX) y con la enzima lipoxigenasa (LOX) (Pervaiz, 2003). En una serie de experimentos, Kimura demostró que el *t*-RSV inhibe la formación del 5-HETE, del HTT y del tromboxano B₂ (un producto formado a partir del TxA₂) por los leucocitos de rata (Kimura *et al.*, 1985). Otros estudios han atribuido la actividad antiinflamatoria de este estilbeno a su capacidad para inhibir selectivamente la actividad de la COX-1 (Schwartz *et al.*, 2000; Szewczuk *et al.*, 2004). Este hallazgo ha sido confirmado en estudios posteriores que demuestran que el *t*-RSV y otras *m*-hidroquinonas son inactivadores selectivos de la COX-1 (Szewczuk *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores han encontrado que el *t*-RSV inhibe la actividad de la COX-2 y la transcripción genética de esta enzima (Subbaramaiah *et al.*, 1998; Martínez y Moreno, 2000).

1.4.2. Efectos cardioprotectores

Se ha descrito que el *t*-RSV reduce las arritmias ventriculares y, como ya se ha mencionado anteriormente es efectivo en la prevención de la aterosclerosis. El *t*-RSV influye sobre la proliferación y el ciclo celular de los cultivos de células musculares lisas. Varios autores han descrito que es capaz de retrasar el desarrollo de la aterogénesis inhibiendo la proliferación de células vasculares lisas inducida por el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Jang *et al.*, 1997; Araim *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Dong y Ren, 2004; Delmas *et al.*, 2005). Es por ello que muchos grupos de investigación estudian los posibles efectos del *t*-RSV en la aterogénesis y en la inhibición del desarrollo de diferentes tipos de cáncer (ver apartado 1.4.4). En una serie de ensayos *in vivo* se observó que la administración crónica de *t*-RSV prevenía el aumento de la presión sistólica y la hipertrofia cardíaca en ratas alimentadas con

fructosa (Miatello *et al.*, 2005). Además, el *t*-RSV disminuye la incidencia de la isquemia coronaria, tanto aguda como crónica.

Los mecanismos celulares que favorecen el origen de una isquemia no se conocen con precisión, pero se sabe que ciertos mensajeros y proteínas pueden contribuir a su desarrollo. Algunos de los factores celulares que se ven alterados durante un proceso isquémico son el NO[•], ciertas enzimas antioxidantes, los receptores de adenosina, el factor nuclear *kappa* B (NFκB), la COX-2, y muchas proteínas cinasas como la proteína cinasa C (PKC) (Smani *et al.*, 2008).

El preconditionamiento isquémico se define como la protección adquirida por el corazón tras haber sufrido breves episodios isquémicos subletales. En clínica el preconditionamiento isquémico suele inducirse quirúrgicamente, aunque también puede ser inducido farmacológicamente con diferentes agentes como el monofosfolípido A (MLA). Diversos estudios *in vivo* han demostrado que el *t*-RSV disminuye el tamaño de infarto y la apoptosis de los cardiomiocitos (Das y Maulik, 2006; Das, 2006). Se ha descrito al *t*-RSV como un agente “precondicionante” farmacológico al relacionarlo con sus efectos activadores de los receptores de adenosina 1 y 3 (A₁ y A₃) (Das *et al.*, 2005b) y su capacidad de activar la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) en el miocardio isquémico (Hattori *et al.*, 2002; Das *et al.*; 2005a). Sin embargo, el *t*-RSV disminuye la expresión de iNOS en el corazón sano. Además de los mecanismos mencionados, los efectos preconditionantes del *t*-RSV implican la movilización de multitud de vías de señalización celular como la potenciación de señales de supervivencia, la modulación de la apoptosis, la potenciación de la vía de señalización de las MAP cinasas (MAPK) y la activación de la PKC (Das y Maulik, 2006; Das, 2006).

No debemos olvidar que las acciones cardioprotectoras atribuidas al *t*-RSV son también consecuencia de los efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiagregantes, antiproliferativos musculares y de su acción sobre el metabolismo lipídico. El *t*-RSV es capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por el ácido araquidónico (Kimura *et al.*, 1985); así como por la trombina y el ADP (Pace-Asciak *et al.*, 1995a). Además, se cree que el *t*-RSV también podría contribuir a la prevención de la formación de trombos, puesto que es capaz de inhibir la expresión del factor tisular

tanto en células endoteliales (Davis *et al.*, 2006) como en monocitos (Pendurthi *et al.*, 1999; Di Santo *et al.*, 2003).

Además, tanto el *t*-RSV como el *c*-RSV se comportan como agonistas estrogénicos (Gehm y Levenson, 2006). Sin embargo, dependiendo de la concentración, ambos isómeros pueden actuar como antagonistas estrogénicos (Basly *et al.*, 2000); por lo que resulta muy difícil evaluar el balance de actividad estrogénica/antiestrogénica del RSV desde el punto de vista de sus efectos cardioprotectores.

A su vez, todos estos efectos forman parte de otras acciones beneficiosas del RSV como las relacionadas con su actividad neuroprotectora o antineoplásica (ver apartado 1.4.4).

1.4.3. Efectos vasorrelajantes

El *t*-RSV (1-30 μ M) induce vasorrelajación en anillos de arteria aorta de rata (Gojkovic-Bukarica *et al.*, 2008), de cerdo (Li *et al.*, 2005) y de cobaya (Naderali *et al.*, 2000) precontraídos con fenilefrina. Estos efectos podrían contribuir a la acción cardioprotectora mediante la disminución de la resistencia periférica y la presión arterial, y subsecuentemente, la disminución del volumen de eyección y la hipertrofia cardíaca.

Este efecto vasorrelajante inducido por *t*-RSV (Su *et al.*, 2005) es observable en anillos de aorta desprovistos de endotelio, por lo que se ha descrito como un mecanismo independiente del endotelio. Sin embargo, existe un componente importante dependiente de endotelio que puede observarse con dosis $<30 \mu$ M (Chen y Pace-Asciak, 1996); por lo que estos autores concluyen que el *t*-RSV actúa mediante mecanismos indirectos (relajación mediada por NO^{*}) y mecanismos vasodilatadores directos.

El laboratorio del Dr. Nguyen-Duong evaluó los efectos vasorrelajantes del *t*-RSV sobre arterias coronarias porcinas. Este grupo de investigación sugirió que dicha relajación era debida a las acciones no genómicas derivadas de la interacción del *t*-RSV con receptores esteroideos presentes en la membrana plasmática (MP) (Jager y Nguyen-Duong, 1999). Naderali también estudió los mecanismos de relajación del *t*-

RSV en diferentes vasos sanguíneos con dos poblaciones de ratas (sanas e hipercolesterolémicas) y concluyó que tales efectos eran mucho mayores en las arterias que oponen mayor resistencia (arterias mesentéricas) que en las arterias de elevada capacidad de conductancia (Lungu *et al.*, 2004). Además, dichos efectos no eran mediados por prostanoïdes, pero sí podían estar mediados por el NO[•] (Naderali *et al.*, 2000). En otro trabajo posterior, estos autores describen mecanismos de relajación diferentes para las ratas sanas y las ratas hipercolesterolémicas. Observaron que los efectos de relajación máximos ejercidos por el RSV sobre las arterias mesentéricas no eran modificados en las ratas hipercolesterolémicas que presentaban una disfunción endotelial, lo que indica un mecanismo independiente de endotelio. Por otra parte, los efectos de relajación producidos en las ratas sanas eran casi totalmente bloqueados por el éster metílico de N-NITRO-L-arginina (L-NAME), lo que indica un mecanismo dependiente de endotelio (Naderali *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios sobre los efectos vasorrelajantes del RSV en anillos de aorta de rata han sido realizados con el isómero *trans* y, por tanto, es mucho menos lo que se conoce acerca de los efectos del *c*-RSV. El Dr. Orallo ha revisado recientemente de los efectos farmacológicos del *c*-RSV (Orallo, 2006). Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio indican que los efectos vasorrelajantes del *c*-RSV (al contrario que los del *t*-RSV) son independientes de endotelio (Fraiz *et al.*, 2004). El *c*-RSV no afecta a la respuesta contráctil inducida por ácido ocadaico (1 µM), aunque sí relaja de forma dependiente de la concentración los anillos de aorta de rata precontraídos con noradrenalina (NA, 1 µM), acetato de miristato de forbol (PMA, 1 µM), o medio despolarizante con elevada concentración de KCl (60 mM). Los estudios comparativos entre el *c*-RSV y el *t*-RSV realizados en nuestro laboratorio parecen indicar que los efectos vasorrelajantes son similares, pero no idénticos para los dos isómeros. Probablemente, el efecto vasorrelajante del *t*-RSV se deba mayoritariamente a su capacidad para inhibir la oxidasa NADH/NADPH y la subsecuente disminución en la producción de O₂^{•-}, lo que favorece una potenciación de la biosíntesis de NO[•] (Orallo y Camiña, 1998; Zhang *et al.*, 2008). Los efectos vasorrelajantes del *c*-RSV parecen ser independientes de endotelio y podrían estar relacionados con la inhibición de la actividad de la PKC en alguno de los pasos del proceso de contracción de la fibra muscular.

Diferentes grupos de investigación estudiaron los efectos vasorrelajantes de una mezcla de polifenoles contenidos en el vino tinto (RWPC, del inglés *Red Wine Polyphenol Compounds*). Los RWPC aumentan la producción de NO[•] mediante el aumento de la expresión y la actividad de la eNOS endotelial (eNOS, ver más adelante) en células endoteliales de arterias pulmonares (Hsieh *et al.*, 1999) y en células HUVEC (Wallerath *et al.*, 2003). El *t*-RSV parece ser el polifenol más activo en la estimulación de la actividad de la eNOS, aunque no es suficiente para explicar el efecto estimulador total que se alcanza con el RWPC (Wallerath *et al.*, 2005). La estimulación de la eNOS inducida por *t*-RSV también ha sido descrita por otros grupos (Rakici *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002) que observaron dichos efectos en diferentes lechos vasculares (arteria mamaria interna humana y en anillos de vena safena).

El tono vascular depende directamente de la concentración intracelular de Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_i) en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos. Por ello, cualquier acción del *t*-RSV relacionada con la señalización cálcica de la maquinaria contráctil podría estar relacionada con los efectos vasodilatadores independientes de endotelio. No son muchos los trabajos relativos a las propiedades antagonistas del Ca²⁺ inducidas por el RSV sobre el sistema cardiovascular presentes en la bibliografía. El grupo del Dr. Wang investigó los efectos del *t*-RSV sobre la [Ca²⁺]_i empleando microscopía confocal. En miocitos ventriculares de rata observaron que el *t*-RSV bloquea los canales de Ca²⁺ operados por voltaje (VOCC) y la actividad tirosina cinasa, además de disminuir la liberación de Ca²⁺ de reservorios sensibles a rianodina (Liu *et al.*, 2005). Posteriormente, el mismo laboratorio, empleando la técnica de *patch-clamp* en célula única, publicó que el *t*-RSV inhibe la activación de VOCC en cardiomiocitos ventriculares y que además, ralentiza la recuperación de la inactivación de estos canales (Zhang *et al.*, 2006a). Dicho mecanismo podría estar relacionado con una inhibición de la actividad tirosina cinasa.

Se ha descrito que el *t*-RSV inhibe el aumento de la [Ca²⁺]_i inducido por agonistas en leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Rotondo *et al.*, 1998) y que puede bloquear la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular en plaquetas humanas estimuladas con trombina (Dobrydneva *et al.*, 2002). Sin embargo, experimentos realizados con ⁴⁵Ca²⁺ en anillos de aorta de rata parecen indicar que el efecto

vasorrelajante del *t*-RSV no está relacionado con el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular (Orallo y Camiña, 1998).

1.4.4. Efectos antitumorales

El RSV ha demostrado presentar actividad antineoplásica en las tres etapas principales (inicio, diferenciación y progresión) de distintos tipos de tumores (Jang *et al.*, 1997). El RSV actúa como un agente antioxidante y promueve la actividad de enzimas que participan en la fase II del metabolismo de fármacos, por lo que contribuye a bloquear la etapa de inicio de la carcinogénesis. Además, es capaz de inhibir la COX y la hidroxiperoxidasa (por lo que también es considerado un agente anti-inflamatorio) y esto explica su capacidad para inhibir la diferenciación en células tumorales. Por otra parte, el RSV frena la división celular de una línea de leucemia mielocítica, por lo que contribuye a detener la progresión del tumor (Jang *et al.*, 1997).

Además de estos efectos, el RSV (50 μM) indujo la muerte celular en modelos animales de neuroblastoma humano (van Ginkel *et al.*, 2007) y a concentraciones más elevadas (Joy *et al.*; 2006) en células cancerosas de colón (Trincheri *et al.*; 2007). También ha demostrado inhibir la progresión del cáncer de mama a concentraciones inferiores a 1 μM tras 48 h de exposición (Su *et al.*, 2007).

Se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos para evaluar los efectos antitumorales del RSV, sólo o acompañado con otros nutrientes. Algunos de éstos pueden ser consultados en la página web del Instituto Nacional de Salud Norteamericano (<<http://clinicaltrials.gov/ct2/search>>). Estos ensayos pretenden aclarar los mecanismos de acción y la potencial actividad quimioprotectora del RSV. Desde el punto de vista nutricional, no es sencillo determinar la cantidad de vino (cacahuets u otros alimentos) que debemos consumir al día para lograr dicha protección, pues la concentración de RSV varía mucho entre unos vinos y otros. Además, el RSV es metabolizado en el hígado por lo que la mayor parte aparece en forma de derivados mono-/di-glucurónidos y sulfatos en el plasma sanguíneo. Por este motivo, muchos autores consideran recomendable que se profundice en los estudios *in*

vitro sobre los metabolitos del RSV generados en los mamíferos (Aggarwal y Shishodia, 2006).

En resumen, teniendo en cuenta los antecedentes científicos relacionados con los efectos del RSV sobre los sistemas biológicos, no hay duda de que esta molécula, o los productos comerciales que la contienen (vino tinto), podrían llegar a ser empleados como agentes terapéuticos.

2. La homeostasis cálcica en células vasculares

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular que, caracterizado por su ubicuidad, controla multitud de procesos bioquímicos, y está implicado en diversos mecanismos fisiológicos como la secreción, la comunicación celular, la contracción muscular, la división y la diferenciación celulares (Lodish *et al.*, 2000). Además, muchas patologías como la hipertensión, el fallo cardíaco congestivo, la enfermedad maniaco-depresiva y el Alzheimer se caracterizan por presentar los mecanismos de regulación cálcica alterados (Berridge, 2008).

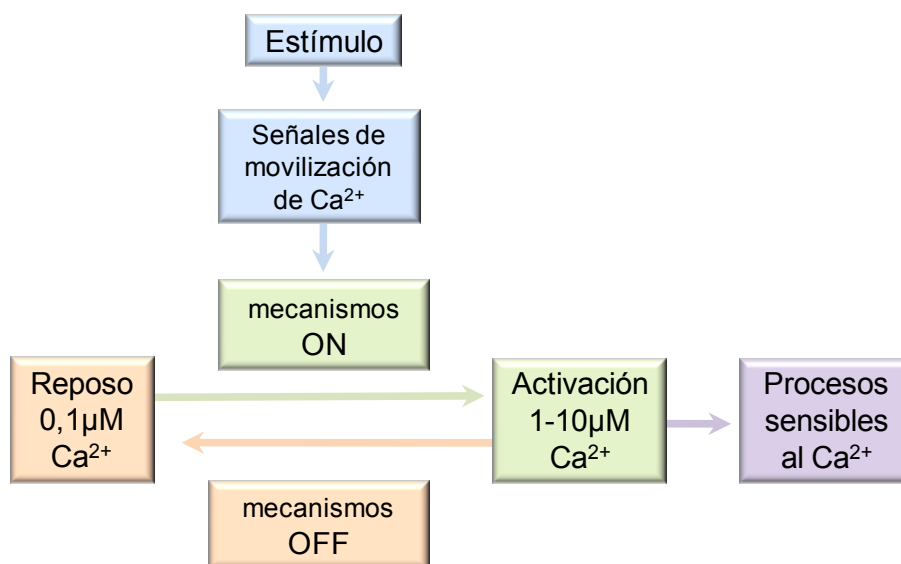


Figura 4. Elementos de señalización cálcica. Los estímulos (agonistas del Ca^{2+}) actúan sobre las señales de movilización del Ca^{2+} que, a su vez, estimulan los mecanismos de activación (mecanismos ON) implicados en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este aumento induce la estimulación de diversos procesos sensibles al Ca^{2+} que desencadenan la activación de diferentes vías celulares. La respuesta finaliza con los mecanismos de desactivación (mecanismos OFF) responsables de la recuperación de los niveles cálcicos en reposo. Figura modificada de Berridge, 2000.

El Ca^{2+} es, por tanto, un elemento de transducción celular básico finamente controlado por multitud de componentes de señalización intracelular. En los subapartados siguientes se describirán brevemente los elementos principales que contribuyen a aumentar o disminuir los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, destacando los principales mecanismos de activación (ON) y desactivación (OFF) que integran la red de señalización cálcica presentes en las células vasculares endoteliales y musculares lisas (Figura 4) (Berridge *et al.*, 2000).

En situación de reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células es del orden de $0,1 \mu\text{M}$, pero se activan cuando estos niveles alcanzan valores de 1 hasta $10 \mu\text{M}$. El hecho de que un único mensajero intracelular pueda controlar tanta variedad de procesos se debe a la versatilidad de los mecanismos de la señalización del Ca^{2+} en términos de rapidez, amplitud y patrón espacio-temporal. Esta versatilidad surge del empleo de una gran variedad de elementos moleculares implicados en la señalización intracelular que, a su vez, forman parte de la red de señalización cálcica (*Ca²⁺ signalling toolkit*) y pueden coordinarse de diferentes maneras para crear señales cálcicas con diferentes perfiles espaciales y temporales.

Berridge y Bootman describieron la red de señalización cálcica de una manera sencilla y sintética en cuatro unidades funcionales (Berridge *et al.*, 2000): i) elementos que desencadenan la movilización del Ca^{2+} como consecuencia a un estímulo, ii) mecanismos de activación (mecanismos ON) que aumentan los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos, iii) procesos sensibles al Ca^{2+} que son activados por este segundo mensajero, y iv) mecanismos de inactivación (OFF), constituidos por bombas e intercambiadores, que permiten regresar a la situación de reposo. La relación funcional entre los distintos elementos se ilustra en la figura 5, que refleja los múltiples componentes por los que está constituida la red de señalización cálcica.

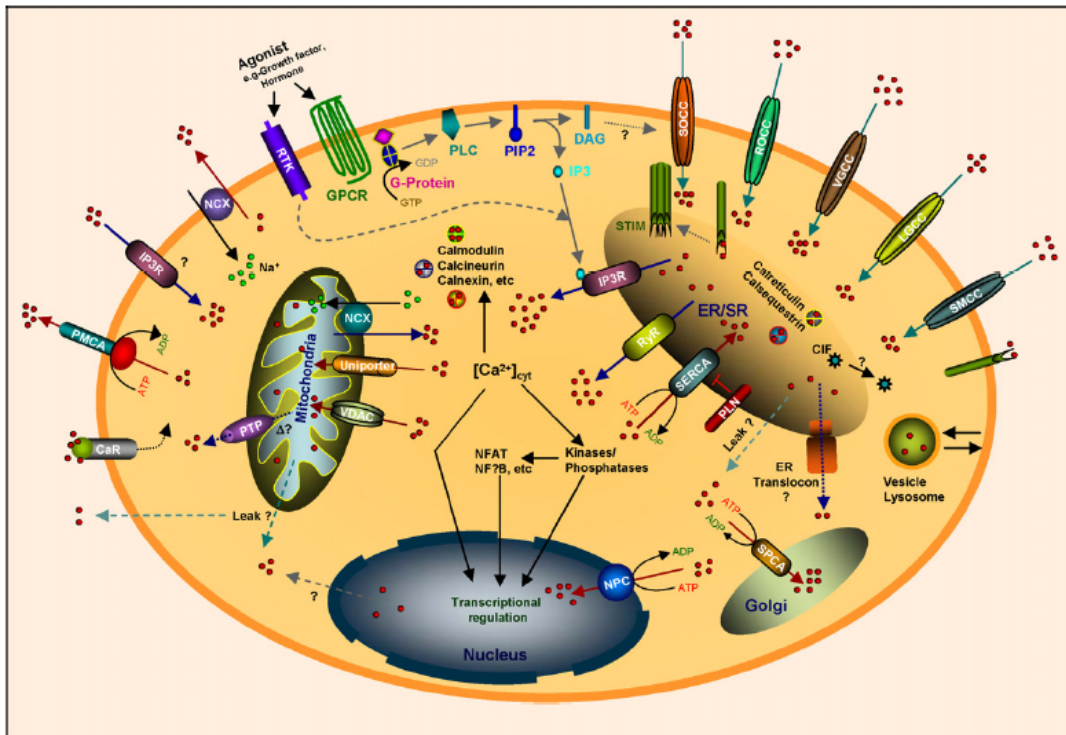


Figura 5. Elementos generales implicados en la señalización cálcica. Las células presentan una extensa maquinaria de regulación cálcica que puede combinarse de distintas formas para producir señales cálcicas de diferente naturaleza. Las señales de movilización del Ca²⁺ son generadas por estímulos que actúan a través de diferentes receptores de la MP, incluyendo a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y los receptores con actividad tirosina cinasa (RTK). Algunas de las señales generadas son el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), la ADP ribosa cíclica (cADPR), el ácido nicotínico dinucleótido fosfato (NAADP), y la esfingosina-1-fosfato. Los mecanismos ON incluyen los canales de Ca²⁺ presentes en la MP que responden a neurotransmisores o a diferencias de potencial, como los presentes en las membranas intracelulares (receptor de IP₃-IP₃R, receptor de rianodina-RyR, receptor de NAADP, y la proteína del RE que media la liberación del Ca²⁺ inducida por esfingolípido-SCAMPER). El aumento de los niveles de Ca²⁺ citoplasmáticos activa diversos sensores de Ca²⁺ capaces de desencadenar una amplia variedad de procesos sensibles al Ca²⁺ dependiendo del perfil de la señal y del tipo celular. Los mecanismos OFF bombean el Ca²⁺ fuera de la MP (intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y la Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática-PMCA), o hacia el interior del RE (Ca²⁺-ATPasa del RE). TnC, troponina; CaM, calmodulina; MLCK, cinasa de la cadena ligera de la miosina; CAMK, cinasa dependiente de Ca²⁺-CaM; NOS, sintetasa de óxido nítrico; PKC, proteína cinasa C; MPTP, poro de permeabilidad transitoria mitocondrial). Figura tomada de Pani y Singh, 2009.

2.1. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$

La $[Ca^{2+}]$ en el medio extracelular es muy superior (1-2 mM) a la $[Ca^{2+}]_i$ (0,1 μ M) de una célula que se encuentra en situación de reposo. Este gradiente de concentración se mantiene gracias a la actuación de una serie de mecanismos homeostáticos que se mencionarán más adelante.

En las células musculares lisas la principal función del Ca^{2+} es la contracción. Para que se produzca una activación de la maquinaria contráctil es necesario que la $[Ca^{2+}]_i$ se incremente hasta un rango de entre 1 y 10 μ M (Bolton, 1979; Marin, 1993). La $[Ca^{2+}]_i$ puede incrementarse por una liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, o bien por una entrada del catión en la célula a través de canales específicos existentes en la membrana plasmática, aunque en la mayoría de los casos el Ca^{2+} procede de ambas rutas. En la célula lisa vascular el Ca^{2+} externo puede entrar durante la despolarización de la membrana plasmática, mediante estímulos mecánicos o por agonistas.

Un aumento en los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales vasculares provoca la liberación de mediadores paracrinos; y ésta es probablemente la función principal del Ca^{2+} en este tipo celular. Sin embargo, este segundo mensajero participa en multitud de procesos tanto en células endoteliales como en las musculares lisas, incluyendo la proliferación celular, la activación de diversos sistemas enzimáticos y la apoptosis.

Niveles muy elevados de la $[Ca^{2+}]_i$ pueden resultar en muerte celular, por lo que es fundamental que los mecanismos homeostáticos de regulación cálcica funcionen correctamente.

2.1.1. *Entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática*

En algunos tejidos la entrada de Ca^{2+} extracelular es relativamente sencilla. En células que funcionan desarrollando pequeñas señales eléctricas, como las neuronas presentes en vasos sanguíneos, el Ca^{2+} puede entrar a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje activados por estas señales. Esto tiene lugar, por ejemplo, en las sinapsis, donde el Ca^{2+} necesario para la liberación del neurotransmisor entra al

abrirse canales de Ca^{2+} activados por voltaje en respuesta al cambio en la polaridad eléctrica de la membrana (potencial de acción). Sin embargo, existen mecanismos de entrada de Ca^{2+} más complejos, algunos de ellos no del todo bien conocidos. A continuación se explican brevemente los mecanismos de activación de algunos de los canales presentes en las células vasculares.

i. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC).

Estos canales constituyen la vía de entrada de Ca^{2+} más importante en células musculares lisas. Una despolarización, es decir, una variación del potencial de membrana hacia valores más positivos, puede inducir la apertura de estos canales, generando así un flujo de entrada de Ca^{2+} que permite la activación de la maquinaria contráctil. La presencia de este tipo de canales ha sido demostrada en gran cantidad de células musculares lisas, tanto vasculares como no vasculares. Se ha descrito la existencia de varios tipos de VOCC caracterizados por métodos farmacológicos y electrofisiológicos. Estos canales, presentes en diferentes tipos celulares, se designan con las letras L, T, R, N, P y Q (Dolphin, 1995), sin embargo en las células musculares lisas sólo se han identificado tres de estos tipos de canales: L, T y R (Ong y Barritt, 2004).

Canales operados por voltaje tipo L

Su denominación procede del inglés *long-lasting large capacitance* (larga duración y gran capacitancia). Este tipo de canales ha sido caracterizado electrofisiológicamente en gran número de preparaciones, siendo los mayoritarios y los más importantes desde el punto de vista funcional en células musculares lisas con fenotipo contráctil, y su presencia se correlaciona con la expresión de genes específicos característicos de la maquinaria contráctil como la α -actina de músculo liso (SM α -actin) y la cadena pesada de miosina (Gollasch *et al.*, 1998).

Canales operados por voltaje tipo T

Su nombre deriva del término inglés *transient* (transitorio). Su inactivación es muy rápida y parece ser únicamente dependiente de voltaje. Se cree que están implicados en el inicio del potencial de acción de células musculares lisas con actividad espontánea. A diferencia de los canales de tipo L, su estructura molecular no se conoce bien (Ong y Barritt, 2004). La función de estos canales no está del todo

clara, aunque diferentes estudios sugieren que los canales tipo T están implicados en la potenciación de la proliferación celular de las células musculares lisas (Rodman *et al.*, 2005; Cribbs, 2006; Braunstein *et al.*, 2009).

Canales operados por voltaje tipo R

Su nombre deriva del término inglés *resting* (reposo). Han sido identificados en células musculares lisas de aorta y de arterias renales. Su papel fisiológico no se conoce con exactitud. Se ha planteado la posibilidad de que este tipo de canales estén implicados en la entrada permanente de Ca^{2+} en la célula durante la fase de contracción tónica que tiene lugar en preparaciones de músculo liso por despolarización con concentraciones extracelulares elevadas de K^+ (Kawanabe *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2008).

ii. *Canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCC)*

Se ha descrito que diversos agonistas son capaces de inducir una contracción en células lisas completamente despolarizadas. A partir de estos y algunos otros datos, diversos autores plantearon la existencia de un tipo de canales de Ca^{2+} de estructura similar a los operados por voltaje, cuya activación se debe únicamente a la interacción de un agonista con su receptor de membrana (van Breemen y Saida, 1989). Por ejemplo, el ATP liberado por neuronas del sistema nervioso autónomo puede provocar un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la entrada de Ca^{2+} a través de canales P2X (Loirand y Pacaud, 1995; Large, 2002). Los principales neurotransmisores simpáticos endógenos que estimulan células musculares lisas en mamíferos son la noradrenalina y el ATP.

Según William Large (2002), dentro de los ROCC podemos distinguir canales activados por ligando como el clásico P2X, presente en células musculares lisas, y otros canales asociados a proteínas G. De cualquier modo, este autor se refiere a estos canales de forma general como canales catiónicos no selectivos permeables al Ca^{2+} y operados por receptor. La característica principal de estos canales es la presencia de un canal iónico permeable a cationes monovalentes y divalentes, pero además, todos muestran una permeabilidad para el Ca^{2+} suficiente como para activar la maquinaria de la contracción.

Además se han descrito otros tipos de canales que pueden considerarse ROCC, como los llamados canales operados por segundos mensajeros (SMOCC, del inglés *second messenger operated Ca²⁺ channel*). En este grupo se consideran todos aquellos canales a través de los cuales entra Ca²⁺ en el citoplasma como consecuencia de la interacción de un mensajero con su receptor. No se conoce con exactitud si la interacción de un agonista con su receptor puede producir directamente una despolarización de la MP (Pacaud *et al.*, 1991). De todas formas, la despolarización puede ser indirecta; así se ha propuesto que la activación de un receptor por su agonista, y la subsiguiente liberación de Ca²⁺ de sus depósitos intracelulares, puede dar lugar a la apertura de canales catiónicos no específicos que provoquen una despolarización de la membrana, con la subsiguiente apertura de VOCC.

Algunos autores identifican a los ROCC con los canales receptores transitorios de potencial (TRP, del inglés *transient receptor potential*) de tipo 6 (TRP6) en el músculo liso vascular (Jung *et al.*, 2002). Sin embargo, estos canales también han sido propuestos como posibles canales operados por depleción (ver más adelante).

iii. Canales catiónicos no selectivos (NSCC) sensibles a estímulos mecánicos.

Determinados estímulos mecánicos también pueden activar la apertura de canales catiónicos en células musculares lisas. El hinchamiento de células musculares de arterias mesentéricas provoca un aumento de la permeabilidad del Ca²⁺ que puede ser bloqueado por Gd³⁺ (Setoguchi *et al.*, 1997). Los canales activados por distensión mecánica no son selectivos para el Ca²⁺, por lo que se consideran canales catiónicos no selectivos.

iv. Canales operados por depleción (SOCC)

En las células endoteliales vasculares, así como en muchos otros tipos celulares, se ha observado un mecanismo de entrada de Ca²⁺ extracelular distinto a los mencionados anteriormente. Estudios en los años 80 pusieron de manifiesto que la entrada se activaba cuando los depósitos intracelulares se vaciaban. Los canales de este tipo que mejor se conocen son los canales de Ca²⁺ activados por liberación de Ca²⁺ (CRAC, del inglés *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels*), aunque existen otros que han sido identificados recientemente, de los que se hablará más adelante. En 1986, el Dr. J.W. Putney acuñó el término entrada capacitativa de Ca²⁺ (CCE) para designar

un modelo según el cual el grado de deplección/llenado de los depósitos regularía la apertura/cierre de los canales de la membrana (Putney, Jr., 1986; Putney, Jr., 1990). La CCE no sólo interviene en el llenado de los reservorios intracelulares, si no que además, está implicada en la regulación fina de multitud de procesos celulares. La activación de los SOCC se inicia con la unión de un agonista (hormona o factor de crecimiento) a un receptor (GPCR o RTK). La activación del receptor dispara una cascada de señalización que termina con la síntesis de DAG e IP₃ mediada por la PLC. El IP₃ se une a receptores de IP₃ localizados en el RE y de este modo se produce la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares. La deplección de estos depósitos de Ca²⁺ inicia una vía de señalización (todavía no del todo conocida) que resulta en la activación de los SOCC. Por lo tanto, la activación de los SOCC viene determinada por el contenido de Ca²⁺ del RE.

Desde entonces, y casi durante 20 años, dos cuestiones fundamentales en torno a la CCE han permanecido sin respuesta: i) la identidad molecular de los SOCC y ii) los mecanismos concretos que conducen a la apertura de los canales SOC tras la deplección del RE.

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar cómo se transfiere dicha información desde el RE hasta la MP. Sin embargo, gracias a la contribución de determinados hallazgos recientes, en la actualidad, tan sólo se mantienen dos modelos generales. El primero establece que se produce una interacción directa entre el canal SOC (CRAC) localizado en la MP y el receptor de IP₃ del RE tras la deplección de Ca²⁺ en el RE, por lo que fue denominado modelo del acoplamiento conformacional (*Conformational Coupling*) por Dr. Robert Irvine y más tarde modificado por el Dr. Michael Berridge (Figura 6.A) (Irvine, 1990; Berridge, 1995). El segundo implica la actuación del factor de entrada de Ca²⁺ (CIF, *Ca²⁺ influx factor*) que es liberado desde el RE como consecuencia de la deplección para activar los SOCC en la MP (Figura 6.B). La idea del CIF fue introducida por el Dr. Takemura (Takemura *et al.*, 1989), pero en la actualidad el máximo representante de este modelo es el grupo de la Dra. Victoria Bolotina de la Universidad de Boston (Bolotina, 2008). Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan esta teoría como el aislamiento del CIF a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, a pesar de que todavía no se conoce la identidad

molecular de este mensajero intracelular (Randriamampita y Tsien, 1993; Csutora *et al.*, 1999; Trepakova *et al.*, 2000).

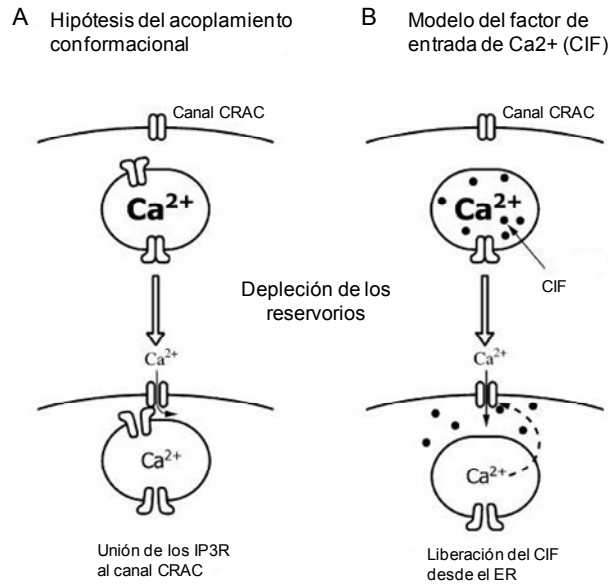


Figura 6. Hipótesis contemporáneas propuestas para explicar el mecanismo de activación de la CCE. A. Hipótesis del acoplamiento conformacional (Berridge, 1995). Según la cual se establece el contacto directo entre los receptores de IP_3 del RE y los canales CRAC. Esto implica el desplazamiento del RE periférico hacia la MP para que el acoplamiento tenga lugar. B. Modelo del factor de la entrada de Ca^{2+} (Randriamampita y Tsien, 1993). Este modelo establece que al reducirse el contenido de Ca^{2+} de los depósitos se genera una señal o mensajero químico (denominado CIF) que difunde hacia la MP y activa la apertura de los SOCC.

En los últimos años se han producido grandes avances en el descubrimiento de la composición molecular y los mecanismos de activación de CCE. Empleando técnicas de cribado con RNA de interferencia (iRNA) cuatro laboratorios independientes consiguieron identificar dos de los genes implicados en la CCE inducida por tapsigargina: Stim1 y Orai1 (Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006b; Vig *et al.*, 2006; Feske *et al.*, 2006). Stim1, una proteína del RE que contiene un único dominio EF (domino estructural propio de proteínas de unión al Ca^{2+}), es un sensor de largo alcance capaz de oligomerizar y reorganizarse en zonas concretas de la MP tras la depleción de los reservorios y de algún modo activar a Orai1, la subunidad formadora del poro de los SOCC de la MP. Los mamíferos presentan dos isoformas de

Stim (Stim1 y Stim2), y tres isoformas de Orai (Dehaven *et al.*, 2007), que se expresan de forma ubicua en diversos tipos celulares. Además, recientemente se ha identificado a la fosfolipasa $A_2\beta$ (iPLA 2β , isoforma independiente de Ca^{2+}) como un componente esencial en la transducción de la señal desde el RE a los canales de la MP.

La identificación de los canales TRPC (especialmente los TRPC1 y TRPC4) como miembros de los SOCC también ha supuesto un avance en la comprensión del mecanismo de activación de los SOCC. Todavía no se conoce la estructura molecular de los SOCC en los diferentes tipos celulares, aunque distintos grupos de investigación han mostrado claras evidencias de que algunos TRPC y Orai actúan como elementos de los canales SOCC, ya sea conjuntamente o de forma independiente (Ambudkar, 2006; Ong *et al.*, 2007; Pani *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008). La familia de los canales iónicos TRP en los humanos está constituida por 27 miembros que pertenecen a 7 subfamilias. Todos estos canales tienen seis dominios transmembrana con los extremos C y N terminales orientados hacia la cara citosólica (Venkatachalam y Montell; 2007).

A pesar de los hallazgos recientes, los mecanismos de la CCE siguen siendo uno de los enigmas más intrigantes en el campo de la señalización cálcica (Bolotina, 2008). La entrada de Ca^{2+} a través de estos canales está implicada en multitud de procesos patológicos (hipertensión, inflamaciones como la pancreatitis, muerte celular, etc.), por lo que comprender bien los mecanismos de regulación de la CCE podría contribuir a mejorar el tratamiento de dichas enfermedades.

2.1.2. Liberación del Ca^{2+} almacenado

El principal reservorio de Ca^{2+} celular es el RE. En esta organela la $[Ca^{2+}]$ puede llegar a alcanzar los 15 mM (Iino, 1990; Sanders, 2001), lo que supone entre cientos o miles de veces la del citosol. Esta gran capacidad de almacenamiento se debe a la existencia en el RE de ciertas proteínas fijadoras de Ca^{2+} como la calreticulina y la calsecuestrina.

Se han descrito dos tipos de receptores en la membrana del RE que a su vez pueden actuar como canales de liberación de Ca^{2+} intracelular:

i. Receptor de IP_3 (IP_3R)

Un mecanismo muy común por el cual se generan señales cálcicas es la activación de receptores que están acoplados a la fosfolipasa C (PLC). La unión de un agonista a su receptor de membrana genera unos cambios conformacionales que provocan la activación de la PLC. La PLC genera inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), molécula de pequeño tamaño que difunde a gran velocidad por el citosol y se une a su receptor específico situado en la membrana del RE denominado receptor del IP_3 (IP_3R) (Berridge, 1993; Clapham, 1995a; Clapham, 1995b). La activación del IP_3R permite la salida del Ca^{2+} desde los depósitos al citosol, lo que conduce al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. La forma de liberación de Ca^{2+} característica de estos canales es conocida con el nombre de *puff*. Los IP_3R s se sensibilizan al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ moderadamente por encima de los niveles de reposo; sin embargo, el Ca^{2+} tiene un efecto bifásico, por lo que un incremento mucho mayor en la $[Ca^{2+}]_i$ bloquea la apertura del canal (Bootman *et al.*, 2001; Lipskaia y Lompre, 2004).

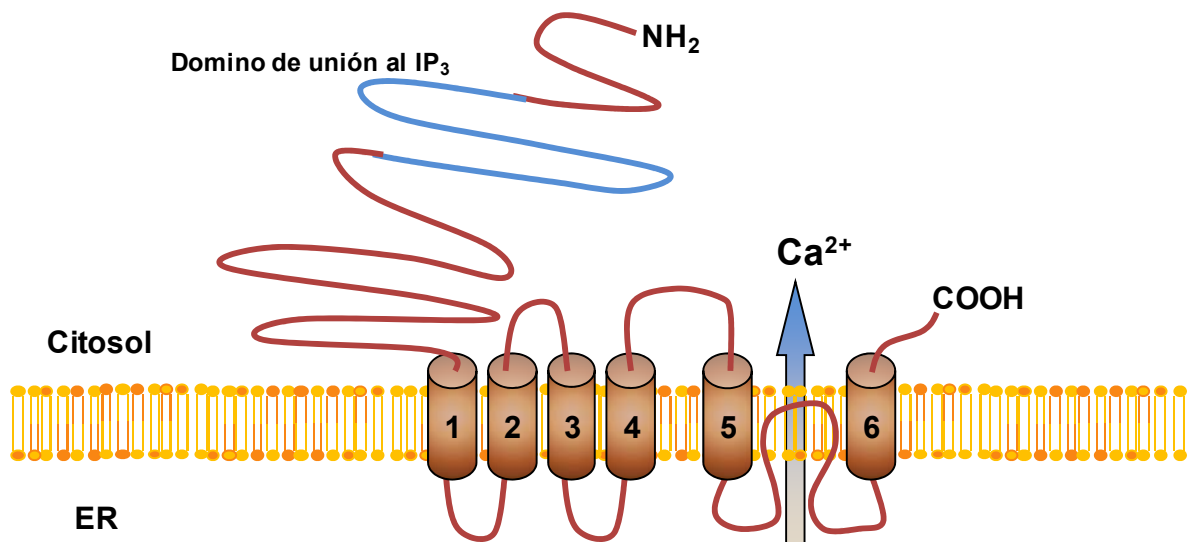


Figura 7. El IP_3R es un heterotetrámero constituido por cuatro subunidades como la que se representa en esta figura. Cada subunidad está constituida por seis dominios transmembrana. La topología del canal de Ca^{2+} está definida por las cuatro subunidades agrupadas de tal modo que los dominios transmembrana 5 y 6 están localizados en la cara interior del poro, mientras que los dominios 1, 2, 3 y 4 se encuentran en el exterior.

El IP_3R pertenece a la superfamilia de los canales iónicos de seis dominios transmembrana (Figura 7). Se han identificado tres isoformas de este receptor con

diferente distribución tisular en los mamíferos (Mikoshiha, 2007). El canal Ca^{2+} es un tetrámero constituido por cuatro subunidades agrupadas de tal modo que los dominios transmembrana 5 y 6 están localizados en la cara interior del poro, mientras que los dominios 1, 2, 3 y 4 se encuentran en el exterior. Tanto el extremo amino terminal como el extremo carboxilo terminal están en la cara citosólica. En el extremo amino terminal está localizada el dominio de unión al IP_3 (*IP₃-binding core domain*) y el lugar de unión al Ca^{2+} . En el extremo carboxilo terminal está localizado el dominio compuerta (*gatekeeper domain*). Recientemente se ha descrito que este receptor también puede estar localizado en la MP (Taylor y Dellis, 2006; Dellis *et al.*, 2008).

ii. Receptor de Rianodina (RyR)

Los RyR son canales localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) que liberan Ca^{2+} al citosol. La liberación de Ca^{2+} a través de estos canales genera señales cálcicas conocidas con el nombre de *sparks*. Los RyR son sensibles a la cafeína y al alcaloide rianodina; aunque el principal activador de estos canales es el Ca^{2+} citoplasmático (del orden nM o μM). Por este motivo, los RyRs están considerados como los canales de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o CICR (del inglés *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*). Su principal modulador alostérico fisiológico es la ADP-ribosa cíclica (cADPR, *cyclic ADP-ribose*), sintetizada a partir del NAD^+ (dinucleótido de nicotín-adenina) por el enzima ADP-ribosil ciclase, aunque la proteína cinasa A (PKA) también está implicada en la regulación de este canal. La cADPR incrementa la sensibilidad del RyR por el Ca^{2+} , lo que induce la CICR, mientras que la PKC disminuye la sensibilidad del RyR por el Ca^{2+} . Se conocen tres isoformas de RyR (RyR1, RyR2 y RyR3), siendo las isoformas RyR1 y 3 las más abundantes en el músculo liso (Zhang *et al.*, 1999; House *et al.*, 2008). El paso de células musculares lisas de aorta a condiciones *in vitro* supone una modificación en el fenotipo celular. Las células pierden su capacidad contráctil y desarrollan un fenotipo proliferativo (House *et al.*, 2008). Esta modificación coincide con la pérdida de la expresión de RyR3 y la consecuente pérdida del mecanismo CICR (Vallot *et al.*, 2000).

2.2. Mecanismos de descenso de la $[Ca^{2+}]_i$

Además de los mecanismos que median el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, en la homeostasis cálcica participan un conjunto de mecanismos cuyo último fin es mantener el estado de reposo o de la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Por ello, las células disponen de sistemas para retirar el Ca^{2+} del citosol y así, evitar su potencial toxicidad. Estos sistemas están constituidos por transportadores proteicos que expulsan el Ca^{2+} al exterior celular, o bien bombas que recaptan Ca^{2+} en reservorios intracelulares, donde este ión se asocia a ciertas proteínas con elevada afinidad.

2.2.1. Salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática

i. Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA)

El principal mecanismo de expulsión de Ca^{2+} de la membrana plasmática es la bomba PMCA. Se cree que este transporte no afecta al gradiente electrónico de la membrana, puesto que el Ca^{2+} bombeado hacia el exterior celular es intercambiado por dos protones. La expulsión de Ca^{2+} supone una disminución del pH en el citoplasma que es compensada por el intercambiador Na^+/H^+ . No existen inhibidores específicos para la PMCA, pero su actividad puede ser bloqueada con inhibidores no selectivos como los lantánidos.

ii. Intercambiador Na^+/Ca^{2+}

Para expulsar Ca^{2+} de forma muy rápida, algunas células musculares lisas cuentan con el intercambiador Na^+/Ca^{2+} que utiliza la energía del gradiente electroquímico del Na^+ para transportar tres Na^+ al interior de la célula mientras expulsa un Ca^{2+} . La contribución relativa del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en la expulsión de Ca^{2+} parece variar entre diferentes tipos de preparaciones.

Tanto este intercambiador como la PMCA permanecen en continuo funcionamiento, incluso mientras se están produciendo modificaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ como las oscilaciones cíclicas de Ca^{2+} (Tepikin *et al.*, 1992).

2.2.2. Recaptación de Ca^{2+} por parte de los reservorios

Estos mecanismos, además de reducir la $[Ca^{2+}]_i$, devuelven la capacidad de respuesta a las células. Las dos estructuras celulares que contribuyen en mayor medida al mantenimiento de la homeostasis cálcica son el retículo endoplasmático (RE) en las células endoteliales o retículo sarcoplásmico (RS) en los miocitos vasculares y la mitocondria (ver apartado siguiente). Aunque el término RS se emplea específicamente para referirse al retículo de las células musculares, puesto que presenta características morfológicas propias; en este trabajo nos referiremos a esta organela con el término RE indistintamente, ya se trate de un miocito o de otro tipo celular.

El RE es el principal reservorio de Ca^{2+} celular, y por tanto, la organela más importante en el mantenimiento de la $[Ca^{2+}]_i$. La membrana del RE no es permeable al Ca^{2+} , de manera que existe una bomba selectiva para el Ca^{2+} denominada Ca^{2+} -ATPasa del RE o SERCA, que genera y mantiene un gradiente de concentración 10.000 veces mayor dentro del retículo con respecto al citoplasma. Esta proteína está codificada por tres genes (SERCA1, 2 y 3) localizados en diferentes cromosomas. Existen multitud de variantes *splicing* para esta proteína, por lo que se conocen más de 10 isoformas de la SERCA presentes en distintos tejidos y estados de desarrollo (Periasamy y Kalyanasundaram; 2007). Las isoformas de la SERCA se diferencian por su resistencia al estrés oxidativo, su afinidad al Ca^{2+} y su modulación por la proteína fosfolamban (PLN) y la cinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII). La actividad de la SERCA depende básicamente de su interacción con la PLN. Cuando la PLN está desfosforilada interacciona con la SERCA inhibiendo la actividad de la bomba. Por el contrario, cuando la PLN es fosforilada (acción llevada a cabo por la PKA) se disocia de la SERCA y aumenta el transporte de Ca^{2+} hacia el RE (MacLennan *et al.*, 2003). Esta bomba de Ca^{2+} puede ser inhibida de forma selectiva por el ácido ciclopiazónico (CPA).

2.3. Papel de la mitocondria y el núcleo en la homeostasis cálcica

Las mitocondrias intervienen decisivamente en el abastecimiento energético de la célula mediante la producción de ATP, y en la regulación de los niveles de

segundos mensajeros como el Ca^{2+} o especies reactivas del oxígeno (ROS). Además, se ha observado que las mitocondrias intervienen en fases iniciales del proceso de muerte celular programada o apoptosis (Pinton *et al.*, 2008). Su capacidad de asociación a los microtúbulos las convierte en orgánulos móviles, capaces de desplazarse activamente por el citoplasma (Alonso *et al.*, 2006).

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la homeostasis celular del Ca^{2+} (capaces de precipitar Ca^{2+} en su matriz en forma de fosfatos) al captar o liberar grandes cantidades de este catión cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se eleva o desciende respecto de determinados valores críticos. Estos valores críticos están en relación con las afinidades relativas de los sistemas de transporte iónico presentes en la mitocondria (Hajnoczky *et al.*, 1995). Al objeto de poder soportar el gradiente electroquímico necesario para desempeñar su función energética, la membrana mitocondrial interna, debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, es especialmente impermeable a los iones. Por el contrario, la membrana externa es más permeable y, debido a la presencia de la porina, un canal aniónico dependiente de voltaje, permite el paso de metabolitos con pesos moleculares de hasta 6000 Da. Se han descrito tres sistemas de transporte implicados en la entrada y salida de Ca^{2+} en las mitocondrias: el uniportador de Ca^{2+} , el intercambiador de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ y el intercambiador de $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ (Figura 8). En determinadas ocasiones, la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria puede producirse a través del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP) (Hoth *et al.*, 2000). La transferencia local de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria permite la liberación de Ca^{2+} del RE y el aumento de los niveles cálcicos en el lumen de la mitocondria, necesario para la activación del ciclo de Krebs y la generación de ATP. Por otra parte, la propagación de la señal de Ca^{2+} citosólico a la mitocondria puede iniciar la muerte celular a través de la apertura del MPTP.

Las mitocondrias también están implicadas en la regulación de la CCE. La regulación mitocondrial de los SOCC ha sido demostrada tanto por métodos electrofisiológicos como fluorimétricos (Hoth *et al.*, 2000; Gilibert y Parekh, 2000; Gilibert *et al.*, 2001).

La señalización cálcica en el núcleo de la célula tiene efectos directos sobre la transcripción génica y el crecimiento celular; y éstos son diferentes a los efectos

producidos por la señalización cálcica citoplasmática. Sin embargo, aunque se sabe que la regulación de la homeostasis cálcica nuclear es independiente del Ca^{2+} citosólico, los mecanismos que controlan dicha regulación no se conocen en profundidad. Los sistemas de transporte de Ca^{2+} presentes en la envoltura nuclear juegan un importante papel en la regulación de la señalización cálcica en el núcleo. Además, el núcleo contiene proteínas que regulan y responden a cambios en la concentración de Ca^{2+} nuclear (Malviya y Rogue, 1998; Echevarria *et al.*, 2003). El Ca^{2+} nuclear puede provenir del Ca^{2+} citosólico, que entra en el núcleo por difusión pasiva a través del poro nuclear (NPC, *nuclear pore complex*); o bien, ser liberado desde los reservorios nucleares (a través de IP_3R de la propia membrana u, ocasionalmente, mediante RyR) localizados en el lumen de la envoltura nuclear (EN), en continuidad con el RE. En cualquier caso, la señal de Ca^{2+} nuclear se propaga por el nucleoplasma por difusión simple. A continuación, este Ca^{2+} sale al citoplasma por el NPC, o vuelve a los depósitos de Ca^{2+} nuclear mediante la NCA (Ca^{2+} -ATPasa nuclear) o por continuidad con el lumen del RE (Malviya y Rogue, 1998).

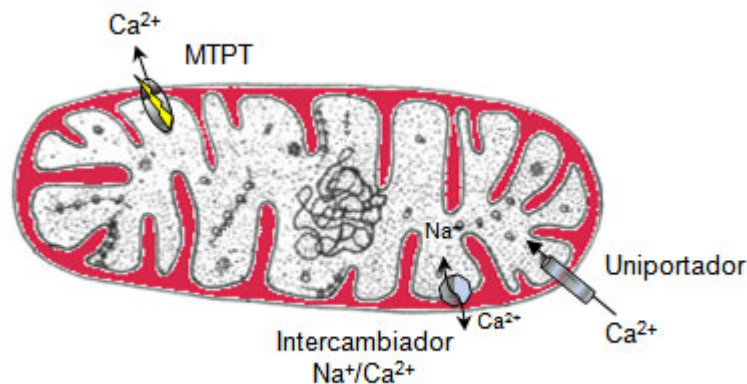


Figura 8. Mecanismos implicados en la regulación mitocondrial de la concentración de Ca^{2+} citosólico. MPTP: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. El mecanismo de salida de Ca^{2+} en las mitocondrias de los hepatocitos tiene lugar a través del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y es independiente de la concentración de Na^+ citosólica.

En resumen, para desarrollar el amplio rango de señales de Ca^{2+} que se conocen, las células de nuestro organismo cuentan con un delicado y complejo conjunto de sistemas de transporte de Ca^{2+} que modula un auténtico lenguaje celular,

rico en matices e implicaciones y todavía profundamente incomprendido en algunos aspectos.

2.4. Microdominios de regulación cálcica

Multitud de elementos que participan en la homeostasis cálcica han sido localizados en ciertos microdominios de la membrana plasmática conocidos como caveolas. Las caveolas con un tipo particular de *lipid rafts* (o balsas lipídicas que actúan como organizadoras de la señalización celular en un compartimento celular concreto) que se caracterizan por contener la proteína caveolina y una composición lipídica rica en colesterol y esfingolípidos (ver apartado 3 de la Revisión Bibliográfica). Las caveolas reúnen multitud de moléculas de señalización en una zona concreta y relativamente pequeña de la membrana, lo que contribuye a una transducción de señales eficaz desde el exterior celular al interior y viceversa.

Muchos de los elementos bioquímicos que albergan las caveolas están relacionados con la regulación de la homeostasis cálcica. De este modo, el IP₃R de tipo I ha sido localizado en caveolas de células endoteliales y de músculo liso mediante técnicas de inmunomarcaje. Aunque la gran mayoría de los IP₃R se encuentran en el RE, diferentes grupos de investigación han descrito su presencia en la MP (Fujimoto *et al.*, 1992; Dellis *et al.*, 2006).

Las caveolas también son microdominios enriquecidos en la bomba ATPasa de Ca²⁺ de la MP (PMCA) cuya concentración es de 18 a 25 veces mayor que en otras regiones de la MP (Fujimoto *et al.*, 1992). Las técnicas de fraccionamiento celular han contribuido a desvelar la localización de ciertos miembros de la familia de canales TRP. Tanto el TRP1 como el TRP3 se localizan en las caveolas y podrían estar directamente implicados en el origen de las oscilaciones cálcicas (Torihashi *et al.*, 2002). Además, existen varios elementos de la señalización cálcica que están asociados a caveolina (la proteína marcadora de las caveolas), tales como la proteína G_{αq/11} y la PLCβ. Por tanto, las caveolas albergan la maquinaria molecular necesaria para secuestrar y descargar Ca²⁺ en el citoplasma celular (Isshiki y Anderson, 2003).

Como hemos visto, existe una gran diversidad de señales cálcicas dentro de un mismo tipo celular. El amplio rango de señales cálcicas se encuentra finamente coordinado por una serie de canales, bombas, intercambiadores iónicos, proteínas de unión al Ca^{2+} y tampones localizados en un microdominio celular.

Uno de los procesos bioquímicos que tiene lugar exclusivamente en las caveolas es la compleja regulación de la sintetasa óxido nítrico endotelial (eNOS). Esta enzima está asociada a caveolas, al igual que muchas proteínas que intervienen en su regulación. Su actividad es dependiente del Ca^{2+} y puede verse modificada por multitud de agonistas y otros factores (Apartado 4.3 de la Revisión Bibliográfica).

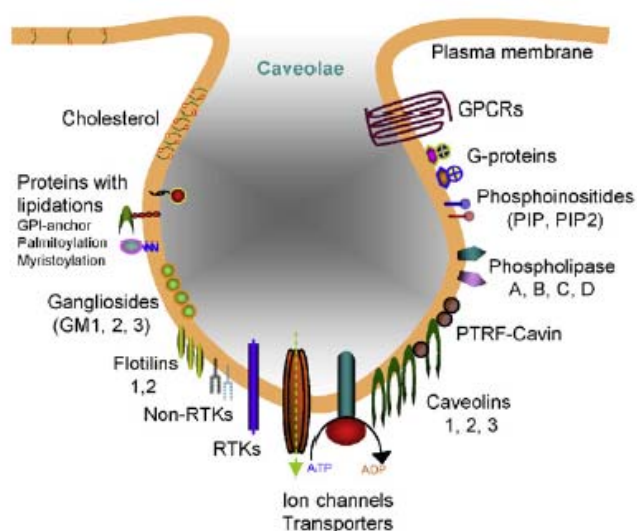


Figura 9. Estructura esquemática de una caveola. En la figura se representan algunos de los elementos celulares implicados en la homeostasis cálcica característicos de las caveolas. Figura tomada de Pani y Singh, 2009.

De hecho, la regulación de la actividad enzimática de la eNOS sólo puede tener lugar en las caveolas, pues son microdominios de membrana que reúnen diversos elementos de la señalización implicados en la homeostasis cálcica, en la fosforilación y consecuente activación de la eNOS, en el anclaje de la enzima, en la inhibición de su actividad, etc. De este modo dicha regulación puede ser llevada a cabo de forma eficiente (Pani y Singh, 2009). En la figura 9 se representan algunos de los elementos celulares implicados en la homeostasis cálcica localizados en las caveolas (GPCRs, proteínas G, PIP/PIP₂, fosfolipasas, caveolinas, canales iónicos,

transportadores, PMCA, IP₃, eNOS, STIM1, PKC, CAMKII, TRPC1/4/6, flotilinas, anexinas,...).

La proximidad que se establece entre los distintos elementos de la regulación cálcica en las caveolas es fundamental para que exista un correcto funcionamiento en la transducción de señales implicadas en la homeostasis cálcica. De no existir estos microdominios muchas de las respuestas celulares se verían alteradas, como demuestran las anomalías fisiológicas que aparecen en ratones *knockout* (KO) para la caveolina (Apartado 3.5 de la Revisión Bibliográfica).

En la sección siguiente se describe en mayor detalle la composición, la morfología y la funcionalidad de los microdominios caveolares. Posteriormente, se discutirá la necesidad celular de las caveolas para llevar a cabo determinados procesos de señalización como la regulación de la homeostasis del NO^{*} en el sistema cardiovascular (Apartado 4 de la Revisión Bibliográfica).

3. Las caveolas en el sistema cardiovascular

En la actualidad, la composición de la MP sigue definiéndose como una estructura fluida, donde tanto las proteínas integrales como los lípidos, dispuestos en una organización de mosaico, pueden realizar movimientos de translación dentro de la bicapa. Este modelo fue introducido por Singer y Nicholson hace casi cuarenta años y fue denominado modelo del mosaico fluido (Singer y Nicholson, 1972). Sin embargo, las MP de los mamíferos presentan una naturaleza altamente heterogénea donde los lípidos y proteínas no se encuentran distribuidos uniformemente. Por ello, a esta definición hay que añadir un nuevo concepto físico: el estado de “líquido ordenado”. Se habla, por tanto, de dos estados, definidos como “líquido ordenado” y “líquido desordenado”, que coexisten en la MP. Dicho de otro modo, en las membranas biológicas existen unas ínsulas rígidas (líquido ordenado), ricas en colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomieline) dentro de un mar de fosfolípidos (líquido desordenado). Estas ínsulas fueron denominadas de forma genérica “*lipid rafts*” (balsas lipídicas) y representan microdominios de membrana discretos que actúan como organizadores de la señalización celular.

En multitud de publicaciones de las últimas décadas el término *lipid raft* aparece confuso e inconcreto. De hecho, científicos de diferentes campos no llegaban a un acuerdo para su definición. En el año 2006 tuvo lugar el Simposio Internacional de Keystone sobre *lipid rafts* y función celular (23-28 de marzo de 2006; Steamboat, Springs, Colorado) que reunió a expertos bioquímicos, biofísicos y biólogos celulares con el objetivo de discutir sobre la estructura y las funciones de los *lipid rafts* (Pike, 2006). De esa fructífera reunión surgió una definición consensuada de lo que denominaremos una “balsa membrana” (del inglés *membrane raft*): pequeños microdominios (10-200 nm), ricos en colesterol y esfingolípidos, altamente dinámicos y capaces de compartimentalizar procesos celulares (Pike, 2006).

El elevado contenido en colesterol y ácidos grasos saturados favorece la estructura rígida de las balsas membrana, mientras que otras zonas de la MP (líquido desordenado) son ricas en fosfolípidos insaturados (fosfolípidos *cis*-insaturados). Tanto el colesterol como los ácidos grasos saturados proporcionan un mayor grado de

empaquetamiento molecular (Brito *et al.*, 2002) y una mayor temperatura de fusión ($T_m > 41^\circ\text{C}$ respecto a $T_m < 0^\circ\text{C}$ para los fosfolípidos) (Schroeder *et al.*, 1994). Por otra parte, el elevado contenido en colesterol y glucoesfingolípidos es lo que confiere a las balsas membrana su característica insolubilidad a los detergentes no iónicos como el Triton X-100 a 4°C , así como una menor densidad con respecto a la fase líquida desordenada. Estas dos propiedades de las balsas membranas hacen posible su aislamiento por gradientes de sacarosa. Es importante destacar que las técnicas para el estudio y aislamiento de las balsas membrana está bastante desarrollada en la actualidad (Munro, 2003; Parton y Hancock, 2004; Henderson *et al.*, 2004); sin embargo, esto no era así hace una década, por lo que muchos de los trabajos publicados deben ser revisados con detalle (Apartado 3.4 de Revisión Bibliográfica).

3.1. Características generales de las caveolas

3.1.1. Descubrimiento y morfología

Las caveolas fueron identificadas en los años 50 por microscopía electrónica de transmisión (TEM) como invaginaciones de la membrana plasmática en la superficie de células endoteliales y epiteliales. Estas vesículas plasmáticas con un tamaño de 50 a 100 nm se denominaron *plasmalemmal vesicles* o *caveolae intracellulare* por su similitud con una cueva (Palade, 1953; Yamada, 1955). Tienen una apariencia lisa por lo que son fácilmente diferenciables de las “vesículas densas”, que son vesículas de clatrina (una proteína implicada en procesos de endocitosis y tráfico vesicular). Posteriormente se observó que las caveolas presentan morfologías variadas, como grupos de pequeñas vesículas próximas a la MP, asociadas formando rosetas, racimos de uva, e incluso cisternas y tubos transcelulares (Figura 10). Estas formas no tradicionales de las caveolas se encuentran en diferentes tejidos. Los racimos son abundantes en las células musculares, las rosetas en los adipocitos y los túbulos vesiculares en las células endoteliales. Estas invaginaciones y vesículas no son estáticas y pueden fusionarse con otras estructuras de membrana y otros orgánulos celulares, dejando de ser estrictamente caveolas.

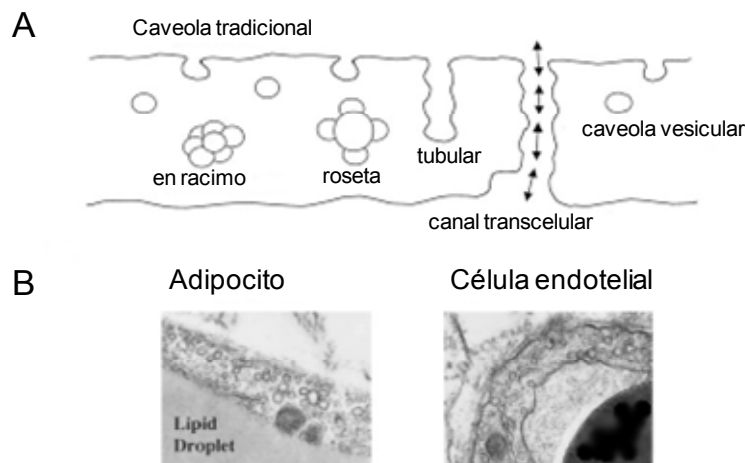


Figura 10. Diversidad morfológica de las caveolas. A. Alternativas morfológicas de las caveolas distintas a la invaginación de la membrana tradicional. B. Imágenes de microscopía electrónica de diferentes formas de caveolas presentes en un adipocito y una célula endotelial. Figura modificada de Razani *et al.*, 2002b.

Existen multitud de publicaciones sobre la morfología de las caveolas en diferentes tipos celulares (Popescu *et al.*, 2006); sin embargo, se conoce muy poco sobre su papel funcional, y mucho menos, sobre las funciones específicas de las diversas formas de caveolas. En consecuencia, el papel funcional de las organelas celulares asociadas a caveolas tampoco se conoce.

3.1.2. Distribución celular

Las caveolas se visualizaron por primera vez en células endoteliales de los capilares sanguíneos (Palade, 1953) y en células epiteliales de la vesícula biliar de ratón (Yamada, 1955). Desde entonces, se han identificado caveolas en multitud de tipos celulares. De hecho, en la actualidad se sabe que las caveolas aparecen en la mayoría de las células diferenciadas y que su presencia varía a lo largo del ciclo celular. Citando algunos ejemplos, las caveolas se presentan en adipocitos, en células endoteliales, en pneumocitos tipo I del pulmón (donde son muy abundantes), y en células musculares lisas y estriadas. Debido a su abundancia en las células endoteliales y en los pneumocitos tipo I, dos constituyentes mayoritarios de los alvéolos, los pulmones destacan como una de las fuentes principales de caveolas identificables en los análisis ultraestructurales. El hecho de que las caveolas

incrementen la superficie celular, tal como se observa en las microfotografías tomadas con microscopios electrónicos de transmisión (TEM), sugiere que las caveolas están implicadas en procesos de transporte macromolecular y mecanotransducción.

3.1.3. *Propiedades bioquímicas*

Como ya se ha mencionado, una visión más contemporánea del aspecto de la MP establece que las proteínas se encuentran distribuidas de forma mucho más heterogénea y pueden formar agregados (*clusters*) en microdominios organizados, llamados en principio *lipid rafts* y más recientemente balsas membrana (*membrane rafts*). Se cree que estas balsas membrana se forman por agregación con glucoesfingolípidos y esfingomielinea en el aparato de Golgi (donde se mantienen ensambladas mediante interacciones moleculares débiles y transitorias) y luego son dirigidas a la MP a modo de parche (van Meer y Burger, 1992).

Las caveolas son un tipo de balsas membrana que se caracterizan por contener una proteína específica, la caveolina (cav), y por presentar en general una morfología fácilmente identificable. Las caveolas han sido consideradas tradicionalmente como una forma invaginada y vesicular específica de las balsas membrana, y aunque hay proteínas que están en los dos tipos de estructuras, algunas están sólo en ciertas balsas membrana o sólo en caveolas (Liu *et al.*, 1997).

Las caveolas comparten con el resto de las balsas membrana características fisicoquímicas (menor densidad, y resistencia a la solubilidad en detergentes no iónicos) que vienen definidas por la composición específica de fosfolípidos, abundante colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomielinea). Sin embargo, la diferencia fundamental entre estos microdominios radica en la localización de la proteína caveolina, un marcador selectivo de las caveolas que permite hacer un análisis específico de la función caveolar.

3.2. Las caveolinas

3.2.1. *La caveolina recubre las caveolas*

El descubrimiento de la caveolina se produjo de manera indirecta buscando sustratos fosforilables en fibroblastos transformados con el virus del sarcoma de Rous (Glenney y Zokas, 1989). De las 4 proteínas fosforiladas en tirosina que se purificaron, una de 21 kDa, resultó ser resistente a la purificación con detergentes no iónicos. Además, la fosforilación de esta proteína era dependiente de la transformación con v-Src (oncogen codificante para la proteína tirosina cinasa del virus del sarcoma de Rous), lo que sugería que pudiera estar implicada en procesos oncogénicos (Glenney, 1989), por lo que se la relacionó con una elevada capacidad de transformación del virus y se propuso que podía estar implicada en mecanismos de oncogénesis (Glenney y Zokas, 1989). Se la denominó VIP21, del inglés *vesicle invagination particle* y veintiuno por su peso molecular.

El desarrollo de anticuerpos generados frente a la proteína VIP21, permitió su observación mediante microscopía inmunoeléctronica. Esta proteína se localizaba en los márgenes celulares asociada a la MP. Así, se descubrió que los monómeros de VIP21 polimerizaban formando una estructura de malla a base de filamentos muy similar a la que había sido descrita con anterioridad a raíz de estudios de microscopía electrónica en la década de los cincuenta (Rothberg *et al.*, 1992).

Por su localización, a esta proteína se la denominó caveolina (actualmente conocida como caveolina-1, cav-1, puesto que fue el primer miembro de la familia descubierto). Desde este momento, la cav-1 fue identificada como la primera proteína específica de microdominios caveolares (Rothberg *et al.*, 1992). A finales de ese mismo año (1992), empleando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del péptido, se clonó el gen de cav-1 (CAV-1) (Schubert *et al.*, 2002). La sobre-expresión de ADNc de cav-1 en fibroblastos confirmó que la caveolina es la proteína residente más abundante en las caveolas (Glenney, 1992).

3.2.2. La familia genética de la caveolina

Se han identificado tres miembros de la familia genética de la caveolina (Figura 11). El gen CAV-1 fue el primero que se descubrió (Scherer *et al.*, 1996) y se compone de tres exones que se encuentran muy conservados en todas las especies. Se han descrito dos isoformas, la predominante o cav-1 α , de 178 residuos, y una isoforma derivada de una iniciación de la traducción interna (Met 32) denominada cav-1 β (32-178 aa) (Scherer *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996c), de 147 residuos. No se conocen bien las diferencias funcionales entre ambas isoformas, sin embargo, algunos estudios sugieren que la cav-1 α se localiza predominantemente en aquellas caveolas que presentan forma de U y que da lugar a la forma característica de las caveolas de manera más eficiente que cav-1 β (Fujimoto *et al.*, 2000).

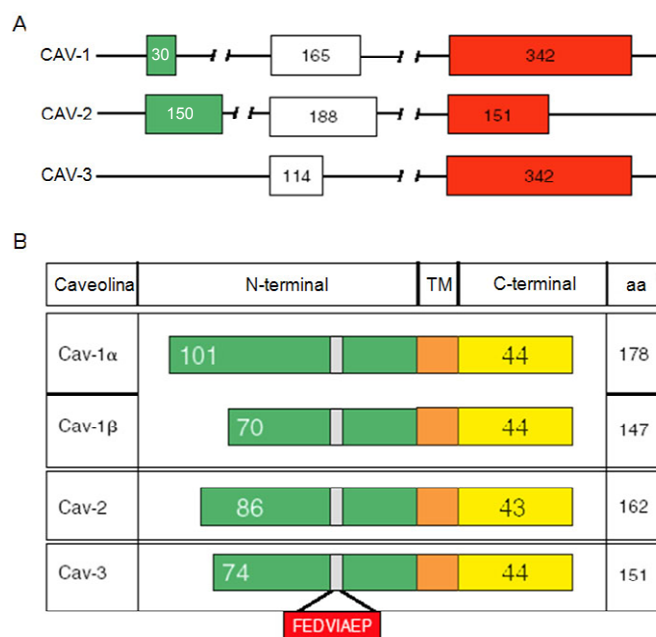


Figura 11. Familia genética de la caveolina. A. Disposición de los exones en los genes de CAV-1, CAV-2 y CAV-3. En las cajas se indica el número de nucleótidos presentes en cada exón. B. Esquema de las tres proteínas de las caveolinas, incluidas las dos isoformas de la cav-1. Los segmentos destacados son el extremo N-terminal, el dominio transmembrana (TM) y el extremo C-terminal. Se representa la posición del “motivo firma” conservado FEDVIAEP.

El gen CAV-2 fue clonado en adipocitos y se compone de tres exones que codifican para una proteína de 162 residuos cuya secuencia es muy similar a la de la cav-1. Cav-2 α representa la secuencia completa de la proteína, pero además, se han descrito dos isoformas truncadas: cav-2 β y cav-2 γ . La isoforma β es una variante *splicing* con diferente distribución subcelular que la isoforma α . Apenas se conoce el papel funcional de las isoformas β y γ .

El gen CAV-3 fue identificado a través de una base de datos que buscaba y analizaba librerías de ADNc para genes homólogos a CAV-1, y está compuesto por dos exones que codifican una proteína de 151 aa (Scherer *et al.*, 1996).

Los tres miembros de la familia del gen CAV están localizados en el cromosoma 6 murino. Cav-1 comparte con Cav-3 una elevada similitud en la secuencia aminoacídica. Los genes homólogos humanos CAV-1 y CAV-2 se localizan en el cromosoma 7q31.1 cerca del marcador genético D7S522, que es conocido como sitio frágil o FRAG7G (Engelman *et al.*, 1998). Muchos cánceres epiteliales (mama, próstata, ovario y renal) presentan deleciones alrededor de este marcador (Shridhar *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1998), lo que sugiere que en esta zona existe un gen supresor de tumores. CAV-3 se encuentra en 3p25 (McNally *et al.*, 1998), a unas 7-10 kpb del gen del receptor de la oxitocina y cerca del marcador genético D3S18. Las tres proteínas tienen un motivo común de 8 aminoácidos llamado “motivo firma” o *caveolin signal motif* (FEDVIAEP) que está muy conservado en los mamíferos (Razani *et al.*, 2002b).

3.2.3. Caracterización de la caveolina

La cav-1 es la isoforma que aparece en más tipos celulares y es responsable de la formación de caveolas tradicionalmente identificables (Li *et al.*, 1996c). Fue la primera isoforma descubierta (Glenney y Zokas, 1989) y en ella se centran la mayoría de los estudios bioquímicos que han contribuido al conocimiento actual de la familia de las caveolinas. La cav-1 es una proteína de 22 kDa constituida por 178 aminoácidos presente en la mayoría de las células. Esta proteína oligomeriza consigo misma (y/o con cav-2 y cav-3) formando mallas que recubren la cara interna de la membrana plasmática. Además, la expresión de cav-1 es estrictamente necesaria para

que cav-2 esté presente en la membrana, es decir, la cav-2 *per se* es insuficiente para inducir la biogénesis de caveolas (Razani *et al.*, 2002a). La cav-3 (18 kDa) es músculo específica y, al igual que la cav-1, la expresión de esta única isoforma es suficiente para la formación de las caveolas tradicionalmente identificables (Galbiati *et al.*, 2001a). Las isoformas de cav-1 y cav-2 presentan un patrón de distribución muy extendido (prácticamente ubicuo), ya que se localizan en la mayoría de las células, con excepción de las fibras de músculo esquelético y los miocitos cardíacos (Scherer *et al.*, 1994). La cav-3 se expresa en células de tipo muscular como tejido cardíaco, esquelético (Song *et al.*, 1996b) y células musculares lisas (Tang *et al.*, 1996).

Los tipos celulares que presentan los mayores niveles de expresión de cav-1 y que, por tanto, constituyen una buena fuente de esta isoforma son los adipocitos, las células endoteliales de los vasos pulmonares, los neumocitos de tipo I y los fibroblastos. Por ello, los ratones modificados genéticamente para que no expresen cav-1 (Schubert *et al.*, 2002), aunque viables y fértiles, presentan alteraciones fundamentalmente respiratorias (Apartado 3.5).

En los siguientes apartados se describen las características estructurales de la cav-1; sin embargo, debemos tener en cuenta que la mayoría de estas características son comunes para los tres tipos de caveolinas.

i. Topología de la caveolina

Los primeros estudios subcelulares a cerca de la localización de la cav-1 revelaron que se trata de una proteína integral de membrana, puesto que es resistente a la extracción con concentraciones elevadas de carbonato sódico (Na₂CO₃) (Rothberg *et al.*, 1992; Sargiacomo *et al.*, 1993; Scherer *et al.*, 1994).

El grupo de investigación del Dr. Robert G. Parton en la Universidad de Queensland (Australia) propuso por primera vez que la cav-1 se dispone insertada en la membrana plasmática con los extremos carboxi- y amino-terminales (NH₂ and COOH) orientados hacia el citosol, dado que anticuerpos diseñados contra estos extremos no marcaban la proteína si previamente la célula no era permeabilizada (Dupree *et al.*, 1993). Más tarde, diversas técnicas experimentales (*cross-linking* o

entrecruzamiento-reticulación forzada y cristalografía entre otras) contribuyeron a generalizar el modelo propuesto por el grupo del Dr. Parton.

Otra serie de experimentos demostraron que el extremo COOH-terminal de cav-1 está palmitoilado y el extremo amino terminal está fosforilado en un residuo de tirosina; dos modificaciones postraduccionales que son requeridas para que la proteína se mantenga en el citoplasma (Dietzen *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996b). Además, los estudios de biotinización fracasaban al intentar marcar cav-1, lo que apoyaba la idea de que la proteína no exponía ningún residuo hacia el exterior celular (Sargiacomo *et al.*, 1995; Jagannadham *et al.*, 2002).

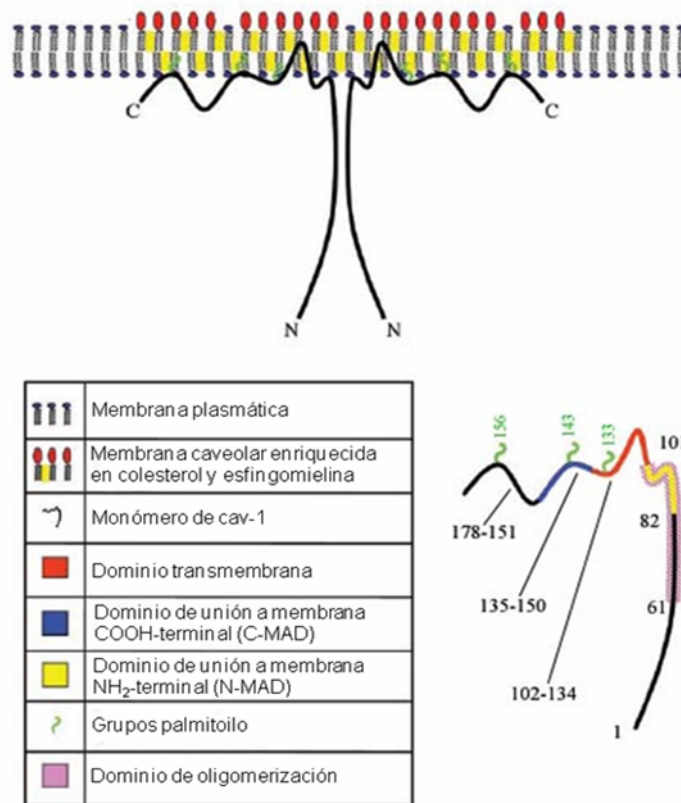


Figura 12. Representación de la cav-1 como un homodímero para simplificar el esquema (arriba). Topología de la cav-1 en la membrana plasmática y dominios de la proteína (abajo). Figura modificada de Cohen *et al.*, 2004.

La inserción de cav-1 en la membrana se produce a través de la vía clásica del retículo endoplasmático (RE), lo que da lugar a un dominio transmembrana de 32 aminoácidos hidrófobos (residuos 102-134) que forman un bucle en forma de hebilla

(*hair-pin loop*) de modo que la proteína se adentra en membrana por la cara citosólica y 32 aa más adelante asoma el final del extremo carboxi terminal (Monier *et al.*, 1995) (Figura 12).

Existen dos regiones (descubiertas mediante técnicas de mapeo proteómico y análisis mutacional) indispensables para la topología de la caveolina, ya que definen el anclaje de ésta a la MP. Es importante mencionar que, al contrario de lo que podría parecer, la región que se extiende por el interior de la MP (residuos 102-134) no es esencial para esta función. Sin embargo, las dos regiones adyacentes, región NH₂ terminal del dominio de unión a membrana (residuos 82-101, *NH₂-terminal membrane attachment domain*; N-MAD) y región COOH terminal del dominio de unión a membrana (residuos 135-150, *COOH-terminal membrane attachment domain*; C-MAD) son las responsables de que la proteína se una a la membrana con gran afinidad (Schlegel y Lisanti, 2000).

La región C-MAD contiene una secuencia señal dirigida al Golgi (*Golgi-targeting*) diferente a la secuencia conocida para proteínas que maduran en Golgi y que se asocia a la cara *cis*- de esta organela (Luetterforst *et al.*, 1999).

Al fusionar cav-1 con GFP, esta proteína quimera resultó ser resistente a la extracción con Triton X-100 a 4 °C y con solución de carbonato sódico fuertemente alcalina, dos características de las proteínas transmembrana integrales. Los ensayos mutacionales de delección de aminoácidos mostraron que la cav-1 mutante de tan sólo 1-101 residuos seguía asociada a membrana, mientras que otra diferente compuesta por los residuos 1-81 se localizaba en el citoplasma (Schlegel y Lisanti, 2000).

Al igual que la región C-MAD, la región N-MAD-GFP también está asociada a membranas. Sin embargo, la proteína de fusión C-MAD-GFP aparecía en el Golgi predominantemente, mientras que la proteína de fusión N-MAD-GFP se localizaba en los microdominos caveolares de la MP (Luetterforst *et al.*, 1999; Schlegel y Lisanti, 2000). Análisis mutacionales posteriores identificaron una secuencia pequeña de unión a membrana (Woodman *et al.*, 2002) necesaria para el anclaje del dominio N-MAD. Sin embargo, más tarde se demostró que para dirigir la caveolina a las caveolas era preciso el dominio N-MAD completo de 20 aminoácidos (Woodman *et al.*, 2002).

ii. Dominio de oligomerización de la caveolina

Las isoformas de cav-1 forman oligómeros de pesos moleculares muy altos (400 kDa), lo que se demostró usando centrifugación en gradiente de velocidad (Sargiacomo *et al.*, 1995). De nuevo, estudios mutacionales de delección demostraron la existencia de una secuencia de oligomerización que se extiende desde los aminoácidos 61 al 101 (Figura 12), capaz de mediar la oligomerización de 14-16 caveolinas individuales. Se cree que estos oligómeros sufren un segundo proceso de oligomerización durante el transporte de las caveolinas desde el *trans*-Golgi a las caveolas de la MP, donde varios oligómeros se asocian mediante interacciones a través del extremo COOH terminal formando redes (cota de malla). Sargiacomo y colaboradores (Sargiacomo *et al.*, 1995) explicaron un modelo de oligomerización estudiando la ultraestructura de homo-oligómeros de cav-1 obtenidos de tejido pulmonar de rata. Por el contrario, la cav-2 es incapaz de formar complejos formados por homo-oligómeros de elevada masa molecular (Scherer *et al.*, 1996), lo que explica la falta de caveolas en células que únicamente expresen cav-2. Sin embargo, cav-2 forma grandes complejos constituidos por hetero-oligómeros con cav-1 en el RE, una asociación que evita que la cav-2 sea degradada por la maquinaria del proteosoma y favorece su transporte desde el Golgi a la MP (Razani *et al.*, 2001).

La cav-3 si forma complejos homo-oligoméricos mediante un mecanismo similar al que usa la cav-1 (Larsson *et al.*, 2008). Además, la cav-3 puede oligomerizar con cav-2 como demuestran algunos estudios realizados en célula muscular lisa y miocitos cardíacos neonatales (Woodman *et al.*, 2002; Rybin *et al.*, 2003). En estos dos sistemas se ha observado que cav-2 co-precipita con cav-3 y aparece en las mismas fracciones tras realizar gradientes de densidad con sacarosa (Woodman *et al.*, 2002; Rybin *et al.*, 2003).

iii. El dominio andamio de la caveolina

El dominio andamio de la caveolina-1 (*caveolin-1 scaffolding domain*, CSD) es una región de la proteína (residuos 83-101) capaz de mediar interacciones con otras proteínas (Couet *et al.*, 1997; Jagannadham *et al.*, 2002) y fue identificado tras una serie de experimentos entre los que se incluye la mutagénesis de delección empleando

proteínas de fusión cav-1-GST (*glutathione-S-transferase*). Por otro lado, el grupo de investigación del Dr. Michael Lisanti descubrió dos secuencias de unión a cav-1 (*caveolin binding motifs*; CBM) presentes en la mayoría de las proteínas que interaccionan con cav-1. El patrón de estas secuencias es $\Phi\text{XXXX}\Phi\text{XX}\Phi$ y $\Phi\text{X}\Phi\text{XXXX}\Phi$, donde Φ representa un aminoácido aromático y X representa un aminoácido no aromático (Couet *et al.*, 1997). Aunque la presencia de este motivo no implica interacción directa de la proteína que lo posea con la caveolina. Debido a que las secuencias de CSD y CBM están enriquecidas en aminoácidos aromáticos se ha sugerido que estas interacciones se pueden producir por yuxtaposición de interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas.

Muy pronto se descubrió que el CSD tenía un papel dual, puesto que actuaba como lugar de anclaje para las proteínas a las caveolas; pero además, regulaba la actividad de dichas proteínas, ya fuera inhibiendo o potenciando la vía de señalización de una proteína determinada (Lisanti *et al.*, 1994; Sbaa *et al.*, 2005).

Recientemente, la proteómica ha identificado el CSD para determinadas proteínas que se localizan en las caveolas; y esto ha contribuido a caracterizar multitud de proteínas específicas de microdominios caveolares (Patel *et al.*, 2007).

3.3. Papel funcional de las caveolas y las caveolinas

Desde su descubrimiento en los años 50, se ha especulado mucho sobre la función de las caveolas. Se les ha atribuido muchos papeles biológicos a las caveolas y a su principal proteína, la caveolina. La relevancia fisiológica de las caveolas se puede resumir en varios aspectos, como son: el transporte vesicular, la homeostasis del colesterol celular y mecanismos de transducción de señales. Debido a la amplia literatura existente en la que se describen las diferentes funciones de las caveolas sólo se desarrollarán en profundidad aquellos aspectos relacionados con la transducción de señales. Más concretamente, aquellas rutas de señalización que implican al Ca^{2+} y NO, puesto que han sido de gran interés para el diseño de este trabajo y la interpretación de los resultados obtenidos. Los demás aspectos serán tratados brevemente en los siguientes apartados.

3.3.1. Transporte vesicular

El endotelio vascular juega un importante papel en la regulación del intercambio de moléculas entre la sangre y los tejidos periféricos. El transporte de moléculas entre tejidos debe estar finamente controlado para mantener la homeostasis entre los diferentes órganos.

Originariamente, basándose en la apariencia estructural de invaginaciones de la membrana, se creyó que las caveolas actuaban como vesículas de transporte macromolecular. Al principio, se las relacionó con procesos de pinocitosis; sin embargo, tecnologías posteriores permitieron observar que estaban implicadas en procesos de transcitosis y endocitosis:

i. Transcitosis

El término de transcitosis fue acuñado por el grupo del Dr. Simionescu para describir el movimiento de partículas desde la cara luminal de las células endoteliales de capilares hacia el espacio intersticial mediante vesículas asociadas a membranas (Schroeder *et al.*, 1994).

El empleo de moléculas trazadoras específicas para caveolas (McIntosh *et al.*, 2002) y el desarrollo de ratones cav-1 KO (Schubert *et al.*, 2002) permitió aclarar el mecanismo de transcitosis empleado por las caveolas. En una serie de elegantes experimentos, el grupo del Dr. Schnitzer demostró que las caveolas estaban implicadas en el transporte vesicular de transcitosis y que tal mecanismo no se trataba de un proceso inespecífico como el transporte paracelular (McIntosh *et al.*, 2002).

Por el contrario, el grupo del Dr. Drab (Drab *et al.*, 2001) no observó diferencias significativas en los procesos de transcitosis entre ratones cav-1 KO, obtenidos de forma independiente, y los ratones salvajes; por lo que concluyen que 1) las caveolas no están implicadas en la transcitosis o 2) se produce un mecanismo compensatorio en los ratones KO. Experimentos posteriores demuestran que la transcitosis deficitaria en los ratones KO se ve compensada mediante procesos de transporte paracelular.

ii. Endocitosis

La vía prototípica de entrada de sustancias extracelulares es la vía endocítica mediada por clatrina, sin embargo, existen otras vías alternativas, incluidas aquellas mediadas por caveolas. La endocitosis mediada por caveolas se suele solapar con otros procesos endocíticos, aunque debemos tener en cuenta que las caveolas también son capaces de desarrollar procesos endocíticos de forma independiente.

El papel de las caveolas en los procesos de endocitosis incluye varias fases: i) el reconocimiento de distintas proteínas implicadas en el anclaje y la fusión, ii) la activación de una vía de señalización dependiente de cinasas de tirosina (Pelkmans y Helenius, 2002) y iii) la actuación de la dinamina GTPasa pequeña, proteína implicada en la internalización de vesículas recubiertas de clatrina, en el cuello de las caveolas tras un estímulo específico (Oh *et al.*, 1998).

De forma análoga, los ligandos que son internalizados vía caveola, incluyendo algunos agentes patógenos, activan vías de señalización dependientes de tirosina cinasa tras la interacción con los receptores celulares (Norkin *et al.*, 2002). Todos estos hallazgos han contribuido a afianzar la idea de que las caveolas actúan como vesículas funcionales.

En general, existen multitud de agentes patógenos incluidos los virus, las bacterias y sus toxinas asociadas, los hongos e incluso los priones, que pueden interactuar con los microdominios caveolares (Shin y Abraham, 2001). El empleo de las caveolas como mecanismo de entrada permite a los agentes patógenos evitar la vía endosoma-lisosoma, y por tanto, escapar de los compartimentos de degradación en la célula. El agente infeccioso mejor documentado que utiliza las caveolas para entrar en las células es el virus de primate 40 (SV40) (Pelkmans y Helenius, 2002)

En la actualidad el número de agentes patógenos conocidos capaces de entrar en las células vía caveola representa, probablemente, una pequeña fracción del total. Sorprendentemente, los virus Marburg y Ébola, que provocan fiebres hemorrágicas letales, interactúan con los receptores de folato α para facilitar la entrada en las células (Chan *et al.*, 2001). Estos receptores se localizan fundamentalmente en los microdominios caveolares y, en consecuencia, estos virus podrían aprovecharse de las caveolas como un mecanismo de invasión celular. Al mismo tiempo, el conocimiento

de los mecanismos de infección abre nuevos horizontes para el desarrollo de fármacos capaces de combatir dichos patógenos.

3.3.2. Homeostasis del colesterol

Existe una amplia variedad de procesos en los que se pone de manifiesto la interrelación entre el colesterol y la caveolina, concretamente la cav-1 (Rothberg *et al.*, 1992). En primer lugar el colesterol es un componente indispensable de la estructura caveolar. El tratamiento de los cultivos celulares con agentes que retiran colesterol de la MP (nistatina, filipina o las ciclodextrinas) modifica la morfología de las caveolas y destruye parcialmente la malla de caveolina polimerizada que recubre la cara citosólica de la MP (Apartado 3.2.3). Además el colesterol regula la expresión de cav-1 a nivel transcripcional, lo que implica una disminución en los niveles de ARNm de cav-1 cuando el colesterol es retirado de la MP. Por el contrario, la morfología de las caveolas se recupera al adicionar colesterol al medio, y un exceso de éste induce un incremento en los niveles de cav-1. Por otra parte, un incremento en la actividad de la oxidasa de colesterol (enzima que convierte colesterol en colesterolona) rompe el equilibrio de colesterol necesario para un funcionamiento celular correcto y provoca la internalización de cav-1 desde la MP al RE y al Golgi. Por tanto, la expresión de cav-1 y su distribución celular dependen claramente de los niveles de colesterol.

En un intento por determinar la relación entre la cav-1 y la maquinaria de transporte celular de colesterol, el Dr. Frank y sus colaboradores pusieron de manifiesto que el colesterol es necesario para la estabilización de la cav-1 en la MP (Frank *et al.*, 2006b). Estos autores demostraron que la expresión de cav-1 en células hepáticas embrionarias 293 (HEK 293) aumentaba al ser transfectadas con ADNc del receptor *scavenger* B1 (SR-B1) y esto, a su vez, inducía una acumulación de cav-1 en el espacio intracelular. Cuando las células eran transfectadas con ADNc del receptor CD-36 (perteneciente a la familia de los SR-B) no se producía acumulación de cav-1 en zonas intracelulares. A partir de estos y otros resultados, este mismo grupo de investigación postuló que era el colesterol, no el SR-B1, el responsable del aumento en los niveles de proteína. De hecho, la adición de colesterol a células HEK 293 indujo un incremento en la expresión de cav-1 que pudo observarse por *western blot*.

Además, la distribución de cav-1 también se vio afectada, apareciendo acumulaciones de cav-1 en zonas intracelulares. Por tanto, además de la regulación positiva a nivel transcripcional, el colesterol también modula la expresión de cav-1 mediante la interacción directa con la proteína, de modo que estabiliza la posición de ésta en la MP.

Experimentos recientes ponen de manifiesto que la relación entre el colesterol y la cav-1 es más complicada, dado que esta proteína puede regular los niveles de colesterol modulando su entrada y salida de la célula (su intercambio con el exterior celular). La cav-1 está implicada en el transporte del colesterol desde el RE a la membrana de la caveola, donde es repartida hacia las HDL. La vía principal de entrada de colesterol en las células –transportado por las LDL– tiene lugar por mecanismos de endocitosis mediados por clatrina; sin embargo, existe otra ruta alternativa que implica el papel de las caveolas en la entrada de colesterol procedente de las HDL y mediada por el SR-B1 (que recientemente se ha observado que colocaliza con cav-1 en las caveolas). Por tanto, las caveolas podrían ser microdominios de intercambio de colesterol entre las HDL y la MP (Thyberg, 2002).

3.3.3. Señalización celular

i. La caveola como “señalosoma”

Las caveolas pueden servir como plataforma para la agregación y/o concentración de otras proteínas. Usando la propiedad de insolubilidad de las caveolas en detergentes suaves y su capacidad de flotar en un gradiente discontinuo de sacarosa (debido a su baja densidad) Lisanti y colaboradores (Lisanti *et al.*, 1994) fueron capaces de obtener una fracción caveolar y determinar las diferentes proteínas que se concentran en ella. La mayoría de las proteínas que se identificaron de esta manera fueron moléculas de transducción de señales que se encontraban a concentraciones mayores que en la MP (Sargiacomo *et al.*, 1993; Lisanti *et al.*, 1994). Esta observación permitió realizar la hipótesis de la “señalización a través de caveolinas y de balsas membrana” (Lisanti *et al.*, 1994). Actualmente, con la ayuda de la proteómica, se han identificado numerosas proteínas que se localizan preferentemente en las caveolas, como receptores tirosina cinasa, receptores acoplados a proteínas G,

canales iónicos, proteínas adaptadoras y proteínas estructurales. Las proteínas asociadas a caveolina que mejor han sido descritas son las H-Ras, la familia de las tirosinas cinasas Src, la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas, y la eNOS. Todas ellas tienen una o varias miristilaciones, palmitoilaciones o grupos prenilo (Lisanti *et al.*, 1994; Feron *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996a; Song *et al.*, 1996a; Garcia-Cardena *et al.*, 1996b; Song *et al.*, 1997; Feron y Balligand, 2006). Dado que las caveolas están implicadas en la compartimentalización de varias vías de señalización, pueden ser consideradas organelas especializadas en señalización, o más apropiadamente “señalosomas”.

ii. Las caveolinas como moduladores de la señalización

Una de las cuestiones que no hay que descuidar es el significado funcional de la caveolina. Como ya se ha mencionado anteriormente, las caveolinas son proteínas estructurales ya que constituyen el armazón que forman las caveolas, pero además, tienen un papel activo en la retención o modulación de la actividad de proteínas de transducción de señales. El concepto de “proteína andamio” o “proteína anclaje” (*scaffolding protein*) no es nuevo y la literatura está llena de descripciones de proteínas que actúan restringiendo, organizando y/o regulando la distribución subcelular de otras moléculas de señalización (Pawson y Scott, 1997).

El dominio de anclaje de la caveolina (CSD) es capaz de inhibir la hidrólisis de GTP por proteínas G heterotriméricas y regula a otras proteínas como la familia de tirosinas cinasas Src, isoformas de PKC, y H-Ras (Okamoto *et al.*, 1998; Smart *et al.*, 1999; Parton y Hancock, 2004). Además, con excepción de algunas moléculas de señalización, la interacción con el CSD conduce directamente a la inhibición de la señalización como ocurre con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y con la eNOS (Razani *et al.*, 2002b), que ha sido una de las interacciones más estudiada (García-Cardena *et al.*, 1996a; Frank y Lisanti, 2006a).

De manera adicional, la cav-1 es una potente inhibidora de las vías de proliferación como las mediadas por EGFR y varios miembros de las cascadas de las cinasas MAP, Ras-p42/p44 (Engelman *et al.*, 1999). La progresión del ciclo celular a través de una vía dependiente de p53/p21 (Galbiati *et al.*, 2001b) y la expresión de

varias oncoproteínas están reguladas negativamente por la cav-1 (Williams y Lisanti, 2005). Es importante destacar que, mientras la caveolina parece ser un regulador negativo para la mayoría de las proteínas de señalización con las que interactúa, el receptor de la insulina es regulado positivamente por una interacción con la cav-1 (Cohen *et al.*, 2003a).

Las caveolas concentran diversas proteínas que implicadas en la adhesión, migración e invasión celular, como las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\beta 1$ (Galvez *et al.*, 2004; Echarri *et al.*, 2007) y algunas metaloproteinasas como MMP-2 y MT1-MMP (Galvez *et al.*, 2004). Existe una relación dinámica entre los receptores acoplados a proteínas G y las caveolas: se ha demostrado que hay receptores adrenérgicos que colocalizan con caveolas (Ostrom *et al.*, 2000).

La cav-1 fue identificada como sustrato de la cinasa Src, que la fosforila en la tirosina 14 (Tyr 14). La cav-1 puede ser fosforilada en respuesta a la estimulación por EGF o insulina; sin embargo, no está claro el significado funcional de la fosforilación en Tyr 14. Se ha propuesto que esta fosforilación puede servir como sitio de anclaje para proteínas con dominios SH₂/PTB, como Grb7, para activar diversas cascadas de señalización (Lee *et al.*, 2000; Orlichenko *et al.*, 2006). Trabajos recientes han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Tyr 14 de la Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (Del Pozo y Schwartz, 2007). También se ha descrito que la fosforilación en Tyr 14 regula la apoptosis mediada por fármacos antitumorales, como el paclitaxel en células de cáncer de mama MCF-7 (Shajahan *et al.*, 2007). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Tyr 14 a través de la activación de p38MAPK y c-Src (Volonte *et al.*, 2001). En este sentido, la cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas.

De todas las proteínas que interaccionan con la caveolina, la eNOS ha sido una de las enzimas más estudiadas (Garcia-Cardena *et al.*, 1996a). La unión del CSD a la eNOS inhibe la actividad enzimática (Venema *et al.*, 1997). Las regiones de la cav-3 que se corresponden con el CSD también inhibe la actividad de la eNOS (Garcia-Cardena *et al.*, 1997), lo que implica que el CSD es una secuencia reguladora

conservada en las caveolinas. Además, la pérdida de expresión de la cav-1 potencia la actividad de la eNOS (Razani *et al.*, 2001), lo que indica que, de algún modo, la cav-1 regula su actividad en condiciones basales. De esta observación surgió la llamada “paradoja caveolar”, enunciada por el Dr. Olivier Feron (Feron y Kelly, 2001), que establecía que un enriquecimiento de eNOS (en los dominios caveolares) no estaba relacionado con una potenciación de la actividad de esta enzima, pues la cav-1 interacciona con ésta inhibiendo su actividad. Cuatro años más tarde (2005), el mismo grupo de investigación propuso un modelo de regulación dual de la eNOS: una interacción directa con la caveolina mantiene la enzima en forma inactiva en condiciones basales, y al mismo tiempo contribuye a que la enzima esté concentrada en las caveolas, lo que favorece una respuesta rápida e intensa tras la estimulación (Sbaa *et al.*, 2005).

Al igual que sucede con la eNOS, las isoformas de la adenilil ciclasa (AC) son reguladas negativamente por la cav-1 y la cav-3, pero no por la cav-2. Además, esta inhibición es dependiente de la isoforma de la AC, siendo las isoformas AC-5 y -3 las más sensibles a la regulación negativa. Las caveolas son microdominios muy enriquecidos en ciertas isoformas de las AC y sus reguladores (por ejemplo, GPCRs, proteínas G, y eNOS), lo que establece un segundo nivel de regulación (Ostrom, 2002; Ostrom *et al.*, 2004). La desestabilización de las caveolas (empleando metil- β -ciclodextrina, M β CD) y de los microtúbulos (con colchicina o citocalasina D) provoca la translocación de la AC desde los microdominios caveolares a zonas de la MP que no son balsas membrana y además, potencia la producción de AMPc inducido por isoprenalina. Según el Dr. Ostrom y colaboradores, esto indica que la interacción entre los componentes del citoesqueleto y las caveolas regula la activación de la AC a través de los GPCRs (Ostrom e Insel, 2004; Head *et al.*, 2006). Dado que la estimulación de la síntesis de AMPc reduce la expresión de ARNm de caveolina (Yamamoto *et al.*, 1999), es fácil suponer que existe un mecanismo de retroalimentación entre los niveles de AMPc y los de caveolina. Los hallazgos realizados con los inhibidores del citoesqueleto, muchos de ellos utilizados en la práctica clínica (ej. colchicina para el tratamiento de la gota y vinblastina como quimioterápico), sugiere que un mejor conocimiento de la regulación de las caveolas/balsas membrana podría contribuir a un mayor aprovechamiento terapéutico de tales agentes farmacológicos. Por otro lado, se

sabe que los dominios citosólicos de dos isoformas de AC sensibles al Ca^{2+} (AC-5 y AC-8) son responsables de que estas enzimas se localicen en las caveolas (Crossthwaite *et al.*, 2005). Todos estos hallazgos contribuyen a apoyar la idea de que las balsas membrana están implicadas en vías de transducción de señales celulares tanto en condiciones basales como en situaciones de respuesta a diversos estímulos (Sbaa *et al.*, 2005).

3.4. Métodos para el estudio de las caveolas

Existen multitud de técnicas muy útiles para el estudio de las caveolas. Se pueden clasificar en bioquímicas, farmacológicas, microscópicas, y técnicas de biología molecular (Ostrom y Insel, 2006). Por enumerar algunos ejemplos: fraccionamiento por gradientes de sacarosa, inmunoprecipitación; depleción de colesterol con nistatina o Me β CD; uso de ARN de interferencia (*small interfering RNA*) para silenciar la acción de las caveolinas o bien constructos de ADN para incrementar la expresión de éstas; la microscopía electrónica y confocal; diseño de ratones *knockout* (cav-1, cav-2, y cav-3-KO y doble KO cav-1/cav-3). Estos últimos, aunque viables y fértiles, presentan una amplia variedad de fenotipos alterados: cardiomiopatías, hipertrofia ventricular derecha, hipertensión arterial pulmonar, remodelado del árbol pulmonar (Apartado 3.5). Se desconoce si estos fenotipos son consecuencia directa de la pérdida de expresión de caveolinas, o bien, si se debe a un mecanismo compensatorio (Williams y Lisanti, 2004; Patel *et al.*, 2007).

No existe un único método ideal para el estudio de las caveolas (su estructura, su función y el papel de los fármacos en la expresión de las caveolinas), por lo que es importante emplear una variedad de técnicas para tal evaluación (subfraccionamiento celular, inmunoprecipitación, microscopía y métodos que alteran la expresión de caveolinas). Se han descrito multitud de funciones celulares que implican el papel de las caveolas; sin embargo, muchas de estas funciones deben ser examinadas de nuevo con detalle, pues se fundamentan en los resultados de una o dos técnicas que no siempre son suficientes para alcanzar tales conclusiones.

3.5. Fisiopatología relacionada con las caveolas

Aunque fueron descubiertas hace más de 50 años, las caveolas continúan siendo una parte de la membrana plasmática poco conocida. Estas estructuras participan en multitud de funciones celulares. De modo análogo a los cuerpos densos de clatrina, las caveolas actúan como transportadores vesiculares de macromoléculas, con una composición lipídica característica de las balsas membrana y enriquecidas en una gran variedad de moléculas de señalización. Las caveolinas son proteínas estructurales de las caveolas, pero también regulan la actividad de dichas moléculas de señalización. La carencia o mutación de las caveolinas desencadena multitud de procesos patológicos de alcance sistémico en la mayoría de los casos, dado que muchos procesos celulares dependientes de caveolas y las caveolinas interactúan con multitud de moléculas de transducción. El desarrollo de ratones deficientes en caveolina y, especialmente, ratones doble KO *cav-1/cav-3*, ha hecho posible la evaluación del papel fisiológico de las caveolinas en animales completos, que pueden ser empleados como modelos de estudio de enfermedades en humanos.

Estudios con ratones deficientes en caveolina han revelado el papel de esta proteína en patologías como la diabetes (Penumathsa *et al.*, 2008), el cáncer (Lee *et al.*, 2002), las enfermedades cardiovasculares (Frank *et al.*, 2007), la aterosclerosis (Wang y Leung, 2007), la fibrosis pulmonar (Drab *et al.*, 2001) y multitud de distrofias musculares degenerativas. Los ratones KO *cav-1* presentan ciertas alteraciones cardiovasculares (incremento de la permeabilidad microvascular, disminución de la capacidad angiogénica, hiperactivación de la eNOS y las cascadas de señalización Ras-p42/44 MAP cinasas en células endoteliales y fibroblastos respectivamente, incremento de la hiperplasia neointima, etc.) y respiratorias (hipertensión y fibrosis pulmonar, incremento de la permeabilidad pulmonar, etc.). Los ratones KO *cav-2* presentan hiperplasia pulmonar e hipertensión y fibrosis pulmonar, pero no muestran alteraciones cardiovasculares significativas. Los ratones KO *cav-3* muestran cardiomiopatía hipertrófica e hiperactivación de la cascada de señalización Ras-p42/44 MAP cinasa. Además, los ratones doble KO *cav-1/-3* presentan graves cardiomiopatías.

Una de las primeras alteraciones que se puso de manifiesto en los ratones KO cav-1 fue el incremento de la biodisponibilidad de NO[•]. Los anillos de aorta aislados de ratones cav-1 KO no muestran un tono contráctil estabilizado, si no que el valor de la tensión oscila constantemente. Además, la vasorrelajación inducida por acetilcolina en estos anillos mostraba valores significativamente mayores (100%) que los valores de relajación en anillos de aorta control (45%). Por otra parte, estos efectos observados en ratones KO eran totalmente bloqueados por el inhibidor de la eNOS (L-NAME), lo que indica que el incremento de la producción de NO[•] es una característica del fenotipo cav-1 KO (Razani *et al.*, 2001). De hecho, estos trabajos despertaron un gran interés por la relación fisiológica entre la cav-1 y la eNOS y contribuyeron a descubrir el papel de la cav-1 en la regulación de esta enzima (Apartado 4.3).

4. La homeostasis del óxido nítrico

La célula endotelial está altamente implicada en la neovascularización y la regulación de la función de los vasos sanguíneos (Mineo y Shaul, 2006). Las células endoteliales generan moléculas de señalización tales como el óxido nítrico (NO[•]), la prostaciclina y la endotelina que actúan como mensajeros autocrinos y paracrinos. La monocapa de células endoteliales de los vasos sanguíneos es capaz de modular la hemostasia local y la trombolisis. Además, constituye una barrera no permeable que protege al músculo liso vascular de factores circulantes promotores del crecimiento. El endotelio está considerado como el *centinela* de la pared vascular, pues constituye una primera línea de defensa frente a multitud de factores físicos, bioquímicos y celulares capaces de alterar la función normal de los vasos sanguíneos.

A lo largo de los últimos años, nuestro conocimiento sobre la función endotelial se ha visto incrementado debido, en parte, a los avances realizados en la identificación y el estudio de las moléculas de señalización localizadas en las caveolas.

En los siguientes subapartados se mencionará brevemente la actividad biológica del NO[•]. Luego, se describirá la estructura, la localización, la función y la catálisis de la sintetasa de óxido nítrico (NOS). Por último, se comentarán los mecanismos de activación de la NOS endotelial (eNOS) destacando las acciones promodulatorias de los receptores estrogénicos (ER).

4.1. Actividad biológica del NO[•] en el sistema vascular

El NO[•] es un radical libre producido bajo ciertas condiciones fisiológicas en la práctica totalidad de las células de los mamíferos (Griffith y Stuehr, 1995; Dudzinski y Michel, 2007; Seddon *et al.*, 2007; Chatterjee y Catravas, 2008). El NO[•] evita los procesos trombóticos, la adhesión molecular y la apoptosis; promueve el desarrollo y migración endotelial; participa en la regulación del tono vascular; atenúa el crecimiento y la migración del músculo liso vascular. Además, actúa como

neurotransmisor en el sistema nervioso central, y media la citotoxicidad del macrófago en la defensa inmunitaria inespecífica.

La diversidad de las funciones biológicas moduladas por el NO[•] resulta difícil de relacionar con la simplicidad de la molécula; sin embargo, su elevada reactividad sí está en concordancia con la compleja regulación de la NOS. A diferencia de la mayoría de las moléculas que transmiten información entre células (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.), el NO[•] no se almacena en vesículas ni es transportado por mecanismos especializados, por lo que muchos expertos no lo consideran estrictamente un neurotransmisor.

El NO[•] es sintetizado en respuesta a un estímulo y, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, difunde a través de las membranas biológicas para reaccionar con diversas dianas intracelulares como son los metales de transición, grupos tioles y aminos presentes en muchas enzimas, el O₂, el anión superóxido y otros radicales libres. Sus acciones no dependen tanto de la diana sobre la que actúa, como de la concentración y del entorno intracelular en el que actúe, particularmente en presencia de radicales libres.

En condiciones fisiológicas, las células sintetizan bajas cantidades de NO[•] en un ambiente pobre en radicales libres, por lo que la acción directa del NO[•] determina la respuesta celular funcional. La principal acción del NO[•] en estas condiciones es la activación de la guanilil ciclase soluble (GCs) por unión con el ión hierro del grupo hemo de la enzima, con el consiguiente incremento de los niveles de GMPc y activación de cinasas, fosfodiesterasas y canales iónicos. Además, el NO[•] puede reaccionar con distintas proteínas (citocromo P450, citocromo C oxidasa, catalasa y proteínas plasmáticas) a través de los grupos tiol, inactivándolas de forma reversible.

En condiciones fisiopatológicas, los elevados niveles de NO[•], generalmente consecuencia de la inducción de la iNOS, se acompañan de un incremento en la producción de radicales libres. En estas condiciones, las acciones del NO[•] serían todas aquellas derivadas de las reacciones inespecíficas de oxidación, nitración y nitrosilación. Además, el NO[•] puede interaccionar de forma irreversible con grupos tiol (o metales de transición) de enzimas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (por ejemplo, la aconitasa), de algunos factores de transcripción

(sensibles al estado redox celular) y de proteínas de unión al ARNm, inhibiendo o activando sus funciones. Una alteración en la biodisponibilidad del NO[•] se relaciona con diversas patologías como la hipertensión pulmonar, la aterosclerosis, y diversas enfermedades del sistema nervioso central (Cohen, 1995; Shaul, 2002; Chatterjee y Catravas, 2008).

4.2. Estructura y función de la NOS *in vitro*

La NOS es la enzima implicada en la biosíntesis del NO[•] mediante la transformación de la L-arginina (L-arg), el O₂, el NADPH y otros cofactores en L-citrulina y NO[•]. En esta reacción la tetrahidrobiopterina (BH₄), el grupo hemo, el FAD y el FMN actúan como cofactores redox (Figura 13).

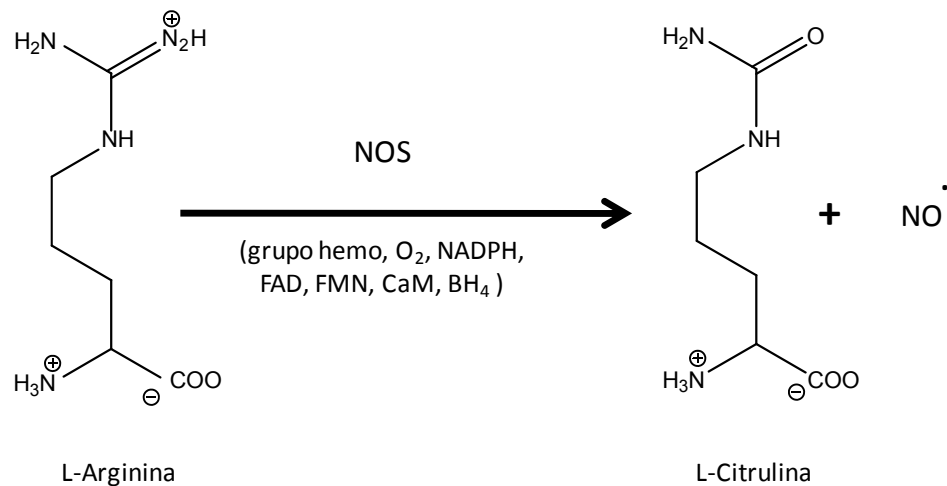


Figura 13. Conversión bioquímica de la L-arginina en L-citrulina por parte de la NOS. Ver texto para mayor detalle.

La NOS pertenece a la familia de las flavoproteínas y presenta una estructura dimérica constituida por dos dominios: i) el dominio oxigenasa, localizado en la mitad del extremo NH₂-terminal (aminoácidos 1-491), que contiene los lugares de unión para la L-arg, el grupo hemo y la BH₄; y ii) el dominio reductasa (aminoácidos 492-1205), en la mitad del extremo COOH-terminal, que contiene los lugares de unión para las flavinas FAD y FMN, la calmodulina (CaM) y el NADPH. De hecho, este último dominio presenta una elevada homología con la NADPH-citocromo P-450 reductasa. La presencia de la BH₄ es necesaria para la formación del dímero (Fleming y Busse,

1999), lo que demuestra claramente que la unidad funcional de la NOS es un dímero (Figura 14). Además, los monómeros son catalíticamente inactivos y sólo la forma dimérica de la enzima es capaz de unir sustrato y cofactor (Fleming y Busse, 1999). Cada monómero presenta un dominio o bucle de inhibición que bloquea el lugar de unión de la L-arg. La formación del dímero implica el desplazamiento de este bucle de inhibición (Bi), de modo que el lugar de unión a la L-arg queda descubierto.

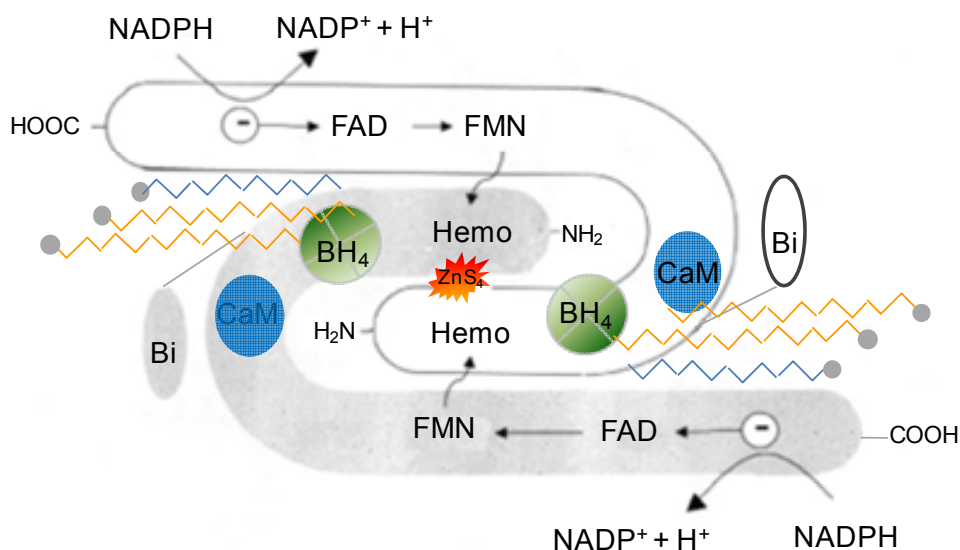


Figura 14. Modelo esquemático del dímero de la eNOS. La enzima es un homodímero que se forma por la interacción de ZnS_4 con residuos aminoacídicos de los grupos hemo de las dos secuencias. La tetrahidrobiopterina (BH_4) es necesaria para la formación del dímero. En la figura se destacan las posiciones de unión a la calmodulina (CaM) y los bucles de inhibición (Bi). En la región NH_2 -terminal se representan los grupos meristoilo (azul) y palmitoilo (naranja) implicados en la unión de la eNOS a la caveola. Las flechas negras representan el transporte de electrones desde el dominio reductasa (extremo COOH-terminal) al grupo hemo del dominio oxigenasa. Modificado de Fleming y Busse (1999).

La enzima NOS cataliza la reacción de síntesis de NO^{\bullet} a partir de la oxidación de un nitrógeno guanidinio terminal de la L-arg en una compleja reacción (Figura 13). Inicialmente y tras la oxidación del NADPH, los electrones son transferidos hacia las flavinas en el dominio reductasa, donde la unión de la CaM permite la transferencia de

electrones al dominio oxigenasa. 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-arg con el O_2 dando lugar a NO^\bullet y L-citrulina (Alderton *et al.*, 2001). En los sistemas biológicos la vida media del NO^\bullet es muy corta (del orden de segundos), ya que se trata de una molécula muy reactiva. En condiciones fisiológicas reacciona con el oxígeno, dando lugar a la formación de nitritos, principal vía de eliminación de este mediador. A su vez, la rápida reacción del NO^\bullet con los grupos tiol sirve de mecanismo de transporte y de eliminación de este mediador (Flórez *et al.*, 2003).

Se han descrito 3 isoenzimas de la NOS que catalizan de igual forma la reacción de síntesis, pero que proceden de genes distintos y presentan diferente localización, cinética y regulación (Bogdan, 2001). La NOS neuronal (nNOS o NOSI), presente en neuronas del sistema nervioso central y periférico, sintetiza un NO^\bullet que actúa como neurotransmisor; la NOS inducible (iNOS o NOSII), expresada en una amplia variedad de células (macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, fibra lisa vascular, células endoteliales, etc.), es capaz de sintetizar grandes cantidades de NO^\bullet con efectos citotóxicos (Chatterjee y Catravas, 2008) y, por último, la NOS endotelial (eNOS o NOSIII), localizada fundamentalmente en las células endoteliales, plaquetas y las células mesangiales renales, está implicada en la regulación de la homeostasia vascular. En esta revisión nos centraremos principalmente en la eNOS, pues es la enzima responsable de la producción de NO^\bullet en condiciones fisiológicas normales y es clave para la homeostasis del sistema cardiovascular.

4.3. Activación de la eNOS en caveolas endoteliales

Como hemos dicho antes, el NO^\bullet es un radical libre muy reactivo y citotóxico con acciones paracrinas que interviene en multitud de procesos fisiológicos; por ello su biosíntesis debe estar finamente regulada. La regulación de la eNOS en el sistema cardiovascular es muy compleja y, aunque no del todo conocida, se sabe que tiene lugar en diferentes etapas del ciclo funcional de la enzima. Además, dicha regulación está controlada por una amplia variedad de mecanismos interdependientes.

Los niveles de ARNm de la eNOS dependen de la regulación de la fase transcripcional y post-transcripcional. Existen multitud de fármacos, la mayoría con

efectos cardioprotectores empleados en la práctica clínica, que afectan a los niveles de expresión de eNOS. Algunos de estos fármacos son estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes del receptor de angiotensina y ciertos bloqueantes de los canales de calcio como las dihidropiridinas y las benzotiazepinas (Dudzinski *et al.*, 2006). Se ha descrito que el *t*-RSV potencia la expresión de la eNOS en células endoteliales aumentando los niveles de ARNm y que, además, potencia la actividad de la enzima, de modo que la producción de NO[•] se ve incrementada (Leikert *et al.*, 2002; Klinge *et al.*, 2008).

La eNOS se asocia de forma reversible a diversas proteínas que controlan la localización, la catálisis y la actividad biológica de la enzima. La actividad enzimática y la localización celular están estrechamente controladas por modificaciones post-translacionales tales como la fosforilación, la nitrosilación y la acilación. Además, múltiples estímulos extracelulares como la bradicinina, la acetilcolina (Ach), la insulina, el VEGF, la esfingosina-1-fosfato (S1P) (Nofer *et al.*, 2004) o la propia tensión de corte (Frank y Lisanti, 2006a) capaces de influir en la función de la eNOS contribuyen a que exista un control dinámico entre la producción y la bioactividad del NO[•] en la pared vascular (Nofer *et al.*, 2004).

En células quiescentes, la eNOS se localiza fundamentalmente en las caveolas de las células endoteliales. Como ya se ha mencionado, las caveolas agrupan multitud de moléculas de señalización que intervienen en la regulación de la eNOS y, por tanto, son necesarias para que exista una coordinación efectiva entre los estímulos que alcanzan la célula y las señales activadoras de la eNOS.

La localización de la eNOS en las caveolas depende de la miristoilación (irreversible y co-translacional) de la glicina N-terminal. Este proceso tiene lugar tras la escisión de la metionina N-terminal de la enzima (Dudzinski *et al.*, 2006). Se cree que esta miristoilación favorece que la enzima sufra, ya en la membrana, dos palmitoilaciones (post-translacionales) en los residuos Cys 15 y Cys 26 (Shaul, 2002). Estas dos acilaciones proporcionan a la eNOS tres puntos de anclaje en las caveolas.

En la regulación de eNOS están implicados múltiples sistemas efectores que ejercen un control espacio-temporal muy fino que permite coordinar los diferentes estados de actividad de todas las eNOS presentes en una célula.

La fosforilación y desfosforilación, junto con la acilación y la unión a la CaM, son los mecanismos de regulación más influyentes sobre la actividad de eNOS a nivel post-translacional. Ciertos residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) son claves en los mecanismos de fosforilación de la enzima. La fosforilación en Ser 1177 (secuencia proteica primaria de la eNOS humana; Ser 1179 en la secuencia bovina), Ser 635, y Ser 617 tiene efectos activadores. La fosforilación en Thr 495 y Ser 116 (Thr 497 y Ser 118 en la secuencia proteica primaria de la eNOS bovina) tiene efectos inhibidores sobre la enzima (García-Cardena *et al.*, 1996a). La fosforilación en Ser 1177 refuerza la interacción entre la CaM y la eNOS, además de potenciar la transferencia electrónica que tiene lugar entre las flavinas asociadas a la enzima. Esta fosforilación es catalizada por diferentes cinasas (Akt, PKA, AMPK, PKG, y CaMKII) (Fulton *et al.*, 2001), que a su vez pueden ser activadas por distintos receptores (Mineo *et al.*, 2006).

La S-nitrosilación constituye también un mecanismo de regulación *in vivo* indispensable en células endoteliales de la pared vascular. La eNOS puede ser inhibida por S-nitrosilación en los residuos Cys 94 y Cys 99 de la secuencia primaria humana (Erwin *et al.*, 2005) y Cys 96 y Cys 101 de la secuencia bovina (Dudzinski y Michel, 2007).

El ciclo de actividad de la eNOS comienza con la miristoilación co-translacional y posterior palmitoilación dual, que conjuntamente sitúan a la eNOS en la caveola. La gran mayoría del conjunto total de eNOS se localiza en membranas intracelulares, aunque la localización en microdominios caveolares es necesaria para una estimulación eficiente mediada por agonistas. No se conocen bien los mecanismos de tráfico e internalización reversible de la eNOS desde la periferia a membranas intracelulares. Descubrimientos recientes apuntan a que una vía de transporte vesicular es utilizada por la enzima y señalan a las proteínas de asociación NOSIP (Assanasen *et al.*, 2005) y NOSTRIN (*eNOS TRafficking INducer protein*) como las moléculas implicadas en el equilibrio dinámico de transporte anterógrado y retrógrado de la eNOS y cav-1 (Dedio *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2006).

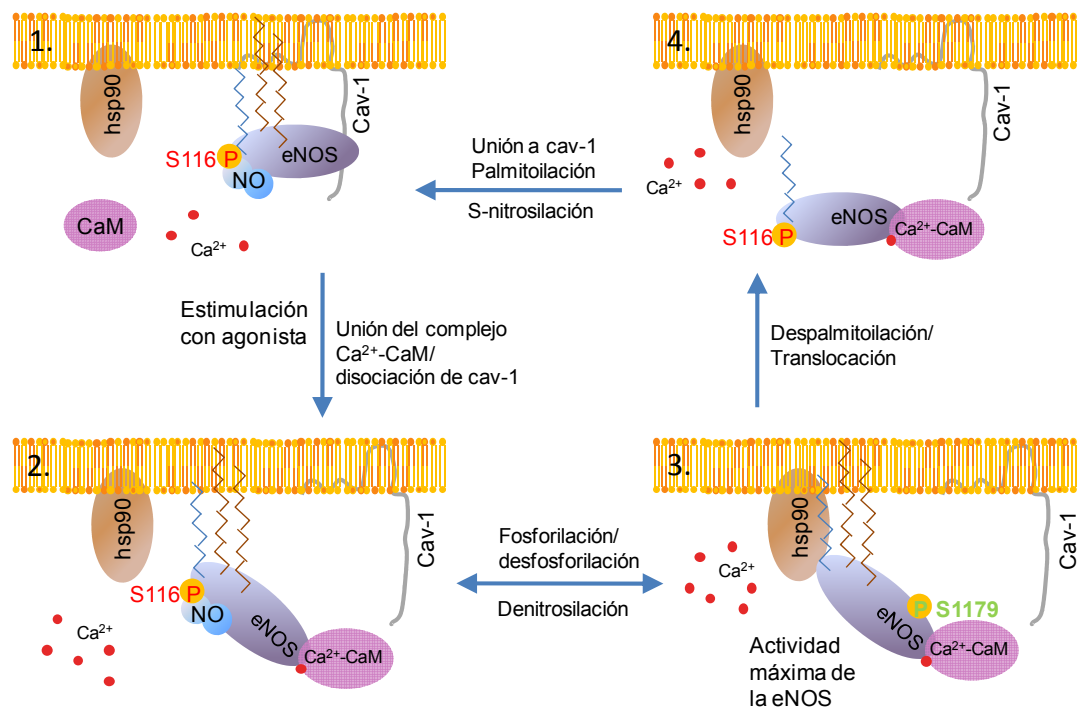


Figura 15. Modelo dinámico del ciclo de actividad de la eNOS. Este esquema representa las interacciones de la eNOS con cav-1, hsp90 y CaM, así como las modificaciones de acilación y fosforilación a lo largo de las distintas etapas de la actividad de la enzima. El panel 1 muestra el estado quiescente de la eNOS anclada a la caveola, unida a cav-1, fosforilada en Ser 116 y nitrosilada en Cys 96. Tras una estimulación con agonista, se producen las reacciones rápidas de activación de la enzima. En el panel 2 se muestra el desplazamiento de cav-1 por parte del complejo Ca^{2+} -CaM, lo que favorece la desfosforilación (Gonzalez *et al.*, 2002) y la desnitrosilación (Dietzen *et al.*, 1995). La unión de hsp90 a la eNOS, acompañada de la fosforilación en Ser 1179 potencia la actividad de la enzima (panel 3). Después de una estimulación prolongada, se produce la despalmiteoilación de la eNOS y la consecuente translocación (panel 4). El ciclo de actividad de la eNOS se cierra con el retorno de la eNOS a la caveola a través de una serie de modificaciones lentas (re-palmitoilación, desfosforilación en los residuos activadores y re-nitrosilación).

En células endoteliales quiescentes la eNOS localizada en las caveolas permanece tónicamente inhibida mediante S-nitrosilación y su unión al CSD de la cav-1 (Figura 15, panel 1). La unión de la cav-1 a la eNOS impide estéricamente que la CaM se una a la enzima (Drab *et al.*, 2001). La localización de la eNOS en las caveolas en el estado de reposo está relacionada con la presencia de niveles bajos de hsp90. En estas condiciones, la producción basal de NO^* es mantenida mediante la tensión de corte (Frank y Lisanti, 2006a) y las oscilaciones cálcicas inducidas por agonistas.

La activación dinámica de eNOS tiene lugar en una fase rápida de catálisis enzimática seguida de una fase de inactivación relativamente lenta e internalización de la eNOS. Esta pauta cinética facilita que la célula endotelial responda de forma rápida a los estímulos y finalmente regrese a un nivel de producción de NO[•] basal. Tras un tiempo prolongado, la eNOS retorna a la membrana caveolar ya preparada para el subsiguiente estímulo dependiente de agonista. Las oscilaciones cálcicas inducidas por agonista que promueven la unión de CaM a eNOS son un elemento fundamental en la activación rápida de la eNOS y, además son necesarias para que se produzca la activación de la enzima a través de otros mecanismos como la fosforilación (Fleming y Busse, 2003). Estas oscilaciones cálcicas son consecuencia de la vía de señalización de la PLC/IP₃ que induce la liberación de Ca²⁺ del RE.

La asociación de eNOS y CaM facilita la desfosforilación de la enzima en Thr 495. El Ca²⁺ y la CaM contribuyen, junto con la hsp90, a desplazar a la caveolina de su unión a eNOS, y así interrumpir la inhibición tónica (Figura 15, panel 2). Ciertos agonistas como el VEGF y la S1P (Nofer *et al.*, 2004) estimulan de manera simultánea los mecanismos dependientes de Ca²⁺ y la señalización dependiente de la cinasa del 3-fosfatidilinositol (PI3K) (Igarashi y Michel, 2001), mientras que otros agonistas como la insulina, los estrógenos, y la tensión de corte funcionan con ambos mecanismos (Ca²⁺-dependientes y Ca²⁺-independientes), y probablemente sólo estimulan una isoforma concreta de la PI3K, la PI3K de clase AI (Montagnani *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Takahashi y Mendelsohn, 2003; Erwin *et al.*, 2005). El complejo eNOS-CaM/hsp90 es capaz de reclutar Akt estimulada por PI3K, lo que induce la fosforilación en Ser 1177. Este gran complejo proteico, y fundamentalmente la unión a CaM y la fosforilación en Ser 1177, potencian la velocidad catalítica de la eNOS como consecuencia de un aumento en el flujo de electrones (Fontana *et al.*, 2002) (Figura 15, panel 3). Tras una estimulación prolongada de agonista y activación de la eNOS, la inactivación de la enzima se regula en parte por la distribución de la eNOS desde las caveolas a las membranas intracelulares. La despalmitoilación facilita la translocación de la enzima al citosol; es decir, la eNOS pasa de las caveolas a compartimentos intracelulares como el Golgi, la región perinuclear, la mitocondria y el citoesqueleto a través de un mecanismo de transporte retrógrado. En algunos casos el transporte retrógrado tiene lugar a través de un mecanismo endocítico (mediado por

NOSTRIN y/o NOSIP), mediante el cual la eNOS permanece unida a la membrana. Se desconoce el papel que juega la despalmiteoilación en estas situaciones (Figura 15, panel 4). Durante la etapa de transporte retrógrado se producen diversos mecanismos de inactivación de la eNOS. En primer lugar, el estímulo de las oscilaciones cálcicas pierde intensidad, ya que, en la región citosólica, la eNOS no se encuentra lo suficientemente próxima a las señales cálcicas necesarias para su activación. Por otro lado, se producen las fosforilaciones inhibitorias (por ejemplo en Ser 116) y las S-nitrosilaciones.

El ciclo de la eNOS se cierra con el transporte anterógrado de la enzima (retorno desde las membranas intracelulares a la caveola). Se desconocen los mecanismos enzimáticos implicados en la re-palmiteoilación y en el transporte vesicular anterógrado, aunque se sabe que la enzima regresa a microdominios caveolares en una situación de inhibición tónica preparada para recibir un nuevo estímulo (Dudzinski y Michel, 2007).

En el mecanismo de regulación fina de la eNOS intervienen muchos más factores además de los mencionados. Existen multitud de mediadores extracelulares capaces de modificar la actividad de la enzima. Algunos de estos mediadores son las HDL y la ApoA-I (Kuvin *et al.*, 2003), la albúmina (Maniatis *et al.*, 2006), los agonistas estrogénicos (Chambliss y Shaul, 2002), ciertos agonistas adrenérgicos (Yao *et al.*, 2003) y otros factores como la presencia de las LDL oxidadas (oxLDL), la tensión de corte (Gallis *et al.*, 1999) o las alteraciones en el ambiente lipídico de la membrana (Uittenbogaard *et al.*, 2000; Assanasen *et al.*, 2005).

Los receptores tirosina cinasa (RTK) y otras cinasas de la familia de las Src son, fundamentalmente, los receptores que median la actividad basal de la eNOS; sin embargo, existen otros receptores localizados en la MP capaces de modular la actividad de la enzima como, por ejemplo, los receptores estrogénicos α y β (ER α y ER β), el receptor *scavenger* BI (SR-BI) y el receptor adrenérgico β (AR β). El VEGF (Takahashi y Mendelsohn, 2003), la S1P (Nofer *et al.*, 2004), la insulina, y los estrógenos (Montagnani *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002) son algunos de los agonistas capaces de modular la actividad de dichos receptores y, por tanto, la actividad de la eNOS.

La vía de señalización intracelular relacionada con la activación de la eNOS mejor estudiada es la que se inicia con la estimulación de las proteínas tirosina cinasa (TK, fundamentalmente las de la familia Src) y da lugar a la fosforilación en Ser 1179. La estimulación de Src induce la activación de la PI3K y ésta, a su vez, activa a la proteína cinasa B, actualmente conocida como cinasa Akt. La Akt fosforila directamente a la eNOS en Ser-1179 (Figura 16). De manera paralela y concomitantemente, la PI3K es capaz de potenciar la actividad de la eNOS activando la cascada de las MAP cinasas (El Mowafy y White, 1999). Además, en este mecanismo, los niveles de Ca^{2+} intracelulares juegan un papel muy importante (Nofer *et al.*, 2004). Aunque los primeros trabajos publicados sobre la activación de la eNOS a través de receptores de membrana (RTK, ER o SR-BI) describían un mecanismo de activación independiente de la movilización del Ca^{2+} citosólico (Caulin-Glaser *et al.*, 1997), posteriormente se descubrió que determinadas etapas del mecanismo de activación son dependientes de las oscilaciones cálcicas, como por ejemplo, la activación de la Akt y la translocación de la eNOS a la MP (Goetz *et al.*, 1999; Hisamoto *et al.*, 2001).

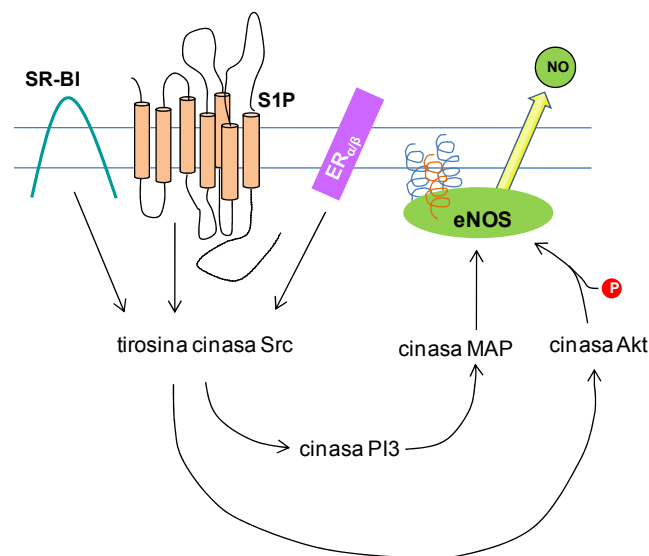


Figura 16. Esquema de la vía de activación de la eNOS inducida por diversos receptores de membrana: receptor scavenger BI (SR-BI), receptor de esfingosina-1 (S1P) y receptores estrogénicos (ER $\alpha\beta$). En la figura se indican dos cascadas de forforilación paralelas activadas por c-Src.

Muchas de las acciones estrogénicas vasculares son debidas a un incremento en la biodisponibilidad del NO[•]. Algunos de los efectos son debidos a la regulación positiva a nivel transcripcional del gen codificante de eNOS; sin embargo, una importante contribución de estos efectos son consecuencia de la activación de la eNOS mediante mecanismos no genómicos (efectos a corto plazo) inducidos por los agonistas estrogénicos. Los efectos a corto plazo de los agonistas estrogénicos son de vital importancia para la fisiología cardiovascular y son caveola-dependientes en tanto en cuanto los ER α están asociados a las caveolas (Chambliss *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003). Los ER β también se expresan en las células endoteliales y aparecen asociados a caveolas (Chambliss *et al.*, 2002). Se ha descrito que tanto los ER α como los ER β participan en los mecanismos no genómicos inducidos por agonistas estrogénicos y que ambos están implicados en el mecanismo de activación de la eNOS mediado por agonistas estrogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

En todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron ratas albinas macho normotensas de la cepa Wistar-Kyoto (WKY; Iffa-Credo, Lyon, Francia) suministradas por la empresa Criffa, S.A. (Barcelona, España). Estos animales se dispusieron, en grupos de cinco, en jaulas grandes (Panlab, Barcelona, España) con lechos de viruta de álamo (Lignocel, J.Rettenmaier and Söhne, Alemania. Certificado ISO 9001) en el animalario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, en una habitación iluminada desde las 08:00 h a las 20:00 h (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad) y mantenida a una temperatura de 22-24 °C. Los animales tuvieron libre acceso a los gránulos de pienso (SAFE: *Scientific Animal Food and Engineering*, Francia) y al agua, así como un período, nunca inferior a una semana, de aclimatación a la instalación y a las condiciones ambientales y de alimentación, antes del inicio de los experimentos.

Los estudios realizados en este trabajo han sido llevados a cabo de acuerdo con las siguientes normativas: i) regulación europea sobre la protección de los animales (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre, sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos), ii) Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, editada por la *Association for Assesment and Accreditation of Laboratory Animal Care International* (AAALAC), adoptada por el Instituto Nacional de Salud Americano (NIH, Publicación No. 85-23, revisada en el año 2004) y iii) Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 1964, enmendada en octubre de 2008).

2. Cultivo primario de células musculares lisas de aorta de rata

Las células musculares lisas de aorta de rata (RASMC) fueron cultivadas siguiendo el protocolo previamente descrito por nuestro laboratorio (Orallo, 1997). Los miocitos vasculares se obtuvieron a partir de aortas torácicas de ratas *Wistar Kyoto* (WKY) macho (8-10 semanas). Las ratas fueron sacrificadas por traumatismo retrocervical. En condiciones estériles y mediante toracolaparotomía se extrajo un segmento de la aorta descendente. Rápidamente, la arteria se colocó en una placa de Petri estéril con solución salina tamponada a pH 7,4 (*Hank's Balanced Salt Solution*), suplementada con penicilina G (100 U/ml), estreptomicina sulfato (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml) (HBSS con antibióticos), donde se limpió el tejido graso y conectivo. La íntima se eliminó mediante raspado, empleando un hilo de algodón estéril enhebrado en una aguja.

Posteriormente se realizó una digestión ligera del órgano con colagenasa B reconstituida en HBSS con antibióticos, en condiciones de agitación continua durante 6-10 min a 37 °C. Seguidamente, siempre manteniendo las condiciones de esterilidad, la arteria se transfirió a una nueva solución de HBSS con antibióticos para separar la capa media de la adventicia empleando pinzas quirúrgicas y una lupa. Las tunicas medias resultantes fueron cortadas en fragmentos más pequeños con un escalpelo y sometidas a una segunda digestión a 37 °C durante 60-70 min con colagenasa B (2,5 U/ml) y elastasa (40 U/ml) en solución HBSS con antibióticos. Las células fueron luego dispersadas mecánicamente con una pipeta pasteur estéril de plástico.

La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de 60 µm y diluida con medio de cultivo completo: medio Eagle modificado de Dulbecco y medio F12 de Ham (DMEM/F12, 1:1), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, inactivado por calor húmedo a 56 °C durante 30 min, ácido L(+)-ascórbico (0,05 mM), L-prolina (1 µM), penicilina G (100 U/ml), estreptomicina sulfato (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml). A continuación, se centrifugó la suspensión a 160 g durante 12 min.

El *pellet* de células fue resuspendido en medio de cultivo completo. Se tomaron alícuotas para realizar un recuento y un estudio de la viabilidad en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) mediante la técnica de exclusión de azul de tripano. Las células fueron sembradas en frascos de cultivo (*flasks*) de 25 cm² de superficie a una densidad aproximada de 20.000 células/cm² y se mantuvieron en cultivo a 37 °C en ambiente saturado de humedad y con un 5% de CO₂ en un incubador. El medio de cultivo se renovó de forma rutinaria cada 2-3 días.

Una vez en confluencia (90-95% de la superficie del *flask*) los cultivos en monocapa se subcultivaron sucesivamente (1-10 pases) en una superficie tres veces mayor. Para ello, las células fueron tratadas, tras aspirar el medio de cultivo, con una solución de tripsina al 5% (v/v) durante 8 min a 37 °C. Tras comprobar la proteólisis de la matriz extracelular, la suspensión celular resultante se diluyó 1:1 en medio de cultivo, se centrifugó a 160 g durante 12 min y el *pellet* resultante se resuspendió en medio de cultivo completo y se sembró en nuevos *flasks* de 75 cm².

La caracterización celular se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo monoclonal anti- α -actina de músculo liso conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; λ_{ex} = 495 nm; λ_{em} = 520 nm) para reconocer de forma específica a las células musculares lisas y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; λ_{ex} = 355 nm; λ_{em} = 460 nm), un fluorocromo selectivo de ácidos nucleicos, para facilitar la visualización de todos los núcleos celulares. Las preparaciones fueron observadas empleando un microscopio confocal (ver apartado 6 de Materiales y Métodos).

3. Cultivos de líneas celulares

En la realización de esta tesis se ha trabajado con dos líneas celulares: miocitos vasculares de aorta embrionaria de rata (A7r5) y células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) ambas comercializadas por *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.; Referencias CRL-1444 y CRL-173, respectivamente). Las células fueron cultivadas en *flasks* de 75 cm² hasta

alcanzar una densidad aproximada de $1,5 \times 10^6$ células en el caso de las HUVEC y 3×10^6 células en el caso de las A7r5.

Para el cultivo de las células A7r5 se empleó el mismo medio de cultivos completo descrito para las células RASMC. El medio de cultivo empleado para las células HUVEC fue el siguiente: DMEM/F12 (1:1) suplementado con FBS al 10%, heparina (10 mg/ml), factor de crecimiento endotelial (ECGS; 30 mg/ml), penicilina G (100 U/ml), estreptomina sulfato (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml).

Durante la fase de crecimiento las células fueron mantenidas en un incubador en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO₂ del 5% en el aire a 37 °C.

Las células A7r5 y HUVEC fueron congeladas regularmente (cada 2 ó 3 subcultivos), con el objeto de poder ser utilizados con posterioridad. La composición del medio de congelación fue 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en el correspondiente medio de cultivo completo. Las células confluentes en un *flask* de 75 cm² ($\sim 3 \times 10^6$ células/ml) fueron tripsinizadas y resuspendidas en 1 ml de medio de congelación. Se conservaron en criotubos a -80 °C o en nitrógeno líquido (-195 °C).

4. Microscopía de epifluorescencia

En el presente trabajo, la microscopía de epifluorescencia fue empleada para medir los cambios producidos en la $[Ca^{2+}]_i$ en células A7r5 y HUVEC y para estudiar los incrementos de la concentración de óxido nítrico (NO[•]) libre en células HUVEC.

La fluorescencia resulta de un proceso en el que siempre 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 es siempre mayor que la longitud de onda del fotón absorbido por la molécula. A esta diferencia en las longitudes de onda se la conoce como desplazamiento de Stokes.

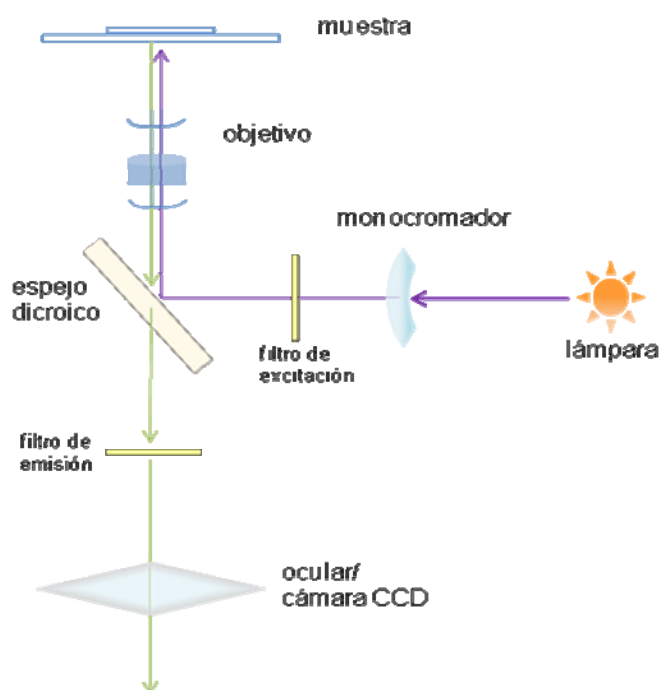


Figura 17. Esquema del camino óptico en un microscopio de epifluorescencia.

Los fluoróforos, o sondas fluorescentes, son sustancias que generalmente presentan estructuras poliaromáticas o heterocíclicas con enlaces o conjuntos de enlaces responsables de la absorción de luz. Cada uno posee espectros característicos de excitación y de emisión. El espectro de excitación mide la intensidad de luz emitida al ir variando la longitud de onda con la que se ilumina la muestra (λ_{ex}) mientras que el espectro de emisión mide la intensidad de luz emitida a cada longitud de onda (λ_{em}) cuando se fija la longitud de onda con la que se ilumina.

El microscopio de epifluorescencia es similar al microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz de excitación, procedente de una lámpara halógena, es refinada mediante un monocromador antes de incidir sobre la muestra. Además, en el camino óptico del microscopio de epifluorescencia hay un espejo

dicroico que refleja la luz de excitación pero deja pasar la luz emitida. Por último, la luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un filtro de emisión capaz de cribar la λ_{em} óptima para el fluoróforo (Figura 17).

El equipo utilizado en el presente trabajo consta de una lámpara de xenón de 75 W (XBO 75W/2), acoplada a un monocromador (P130/MLE/400 Optoscan, Cairn Research Ltd., Faversham, Reino Unido) que permite seleccionar la λ_{ex} . La luz generada es transmitida por un cable de fibra óptica a un microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert 135, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) donde es reflejada por un espejo dicroico (≥ 400 nm ó ≥ 500 nm) hacia las muestras (células aisladas o grupos de 2-8 células dispersas) a través de un objetivo de fluorita (Plan-Neofluar, 63X/1,25 aceite, Carl Zeiss). La luz emitida por las muestras es enviada a través del espejo dicroico hacia el módulo de detección, que consta de un filtro de emisión de 510 ± 20 nm y de una cámara digital CCD intensificada (C651-ICCD; Cairn Research Ltd.) capaz de digitalizar la información lumínica. Las imágenes así obtenidas son registradas y almacenadas para su análisis posterior mediante el programa MetaFluor 7.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, EE.UU.).

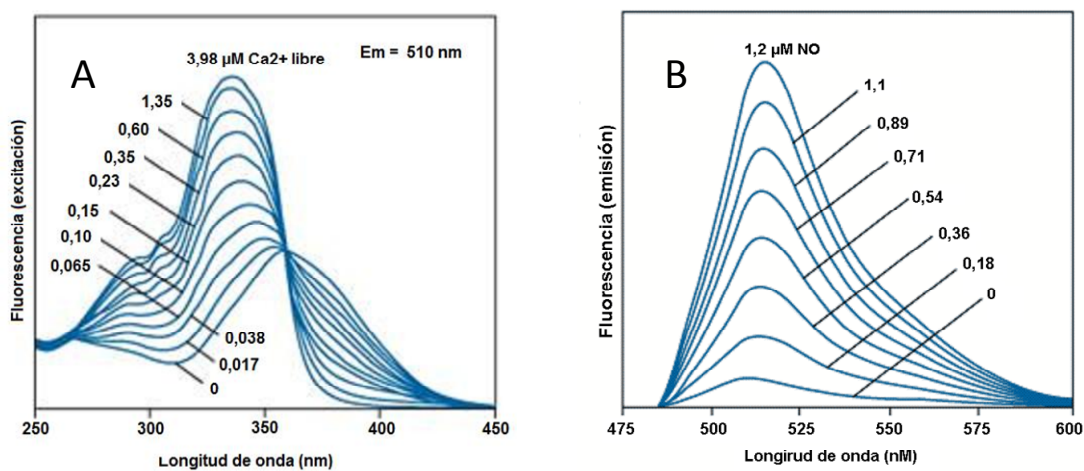


Figura 18.A. Espectro de excitación del fura-2 en medios con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (0–3,98 μ M). **B.** Espectro de emisión del DAF-2 en medios con diferentes concentraciones de NO^{\bullet} (0–1,2 μ M).

Las medidas de la $[Ca^{2+}]_i$ se llevaron a cabo empleando el 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 ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ y 380 nm), se obtienen dos imágenes de emisión diferentes y con la relación entre ambas se calcula la concentración de Ca^{2+} en la región seleccionada (de ahí la denominación de sonda ratiométrica).

Por su parte, la producción de NO^{\bullet} en las células HUVEC se efectuó empleando la 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), una sonda intracelular no ratiométrica que aporta información sobre los incrementos del NO^{\bullet} libre en el interior celular. El DAF-2 reacciona con el NO^{\bullet} 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).

Para los experimentos de epifluorescencia, las células (A7r5 o HUVEC) fueron sembradas a baja densidad (~ 1500 células/cm²) en placas Petri de 35 mm de diámetro en las que previamente se había practicado un orificio 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. 24 h antes de los experimentos, las células HUVEC fueron mantenidas en cultivo empleando medio carente de FBS y conteniendo L-arg (100 μM).

Los protocolos de carga con las sondas fluorescentes fueron similares para los dos fluorocromos utilizados y para los dos modelos celulares empleados. 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, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5, MgCl_2 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 (para los

experimentos de medición simultánea de la $[Ca^{2+}]_i$ y el NO^{\bullet} intracelular en HUVEC, la carga se llevó a cabo con ambas sondas). Posteriormente, se realizaron dos lavados con solución salina normal 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 min para que las esterasas intracelulares hidrolizasen las formas esterificadas de las sondas dejando las formas ácidas libres (Figura 19).

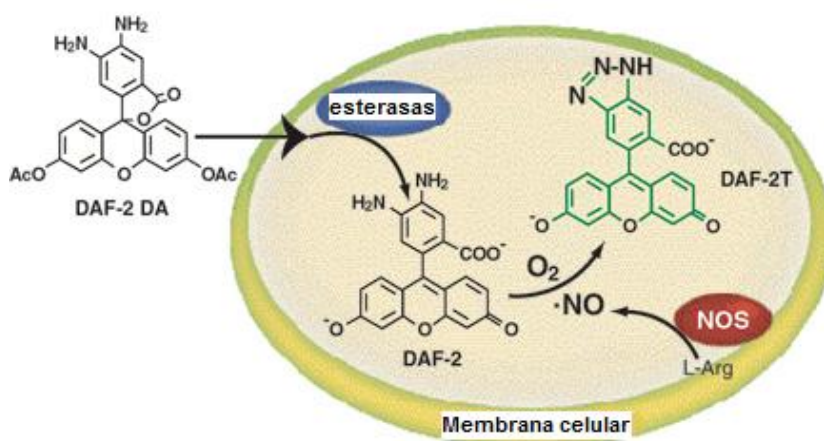


Figura 19. Principio de detección de NO^{\bullet} con la sonda fluorescente DAF-2.

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 dicróico de 400 y la fluorescencia emitida fue filtrada con el filtro de 510 ± 20 nm. Con este protocolo, 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 2-20 s y almacenadas para su análisis posterior. A partir de la relación de las intensidades de las dos imágenes obtenida se calculó la $[Ca^{2+}]_i$ (Apartado 13 de Materiales y Métodos).

Para los experimentos de medición simultánea de la $[Ca^{2+}]_i$ y los niveles intracelulares de NO^{\bullet} en HUVEC, las células cargadas con ambas sondas fluorescentes fueron excitadas alternativamente de modo similar al descrito anteriormente para los experimentos con fura-2 y además, a 490 ± 10 nm (200 ms de

tiempo 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 dichroico de 500 nm y la fluorescencia emitida se recogió tras atravesar un filtro de 510 ± 20 nm. En este caso, las imágenes ratiométricas para la [Ca²⁺]_i y las imágenes para la generación de NO[•] fueron capturadas a intervalos de 10 s, empleando la media de 4 imágenes para cada longitud de onda.

Dependiendo del protocolo a seguir, en algunos experimentos se sustituyó la SN por una solución libre de Ca²⁺ (S0Ca²⁺; composición en mM: NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 2, EGTA 10, HEPES 10, glucosa 11, pH 7,4) o una solución despolarizante con elevada concentración de K⁺ y libre de calcio (composición en mM: NaCl 85, KCl 60, MgCl₂ 2, HEPES 10, glucosa 11, pH 7,4).

Los fármacos (o los vehículos para los correspondientes experimentos control) fueron añadidos en volúmenes de 10 a 50 µl a un volumen final de 2 ml de solución externa. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (~20 °C) para minimizar la compartimentalización y la extrusión de la célula de las sondas fluorescentes.

5. Subfraccionamiento celular para el estudio de las caveolas

La purificación de caveolas se realizó por ultracentrifugación del lisado celular en gradientes discontinuos de sacarosa. El método empleado es una modificación del subfraccionamiento desarrollado por Song y colaboradores (Song *et al.*, 1996a) que permite aislar balsas membrana del resto de los componentes celulares.

Las células fueron cultivadas en placas Petri de 150 cm² con los correspondientes medios de cultivo definidos anteriormente. En los experimentos realizados para evaluar el efecto de los agentes secuestrantes de colesterol sobre las caveolas las células fueron tratadas con metil β-ciclodextrina (MeβCD, 10 mM) durante 2 h antes de proceder con el subfraccionamiento. Además, las células fueron tratadas con *t*-RSV (50 µM) durante 24 h previamente al subfraccionamiento para estudiar los efectos del *t*-RSV sobre la integridad de las caveolas y sobre la expresión

de cav-1 en los microdominios caveolares. En los cultivos control se comprobó el efecto del vehículo (DMSO) manteniendo las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente. Todos los procesos realizados durante el subfraccionamiento se realizaron a temperaturas inferiores a 4 °C (en hielo).

Para extraer las células de las placas se preparó una solución de lisis sin detergente de elevada alcalinidad (500 mM de Na₂CO₃, pH 11) con inhibidores de proteasas (*Complete*TM; Roche). Sobre la placa se añadió 1 ml de la solución de lisis y, con ayuda de un raspador de cultivos y una pipeta, se transfirieron las células a un tubo de 2 ml. A continuación, se rompieron mecánicamente las membranas celulares empleando una aguja (0,5 x 16 mm) con jeringa y luego, un sonicador durante 5 min en un baño con hielo.

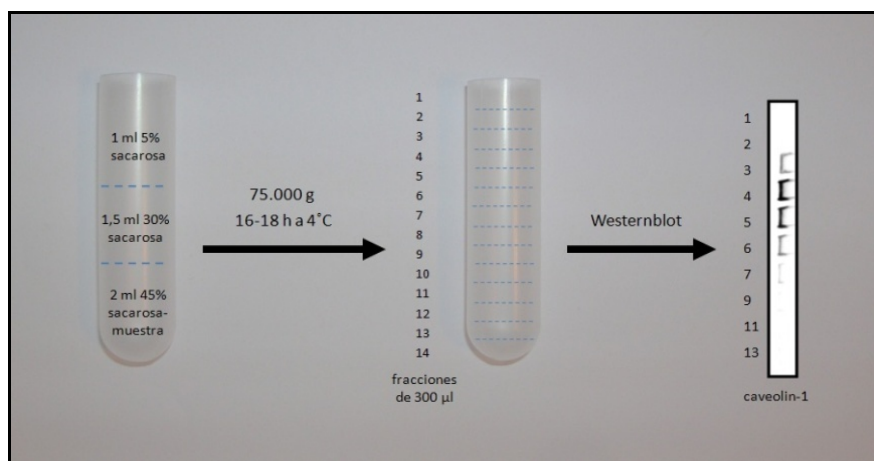


Figura 20. Esquema de la purificación de caveolas mediante el subfraccionamiento celular por ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa.

Para cada muestra se preparó un gradiente discontinuo de concentraciones de sacarosa. Seguidamente, 1 ml del lisado se mezcló con 1 ml de una solución de sacarosa al 90% en tampón MES (25 mM de ácido 4-morfolinoetanosulfónico, 150 mM de NaCl a pH 6,5). El homogeneizado resultante (~45% de sacarosa) se transfirió a un tubo de centrífuga y sobre éste se añadió 1,5 ml de una solución de sacarosa al 30% (25 mM MES, 150 mM de NaCl, 250 mM de Na₂CO₃ y sacarosa al 30% p/v a pH 6,5) con cuidado de no mezclar las dos fases. Posteriormente, se añadió 1 ml de una solución de sacarosa al 5% (25 mM MES, 150 mM de NaCl, 250 mM de Na₂CO₃

y sacarosa al 5% p/v a pH 6,5) de manera que las tres fases quedaron perfectamente diferenciadas (Figura 20).

Las muestras fueron centrifugadas a 75.000 g en una ultracentrífuga (Optima L-100; Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU) empleando un rotor basculante SW55Ti durante 16-18 h a 4 °C. Tras la centrifugación, se extrajeron alícuotas de 300 µl desde la parte superior del tubo hasta el fondo del mismo. La primera alícuota, correspondiente a los 300 µl de la superficie se denominó “fracción nº 1”, a los siguientes 300 µl de la segunda alícuota se les asignó el nombre de “fracción nº 2”, y así sucesivamente hasta llegar a la última, correspondiente a los 300 µl de la parte inferior del tubo (“fracción 14”). Las fracciones se guardaron en tubos eppendorf independientes que fueron enumerados y conservados a -20 °C por un periodo no superior a 3 meses para posteriores análisis (medida de la concentración de sacarosa, de la proteína total y *western blot*).

La medida de la concentración de sacarosa de cada fracción se realizó con un refractómetro con una escala para medir la concentración de sacarosa (Meopta-optika, Olomouc, República Checa) cedido amablemente por el Departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia de la USC (Figura 21). Además, se midió la concentración de proteína total mediante el método de Bradford (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.), con el objeto de estudiar la distribución de las proteínas en las fracciones.

Por otro lado, para el estudio de las proteínas contenidas en cada fracción, éstas fueron separadas mediante SDS-PAGE (4-12%) y transferidas a membranas de nitrocelulosa empleando procedimientos estandarizados de *western blot*. El marcaje de las membranas se realizó con diferentes anticuerpos primarios que fueron detectados con el correspondiente anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo) conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP).

Este doble marcaje permite amplificar enormemente la señal. Las membranas fueron reveladas en una cámara oscura o bien, con una cámara CCD de captura de luminiscencia (Fluo-Chem FC2 MultiImage II; Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE.UU) empleando una solución de luminol (ECL Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Las imágenes obtenidas se guardaron en formato TIF (*Tagged*

Image File Format) y la expresión de las proteínas se cuantificó por densitometría mediante un programa informático (Fluo-Chem FC2 Tool; Alpha Innotech).



Figura 21. Sacarímetro empleado en el presente trabajo para la medida de la concentración de sacarosa en los gradientes obtenidos tras el subfraccionamiento.

6. Microscopía confocal

La ventaja que ofrece el microscopio confocal respecto al microscopio de epifluorescencia convencional estriba en que recoge la luz procedente del objeto a nivel de su plano focal, eliminando la fluorescencia proveniente de áreas fuera del campo de enfoque. El fundamento del microscopio confocal es, básicamente, el mismo al descrito anteriormente (microscopio de epifluorescencia); sin embargo, algunos de los elementos difieren en sus características. En primer lugar, la luz de excitación (procedente de un láser) ilumina áreas muy precisas de la preparación. De este modo, se atenúa el fenómeno de blanqueamiento sufrido por la muestras cuando son excitadas por un largo periodo de tiempo o a una intensidad lumínica muy elevada. En segundo lugar, la luz fluorescente emitida es conducida hacia un diafragma conocido como *pinhole* consistente en un anillo que evita la contaminación lumínica procedente de áreas adyacentes al plano focal.

Para estos experimentos, las células (HUVEC, A7r5 y RASMC) fueron sembradas en cubreobjetos (15 mm de diámetro). La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante procedimientos estandarizados para el marcaje de dos proteínas simultáneamente. Brevemente, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego, se permeabilizaron con triton X-100 al 0,1% y se incubaron con seroalbúmina bovina (BSA) al 5% para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. El marcaje se llevó a cabo, en primer lugar, con un anticuerpo primario (anti-cav-1) policlonal de conejo (2 h a 37 °C) y después, empleando las mismas condiciones, se realizó el marcaje con otro anticuerpo primario (anti-IP₃R o anti-eNOS) monoclonal de ratón. A continuación, se añadió una mezcla de los anticuerpos secundarios conjugados con distintos fluorocromos (Alexa Fluor 555 anti-conejo y Alexa Fluor 488 anti-ratón) y se incubó una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se hicieron 3 lavados de 1, 2 y 3 min con PBS. Por último, se montaron los cubres sobre un portaobjetos con medio de montaje (Anti-fade ProLong Gold).

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) en los servicios generales de la USC (RIADIT, Edificio CACTUS, Santiago de Compostela). La fuente de luz de este equipo está constituida por tres láseres: argón de 488 nm, un diodo de láser verde HeNe de 543 nm y un diodo de láser rojo de 638 nm. Las muestras fueron excitadas a diferentes longitudes de onda (495 nm para AlexaFluor 488 y 555 nm para AlexaFluor 555). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo de fluorita 60x de inmersión en aceite y 1,4 de apertura numérica. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo escaneando superficies de corte a diferentes alturas recogiendo la fluorescencia de emisión máxima para los dos fluorocromos (519 nm para AlexaFluor 488 y 565 nm para AlexaFluor 555).

Posteriormente, dichas imágenes fueron analizadas con la aplicación de programa informático Lite (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Dicho programa asigna el color verde a la fluorescencia emitida por el AlexaFluor 488 y el color rojo a la emitida por el AlexaFluor 555, obteniéndose así dos imágenes que pueden ser superpuestas para realizar estudios de aproximación, interacción y colocalización de proteínas.

7. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica utilizada para analizar la morfología, estructura cristalográfica e incluso la composición de un material. La TEM tiene mayor resolución espacial que la microscopía electrónica de barrido y permite el análisis de características a escala atómica (en el rango de unos pocos nanómetros) usando haces de electrones de energías en el rango de 60 a 350 keV. El TEM colecta los electrones transmitidos a través de una muestra muy fina y utiliza un cañón de electrones para producir el haz primario que será focalizado por lentes y aperturas en un haz coherente y muy pequeño. Los electrones interactúan con la muestra al atravesarla y se forma una imagen magnificada y focalizada por un sistema de lentes electrostáticas y electromagnéticas la cual se proyecta por una pantalla fluorescente o sobre un film fotográfico o bien, detectada por un sensor como una cámara CCD. El TEM presenta una resolución del orden de unos pocos nanómetros, por lo que resulta muy útil para visualizar microdominios caveolares.

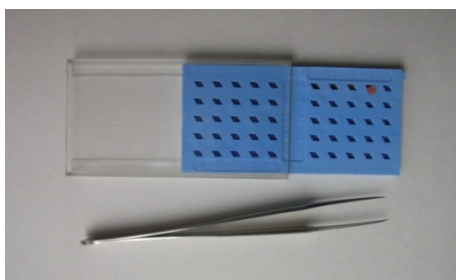


Figura 22. Gradilla para rejillas de cobre recubiertas de polímero para soporte de Formvar[®] para muestras en suspensión.

Las fracciones ricas en caveolas obtenidas tras el subfraccionamiento en gradientes discontinuos de sacarosa fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión (TEM) con la intención de estudiar la morfología de estos microdominios de membrana resistentes a detergentes no iónicos y pHs fuertemente alcalinos.

A partir de las fracciones ricas en caveolas (fracciones 3 y 4) se prepararon diferentes tinciones negativas con ácido fosfotúngstico (TPA). Brevemente, se diluyeron las fracciones (1:100) en tampón MES (25 mM de MES, 150 mM de NaCl a pH 6,5). A continuación, se depositó una gota de la solución diluida sobre el polímero

de Formvar[®] de la rejilla de cobre, se retiró el exceso con un papel y se dejó secar. Rápidamente, se aplicó una gota de TPA al 2% durante 1 min para fijar el material biológico a la rejilla. Por último, se lavó la preparación con agua destilada y se dejó secar hasta el día siguiente en una cámara para muestras de microscopía electrónica (Figura 22). Las distintas muestras fueron observadas en el TEM (Philips CM12, Figura 23) de la Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológicos de la Universidad de Santiago de Compostela (RIADIT, Santiago de Compostela).



Figura 23. Microcopio electrónico de transmisión (TEM) de la RIADIT de la Universidad de Santiago de Compostela.

8. Retrotranscripción-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 cav-1, eNOS y β -actin en células musculares lisas (A7r5 y RASMC), células endoteliales (HUVEC) y homogeneizados de la túnica media de aorta de rata. 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.

Para estudiar los efectos del *t*-RSV sobre la inducción de la expresión de *cav-1* y *eNOS* en células vasculares las A7r5, RASMC y HUVEC fueron tratadas con *t*-RSV (1, 10, 30, 50 y 70 μ M) o diluciones adecuadas del vehículo (DMSO) en el caso de los controles, a distintos tiempos (12-48 h). A continuación, se aisló el ARN total de los cultivos celulares y los homogeneizados empleando un sistema de columnas de intercambio iónico (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel GmbH and Co KG, Alemania). Este proceso de aislamiento consta de varias etapas. 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 posterior lavado de la columna con disolventes compatibles para eliminar el ADN. Por último, se eluyó el ARN en condiciones de baja fuerza iónica con H₂O libre de RNasas y se midió la concentración por espectrofotometría (relación 260/280 nm). El ARN total aislado se distribuyó en alícuotas de 1,75 μ g y se guardaron a -80 °C.

La composición de la mezcla de reacción de la RT (25 μ l de volumen final a pH 8,4) fue la siguiente: ARN total (1,75 μ g), iniciadores aleatorios (hexámeros de ADN; 0,5 μ g); retrotranscriptasa recombinante M-MLV-RT (1000 U), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP; 10 mM), tampón 5x de retrotranscripción (5 μ l) e inhibidores de RNasa (40 U/ μ l). 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 μ l; 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 μ M de cada iniciador, 1 U de la Taq ADN polimerasa y 1 μ l del producto obtenido en la RT.

Empleando las herramientas informáticas *Clustal W2* y *Primers* (www.yeastgenome.org) se diseñaron *primers* (cebadores) específicos para secuencias

de ~20 nucleótidos comunes a un mismo gen de dos especies diferentes (en nuestro caso *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*).

En la siguiente tabla se indican las secuencias de los *primers* empleados en la PCR, así como los tamaños correspondientes de los fragmentos amplificados y sus T_m (temperatura a la cual la doble hélice del ADN se disocia en dos hebras sencillas):

gen	Secuencia del <i>primer</i>	T_m	Tamaño
eNOS	s: 5'-TCCgATTCAACAgTgTCTCCT-3'	55 °C	151 bp
	a: 5'-ACAgAAgTgCgggTATgATgCTC-3'		
eNOS	s: 5'-gCACAggAAATgTTCACCTA-3'	52 °C	360 bp
	a: 5'-TCCATgCAGACAgCCACAT-3'		
CAV-1	s: 5'-AgCATgTCTgggggTAAATACg-3'	50 °C	560 bp
	a: 5'-CCTCCATCCCTgAAATgTCCT-3'		
β -ACTINA	s: 5'-TggAATCCTgTggCATCCATgAAAC-3'	60 °C	360 bp
	a: 5'-TAAAACgCAgCTCAgTAACAgTCCg-3'		

Tabla 1: Secuencia de *primers*. s: *primer* sentido; a: *primer* antisentido

Los ensayos de PCR para la amplificación del fragmento correspondiente al gen de eNOS fueron realizados con dos *primers* diferentes con el propósito de descartar una posible inespecificidad de la secuencia polinucleotídica.

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 ($T_m - 5$ °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 μ l por tubo). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparado en tampón TBE (45 mM Tris-base, 45 mM H_3BO_3 , 1 mM EDTA; pH 8) teñido con bromuro de etidio (0,05 μ l/ml). Las bandas fueron visualizadas con un sistema de adquisición de imágenes dotado con una lámpara ultravioleta (Fluo-Chem FC2 MultiImage II; Alpha Innotech). La intensidad de las bandas se midió por densitometría con el programa Fluo-Chem FC2 Tool (Alpha Innotech).

9. Co-inmunoprecipitación

La co-inmunoprecipitación es una técnica bioquímica que consiste en la precipitación de complejos proteicos y se fundamenta en el reconocimiento específico de una proteína (antígeno, Ag) por parte de un anticuerpo (Ac). El anticuerpo interacciona con unas microsferas de agarosa (proteína A/G) a través de su brazo constante. Tras el reconocimiento específico el complejo microsfera-Ac-Ag puede precipitarse por centrifugación, lo que permite la separación del Ag de interés del resto de la muestra. Posteriormente, el contenido proteico obtenido en el precipitado es separado por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y analizado por *western blot*. Esta técnica resulta de gran utilidad para el estudio de interacciones directas o indirectas entre proteínas.

En los estudios de evaluación de los potenciales efectos del *t*-RSV sobre la interacción proteica entre la cav-1 y el IP₃R en RASMC y la interacción entre la cav-1 y la e-NOS en HUVEC, estas células fueron tratadas con *t*-RSV (50 µM) durante 24 h antes de realizar la inmunoprecipitación. En las células control se comprobó el efecto del vehículo (DMSO) manteniendo las mismas condiciones de tratamiento anteriormente descritas.

Las células de cultivo se lavaron dos veces con PBS en hielo y posteriormente fueron lisadas con tampón de inmunoprecipitación (140 mM NaCl, 10 mM Tris, 5 mM NaF, 1% Triton X-100 y una mezcla de inhibidores de proteasas; pH 7.4). Luego, se homogeneizó el lisado haciéndolo pasar 10 veces por una aguja de 0,5 x 16 mm y se incubó en un agitador a 4 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se separó una alícuota de la suspensión celular para ser analizada por SDS-PAGE (fracción total, T).

La inmunoprecipitación se llevó a cabo adicionando el anticuerpo primario específico para la proteína que se desea precipitar y esferas de agarosa (protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology, Inc) que reconocen la región constante de las inmunoglobulinas G (anticuerpos primarios). La mezcla se mantuvo en un agitador a 4 °C un mínimo de 4 h. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 7.000 g durante 2 min. Tras la centrifugación se separó el sobrenadante (fracción S) del *pellet* (P). Las tres fracciones obtenidas de la inmunoprecipitación (T, S y P) se trataron con tampón desnaturizante para realizar una SDS-PAGE y luego una transferencia de las

proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron marcadas con el mismo anticuerpo que se empleó en la inmunoprecipitación y con otros anticuerpos primarios específicos dirigidos contra la proteína para la cual se sospecha una interacción. La intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa Fluo-Chem FC2 (Alpha Innotech).

10. Liberación de NO[•] por células HUVEC cultivadas en monocapa

Para estos experimentos, se sembraron células HUVEC en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Transcurridas 48 h, las células se encontraban en confluencia y se procedió a la medida de la liberación de NO[•] al exterior celular. Para ello, las células fueron lavadas dos veces con solución PBS (composición en mM: NaCl 137, KCl 2,7, MgSO₄ • 7H₂O 0,5, CaCl₂ • 2H₂O 0,9, KH₂PO₄ 1,5; pH 7,4) e incubadas en la misma solución conteniendo L-arg (100 μM) durante 10 min a 37 °C. A continuación, las células fueron tratadas durante 20 min con PBS conteniendo Ni²⁺ (300 μM), SKF 96365 (30 μM), TMB-8 (100 μM), L-NAME (500 μM) o el correspondiente vehículo y, seguidamente, incubadas con PBS conteniendo DAF-2 (0,1 μM). Esta baja concentración de DAF-2 fue escogida para reducir la contribución del DAF-2 a la autofluorescencia de las muestras (medida en los pocillos sin células), y que fue restada de la medida de fluorescencia total, de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Rathel y cols. (Rathel *et al.*, 2003). Este método permite la cuantificación del NO[•] en células endoteliales humanas en un rango nanomolar.

En estas condiciones, se añadió el *t*-RSV (1, 30, 100 μM), la TP (0,5 μM) la ionomicina (0,5 μM) o el vehículo a los correspondientes pocillos. En algunos experimentos, se empleó nitroprusiato sódico (NPS, 100 μM) como control positivo para la técnica. La fluorescencia de los sobrenadantes se midió cada 10 min durante 40 min a temperatura ambiente utilizando un lector de placa (Titertek Multiskan PLUS MKII, Titertek, Huntsville, AL, USA). Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 490 nm y 515 nm, respectivamente.

11. Evaluación de la actividad de la eNOS *in vitro*

Con la intención de estudiar los potenciales efectos directos del *t*-RSV sobre la actividad de la eNOS se llevaron a cabo una serie de experimentos para medir la actividad de esta enzima *in vitro*. La sonda fluorescente DAF-2 fue empleada para determinar la producción de NO[•]. La reacción de biosíntesis (Figura 13) se reprodujo utilizando la eNOS bovina recombinante y un kit diseñado para la medida de NO[•] libre en sistemas biológicos.

En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas para la medida de la actividad de esta enzima en placas de 96 pocillos. Una vez escogidas estas condiciones se evaluaron los efectos directos del *t*-RSV sobre la actividad de la eNOS.

Para ello, la solución de DAF-2 (concentración final 0,5 μM), la eNOS recombinante (0,05 x 10⁻³ U/pocillo) con diferentes concentraciones de *t*-RSV (0,5-100 μM) y la solución de β-NADP reducido (1 μM) fueron preparadas en tampón de reacción (50 mM Tris-HCl con CaM, BH₄, FMNH₂, FADH como catalizadores, Ca²⁺ y Fe²⁺ a pH 7,4). Se mezclaron 50 μl de cada una de las soluciones en los pocillos de la placa por triplicado y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. La producción de NO[•] fue cuantificada a 37 °C en un espectrofotómetro de placa (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech) determinando la fluorescencia generada (exc. 545 nm, em. 590 nm) cada 3 s durante 1 min. El sustrato a saturación (10 μl de L-arg 50 μM) fue aplicado después de la primera medida (1,5 s) con la ayuda de los inyectores del espectrofotómetro de placa.

Simultáneamente se llevaron a cabo experimentos control empleando inhibidores específicos para la eNOS (L-NNA, 1μM), y midiendo la fluorescencia en ausencia de enzima y/o DAF-2. Además, la posible capacidad del *t*-RSV para modificar la fluorescencia generada en la mezcla de reacción fue evaluada añadiendo este fármaco a soluciones que contenían solamente DAF-2 en tampón de reacción.

12. Fármacos y reactivos

Los fármacos y reactivos utilizados en los experimentos fueron: ácido L-(+)-ascórbico, ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico (MES), angiotensina II (ANG II), antibiótico-antimicótico (contiene penicilina G, estreptomicina y anfotericina B), anticuerpo monoclonal anti- α -actina de músculo liso conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), L-arginina (L-arg), azul de tripano, cafeína, dimetilsulfóxido (DMSO), elastasa pancreática de cerdo, heparina, ionomicina, kit para la determinación de la actividad de la enzima eNOS (FCANOS-1), β -mercaptoetanol, nifedipina (NIF), clorhidrato del éster metilo de L-N^G-Nitroarginina (L-NAME), N ω -NITRO-L-arginina (L-NNA), nitroprusiato sódico (NPS), noradrenalina (NA), L-polilisina, clorhidrato de 1-(β -[3-(4-metoxifenil) propoxi]-4-metoxifenetil)-1H-imidazol (SKF 96365), taspigargina (TP), clorhidrato de 8-(dietilamino) octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8), *trans*-resveratrol (*t*-RSV), TritónX-100, Tween 20, [Arg⁸]-vasopresina (AVP), todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich. La rianodina fue suministrada por ICN Pharmaceuticals (Irvine, CA, EE.UU). El *c*-RSV (*cis*-3,4,5-trihidroxiestilbeno) fue proporcionado por el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela donde se llevó a cabo el procedimiento experimental para la obtención del isómero *cis* descrito en la Revisión Bibliográfica. La acrilamida, la N,N'-bis-metilenacrilamida, y el reactivo de Bradford para la determinación de proteínas fueron suministrados por Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU). El marcador de pesos moleculares de proteína para SDS-PAGE empleado fue *PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas, Ontario, Canadá). Las esferas de agarosa A/G empleadas en las inmunoprecipitaciones proceden de Santa Cruz Biotechnology (California, EE.UU). El Temed (N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina), el persulfato amónico (PSA) y el dodecilsulfato sódico (SDS) fueron proporcionados por Merck. La seroalbumina bovina Fracción V (BSA), el cóctel de inhibidores de proteasas Complete[®] y CompleteMini[®], el marcador de peso molecular de ADN (*DNA Molecular Weight XIV*), la enzima Taq polimerasa y la colagenasa de páncreas porcina empleados en nuestros experimentos fueron suministrados por Roche (Mannheim, Alemania). La enzima retrotranscritasa de ratón (M-MLV-RT), los iniciadores aleatorios y los

inhibidores de RNasa (Rnasin® Plus) utilizados en la retrotranscripción fueron obtenidos de Promega (Madison, WI, EE.UU).

El suplemento de factor de crecimiento endotelial (ECGS) fue suministrado por Millipore (Temecula, CA, EE.UU). El medio DMEM/F-12, el suero fetal bovino (FBS) y la tripsina-EDTA (5%) fueron suministrados por Invitrogen (Paisley, Reino Unido), así como la sonda fluorescente fura-2 AM. Las sondas DAF-2 y DAF-2 DA proceden de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU).

Los anticuerpos monoclonales anti-cav-1 y anti-ER β y los policlonales anti-adenilil ciclasa 5/6, anti-G α_q y anti- β -adaptina fueron proporcionados por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, EEUU). Los anticuerpos monoclonales anti-caveolina-2, anti-caveolina-3, anti- β -adaptina, anti-eNOS y anti-receptor de IP $_3$ tipo 3 fueron suministrados por Becton Dickinson Biosciences (Erembodegem, Bélgica) a la vez que los anticuerpos policlonales anti-cav-1 y anti-caveolina (anti-cav-c). El anticuerpo policlonal anti-SERCA2 fue facilitado por Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo anti-receptor de IP $_3$ tipo 1 fue diseñado en el laboratorio del Prof. C.W. Taylor (Departamento de Farmacología de la Universidad de Cambridge). Además, se emplearon dos anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos para el marcaje inmunohistoquímico, anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 y anti-IgG de conejo Alexa Fluor 555 suministrados por Molecular Probes (Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

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: ANG II (1 mM), L-arg (100 mM), AVP (1 mM), Ni $^{2+}$ (10 mM), SKF 96365 (10 mM) y TMB-8 (10 mM) en agua desionizada; ionomicina (1 mM), NIF (10 mM), *t*-RSV (100 mM) y *c*-RSV (100 mM) en DMSO. La concentración final de DMSO no excedió en ningún caso el 0,01% (v/v).

Debido a la fotosensibilidad de las sondas fluorescentes y de algunos fármacos (*t*-RSV, *c*-RSV, NIF y NPS), todos los experimentos realizados con estos compuestos fueron llevados a cabo en la oscuridad.

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

13. Expresión y análisis estadístico de los resultados

Excepto donde se especifique de otro modo, los resultados mostrados en el texto y en las figuras están expresados como la media \pm el error estándar de la media (e.e.m.). Las diferencias significativas entre dos medias ($p < 0,05$ or $p < 0,01$) fueron determinadas utilizando el test de la 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, según procediese.

Para el cálculo de la $[Ca^{2+}]_i$ en células A7r5 o HUVEC en los experimentos de microscopía de epifluorescencia se procedió del siguiente modo: la fluorescencia media de cada célula individual se calculó a partir de los píxeles incluidos en regiones delimitadas manualmente mediante el programa Metafluor 7.1. La compensación de la fluorescencia de fondo se realizó por substracción de la iluminación medida en un área de la imagen que no presentaba ninguna célula. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó a partir de la relación de intensidades de emisión a la $\lambda_{em} = 510$ nm medidas tras la excitación dual del fura-2 a las λ_{ex} de 340 nm y 380 nm (F_{340}/F_{380}) según lo descrito por Grynkiewicz y cols. (1985). La relación fue convertida en concentración de Ca^{2+} libre mediante la ecuación: $[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}/R_{max} - R) (F_{min380}/F_{max380})$, donde K_d es la constante de afinidad del fura-2 por el Ca^{2+} , R es el cociente de fluorescencia F_{340}/F_{380} , R_{min} y R_{max} son los ratios limitantes para una $[Ca^{2+}]_i$ mínima (0 mM Ca^{2+} y 10 mM EGTA en la solución externa) y de saturación (10 mM Ca^{2+} en la solución externa), ambos en presencia de ionomicina (10 μ M). F_{min380}/F_{max380} es la relación de la fluorescencia para el fura-2 a 380 nm en presencia de $[Ca^{2+}]_i$ mínima o de saturación.

La $[Ca^{2+}]_i$ basal fue determinada efectuando una media de los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo medidos durante 10 s en células de diferentes preparaciones. Para el cálculo de los resultados se utilizaron únicamente los datos obtenidos a partir de células que respondían con una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al ionóforo ionomicina (0,5 μ M) al final de los experimentos. A partir de las curvas acumulativas, se calculó la concentración eficaz 50 (EC₅₀) para los efectos del *t*-RESV y del *c*-RESV mediante la estimación gráfica a partir de un ajuste de las curvas concentración respuesta obtenido por análisis sigmoidal (Origin 7.0).

Teniendo en cuenta que la expresión de β -actina no se ve modificada por los tratamientos llevados a cabo en este trabajo, se utilizó el valor de la intensidad de las bandas de β -actina ($I_{\beta\text{-actina}}$) medido por densitometría correspondientes a una misma muestra para normalizar los valores de las intensidades de las bandas. Los ratios $I_{\text{eNOS}}/I_{\beta\text{-actina}}$ y $I_{\text{cav-1}}/I_{\beta\text{-actina}}$ son, por tanto, magnitudes normalizadas y permiten comparar los niveles de expresión de eNOS y cav-1 de muestras diferentes para un mismo cultivo celular. Los resultados obtenidos mediante la RT-PCR se expresaron como la media \pm e.e.m. de al menos 3 experimentos independientes.

Para evaluar la interacción entre proteínas mediante inmunoprecipitación se utilizó el ratio entre la intensidad de banda de la fracción de *pellet* (P) y fracción de la banda de sobrenadante (S) como magnitud de referencia. Al tratarse de una relación de intensidades (P/S) para una misma muestra se discriminan las diferencias derivadas de la cantidad de proteína total, por la que este ratio permite comparar muestras control y tratadas para evaluar la influencia de un fármaco sobre la interacción entre dos proteínas.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización de las células de cultivo primario

Las células de cultivo primario empleadas en este trabajo son células musculares lisas de aorta de rata (RASMC). La viabilidad de estas células se determinó por la técnica de exclusión empleando azul de tripano, bajo la observación directa en un microscopio de contraste de fases inmediatamente antes de la puesta en cultivo. En nuestras condiciones de cultivo, estos miocitos presentaron una viabilidad del 90-95%, y así se mantuvo a lo largo de los sucesivos subcultivos.

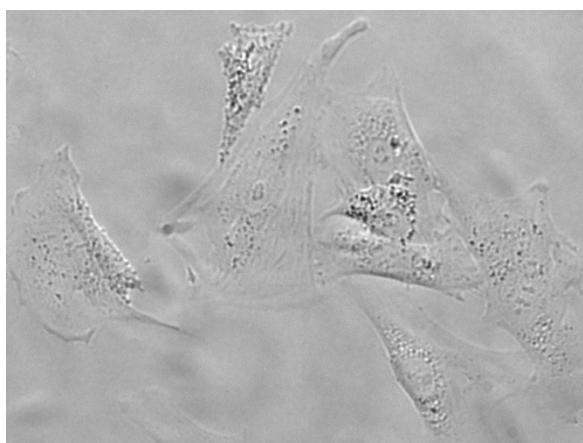


Figura 24. Fotografías realizadas bajo observación directa con un microscopio de contraste de fases (200 x) de RASMC después de 4 días de su puesta en cultivo.

Las células, inicialmente redondeadas y refringentes (aproximadamente 10 μm de diámetro), comenzaron a adherirse a la superficie del *flask* tras 24-48 horas. Una vez adheridas presentaron una morfología plana, fusiforme, con un gran citoplasma y,

frecuentemente, binucleadas (Figura 24). A los tres días de la siembra, entraron en mitosis. En las primeras etapas de la expansión del cultivo los miocitos formaron pequeñas colonias de crecimiento en monocapa. Sin embargo, antes de tupir la superficie del *flask*, se dispusieron unos sobre otros adoptando una configuración característica de los miocitos *in vitro* denominada “colina y valle” (del inglés *hill and valley*).

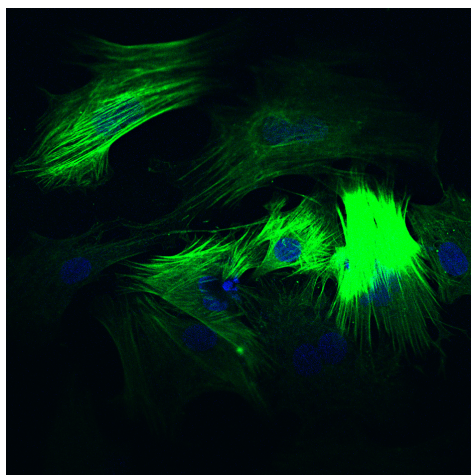


Figura 25. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de RASMC. El citoesqueleto de α -actina se muestra en verde. Los núcleos aparecen en color azul.

Con cada preparación de cultivo primario realizó una inmunotinción empleando un anticuerpo monoclonal anti- α -actina de músculo liso de aorta conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC). Tras el marcaje con este anticuerpo, se tiñó el núcleo de las células empleando 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI), un colorante azul de ADN, con el propósito de marcar con un fluorocromo todas las células de la preparación.

Las preparaciones fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con tritón X-100, tal como se indicó en la metodología. Tras el marcaje y la tinción, las células fueron observadas bajo un microscopio confocal excitando la muestra a 495 nm y recogiendo la máxima intensidad de fluorescencia a 520 nm para el FITC. A continuación se realizó la captura de la tinción nuclear excitando la muestra a 358 nm (longitud de onda contenida en el rango de luz UV) y recogiendo la máxima intensidad de fluorescencia a 461 nm para el DAPI.

En la figura 25 se muestra la inmunotinción de una preparación de cultivo primario de RASMC empleando el anticuerpo anti- α -actina para visualizar el citoesqueleto de actina y el reactivo DAPI para visualizar el ADN. En las células musculares puede observarse un citoesqueleto muy bien organizado con una estructura lineal muy bien definida.

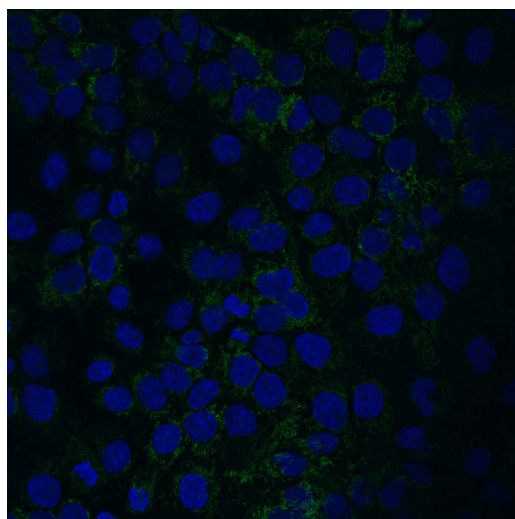


Figura 26. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células COS-7. En la figura se muestran los fibroblastos hepáticos marcados con el anticuerpo anti- α -actina y el colorante fluorescente DAPI. Los núcleos aparecen teñidos en color azul. El FITC conjugado al anticuerpo anti- α -actina permite visualizar el citoesqueleto de actina (en verde).

Para comprobar la especificidad del método se llevaron a cabo inmunotinciones en paralelo con otros tipos celulares que abundan en los vasos sanguíneos como son los fibroblastos y las células endoteliales. Concretamente, se emplearon fibroblastos hepáticos de mono verde africano (células COS-7) procedentes del laboratorio del Dr. Colin Taylor (Departamento de Farmacología de la Universidad de Cambridge, Reino Unido) y células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) de nuestro laboratorio. Tanto las células endoteliales de la capa íntima como los fibroblastos presentes en la capa adventicia de la arteria aorta constituyen una fuente potencial de contaminación para la preparación del cultivo primario de RASMC. La ausencia de señal de FITC en COS-7/HUVEC indica que dichas células no expresan la clase de α -actina característica de las células lisas vasculares (Figura 26).

2. Efectos del RSV sobre la homeostasis cálcica

2.1. Efectos del *c*-RSV y el *t*-RSV sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal

El valor medio de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en células A7r5 en medio 1,5 mM Ca^{2+} fue de $82,7 \pm 4,3$ nM ($n = 66$) y se mantuvo constante a lo largo de los experimentos. La aplicación acumulativa de *c*-RSV y *t*-RSV (0,1-100 μ M) provocó un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración, que después de 1 h no retornó a los valores basales iniciales (Figura 27), ni siquiera después de eliminar los compuestos mediante dos lavados.

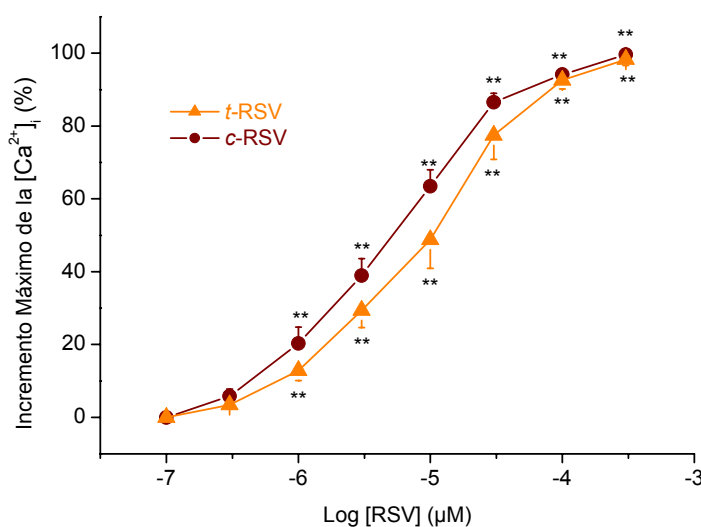


Figura 27. Curvas acumulativas concentración-respuesta del *c*-RSV y el *t*-RSV en A7r5. La $[Ca^{2+}]_i$ se expresa en % de la máxima respuesta obtenida para cada isómero, considerando la $[Ca^{2+}]_i$ basal como el 0%. Cada valor representa la media de 17 experimentos (*c*-RSV) o 14 experimentos (*t*-RSV). El e.e.m. se indica mediante barras verticales. Significación estadística con respecto a los valores basales $**p < 0,01$.

Los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ máximos alcanzados fueron: $270,0 \pm 27,9$ nM ($n = 17$) para el *c*-RSV y $246,7 \pm 35,6$ nM ($n = 14$) para el *t*-RSV ($p < 0,01$ respecto a los niveles basales en ambos casos). No se han encontrado diferencias significativas entre los valores máximos alcanzados en los tratamientos con el *c*-RSV y el *t*-RSV ($p >$

0,05); pero, sí hay diferencias significativas entre los valores de las EC_{50} : $16,5 \pm 4,4$ μM para el *t*-RSV y $6,8 \pm 1,3$ μM para el *c*-RSV ($p < 0,05$).

El porcentaje de células que respondieron al *c*-RSV y al *t*-RSV no varió de forma significativa siendo, en ambos casos, un 90% la fracción de células que respondió a la ionomicina (0,5 μM) al final de los experimentos.

2.2. Efectos del Ni^{2+} , la NIF y el SKF 96365 sobre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el *c*-RSV y el *t*-RSV

La aplicación de un única concentración de *c*-RSV o *t*-RSV (10 μM) provocó un aumento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con niveles máximos de $212,6 \pm 39,8$ nM ($n = 16$) y $201,9 \pm 41,3$ nM ($n = 19$) respectivamente. En ambos casos, las diferencias con respecto a los niveles basales fueron significativas ($p < 0,01$) y no se encontraron diferencias significativas entre los dos isómeros ($p > 0,05$).

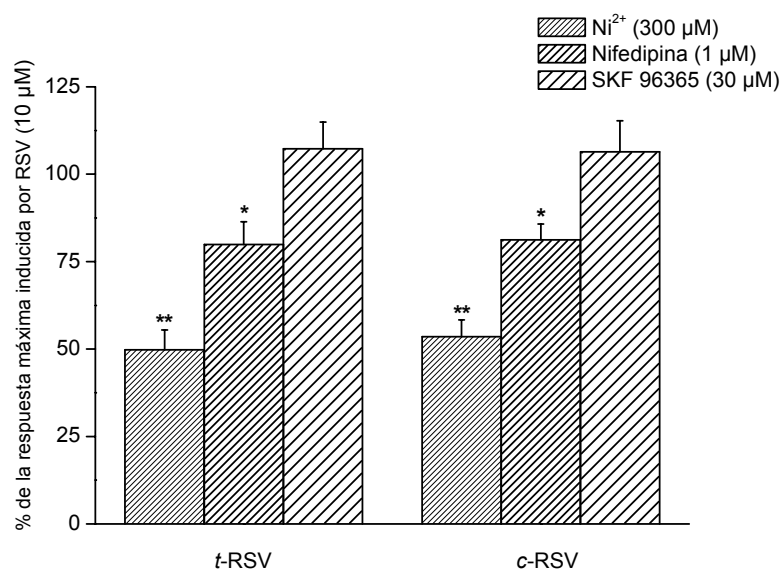


Figura 28. Efectos de Ni^{2+} , NIF y SKF 96365 sobre el incremento máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (considerado el 100%) inducido por los dos isómeros del RSV en SN. Cada columna representa la media \pm e.e.m. (indicado en líneas verticales) de un mínimo de 12 células. * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$ respecto al control.

La aplicación de Ni^{2+} (300 μM) 20 min después de la aplicación de *c*-RSV o *t*-RSV (10 μM) inhibió significativamente el aumento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, observándose una reducción de ~50% de la máxima respuesta alcanzada por ambos isómeros (Figura 28). De forma análoga, la nifedipina (NIF, 1 μM) redujo parcialmente el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por *c*-RSV y *t*-RSV, con una disminución de la máxima respuesta a los dos isómeros de ~20%. Sin embargo, el SKF 96365 (30 μM) no modificó significativamente la respuesta sostenida inducida por el *c*-RSV ni por el *t*-RSV (Figura 28).

2.3. Interferencias entre los aumentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la TP y el RSV

2.3.1. Efectos del RSV sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la administración de TP

En medio 1,5 mM de CaCl_2 (SN), la aplicación previa de TP modificó de forma significativa el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el *c*-RSV y por el *t*-RSV. El grado de interferencia es dependiente de la concentración (Tabla 2). La TP a dosis bajas (10 nM) no modificó los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 5 min después de la aplicación de TP la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ era de $82,0 \pm 8,1$ nM ($n = 10$; $p > 0,05$). Sin embargo, a dosis más altas (100 nM) la TP sí provocó un aumento lento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, alcanzando $159,0 \pm 15,4$ nM ($n = 14$; $p < 0,01$) 5 min después de su aplicación. 10 min después de la aplicación de la TP (10 y 100 nM), tanto el *c*-RSV como el *t*-RSV (10 μM) indujeron un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que fue significativamente mayor que en ausencia de la TP (Tabla 2). La subsiguiente aplicación de una concentración más elevada de ambos isómeros (30 μM) indujo un incremento adicional de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de 10 nM de TP, pero no en presencia de 100 nM (Tabla 2).

El empleo de concentraciones mayores de TP generó un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se reflejó en un pico inicial que aparece a los 3-5 min de la aplicación. Aproximadamente 5 min después de la aplicación de 0,5 ó 1 μM de TP la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue $332,6 \pm 34,3$ nM ($n = 16$) y $361,3 \pm 36,9$ nM ($n = 14$), respectivamente ($p < 0,01$ respecto a los niveles basales y $p > 0,05$ entre ambas concentraciones). A los 15 min después de la aplicación de TP (0,5 y 1 μM), la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuyó hasta estabilizarse en una meseta: $143,1 \pm 13,3$ nM ($n = 16$) y $168,2 \pm 16,8$ nM ($n = 14$),

respectivamente. Las diferencias entre valores medios fueron significativas ($p < 0,01$) respecto a los niveles basales y no significativas ($p > 0,05$) entre ambas concentraciones. La meseta inducida por la TP (0,5 μM) fue inhibida de modo significativo por el Ni^{2+} (300 μM), la NIF (1 μM) y el SKF 96365 (30 μM) con reducción de las respuestas máximas de 65%, 25% y 30% respectivamente (Figura 29).

La aplicación de *c*-RSV y *t*-RSV (10 y 30 μM) sobre la meseta inducida por la TP (0,5 y 1 μM), provocó un aumento adicional de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este caso, los niveles finales de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no son estadísticamente diferentes o están disminuidos en relación con los valores obtenidos en ausencia de la TP (Tabla 2).

		<i>t</i>-RSV	
		10 μM	30 μM
Control		201,9 \pm 41,3	258,9 \pm 33,1
	10 nM	299,2 \pm 22,2**	336,7 \pm 32,0**
TP	100 nM	343,4 \pm 31,1**	345,2 \pm 44,9**
(aplicación previa)	500 nM	220,3 \pm 30,1	208,2 \pm 19,0*
	1 μM	189,2 \pm 16,2	178,2 \pm 15,6**

		<i>c</i>-RSV	
		10 μM	30 μM
Control		212,6 \pm 39,8	245,0 \pm 26,6
	10 nM	278,3 \pm 37,7*	327,4 \pm 22,3**
TP	100 nM	326,8 \pm 26,4**	319,1 \pm 25,8**
(aplicación previa)	500 nM	229,3 \pm 19,1	216,3 \pm 21,5
	1 μM	201,5 \pm 24,8	177,2 \pm 21,7**

Tabla 2. Efectos de la aplicación previa de TP sobre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM) inducido por *t*-RSV o *c*-RSV en medio 1,5 mM CaCl_2 . Cada valor se expresa como la media \pm e.e.m de al menos 12 células (* $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$ respecto al control sin TP).

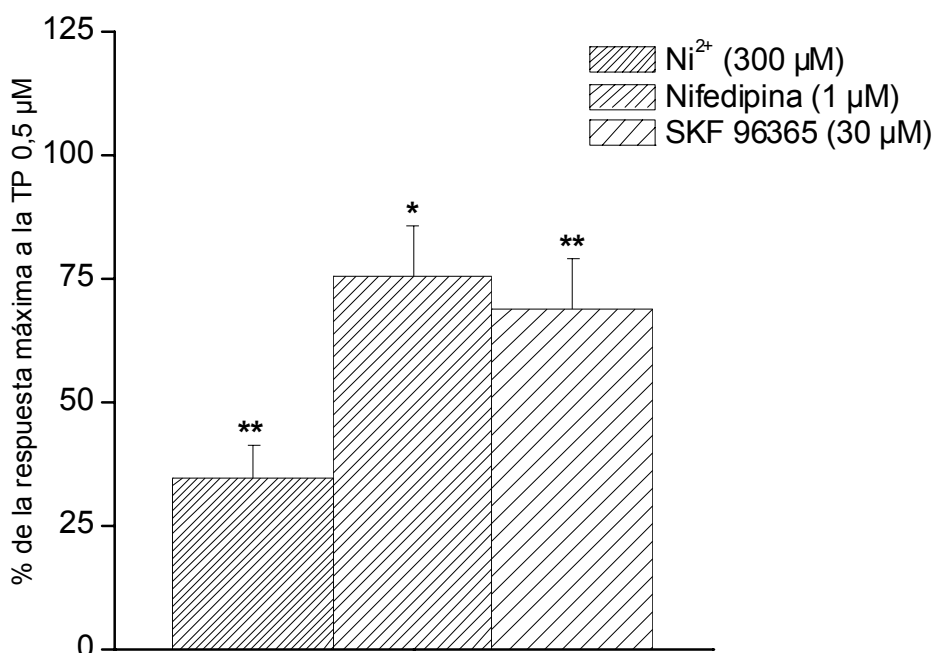


Figura 29. Efectos del Ni²⁺, la NIF y el SKF 96365 sobre el valor de la [Ca²⁺]_i en la fase de meseta de la respuesta cálcica (considerado el 100%) inducida por la TP en SN. Cada columna representa la media ± e.e.m. (indicado en líneas verticales) de un mínimo de 12 células. **p* < 0,05 o ***p* < 0,01 respecto al control.

El aumento adicional de la [Ca²⁺]_i provocado por *c*-RSV y *t*-RSV tras incubación con la TP fue inhibido parcialmente por el Ni²⁺ (300 μM; reducción del ~60%) y por la NIF (1 μM, ~20%), pero no por el SKF 96365 (30 μM) (datos no mostrados).

2.3.2. Efectos de la TP sobre la [Ca²⁺]_i tras la administración de *c*-RSV o *t*-RSV

Los aumentos de la [Ca²⁺]_i provocados por la TP en SN (1,5 mM CaCl₂) se vieron alterados de forma significativa cuando se realizó una preincubación con ambos isómeros del RSV. En presencia de concentraciones inferiores de *c*-RSV y *t*-RSV (100 nM), que no provocaron aumentos en la [Ca²⁺]_i *per se*, las [Ca²⁺]_i alcanzadas tras administrar TP (10, 100 y 500 nM) fueron significativamente potenciadas (Tabla 3). Sin embargo, al emplear una concentración mayor de TP (1 μM) no se observó potenciación significativa (Tabla 3).

Una concentración mayor de *c*-RSV o *t*-RSV (10 μ M), que sí provoca un marcado aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, potenció de forma significativa el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por concentraciones bajas de TP (10, 100 nM), pero redujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por TP a concentraciones mayores (0,5 y 1 μ M) (Tabla 3).

Tapsigargina					
		10 nM		100 nM	
		Pico	Meseta	Pico	Meseta
Control		82,0 \pm 8,1	78,3 \pm 5,5	159,0 \pm 15,4	90,6 \pm 7,4
<i>t</i>-RSV	100 nM	129,8 \pm 21,2**	85,9 \pm 7,1	208,1 \pm 31,1**	116,4 \pm 15,0*
	10 μ M	198,4 \pm 30,0**	135,3 \pm 16,9**	215,2 \pm 28,9**	142,2 \pm 28,1**
<i>c</i>-RSV	100 nM	135,2 \pm 17,2**	90,6 \pm 10,0	210,8 \pm 19,1**	122,4 \pm 27,0
	10 μ M	205,4 \pm 21,6**	140,0 \pm 17,7**	233,8 \pm 31,5**	139,8 \pm 18,4**

		500 nM		1 μM	
		Pico	Meseta	Pico	Meseta
Control		332,6 \pm 34,3	143,1 \pm 13,3	361,3 \pm 36,9	168,2 \pm 16,7
<i>t</i>-RSV	100 nM	395,0 \pm 24,4*	177,3 \pm 19,0**	377,9 \pm 28,9	184,3 \pm 23,4
	10 μ M	256,3 \pm 22,0**	122,1 \pm 19,5	235,4 \pm 33,7**	119,8 \pm 15,1**
<i>c</i>-RSV	100 nM	401,9 \pm 29,3**	190,2 \pm 22,6**	398,1 \pm 30,0	192,3 \pm 24,5
	10 μ M	277,2 \pm 27,8**	130,1 \pm 17,5	244,4 \pm 31,1**	122,3 \pm 23,3**

Tabla 3. Efectos de la administración previa de *t*-RSV o *c*-RSV sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (nM) inducido por la TP en medio 1,5 mM de $CaCl_2$. Cada valor se expresa como la media \pm e.e.m. de al menos 10 células (* $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$).

2.4. Efectos del *c*-RSV y el *t*-RSV sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en ausencia de Ca^{2+} extracelular

En ausencia de Ca^{2+} extracelular (medio $0Ca^{2+}$), la media de la $[Ca^{2+}]_i$ basal fue de $65,7 \pm 5,7$ nM ($n = 33$; $p < 0,05$ respecto a los valores obtenidos en SN conteniendo $1,5$ mM $CaCl_2$). En ausencia de tratamiento este valor se mantuvo constante durante todo el experimento.

La aplicación de *c*-RSV o *t*-RSV ($10 \mu M$) provocó un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ que alcanzó un máximo en torno a los 8-10 min y retornó a niveles basales transcurridos ~ 25 min. Los valores máximos de $[Ca^{2+}]_i$ alcanzados fueron $115,6 \pm 12,5$ nM ($n = 18$) para el *c*-RSV y $111,2 \pm 13,0$ nM ($n = 15$) para el *t*-RSV. En ambos casos las diferencias son significativas respecto a los valores basales ($p < 0,01$) y no significativas entre los dos isómeros ($p > 0,05$).

La aplicación sucesiva de *c*-RSV o *t*-RSV, sin lavados intermedios, generó aumentos consecutivos de la $[Ca^{2+}]_i$. En este caso, el nivel máximo de la $[Ca^{2+}]_i$ alcanzado tras la aplicación se fue reduciendo hasta la ausencia total de respuesta después de 3-4 aplicaciones.

Después de una única administración de *t*-RSV o *c*-RSV ($10 \mu M$), la sustitución de medio $0Ca^{2+}$ por SN provocó un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ con las características de la denominada CCE. En estas condiciones, los valores máximos de $[Ca^{2+}]_i$ alcanzados fueron $163,1 \pm 18,3$ nM ($n = 9$) para el *t*-RSV y $158,4 \pm 26,1$ nM ($n = 7$) para el *c*-RSV ($p < 0,01$ con respecto a los valores basales y sin diferencias significativas entre ellos, $p > 0,05$).

A la concentración de $100 \mu M$, el *c*-RSV y el *t*-RSV provocaron un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ significativamente mayor que el inducido a la concentración de $10 \mu M$ (datos no mostrados). En estas condiciones, las células no respondieron a una segunda aplicación de los agentes.

2.5. Interferencias entre la TP y el RSV en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular

En $0Ca^{2+}$, la TP ($0,5 \mu M$) provocó un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ que alcanza un valor máximo de $184,3 \pm 20,9$ nM ($n = 12$; $p < 0,01$ respecto a los valores basales) a los 3-5 min tras la aplicación y regresa a línea base al cabo de 10 min.

El cambio de medio $0Ca^{2+}$ a SN después de la aplicación de TP induce la entrada capacitativa de Ca^{2+} , con un valor máximo de $163,1 \pm 25,1$ nM ($n = 10$; $p < 0,01$ respecto a los valores basales).

Las interacciones entre la TP y los dos isómeros de RSV son coherentes con los resultados obtenidos en SN. Es decir, los aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ provocados por el RSV fueron potenciados por la aplicación previa de concentraciones bajas de TP (10 y 100 nM); sin embargo, las concentraciones más elevadas de TP ($0,5$ y $1 \mu M$) inhibieron de forma significativa el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocado por el *t*-RSV y el *c*-RSV (Figura 30).

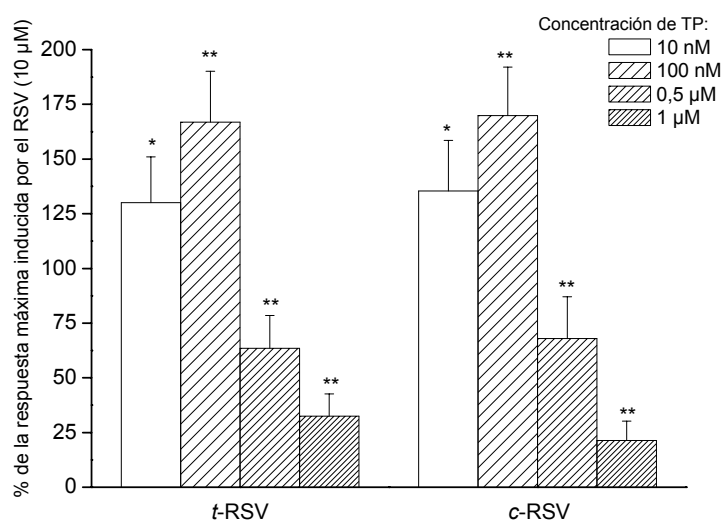


Figura 30. Efectos de la preincubación con TP sobre el máximo incremento de $[Ca^{2+}]_i$ (considerado como el 100%) inducido por el *c*-RSV y el *t*-RSV en medio $0Ca^{2+}$ ($n = 10$; * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$).

Además, después de la depleción parcial de los depósitos de Ca^{2+} por la aplicación de *t*-RSV y *c*-RSV (10 μM), el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por la TP (0,5 μM) se redujo de forma significativa. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máxima alcanzada fue $111,9 \pm 12,5$ nM ($n = 11$) tras una depleción previa con *t*-RSV y $98,0 \pm 14,2$ nM ($n = 13$) tras una depleción previa inducida por el *c*-RSV. Las diferencias fueron significativas ($p < 0,01$) respecto a los valores obtenidos en ausencia de RSV. En aquellas situaciones en las que el RSV no fue capaz de liberar más Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, por ejemplo, tras la aplicación de una concentración elevada (100 μM) o de aplicaciones acumulativas (10 μM) de *t*-RSV y *c*-RSV, la subsiguiente aplicación de TP (0,5 μM) no aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal.

2.6. Efectos del TMB-8 sobre los aumentos de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ inducidos por *c*-RSV, *t*-RSV y TP

Los efectos del antagonista de Ca^{2+} intracelular TMB-8 (100 μM) se estudiaron tanto en S0Ca^{2+} como en SN, preincubando las células durante 5 min con dicho agente.

En S0Ca^{2+} , el TMB-8 (100 μM) inhibió completamente los aumentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la TP (0,5 μM) o por los dos isómeros del RSV (10 μM). Sin embargo, después de la preincubación con TMB-8 (100 μM) en SN los tres agentes fueron capaces de inducir un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lento y sostenido. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máxima fue de $142,5 \pm 16,0$ ($n = 9$) para la TP (0,5 μM); $119,7 \pm 18,3$ ($n = 8$) para el *c*-RSV (10 μM) y $129,1 \pm 15,1$ ($n = 12$) para el *t*-RSV (10 μM). En los tres casos, las diferencias con respecto a los valores basales fueron significativas ($p < 0,01$). Estos aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no fueron inhibidos de forma significativa por el Ni^{2+} (300 μM), la NIF (1 μM) o el SKF 96365 (30 μM).

2.7. Efectos del RSV sobre la respuesta a agonistas de GPCR en células A7r5

2.7.1. Caracterización de la respuesta cálcica a la AVP (0,5 μM) y a la ANG II (0,1 μM) en medio 1,5 mM de Ca^{2+}

La arginina vasopresina (AVP, 0,5 μM) causó un incremento bifásico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células A7r5: primero una elevación transitoria (pico) de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que tiene lugar antes de 2 min tras la aplicación de la AVP (valor máximo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alcanzado: $685,2 \pm 30,9$ nM; $n = 67$; $p < 0,01$ con respecto al valor basal), seguida de un descenso hasta que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se estabiliza en una meseta ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $167,7 \pm 9,5$ nM; $n = 67$; $p < 0,01$ con respecto al valor basal y al del pico máximo). Esta meseta permaneció estable durante, al menos, 45 min en presencia del agonista y descendió rápidamente a niveles basales cuando éste fue eliminado mediante lavado (Figura 31).

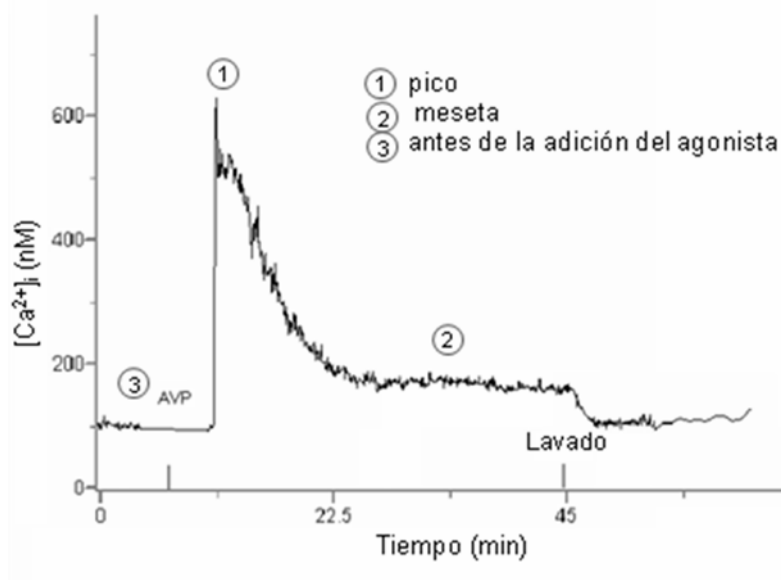


Figura 31. Registro representativo de la respuesta cálcica inducida por AVP (500 nM) en células A7r5.

La fase de meseta de la respuesta cálcica inducida por AVP (0,5 μM) fue parcialmente inhibida (~30%) por la administración de NIF (1 μM) ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $128,3 \pm 8,5$ nM; $n = 18$; $p < 0,05$) y completamente abolida por la administración de Ni^{2+} (300 nM) ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $80,6 \pm 7,2$ nM; $n = 7$; $p < 0,01$ y $p > 0,05$ respecto al nivel basal).

La aplicación de angiotensina II (ANG II) indujo un incremento bifásico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cualitativamente similar al producido por la AVP. La respuesta cálcica de la ANG II (0,1 μM) se caracterizó por presentar un pico transitorio que alcanzó el valor de $394,5 \pm 17,1$ nM y una fase de meseta de $131,3 \pm 10,5$ nM ($n = 31$; $p < 0,01$ respecto al valor basal) que se mantuvo estable, al menos, 45 min en presencia del agonista. Esta fase de meseta fue parcialmente inhibida por NIF (1 μM) ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $99,7 \pm 4,2$ nM; $n = 18$; $p < 0,05$) y completamente abolida por 300 μM de Ni^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $75,3 \pm 7,0$ nM; $n = 10$; $p < 0,01$; $p > 0,05$ respecto al valor basal inicial).

En otra serie de experimentos realizamos curvas acumulativas con el agonista adrenérgico noradrenalina (NA 100 nM -10 μM), además de realizar aplicaciones en células individuales mediante microperfusión con dicho agonista (1-100 μM). En general, las células A7r5 respondieron muy poco o nada a este agonista, y tan sólo a las concentraciones más altas un porcentaje muy bajo (< 5%) de las células presentó una respuesta cálcica que fue, en general, poco importante (datos no mostrados). En varias de las células insensibles a la NA se realizó la aplicación posterior de AVP (500 nM), que dio lugar a la respuesta cálcica característica de este agonista. Además, un porcentaje elevado (~90 %) de las células insensibles a NA respondieron a una aplicación posterior de ionomicina (500 nM).

2.7.2. Efectos de la preincubación con los isómeros del RSV sobre la respuesta cálcica inducida por la AVP y la ANG II en medio con 1,5 mM de Ca^{2+}

Con el propósito de investigar los efectos del RSV sobre la respuesta cálcica bifásica inducida por la AVP (0,5 μ M) y la ANG II (0,1 μ M), se adicionó el estilbena 20 min antes de la aplicación de los agonistas. En esta serie de experimentos, la preincubación de A7r5 con *t*-RSV o *c*-RSV (10 y 60 μ M) causó un incremento lento y sostenido de los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ similares a los que se han descrito previamente en el apartado 2.2. de Resultados (Tabla 4).

		$[Ca^{2+}]_i$ en medio 1,5 mM de Ca^{+2}	n
<i>t</i> -RSV	10 μ M	190,4 \pm 9,9 ^a	41
	60 μ M	231,5 \pm 9,8 ^a	37
<i>c</i> -RSV	10 μ M	203,1 \pm 10,3 ^a	36
	60 μ M	263,8 \pm 10,5 ^{a, b}	32

Tabla 4. Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la aplicación de *t*-RSV o *c*-RSV. ^a $p < 0,01$ respecto al valor basal y ^b $p < 0,05$ respecto al *t*-RSV. El número de experimentos (n) se representa en la columna adyacente.

En estas condiciones, la fase de pico de la respuesta cálcica inducida por la AVP (0,5 μ M) fue significativamente menor, mientras que la fase de meseta fue completamente abolida. (Figura 32).

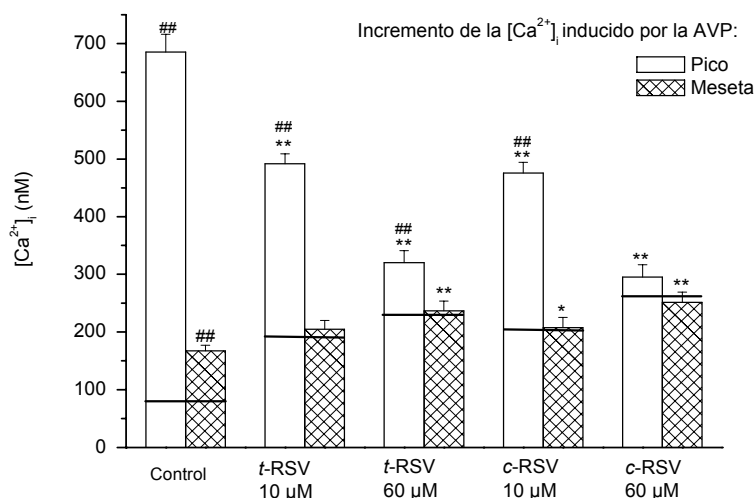


Figura 32. Efectos de la preincubación con *t*-RSV y *c*-RSV (20 min) sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la AVP (0,5 μ M) en A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. (indicado con líneas verticales) de un mínimo de 15 células. Los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ medidos antes de la adición de la AVP en A7r5 tratadas con RSV y controles se indican mediante barras horizontales (Tabla 5). Nivel de significación estadística: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control; ## $p < 0,01$ respecto al valor de la $[Ca^{2+}]_i$ antes de la aplicación de la AVP.

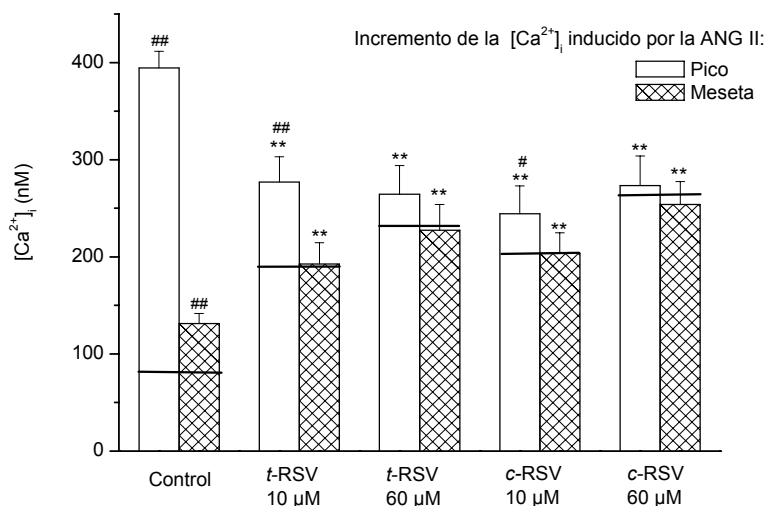


Figura 33. Efectos de la preincubación con *t*-RSV y *c*-RSV (20 min) sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la ANG II (0,1 μ M) en A7r5. Cada barra representa la media \pm e.e.m. (indicado con líneas verticales) de un mínimo de 15 células. Los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ medidos antes de la adición de la ANG II en A7r5 tratadas con RSV y controles se indican mediante barras horizontales (Tabla 5). Nivel de significación estadística: ** $p < 0,01$ respecto al control; ## $p < 0,01$ respecto al valor de la $[Ca^{2+}]_i$ antes de la aplicación de la AVP.

Análogamente, se obtuvieron resultados similares con la aplicación de ANG II. Tras la preincubación con *c*- o *t*-RSV (10 y 60 μM), la fase de pico de la respuesta cálcica inducida por la ANG II (0,1 μM), se vió también disminuida respecto al valor máximo alcanzado en ausencia de los dos isómeros. Al igual que en el caso de la AVP, la fase de meseta de la respuesta cálcica de la ANG II en estas condiciones fue completamente abolida (Figura 33).

Es importante destacar aquí que, teniendo en cuenta los valores absolutos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el pico inducido por los agonistas disminuyó significativamente con la preincubación de *c*- o *t*-RSV, mientras que la fase de meseta se vio incrementada. Esto parece indicar que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la preincubación con los isómeros del RSV se mantiene incluso después de la aplicación de la AVP (0,5 μM) o la ANG II (0,1 μM).

Con el propósito de evaluar los efectos del RSV sobre la respuesta cálcica inducida por agonistas, se calcularon las relaciones entre los valores absolutos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alcanzada en el pico y los valores absolutos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la meseta (ratio pico/meseta) de las respuestas cálcicas inducidas por AVP (0,5 μM) y ANG II (0,1 μM) en ausencia (control) y en presencia de los isómeros del RSV. El valor del ratio pico/meseta se vió disminuido de modo concentración dependiente. Los valores del ratio fueron más bajos para el *c*-RSV que para el *t*-RSV (Tabla 5).

	Control	10 μM		60 μM	
		<i>t</i> -RSV	<i>c</i> -RSV	<i>t</i> -RSV	<i>c</i> -RSV
AVP	4,08	2,39	2,29	1,35	1,17
ANG II	3,00	1,43	1,19	1,16	1,07

Tabla 5. Ratio pico/meseta de los valores absolutos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la AVP (0,5 μM) y la ANG II (0,1 μM) en ausencia (control) y en presencia de los isómeros del RSV (10 y 60 μM).

2.7.3. Efectos de la aplicación de los isómeros del RSV en la fase de meseta de la respuesta cálcica de AVP o ANG II en medio 1,5 mM de Ca^{2+}

La fase de meseta de la respuesta cálcica inducida por AVP (0,5 μ M) o por ANGII (0,1 μ M) se caracteriza por un ligero incremento en los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ muy prolongado (45 min) que regresa a valores basales tras un lavado (ver apartado de la caracterización de la respuesta cálcica a agonistas). Este incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de la fase de meseta se debe fundamentalmente a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de canales todavía no caracterizados (ver Discusión).

Para evaluar los efectos de los dos isómeros del RSV sobre la entrada de Ca^{2+} que tiene lugar durante esta fase, éstos fueron adicionados a las células una vez que la meseta estaba estabilizada (punto 2 de la figura 31).

Cuando los dos isómeros del RSV (60 μ M) fueron aplicados sobre la meseta de la respuesta cálcica a la AVP (0,5 μ M) se observó un cambio bifásico de la $[Ca^{2+}]_i$: 1) una reducción lenta de dicha meseta durante los primeros 5 min, 2) seguida de un incremento sostenido (que comenzó \sim 10 min después de la aplicación de los isómeros) que se estabilizó a los 20 min en valores de $[Ca^{2+}]_i$ similares a los de la meseta inducida por el agonista (Figuras 34 y 35).

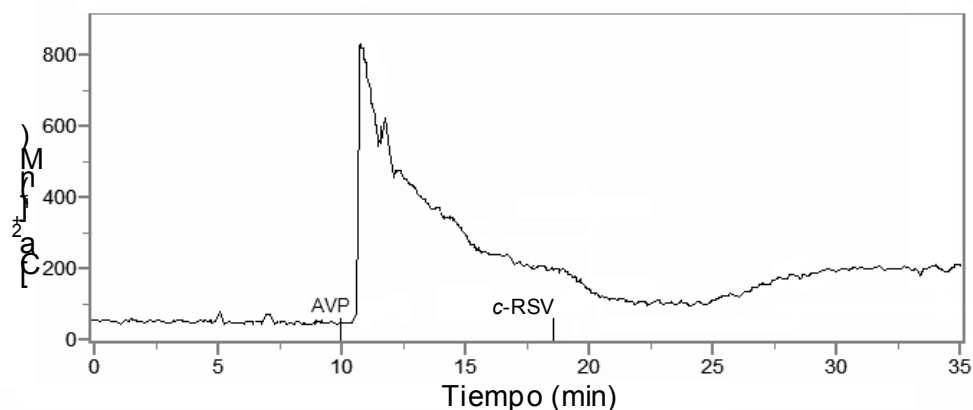


Figura 34. Registro representativo de los efectos del *c*-RSV (60 μ M) aplicado en la fase de meseta de la respuesta cálcica inducida por la AVP (0,5 μ M) en células A7r5.

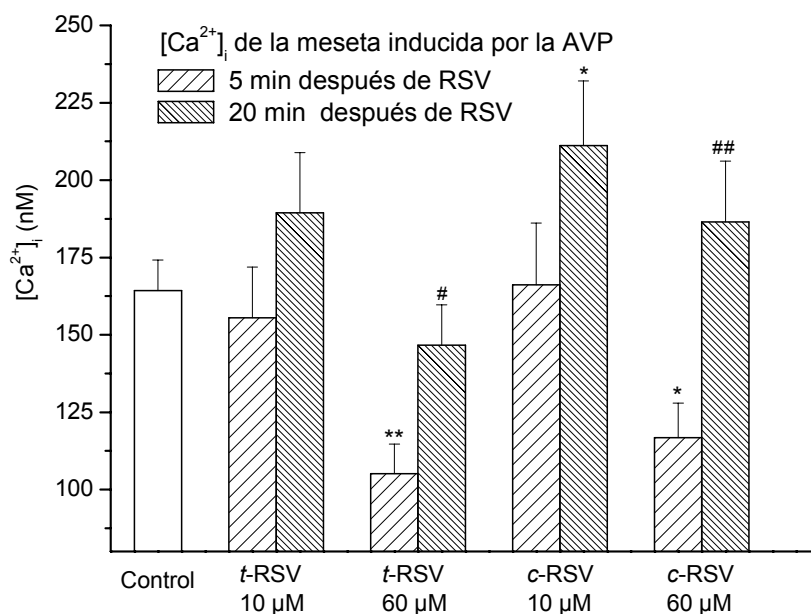


Figura 35. Valores absolutos de la $[Ca^{2+}]_i$ medidos a los 5 y 20 min después de la aplicación de los isómeros de RSV sobre la fase de meseta de la respuesta cálcica de la AVP (0,5 μ M). Cada barra representa el valor medio \pm e.e.m (indicada con líneas verticales) de un mínimo de 14 células. Nivel de significación estadística: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a los valores control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a la $[Ca^{2+}]_i$ medida 5 min después de la aplicación de los isómeros del RSV.

De nuevo, los efectos de los isómeros del RSV aplicados sobre la meseta de la respuesta cálcica a la ANG II fueron similares a los descritos anteriormente para la AVP. Esto es, la entrada de Ca^{2+} externo inducida por la aplicación de ANG II fue primero inhibida por la aplicación de los isómeros del RSV (60 μ M), y posteriormente potenciada, dando lugar a un incremento sostenido que comenzó \sim 10 min después de la aplicación de los isómeros y que se estabilizó a los 20 min en valores similares a los de la meseta inducida por el agonista (Figura 36).

Es importante destacar que, a la concentración de 10 μ M, tan sólo el *c*-RSV indujo un incremento significativo de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre la respuesta inducida por la AVP y la ANG II (Figura 35 y 36 respectivamente).

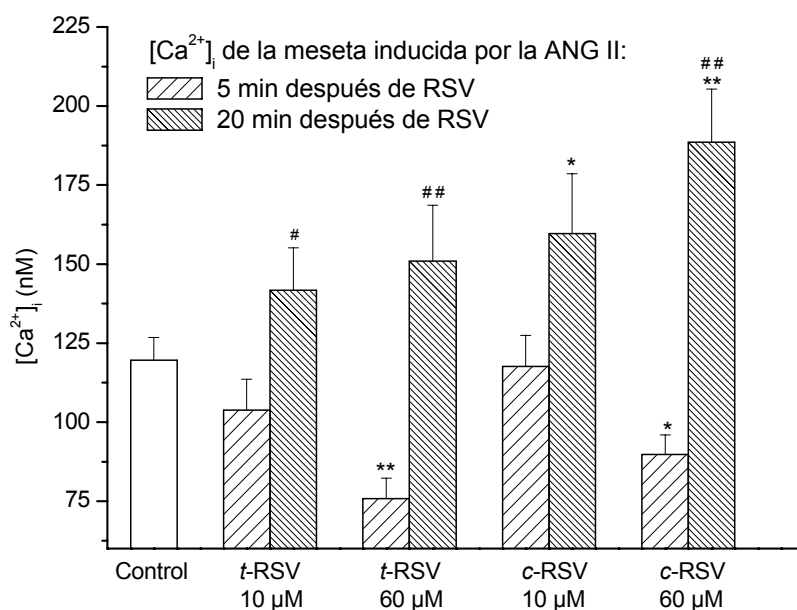


Figura 36. Valores absolutos de la $[Ca^{2+}]_i$ medidos a los 5 y 20 min después de la aplicación de los isómeros de RSV sobre la fase de meseta de la respuesta cálcica de la ANG II ($0,1 \mu M$). Cada barra representa el valor medio \pm e.e.m (indicada con líneas verticales) de un mínimo de 14 células. Nivel de significación estadística: $*p < 0,05$ y $**p < 0,01$ respecto a los valores control; $^{\#}p < 0,05$ y $^{\#\#}p < 0,01$ respecto a la $[Ca^{2+}]_i$ medida 5 min después de la aplicación de los isómeros del RSV.

2.7.4. Efectos del RSV sobre la respuesta cálcica inducida por AVP o ANG II en ausencia de Ca^{2+} extracelular

Como ya se mencionó anteriormente, el pico de la respuesta cálcica inducida por AVP o ANG II fue significativamente inhibido por los dos isómeros del RSV. Con el propósito de estudiar si el RSV inhibe la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares sensibles al IP_3 , se midieron sus efectos sobre los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la AVP y la ANG II en $S0Ca^{2+}$. En estas condiciones, el promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ basal fue $67,3 \pm 3,0$ nM ($n = 121$; $p < 0,05$ con respecto al nivel basal en SN). El tratamiento de las A7r5 con AVP ($0,5 \mu M$) o ANG II ($0,1 \mu M$) indujo un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ consistente en un pico rápido que regresó a niveles basales de Ca^{+2} en 5 min (Figuras 37 y 38).

Tras la aplicación del agonista se sustituyó la $SOCa^{2+}$ por SN. La presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular indujo un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figuras 37 y 39), probablemente debido a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de SOCC, aunque teniendo en cuenta los resultados descritos en el apartado 2.2. de esta sección, los canales de Ca^{2+} sensibles a NIF podrían estar también implicados.

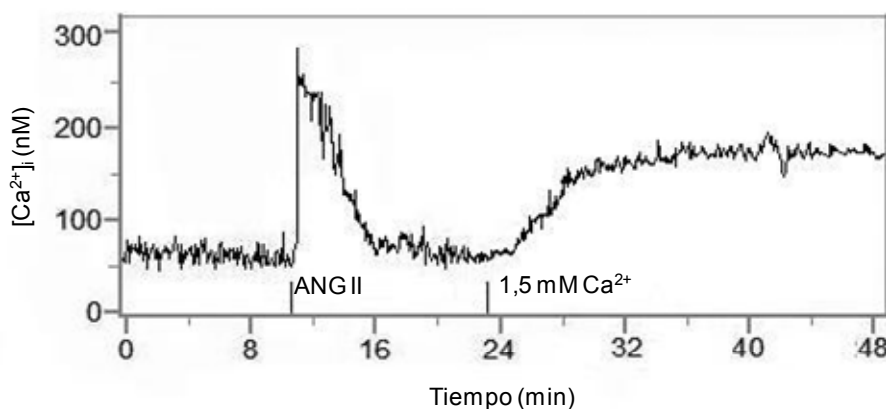


Figura 37. Registro representativo de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por la ANG II ($0,1 \mu M$) en medio libre de Ca^{2+} y la subsiguiente reintroducción de Ca^{2+} ($1,5 mM$) en la solución extracelular.

	<i>t</i> -RSV		<i>c</i> -RSV	
	10 μM	60 μM	10 μM	60 μM
Antes de agonista	109.7 ± 11.8^b (25)	156.6 ± 11.1^b (25)	118.8 ± 10.4^b (24)	167.5 ± 15.8^b (27)
Después de AVP	70.3 ± 9.8 (12)	120.3 ± 14.2^b (12)	73.9 ± 12.1 (12)	132.2 ± 14.1^b (14)
Después ≥ 3 AVP	73.6 ± 8.1 (10)	93.3 ± 6.8^a (12)	75.3 ± 9.6 (9)	109.4 ± 12.2^b (9)
Después de ANG II	80.4 ± 8.8 (10)	138.3 ± 19.2^b (12)	79.1 ± 9.0 (11)	156.2 ± 21.9^b (10)

Tabla 6. $[Ca^{2+}]_i$ (nM) máxima inducida por el *t*-RSV y el *c*-RSV en medio libre de Ca^{2+} antes de la aplicación cualquier agonista, después de la aplicación de AVP ($0,5 \mu M$) o ANG II ($0,1 \mu M$) y después de tres o más aplicaciones consecutivas de AVP ($0,5 \mu M$). Niveles de significación estadística: $^a p < 0,05$ o $^b p < 0,01$ respecto al valor basal. No hubo diferencias significativas entre ambos isómeros. El número de experimentos realizados en cada caso se indica entre paréntesis.

Cuando los isómeros del RSV (10, 60 μM) fueron aplicados al inicio del experimento se produjo un aumento significativo y transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tabla 6) que regresó a valores basales tras $\sim 20\text{-}25$ min. En estas condiciones, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la subsiguiente aplicación de AVP (0,5 μM) o ANG II (0,1 μM) fue significativamente menor (Figura 38).

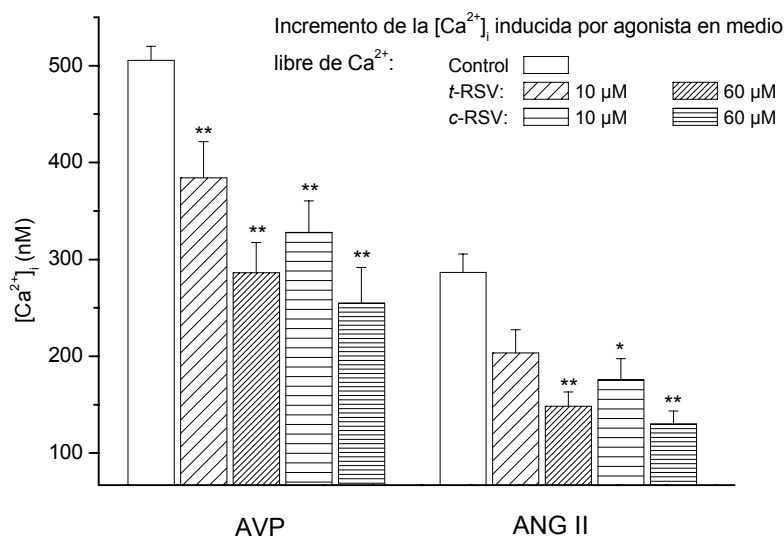


Figura 38. Efectos de los isómeros del RSV sobre los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la AVP (0,5 μM) o por la ANG II (0,1 μM) en medio libre de Ca^{2+} .

En otra serie de experimentos, tras el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el agonista en medio libre de Ca^{2+} , el *t*-RSV o *c*-RSV (60 μM , pero no 10 μM) todavía fueron capaces de provocar un incremento en los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que alcanzó su valor máximo a los 10 min (Tabla 6). Además, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ medido tras el cambio de medio libre de Ca^{2+} por medio 1,5 mM Ca^{2+} fue significativamente potenciado en presencia de los isómeros del RSV (60 μM , pero no 10 μM) (Figura 39).

Con el propósito de lograr la depleción total de los reservorios de Ca^{2+} sensibles a la AVP, se realizaron adiciones sucesivas de este agonista en medio libre de Ca^{2+} . En estas condiciones, el pico de Ca^{2+} inducido por la AVP (0,5 μM) fue

completamente abolido tras dos aplicaciones sucesivas de agonista. La falta de respuesta a la AVP tras tres aplicaciones sucesivas en medio libre de Ca^{2+} no fue debido a la desensibilización de los receptores, dado que la AVP fue capaz de provocar un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de haber reintroducido Ca^{2+} en el medio extracelular (datos no mostrados).

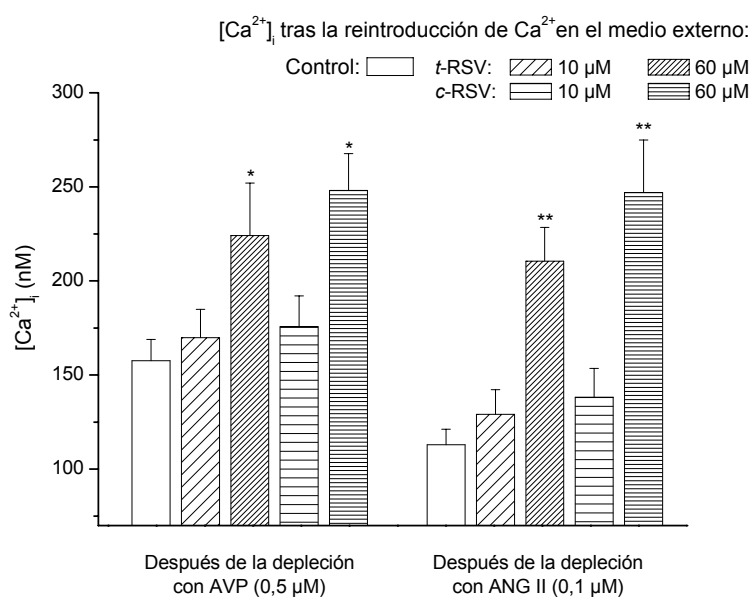


Figura 39. Efectos de los isómeros del RSV sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de la reintroducción de Ca^{2+} en el medio extracelular. Cada barra representa el valor medio \pm e.e.m. (indicado mediante líneas verticales) de un mínimo de 10 células. Nivel de significación estadística: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a los controles.

Después de la total depleción de los reservorios de Ca^{2+} sensibles a la AVP tanto el *t*-RSV como el *c*-RSV (60 μM) indujeron un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tabla 6). Sin embargo, la aplicación de *c*-RSV o *t*-RSV (10 μM) fue insuficiente para inducir dicho incremento.

Análogamente, la taspigargina (TP; 0,5 μM) indujo un incremento adicional de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la depleción total de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} sensibles a la AVP (Tabla 6). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máxima alcanzada después de la adición de la TP fue $158,4 \pm 28,4$ nM ($n = 10$, $p < 0,01$ con respecto al valor basal).

2.8. Efectos del RSV sobre la respuesta cálcica de la rianodina y la cafeína en A7r5

El alcaloide rianodina es un agonista específico de los receptores (conocidos como receptores de rianodina, RyR) implicados en el mecanismo de la CICR (ver Revisión Bibliográfica). En las células A7r5 la existencia de dicho mecanismo ha sido cuestionada por diversos grupos de investigación (ver Discusión). Para evaluar la actividad de los receptores de rianodina se midieron los efectos de este alcaloide sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en medio libre de Ca^{2+} . En estas condiciones, la rianodina (0,1-1 μ M) no indujo cambios significativos en la $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_i$ 3 min después de la aplicación de rianodina: $68,9 \pm 8,8$ nM; $n = 18$, $p > 0,05$ con respecto al valor basal).

La aplicación posterior de *c*-RSV o *t*-RSV (60 μ M) indujo un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que no fue significativamente diferente del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido en ausencia de la rianodina (datos no mostrados).

2.9. Efectos del RSV sobre la respuesta a K^+ isotónico

La hipótesis de que los efectos vasorrelajantes del RSV sean en parte debidos a que estos actúen sobre canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC) nos condujo a realizar medidas de la $[Ca^{2+}]_i$ actuando farmacológicamente sobre la actividad de estos canales. Con el propósito de inducir la despolarización de la membrana plasmática se empleó una solución extracelular libre de Ca^{2+} con elevado contenido en K^+ (60 mM, medio despolarizante).

La sustitución de la SN por medio despolarizante en A7r5 indujo una disminución de los niveles basales de la $[Ca^{2+}]_i$ ($66,5 \pm 4,2$ nM; $n = 68$; $p < 0,05$ respecto a los valores medidos en SN) que se mantuvo constante, al menos, durante 2 h. La reintroducción de Ca^{2+} (1,5 mM) en el medio extracelular provocó un aumento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_i$ máxima alcanzada: $227,9 \pm 22,1$ nM; $n = 16$; $p < 0,01$ respecto al valor basal) (Figuras 40 y 41). Esta respuesta fue completamente suprimida en presencia de NIF (1 μ M) ($[Ca^{2+}]_i$ máxima: $69,3 \pm 8,5$ nM; $n = 7$; $p > 0,05$ respecto al valor basal).

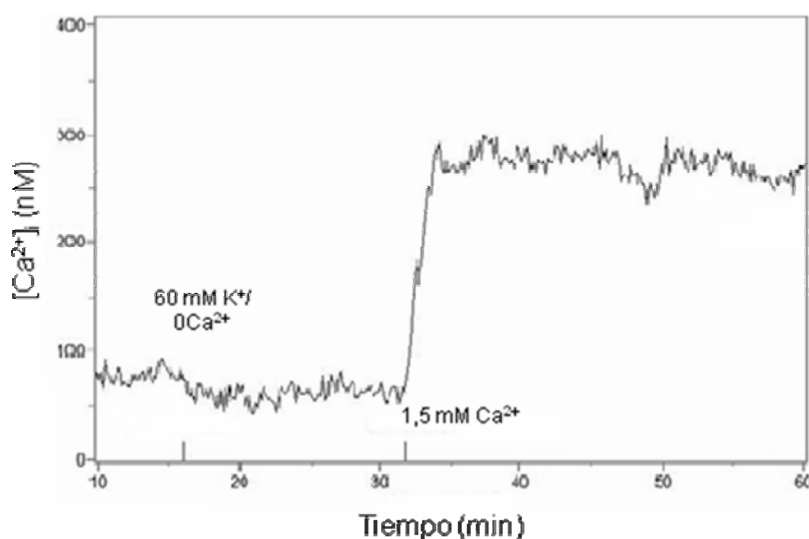


Figura 40. Registro representativo de la respuesta cálcica provocada por la reintroducción de Ca^{2+} (1,5 mM) en medio despolarizante 0Ca^{2+} en células A7r5.

La incubación con *c*-RSV o *t*-RSV (10 y 60 μM) en medio despolarizante libre de Ca^{2+} provocó un incremento transitorio significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que regresó a valores basales después de 20-25 min (Tabla 7). A continuación, la reintroducción de Ca^{2+} (1,5 mM) en el medio extracelular, en presencia de ambos isómeros, indujo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ significativamente menor que aquel provocado en ausencia de los estilbenos (a excepción de la concentración 10 μM de *t*-RSV; (Figura 41).

La aplicación de ambos isómeros del RSV sobre la meseta inducida por la reintroducción de Ca^{2+} (1,5 mM) en medio despolarizante con K^+ isotónico redujo marcadamente el plato de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante los primeros 5 min y, al cabo de un tiempo, comenzó a subir lentamente hasta alcanzar valores superiores a los de la meseta inicial (Figura 42 y 43). En estos experimentos los efectos cuantitativos del *c*-RSV (60 μM) fueron significativamente diferentes a aquellos obtenidos con el *t*-RSV a la misma concentración.

		[Ca ²⁺] _i en medio 60 mM K ⁺ /0Ca ²⁺	n
<i>t</i> -RSV	10 μM	101,6 ± 13,1 ^a	12
	60 μM	145,4 ± 13,2 ^b	10
<i>c</i> -RSV	10 μM	116,9 ± 9,9 ^b	11
	60 μM	152,2 ± 15,8 ^b	12

Tabla 7. Valores de la [Ca²⁺]_i alcanzados al sustituir solución salina normal por medio despolarizante con K⁺ en presencia de diferentes tratamientos con *c*-RSV y *t*-RSV. Nivel de significación estadística: ^a $p < 0,05$ y ^b $p < 0,01$ respecto al valor basal. No hay diferencias significativas entre los valores obtenidos para los dos isómeros ($p > 0,05$).

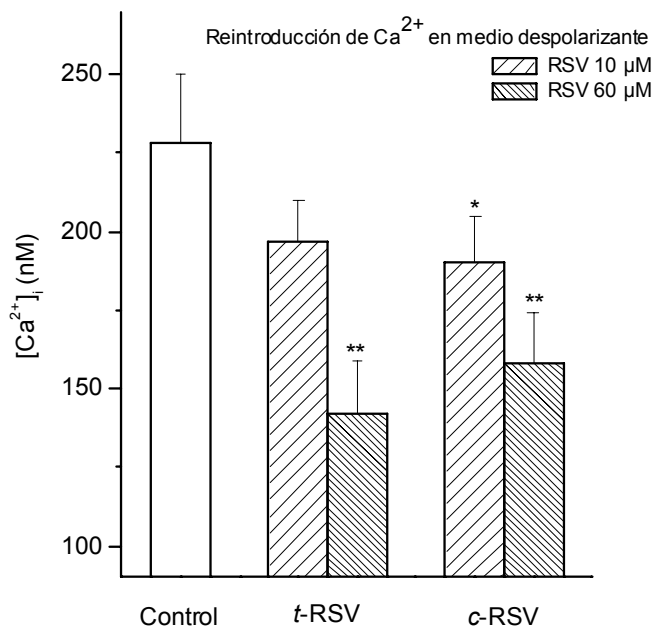


Figura 41. Efectos de los isómeros del RSV sobre el incremento de la [Ca²⁺]_i provocado por la reintroducción de Ca²⁺ en medio despolarizante. Cada barra representa la [Ca²⁺]_i media ± e.e.m. (indicado mediante líneas verticales) de un mínimo de 13 células; ^{*} $p < 0,05$ y ^{**} $p < 0,01$ respecto a los valores control.

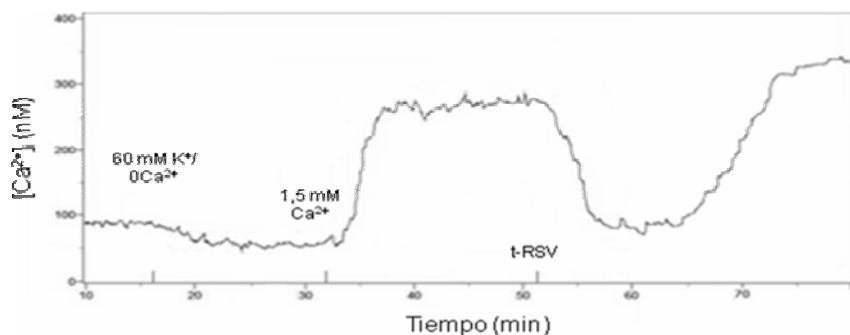


Figura 42. Registro característico de los efectos del t -RSV (60 μ M) después de la estabilización del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por la reintroducción de Ca^{2+} en medio despolarizante.

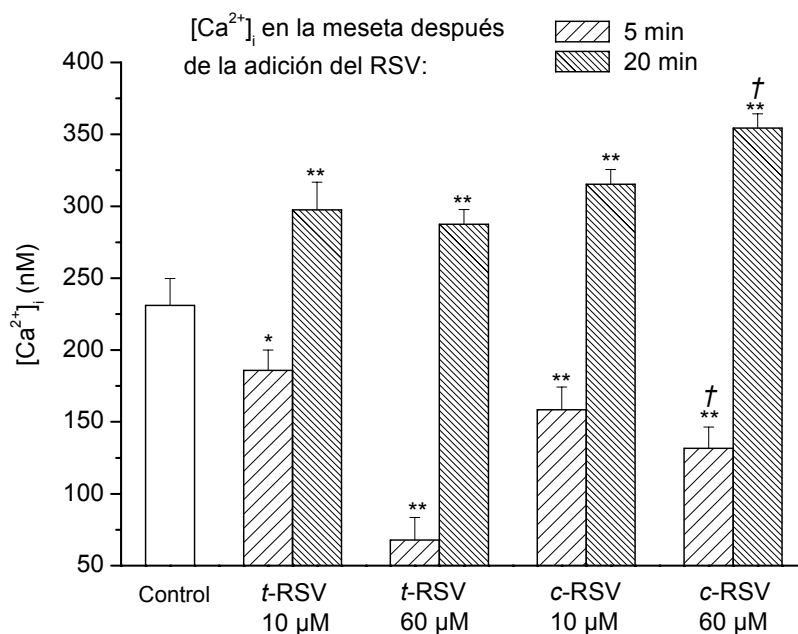


Figura 43. Valores medios de la $[Ca^{2+}]_i$ medidos 5 y 20 min después de la aplicación de c -RSV y t -RSV durante la fase de meseta inducida por la reintroducción de 1,5 mM de Ca^{2+} en medio despolarizante. Cada barra representa la $[Ca^{2+}]_i$ media \pm e.e.m. (indicado mediante líneas verticales) de un mínimo de 11 células; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a los valores control; † $p < 0,01$ respecto al t -RSV.

3. Efectos del RSV sobre la homeostasis del NO[•]

3.1. Expresión de la eNOS en células vasculares

Mediante técnicas estandarizadas de *western blot* se evaluó la presencia de enzima eNOS en célula endotelial HUVEC, miocito vascular liso de línea (A7r5) y de cultivo primario (RASMC). En la figura 44.A se representa el *blot* marcado con anticuerpo anti-eNOS de muestras de los lisados celulares totales de HUVEC, A7r5 y RASMC (1 µg de proteína total/calle). Las células endoteliales vasculares presentaron de forma constitutiva la enzima eNOS. En contraste, los lisados de células musculares lisas (A7r5 y RASMC) no mostraron banda tras el marcaje de la membrana con anticuerpo primario anti-eNOS.

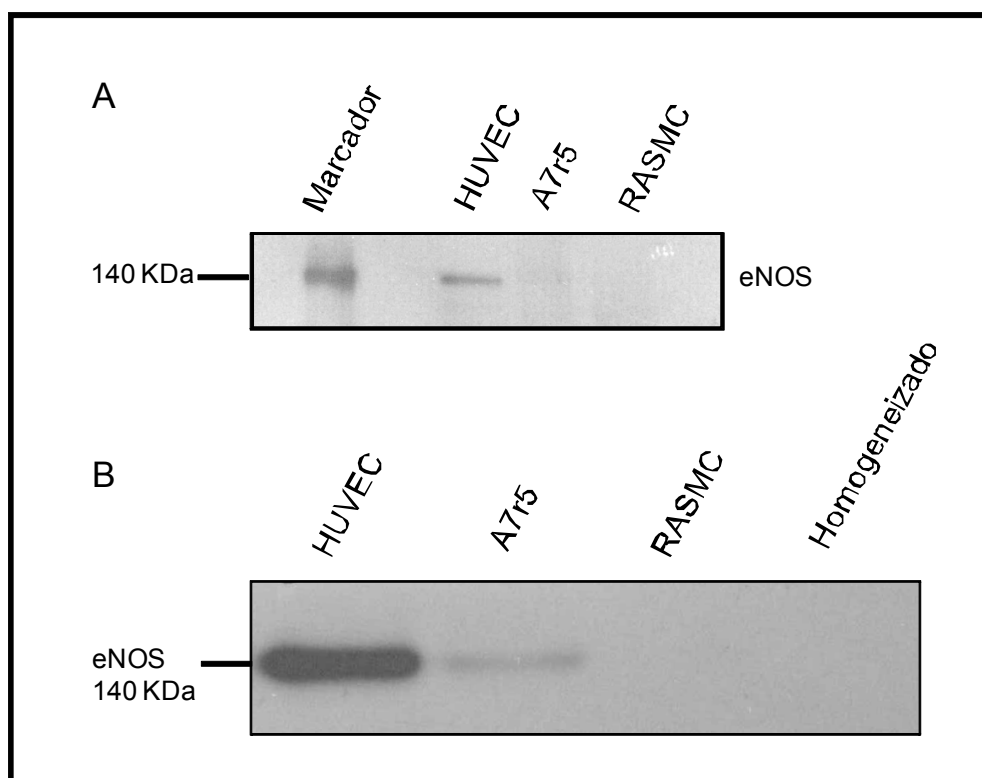


Figura 44. *Blots* representativos de muestras de los lisados totales de células HUVEC, A7r5, RASMC y de los homogeneizados de aorta de rata marcados con anticuerpo anti-eNOS. **A.** La cantidad de proteína total cargada en cada calle es 1 µg. La primera banda representa la proteína de 140 kDa del marcador de peso molecular. **B.** La cantidad de proteína total cargada en estas calles es de 3 µg.

Los *blots* se repitieron empleando una cantidad tres veces mayor de proteína total (3 µg de proteína total en cada calle del gel de electroforesis). En estas condiciones, los *blots* realizados con los lisados celulares de HUVEC presentaron una banda saturada correspondiente a la enzima eNOS (140 kDa), mientras que las muestras de A7r5 mostraron una banda muy débil correspondiente a dicha enzima. Sin embargo, los miocitos de cultivo primario no mostraron evidencias de la presencia de eNOS.

Para asegurarse de que la falta de expresión de la eNOS en RASMC no fuese consecuencia de la modificación fenotípica que sufren las células tras la obtención del cultivo primario, se realizaron los mismos ensayos con muestras de los homogeneizados de la túnica media de aorta de rata con individuos de dos edades diferentes: ratas neonatas (dos días de edad) y ratas de 3 meses de edad (Figura 44.B). Al igual que sucedía con las RASMC, los homogeneizados de la túnica media de aorta de rata tampoco mostraron evidencias de la presencia de eNOS.

Posteriormente, se procedió a la determinación de ARN codificante para la enzima eNOS tanto en las HUVEC, como en los tres tipos de células musculares lisas (A7r5, miocitos de cultivo primario y homogeneizado de la túnica media de aorta de rata). Para ello, se aisló el ARN total de estas cuatro muestras empleando un sistema de columnas de intercambio iónico. Tras la retrotranscripción se procedió a la amplificación de un fragmento del gen de eNOS empleando *primers* específicos para una secuencia común al ADNc de ambas especies (*R. norvegicus* y *H. sapiens*). Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa mediante electroforesis según lo descrito en el apartado 8 de Materiales y Métodos. En la figura 45 se muestra un gel de agarosa representativo de los ensayos realizados con las cuatro muestras mencionadas anteriormente. Tan sólo las HUVEC y las A7r5 dieron lugar a la amplificación del fragmento de ADNc de la eNOS; mientras que los miocitos procedentes de los homogeneizados de la túnica media de la aorta y las células de cultivo primario no mostraron banda de ADNc de eNOS en ausencia de tratamiento.

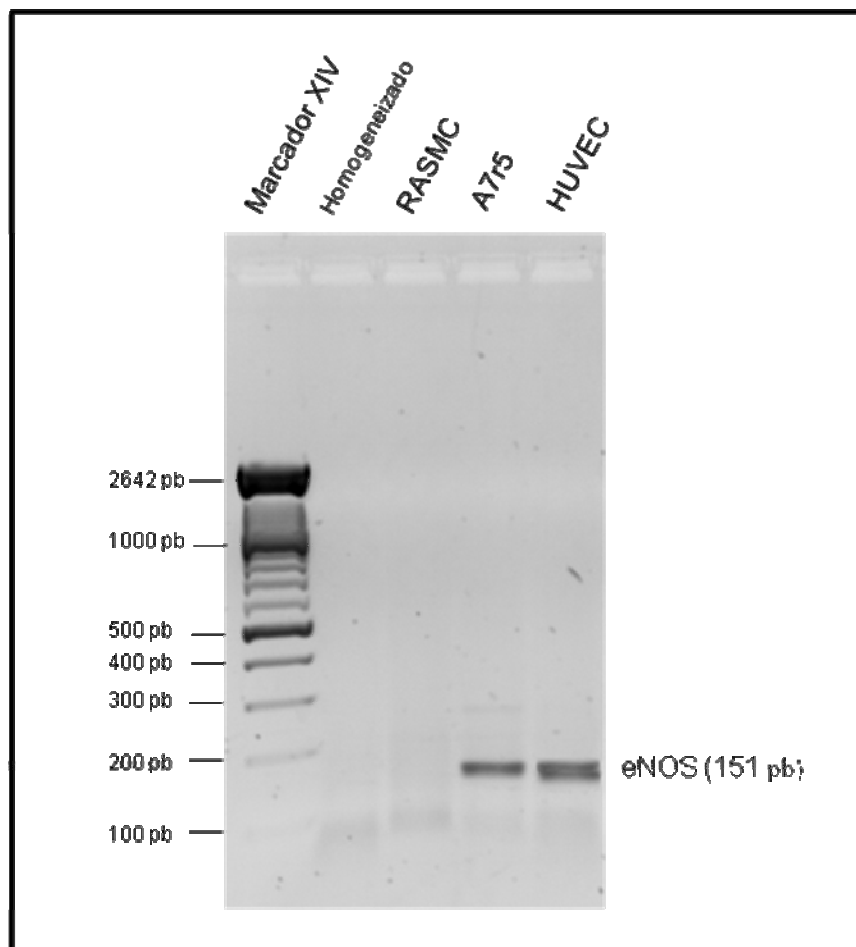


Figura 45. Gel de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de un fragmento de 151 pb del gen eNOS de muestras del homogeneizado de la túnica media de aorta torácica de rata, RASMC, A7r5 y HUVEC.

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión proteica (*western blot*) están en concordancia con los resultados obtenidos mediante la técnica de la RT-PCR. Ambos, en conjunto, indican que tan sólo las células endoteliales y las musculares lisas de línea (A7r5) expresan, de manera constitutiva, la enzima eNOS en ausencia de tratamiento. Por el contrario, las células musculares lisas de cultivo primario (RASMC) carecen de esta enzima en estas condiciones y además, no presentan ARN codificante para eNOS.

3.2. El *t*-RSV potencia la expresión de eNOS en células vasculares

Las células HUVEC fueron tratadas con diferentes concentraciones de *t*-RSV a distintos tiempos. Tras el aislamiento de ARN total de las diferentes muestras se realizaron las correspondientes RT-PCRs con el propósito de cuantificar los niveles de ARN mensajero codificante para eNOS según se explica en el apartado 8 de Materiales y Métodos. En la tabla 8 se indican las intensidades de las bandas de un fragmento de ADNc de eNOS obtenido mediante RT-PCR a partir de muestras de ARN total de HUVEC. Los datos están normalizados considerando el nivel de ARN de eNOS basal como el valor de referencia 1. La intensidad de la banda del fragmento de ADNc de eNOS amplificado se incrementa al aumentar la concentración y el tiempo de exposición del *t*-RSV.

		Tiempo		
		12 h	24 h	48 h
Control		1	1	1
	10 μ M	1,08 \pm 0,023	1,38 \pm 0,032	3,36 \pm 0,049
<i>t</i> -RSV	30 μ M	1,2 \pm 0,027	1,84 \pm 0,033	4,02 \pm 0,045
	70 μ M	1,42 \pm 0,022	2,16 \pm 0,047	4,82 \pm 0,038

Tabla 8. Intensidad de las bandas de ADNc de eNOS de muestras de HUVEC cuantificadas por densitometría. El valor 1 representa la media del nivel de ARN basal codificante para eNOS. Este valor se mantiene constante a lo largo del tiempo en ausencia de tratamiento. El *t*-RSV indujo un incremento en los niveles de ARN mensajero codificante para eNOS dependiente del tiempo y de la concentración.

El tratamiento de los miocitos vasculares de cultivo primario (RASMC) y de línea (A7r5) con *t*-RSV también activa la regulación transcripcional de la eNOS. En A7r5, al igual que sucedía con HUVEC, el *t*-RSV (30 μ M, 24h) incrementa los niveles de ARN codificante para eNOS (Figura 46).

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las RASMC no mostraron evidencias de presentar ARN codificante para eNOS en ausencia de tratamiento; sin embargo, en muestras tratadas con *t*-RSV (30 μ M, 24h) aparecieron bandas correspondientes al fragmento de ADNc codificante para eNOS (Figura 46.A). Para comparar las intensidades de las bandas de eNOS correspondientes al tratamiento y al control se normalizó el valor de dicha intensidad respecto a la intensidad de la banda de β -actina correspondiente a la misma muestra. En el histograma de la figura 46.B se representa el ratio entre las intensidades de las bandas correspondiente a la eNOS y a la β -actina (intensidad de banda de eNOS/ intensidad de banda de β -actina) para los diferentes controles y tratamientos (30 μ M *t*-RSV, 24h).

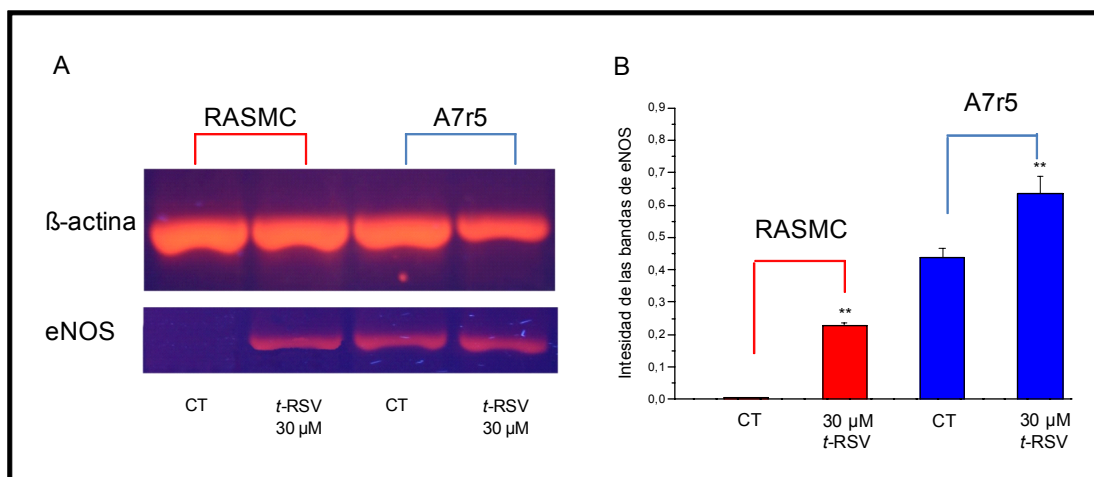


Figura 46.A. Geles de agarosa representativos con los productos de la RT-PCR de muestras de A7r5 y RASMC (controles y tratamientos con 30 μ M de *t*-RSV durante 24h). **B.** Niveles relativos de expresión de eNOS en A7r5 y RASMC (controles y tratamientos). Cada barra representa el valor medio \pm el e.e.m. (indicado con líneas verticales) de un mínimo de 4 experimentos. Nivel de significación estadística: ** $p < 0,01$ respecto al control.

Además, en RASMC este efecto es dependiente de la concentración; dado que a mayor concentración de *t*-RSV, mayor es la intensidad de la banda de ADNc de eNOS y, por tanto, mayor es la cantidad de ARNm codificante para esta enzima. En la figura 47 se muestra un gel de agarosa al 2% representativo con los productos de la RT-PCR de RASMC tratadas con *t*-RSV (30, 50 y 70 μ M) durante 24 h. Se puede observar claramente como la banda correspondiente al fragmento de ADN codificante para eNOS aumenta de intensidad al aumentar la concentración de *t*-RSV, mientras que la intensidad de la banda del fragmento de ADNc codificante para β -actina permanece constante a lo largo de los distintos tratamientos.

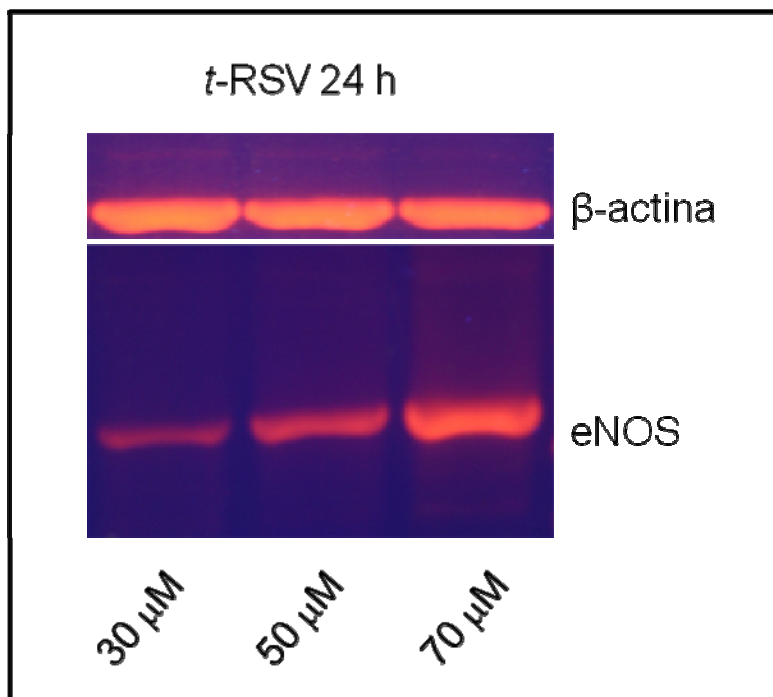


Figura 47. Gel de agarosa representativo con los productos de la RT-PCR de muestras de RASMC tratadas con diferentes concentraciones de *t*-RSV tras 24 h de incubación. Las bandas se corresponden con fragmentos de ADNc codificante para las proteínas eNOS y β -actina. En la figura se puede observar como se potencia la expresión a nivel transcripcional del gen de eNOS.

3.3. Evaluación de la actividad de la eNOS *in vitro*

Con la intención de estudiar los potenciales efectos directos del *t*-RSV sobre la actividad de la eNOS se midió la producción de NO *in vitro* empleando una enzima recombinante comercial purificada (eNOS bovina) y la sonda fluorescente DAF-2.

La eNOS recombinante fue incubada con diferentes concentraciones de *t*-RSV (0,5-100 μ M) como se detalló en el apartado 11 de Materiales y Métodos. En la figura 48 se representan las unidades arbitrarias de fluorescencia frente al tiempo. Se midió la fluorescencia inicial (tiempo = 0) antes de añadir el sustrato (L-arg 50 μ M) en todos los pocillos. Este valor coincidió con la señal de fluorescencia basal de la sonda DAF-2 medida en pocillos que carecían de enzima y/o *t*-RSV.

Al cabo de 1,5 s se aplicó la L-arg y se midió la fluorescencia a los 3 s desde el inicio de la medida. En nuestras condiciones de reacción, tras la adición del sustrato, se produjo un incremento de la fluorescencia en todos los pocillos que contenían la enzima. No existieron diferencias significativas entre los incrementos de fluorescencia medidos en los pocillos que contenían *t*-RSV con respecto a los medidos en los controles sin *t*-RSV (Figura 48).

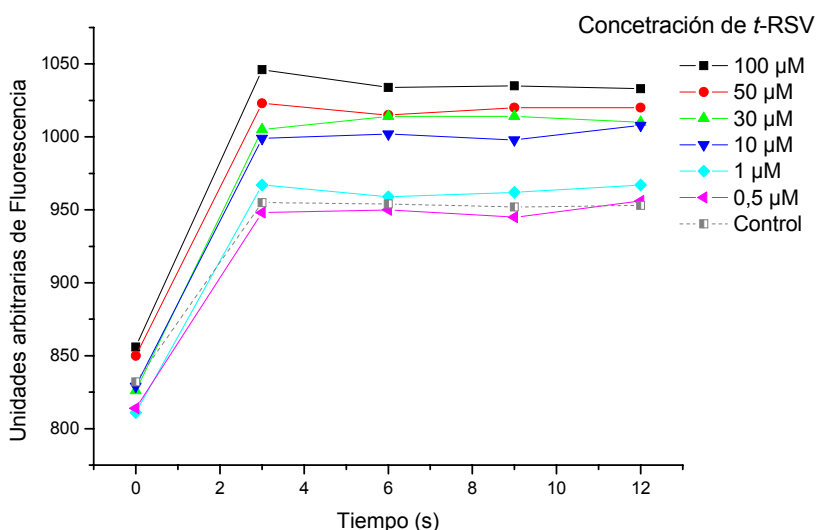


Figura 48. Registro representativo de la medida de la producción de NO *in vitro*. La línea discontinua representa los valores en ausencia de *t*-RSV (control). Cada punto representa el valor medio de la fluorescencia medida en 5 pocillos.

3.4. Efectos del *t*-RSV sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y los niveles intracelulares de NO en células HUVEC

En una solución externa con 1,5 mM de Ca^{2+} (SN), la $[Ca^{2+}]_i$ basal fue de $76,7 \pm 4,3$ nM ($n = 16$), y permaneció sin cambios durante el tiempo que duraron los experimentos. La adición acumulativa de *t*-RSV (0,3-60 μ M) indujo un incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ (incremento máximo de la $[Ca^{2+}]_i$: $152,3 \pm 11,2$ nM, $CE_{50} = 37,1 \pm 1,8$ μ M, $n = 16$, $p < 0,01$ con respecto al control). El porcentaje de células que respondieron al *t*-RSV en un determinado cultivo fue de $\sim 75\%$.

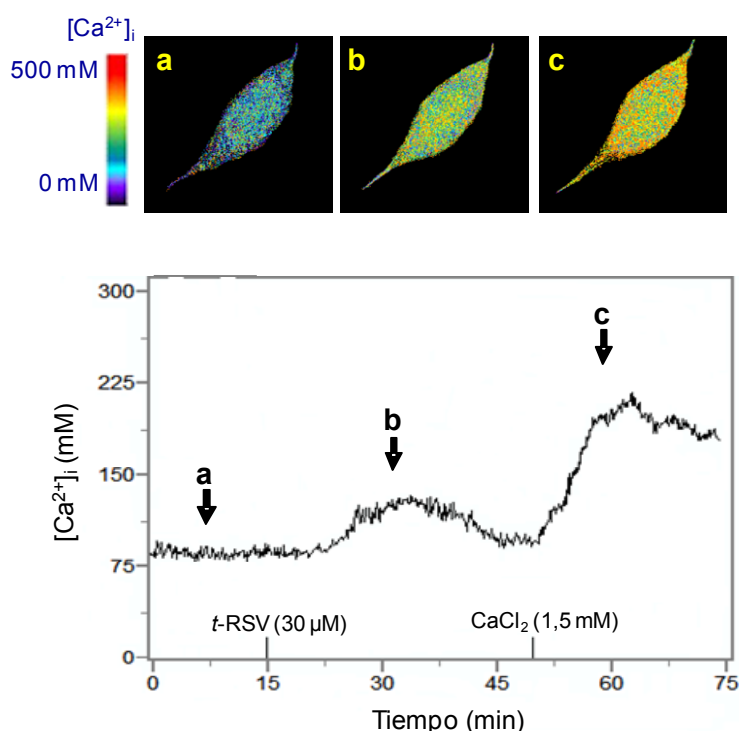


Figura 49. Imágenes digitalizadas obtenidas con fura-2 y registro representativo del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el *t*-RSV en solución $0Ca^{2+}$ y la subsiguiente entrada capacitativa de Ca^{2+} tras la reintroducción de Ca^{2+} en la solución extracelular en células HUVEC.

En ausencia de Ca^{2+} extracelular (solución $0Ca^{2+}$), la $[Ca^{2+}]_i$ basal fue de $70,9 \pm 3,1$ nM ($n = 44$, $p > 0,05$ con respecto a la obtenida en presencia de Ca^{2+} extracelular), valor que permaneció inalterado durante el tiempo de duración de los experimentos. En estas condiciones, el *t*-RSV provocó un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en $\sim 60\%$ de las células, cuyo valor máximo se alcanzó 10 min después de la

adición y que retornó a la línea basal aproximadamente después de 25 min (incremento máximo: $79,2 \pm 6,5$ nM, $n = 21$, $p < 0,01$ con respecto al control). Esta respuesta fue inapreciable tras la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} con TP, la cual indujo un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (incremento máximo: $160,4 \pm 12,0$ nM, $n = 9$, $p < 0,01$ con respecto al incremento inducido por *t*-RSV). Tras la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por una única concentración de *t*-RSV o de TP, la sustitución de la solución externa 0Ca^{2+} por SN produjo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ siguiendo el modelo clásico de la entrada capacitativa (incremento máximo: $117,0 \pm 14,1$ nM, $n = 15$ y $188,6 \pm 9,9$ nM, $n = 10$, para el *t*-RSV y la TP, respectivamente, $p < 0,01$ con respecto a los valores control y entre ellos (Figura 49).

A raíz de estos resultados, se llevó a cabo una medición simultánea de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de los niveles de NO intracelular en las células HUVEC aisladas. Las células siguieron tres patrones diferentes de respuesta tras la aplicación de *t*-RSV (Tabla 9).

	% de células	Incremento de los niveles de NO (% de la respuesta a la ionomicina)
Pico+ meseta	28.6	$23,8 \pm 5,4^*$
Meseta	49.2	$5,3 \pm 2,8$
Sin respuesta	22.2	0

Tabla 9. Pico + meseta: células que muestran los componentes transitorio y sostenido en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el *t*-RSV (30 $\mu\text{mol/L}$). Meseta: células que únicamente muestra un componente sostenido en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por *t*-RSV. Sin respuesta: células que no mostraron incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta al *t*-RSV. Nivel de significación estadística: $*p < 0,05$ con respecto al incremento de NO en las células sin respuesta ($n \geq 10$).

En primer lugar, en un 30% de las células el *t*-RSV indujo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un componente transitorio y otro sostenido (incremento máximo: $272,7 \pm 12,7$ nM y $108,2 \pm 9,3$ nM, respectivamente, $n = 18$, $p < 0,01$ con respecto a los controles. Figura 50). En este grupo, se pudo medir un incremento simultáneo de la biosíntesis de NO, que representó un $\sim 23\%$ del incremento de la biosíntesis de NO inducida por la administración de ionomicina (0,5 μM). En segundo lugar, en un 50% de las células, el *t*-RSV indujo un incremento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($108,7 \pm 12,0$

nM, $n = 31$, $p < 0,01$ con respecto a los valores control). En este caso, no se observó ningún incremento de la biosíntesis de NO. Por último, y en contraste con las dos respuestas precedentes, un 20% de las células ($n = 14$) no respondieron a la aplicación de *t*-RSV, a pesar de exhibir un incremento significativo de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la biosíntesis de NO tras su estimulación con ionomicina ($0,5 \mu\text{M}$; datos no mostrados).

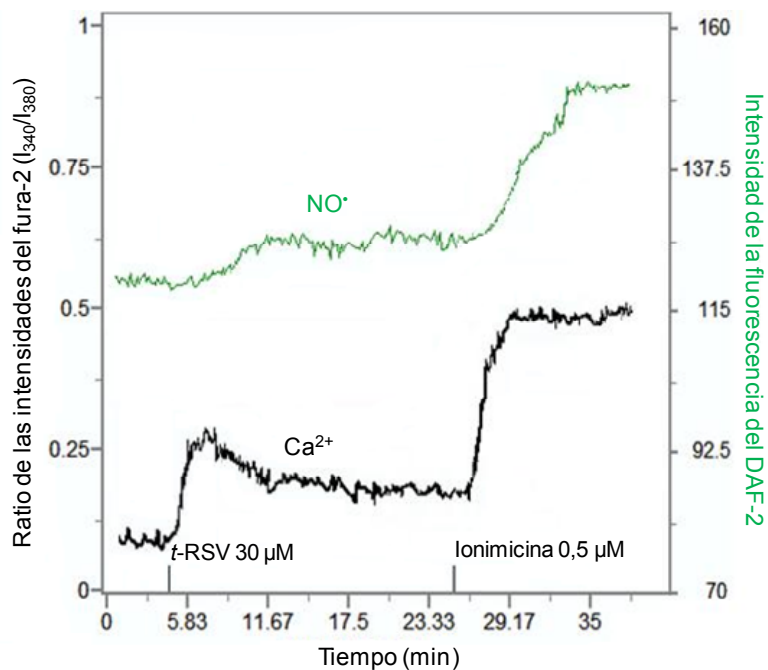


Figura 50. Registro representativo de los incrementos simultáneos de la $[Ca^{2+}]_i$ (negro) y de los niveles de NO libre intracelular (verde) inducidos por la aplicación de *t*-RSV y la posterior aplicación de ionomicina en una única célula HUVEC.

En otra serie de experimentos se realizaron medidas de la liberación de NO inducida por *t*-RSV en cultivos de HUVEC en monocapa empleando la sonda fluorescente DAF-2.

La aplicación de *t*-RSV ($30, 60 \mu\text{M}$) o TP ($0,5 \mu\text{M}$) en monocapas de células HUVEC indujo una liberación de NO dependiente de la concentración, que fue máxima a los 10 min de haber efectuado el tratamiento. Una concentración inferior de *t*-RSV ($1 \mu\text{M}$) no provocó ningún efecto (Figura 51). El incremento en la liberación de NO inducido por el *t*-RSV fue parcialmente inhibido por la aplicación de SKF 96365 o Ni^{2+} y completamente eliminado por la aplicación de TMB-8 o L-NAME (Figura 52).

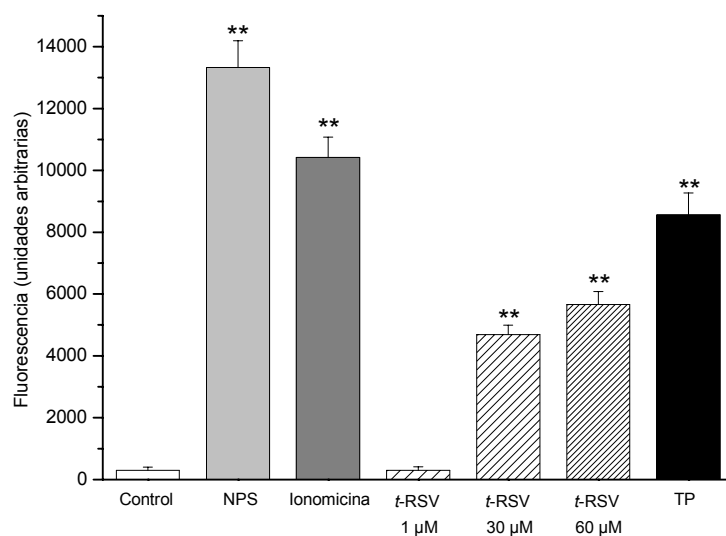


Figura 51. Efectos de la *t*-RSV sobre la producción de NO en HUVEC. Incrementos del NO libre intracelular inducidos por nitroprusiato sódico (NPS 100 μM), ionomicina (0,5 μM), *t*-RSV (1, 30 y 60 μM) y TP (0,5 μM). Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales) de un mínimo de 10 experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

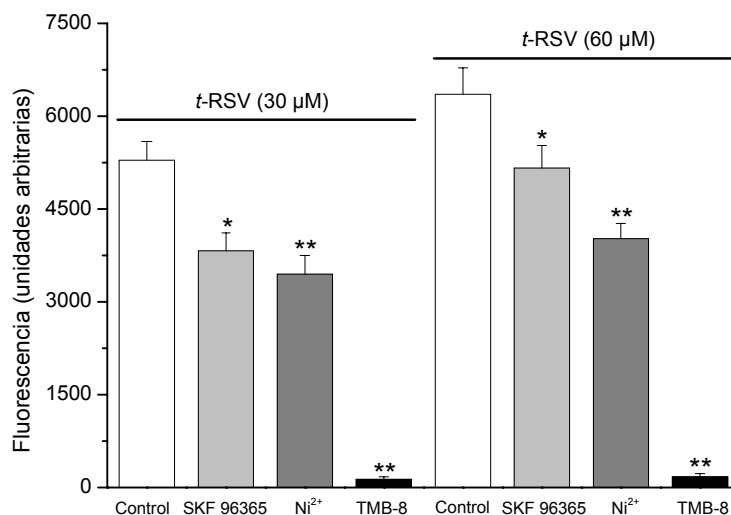


Figura 52. Efectos de la preincubación con SKF 96365 (30 μM), Ni²⁺ (300 μM) y TMB-8 (100 μM) sobre los incrementos del NO intracelular libre inducidos por el *t*-RSV (30 y 60 μM) en HUVEC. Cada barra representa la media ± e.e.m. (líneas verticales) de un mínimo de 10 experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

4. Efectos del RSV sobre la integridad de las caveolas

4.1. Proteínas localizadas en los microdominios caveolares

A partir de las muestras de los lisados totales de HUVEC, RASMC y A7r5 se obtuvieron diferentes fracciones celulares mediante subfraccionamiento celular, como se explicó en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

Las balsas membrana (líquido ordenado) pueden ser separadas del resto de los componentes celulares ya que presentan una composición lipídica característica que les confiere una menor densidad en comparación con otras regiones de la MP (líquido desordenado) y resistencia a pHs alcalinos. Durante la ultracentrifugación los componentes celulares de menor densidad migran desde el fondo del tubo (elevada concentración de sacarosa) hacia zonas de menor concentración de sacarosa hasta que alcanzan un equilibrio de flotación que depende de las características fisicoquímicas de los mismos. Estos componentes celulares son principalmente membranas en forma de vesículas que albergan proteínas propias de estos microdominios. Por tanto, las proteínas integrales y periféricas asociadas a estas membranas de menor densidad migran también a zonas de menor concentración de sacarosa.

Tras la ultracentrifugación las diferentes fracciones fueron separadas y enumeradas en orden creciente como se describió en la metodología. A continuación, se determinó el porcentaje de sacarosa (p/v) y el contenido de proteína total para cada una de ellas.

La concentración de sacarosa de las distintas fracciones se mantuvo constante entre experimentos independientes llevados a cabo con los tres tipos celulares (A7r5, HUVEC y RASMC). De hecho, no existieron diferencias significativas entre los valores de % de sacarosa y contenido de proteína total entre los tres tipos celulares estudiados. En todos los tipos celulares empleados se obtuvieron perfiles de distribución de proteína total similares a los que se muestran en la figura 53. Dicha distribución se caracteriza por presentar dos picos. El primer pico representa las proteínas asociadas a balsas membrana o *lipid rafts* (fracciones 3-6). Al conjunto de proteínas contenidas en estas fracciones se le llama de manera global “fracción

ligera”, por estar asociadas a membranas de baja densidad. El segundo pico o “fracción pesada” representa las proteínas asociadas a membranas de mayor densidad como la membrana nuclear o las regiones de líquido desordenado de la MP (fracciones 8-13).

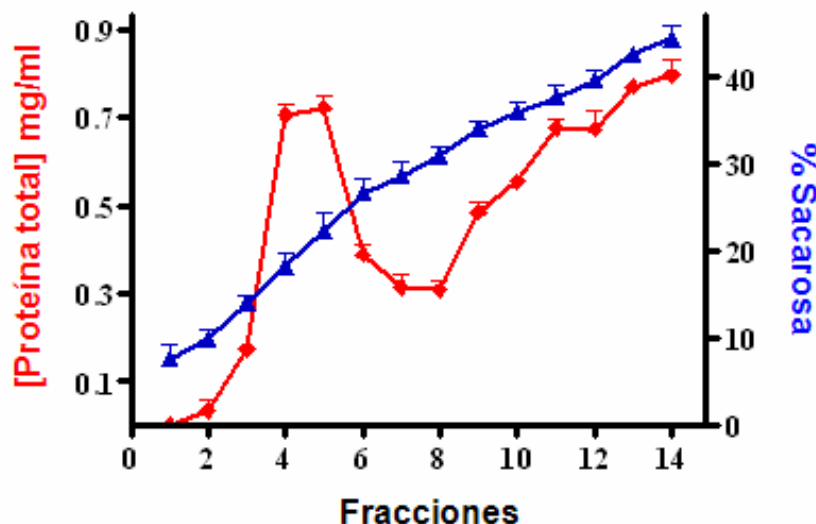


Figura 53. Concentración de sacarosa (azul) y contenido total de proteína (rojo) de las fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación en gradientes de densidad. Los valores representados son las medias \pm e.e.m. (líneas verticales) de $n = 9$.

La última fracción (fracción 14) es siempre la fracción con mayor contenido proteico, y en ella se encuentran todas las proteínas solubles y los ácidos nucleicos que, por no estar asociadas a membranas, no han migrado a zonas de menor densidad. Esta última fracción no aporta información alguna sobre la distribución de proteínas en las caveolas.

Para identificar las fracciones en las que están contenidas las caveolas se separaron las proteínas de cada fracción mediante electroforesis convencional (SDS-PAGE). Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se marcaron con anticuerpos específicos dirigidos contra las tres isoformas de caveolinas (cav-1, -2 y -3) y un anticuerpo capaz de reconocer las tres isoformas de caveolina (anti-cav-c). En la figura 54.A se muestran los *blots* representativos de las diferentes fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación en gradientes de densidad de tres muestras diferentes (A7r5, RASMC y HUVEC)

marcados con los anticuerpos antes mencionados. Las células HUVEC sólo expresaron cav-1 y cav-2; mientras que las células musculares lisas de aorta de rata (A7r5 y RASMC) expresaron las tres isoformas de la caveolina.

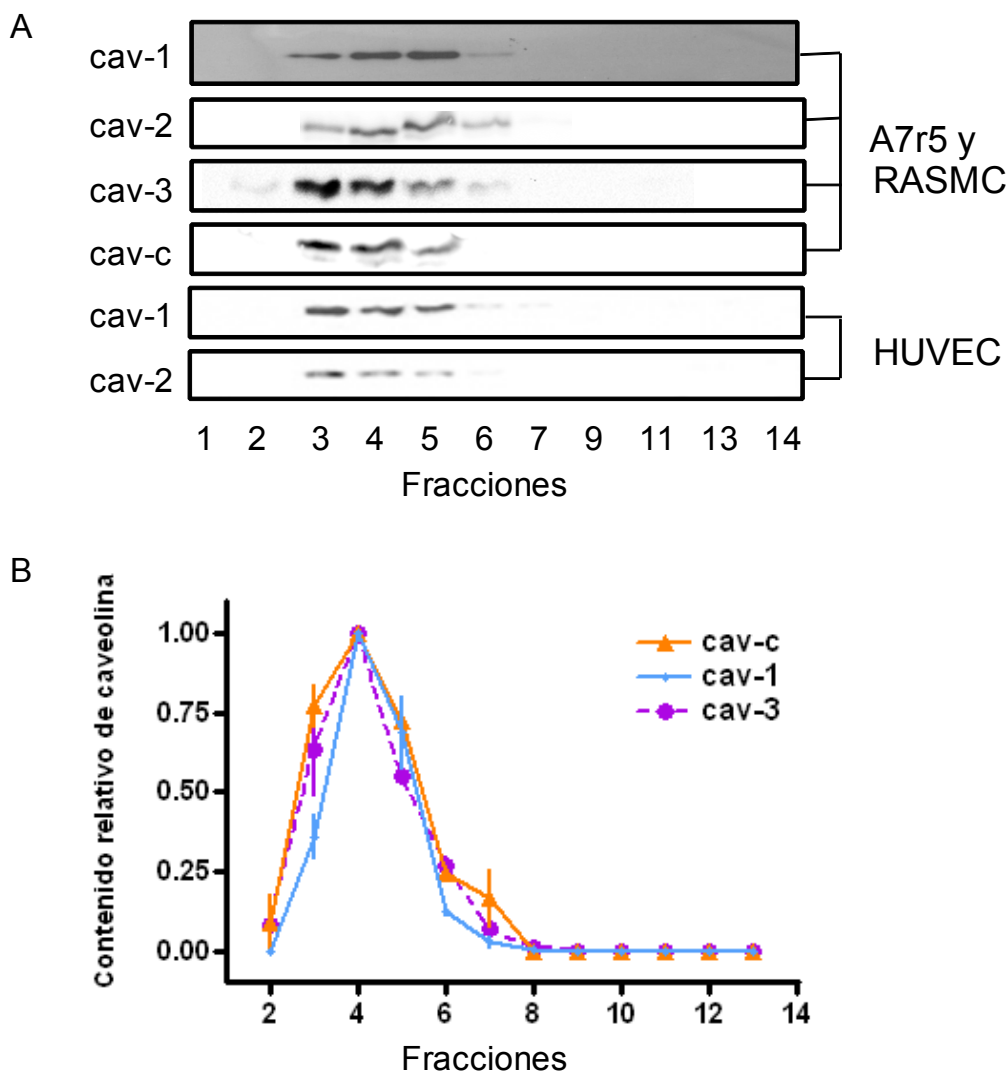


Figura 54.A. Blots representativos de las fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación en gradientes de densidad marcados con cav-1, -2, -3 y cav-c. En la figura se muestran las fracciones 1-7, 9, 11, 13 y 14. Las caveolas se distribuyen entre las fracciones 3-6 que se corresponden con una concentración de sacarosa de 17-25%. **B.** Cantidad relativa de las isoformas de caveolina en las fracciones obtenidas por ultracentrifugación a partir de una muestra de RASMC.

Para estudiar la morfología y la abundancia de estos microdominios de membrana se empleó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para visualizar muestras de las fracciones ricas en caveolina (fracciones 3-6) obtenidas de HUVEC. En las imágenes obtenidas, las caveolas mostraron un aspecto circular con apariencia vesicular, y su tamaño varió entre 70-250 nm de diámetro (Figura 55). En algunos casos se observó una red de citoesqueleto asociado a las vesículas (Figura 55.D).

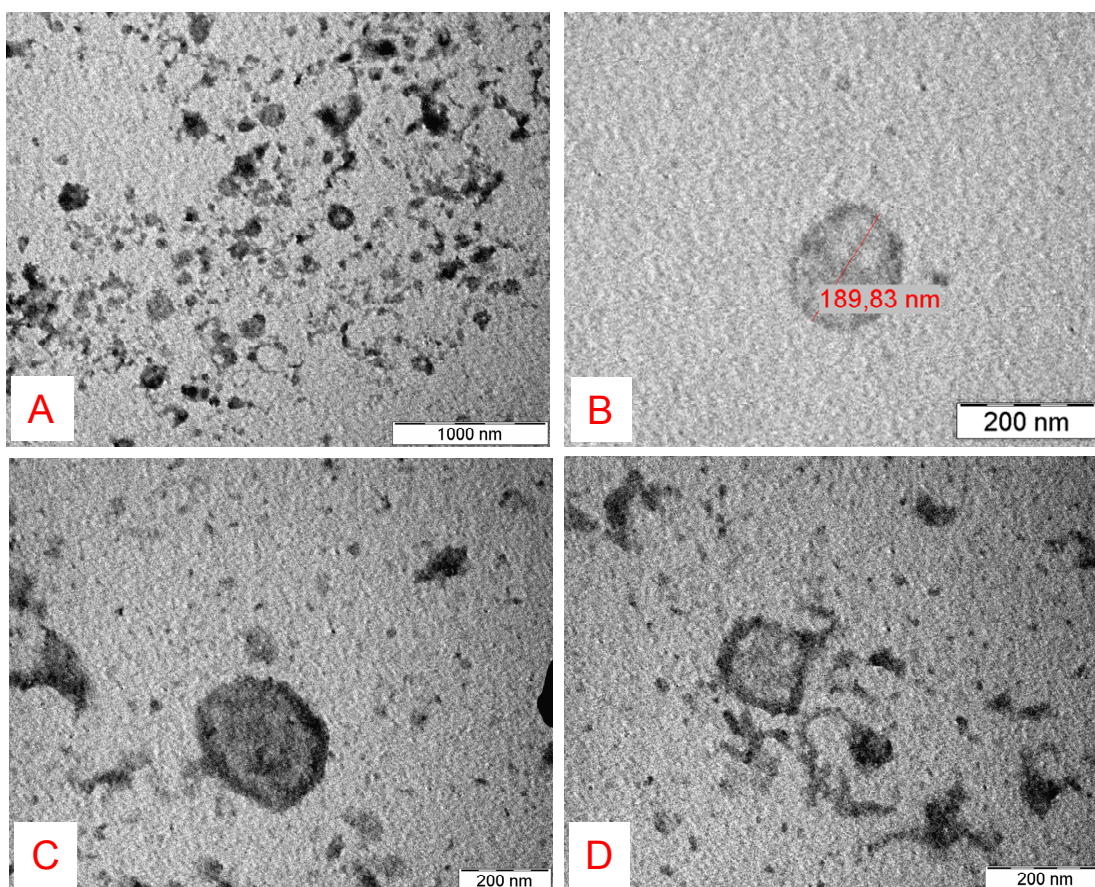


Figura 55. Imágenes de TEM obtenidas a partir de las fracciones ricas en caveolas (fracciones 3 y 4) de muestras de células HUVEC. A. Imagen general de las vesículas presentes en la fracción 4. B, C y D. Detalles de balsas membrana localizadas en la fracción 3.

Con el propósito de caracterizar el tipo de proteínas asociadas a las balsas membrana se realizaron *western blots* con las mismas fracciones que habían sido obtenidas a partir de muestras de A7r5, RASMC y HUVEC empleando, esta vez, anticuerpos específicos para diferentes proteínas (ver figuras siguientes).

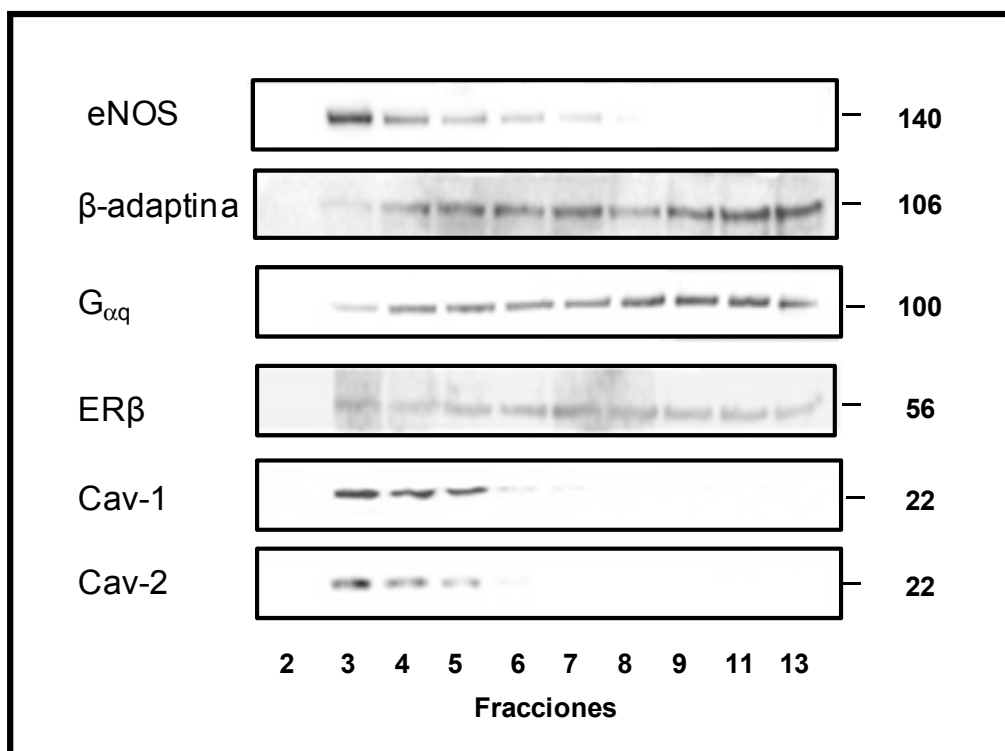


Figura 56. *Blots* de las fracciones tras la purificación de microdominios caveolares de HUVEC marcados con diferentes anticuerpos. A la derecha se representan los pesos moleculares (kDa) de las correspondientes proteínas. La β -adaptina se empleó como control de distribución no caveolar (fracciones 6-13).

En la figura 56 se representan los *blots* de las fracciones de una muestra de HUVEC. La eNOS se distribuyó en las mismas fracciones que los microdominios caveolares (cav-1 y cav-2). Como cabía esperar, la β -adaptina apareció mayoritariamente en la fracción pesada y mostró una menor presencia en los dominios caveolares (fracciones 6-14). Los receptores estrogénicos β (ER β) y la proteína $G_{\alpha q}$ se distribuyeron de forma más homogénea en la fracción ligera (caveolar) y en la pesada, probablemente debido a su condición de proteínas solubles que pueden estar asociadas a membranas de alta y baja densidad.

En la figura 57 se representan los *blots* de las fracciones de una muestra de RASMC. Las proteínas IP₃R1, IP₃R3, AC 5/6 y SERCA-2, pero no la β -adaptina, se localizaron en fracciones de densidad similar a los microdominios caveolares (cav-1 y cav-3). Las células A7r5 presentaron una distribución proteica similar (datos no mostrados).

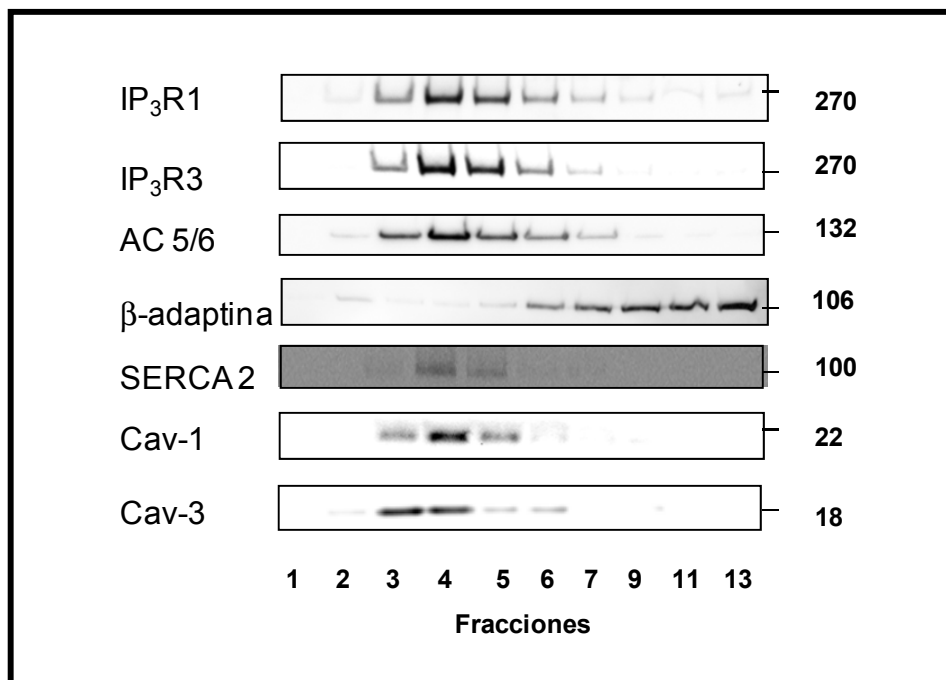


Figura 57. Blots de las fracciones tras la purificación de microdominios caveolares de RASMC marcados con diferentes anticuerpos. A la derecha se representan los pesos moleculares (KDa) de las correspondientes proteínas. La β-adaptina se empleó como control de distribución no caveolar (fracciones 6-14).

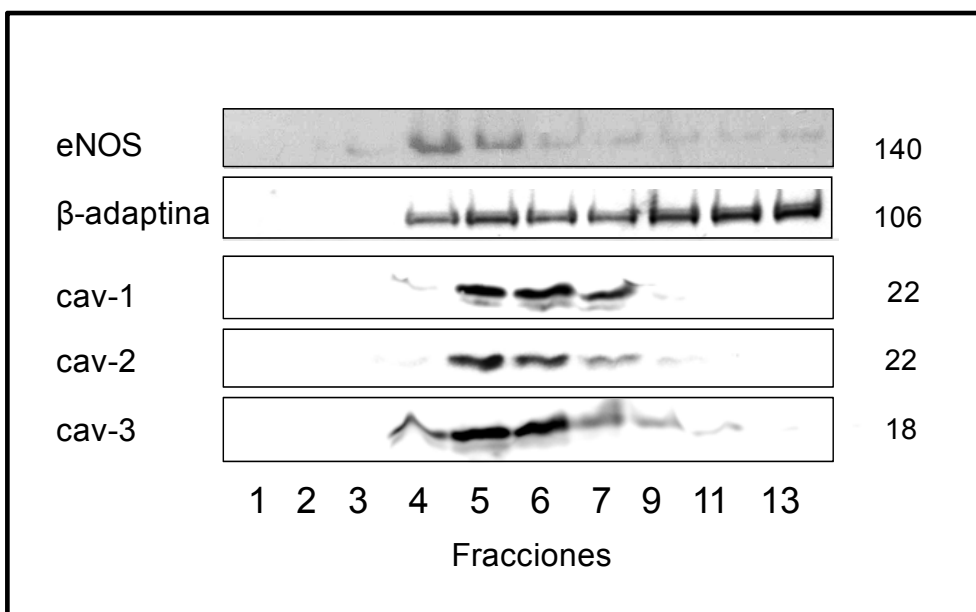


Figura 58. Blots con las fracciones obtenidas en el aislamiento de caveolas de cultivos celulares expuestos a MeβCD (10 mM, 2h). Las bandas de la eNOS y la β-adaptina corresponden a muestras de HUVEC; las de cav-1, cav-2 y cav-3, a muestras de RASMC.

En otra serie de experimentos, se realizó el aislamiento de balsas membrana con muestras de A7r5, RASMC y HUVEC previamente tratadas con β -metilciclodextrina (Me β CD, 10 mM) durante 2 h. La Me β CD se emplea para desestabilizar los microdominos caveolares, dado que retira colesterol de la membrana plasmática. Una menor cantidad de colesterol en los *lipid rafts* implica un aumento de la densidad de estos microdominios. En estas condiciones, las proteínas detectadas por *western blot* aparecieron en fracciones de mayor densidad en los tres tipos celulares (Figura 58), es decir, hacia la derecha en las imágenes de los *blots*.

Empleando los mismos anticuerpos se realizaron los *blots* con las fracciones obtenidas de muestras de HUVEC y RASMC tratadas con *t*-RSV (30 μ M, 24h), con la finalidad de estudiar sus efectos sobre la estabilidad de los microdominios caveolares son similares a los del Me β CD. El *t*-RSV no afectó a la distribución de las proteínas estudiadas; es decir, no indujo migración de las proteínas detectadas hacia fracciones de diferente densidad (datos no mostrados).

4.2. Interacciones entre proteínas a nivel caveolar

Para profundizar en el conocimiento de los componentes intracelulares implicados en la funcionalidad de los microdominios caveolares de células vasculares se estudiaron dos tipos de interacciones proteicas. En primer lugar, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación para evaluar la interacción entre la caveolina (cav-1 y cav-3) y el IP₃R (IP₃R1 y IP₃R3) en células RASMC y, en otra serie de experimentos, se estudió la interacción entre la caveolina (cav-1 y cav-2) y la eNOS en RASMC tratadas con *t*-RSV (30 μ M, 24 h) y HUVEC. Además, se realizaron inmunotinciones dobles para estudiar la potencial colocalización de las proteínas mencionadas con las isoformas de la caveolina mediante microscopía confocal.

Los *blots* de las fracciones obtenidas tras precipitar la cav-1 fueron marcados con IP₃R1 e IP₃R3. La fracción de *pellet* dio lugar a la presencia de bandas específicas de las dos isoformas de las subunidades del receptor. Esto indica que la cav-1 interacciona de modo directo o indirecto con las dos isoformas de IP₃R expresadas en RASMC (Figura 59). En la co-inmunoprecipitación recíproca (precipitación con los anticuerpos IP₃R1 e IP₃R3 y detección con los anticuerpos cav-1 y cav-3) la cav-1,

pero no la cav-3, fue detectada en la fracción de *pellet*. Posteriormente se realizaron experimentos similares con muestras de RASMC tratadas con *t*-RSV (30 y 50 μ M, 24 h). No existieron diferencias significativas entre los ratios *pellet*/sobrenadante (P/S) de las muestras tratadas respecto a los controles (datos no mostrados), lo que indica que el *t*-RSV no afectó a la interacción entre cav-1 y el IP₃R.

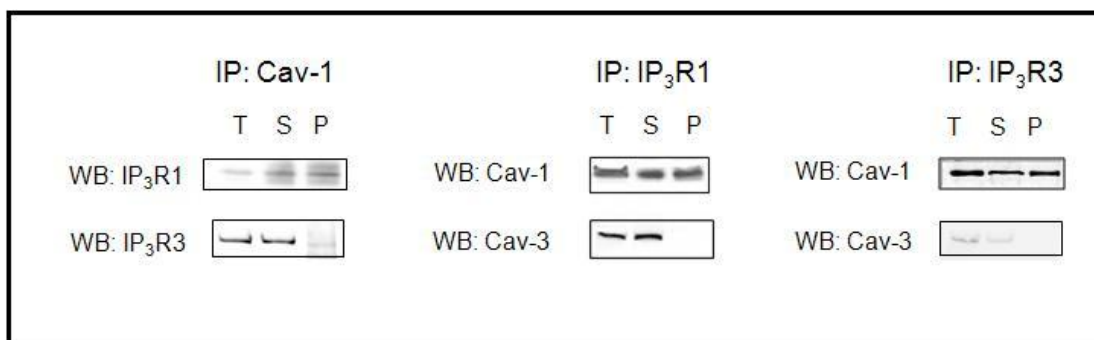


Figura 59. *Western blots* (WB) representativos de la fracciones total (T), sobrenadante (S) y *pellet* (P) obtenidas a partir de la co-inmunoprecipitación (IP) de IP₃R1, IP₃R3 y cav-1 de muestras de RASMC.

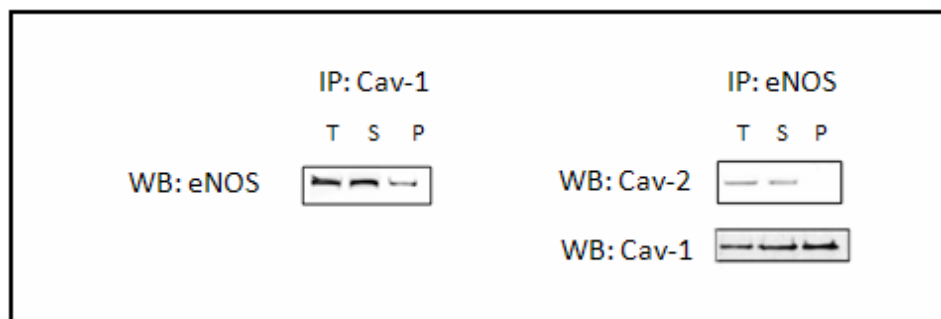


Figura 60. *Western blots* (WB) de las fracciones totales (T), sobrenadante (S) y *pellet* (P) obtenidas a partir de la co-inmunoprecipitación (IP) de cav-1 y eNOS en muestras de HUVEC. Resultados similares fueron obtenidos en muestras de RASMC tratadas con *t*-RSV (30 μ M, 24 h).

Con el propósito de estudiar la interacción entre cav-1 y eNOS se inmunoprecipitaron las dos proteínas a partir de los lisados de RASMC tratadas con *t*-RSV (30 μ M, 24 h) y HUVEC. En ambos tipos celulares, la eNOS fue inmunodetectada en la fracción de *pellet* obtenido tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-cav-1. En la co-inmunoprecipitación recíproca la cav-1, pero no la

cav-2 en HUVEC ni la cav-3 en las muestras de miocitos, fue detectada en el *pellet* obtenido tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-eNOS (Figura 60).

A continuación, se evaluaron los posibles efectos del *t*-RSV (50 μ M, 24h) sobre las interacciones entre eNOS y cav-1 en HUVEC. El *t*-RSV disminuyó el valor del ratio *pellet*/sobrenadante (P/S) de la interacción entre la cav-1 y la eNOS. Es decir, los valores de intensidad de banda de eNOS detectada en el *pellet* obtenido en la inmunoprecipitación con anti-cav-1 disminuyeron con respecto a los de la fracción sobrenadante tras el tratamiento con *t*-RSV (Figura 61), lo que indica que el *t*-RSV interfiere con la interacción cav-1-eNOS.

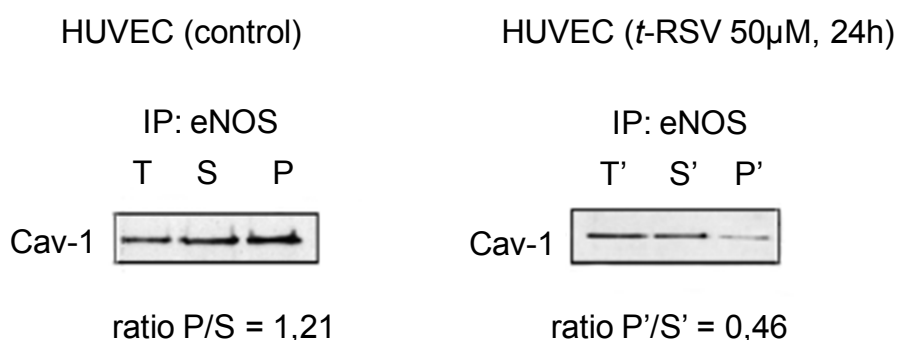


Figura 61. Efecto del *t*-RSV sobre la interacción entre cav-1 y eNOS en HUVEC. Los *blots* muestran las fracciones totales (T), sobrenadante (S) y *pellet* (P) obtenidas tras la inmunoprecipitación (IP) de eNOS. Las membranas fueron marcadas con el anticuerpo anti-cav-1.

Para verificar las interacciones proteicas descritas en RASMC (entre la cav-1 y el IP₃R) y en HUVEC (entre la cav-1 y la eNOS) se empleó la microscopía confocal de colocalización con el propósito de visualizar dichas interacciones *in situ*. El marcaje de RASMC con anti-cav-1 se distribuyó predominantemente en el citoplasma y en la membrana plasmática, donde se visualizaron, con frecuencia, agregados de la proteína. El IP₃R1 presentó una distribución claramente perinuclear. La superposición de las imágenes obtenidas no mostró colocalización entre la cav-1 y el IP₃R1 (Figura 62). El marcaje de HUVEC con anti-eNOS mostró una distribución claramente periplasmática, lo que confirma la localización de la eNOS asociada a la cara interna de la membrana plasmática. La ausencia de píxeles amarillos en las imágenes superpuestas indica que no existe colocalización de la cav-1 y la eNOS (Figura 63).

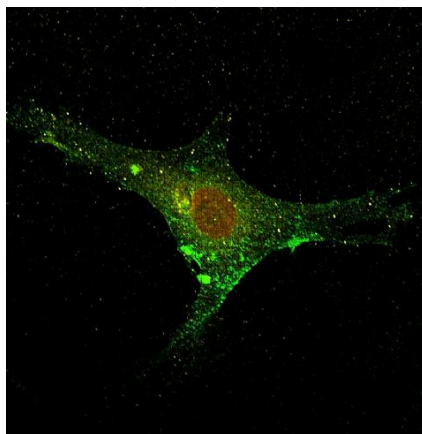


Figura 62. Superposición de las imágenes obtenidas con microscopio confocal para el estudio de la interacción entre la cav-1 y el IP₃R1 en células RASMC. La muestra fue fijada con paraformaldehído y marcada con los anticuerpos primarios anti-cav-1 (verde) y anti-IP₃R1 (rojo).

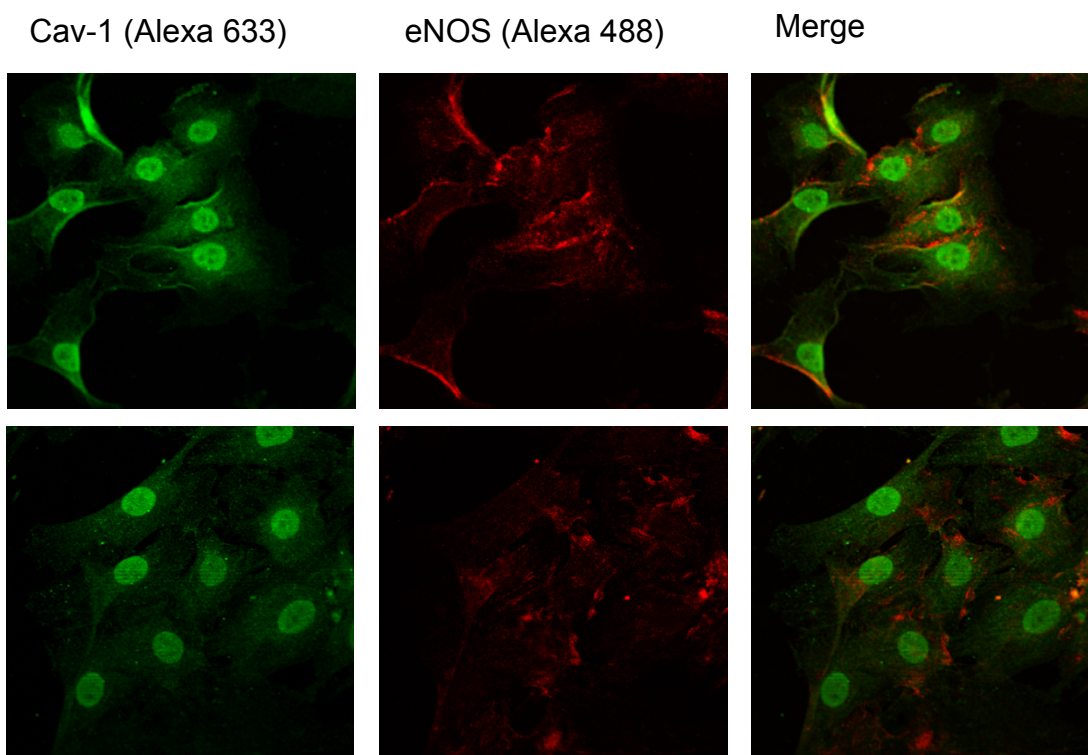


Figura 63. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal para el estudio de la interacción entre caveolina y eNOS. En la figura se muestra la preparación de HUVEC fijada con paraformaldehído y marcada con anticuerpo primario anti-cav-1 (verde) y anti-eNOS (rojo). Las imágenes de la derecha se obtuvieron por superposición de las dos imágenes anteriores.

4.3. Efectos del RSV en la expresión de caveolin-1

En este apartado se reflejan los cambios en los niveles de expresión de cav-1 inducidos por el *t*-RSV en HUVEC y RASMC.

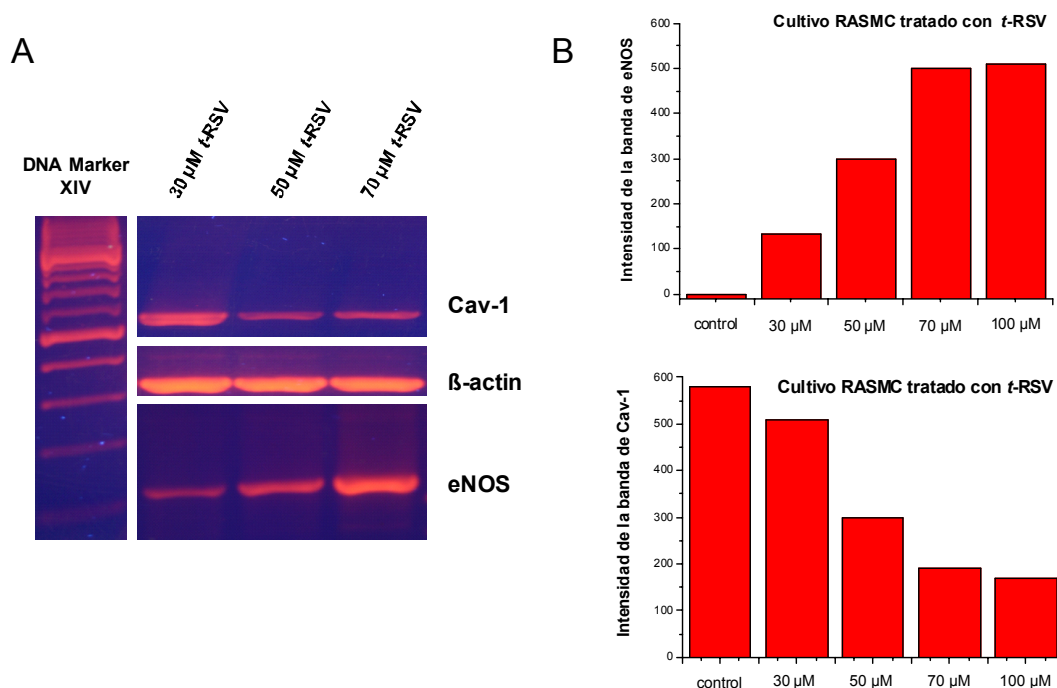


Figura 64. A. Geles de agarosa al 2% con los productos de la RT-PCR de muestras de RASMC tratadas con *t*-RSV (30, 50 y 70 μ M) durante 24 h. El ADNc obtenido tras la transcripción fue amplificado con *primers* para cav-1, β -actina y eNOS. **B.** Histograma de frecuencias con los valores relativos de las intensidades de las bandas de cav-1 y eNOS. Los valores están normalizados respecto a la intensidad de la banda de β -actina para muestra.

Utilizando las mismas muestras que fueron empleadas para amplificar el gen eNOS en HUVEC y RASMC (apartado 3.2), se realizaron experimentos de RT-PCR con *primers* específicos para amplificar el gen CAV-1. En la figura 64.A se muestra la amplificación de ADNc de cav-1, β -actina y eNOS en RASMC tratadas con diferentes concentraciones de *t*-RSV (30, 50 y 70 μ M; 24 h). El *t*-RSV disminuyó la transcripción de cav-1 de modo dependiente de la concentración. En la figura 64.A se muestra además, la regulación positiva a nivel transcripcional del gen de eNOS inducida por el *t*-RSV (similar a lo descrito en el apartado 3.2). No se apreció modificación alguna en la intensidad de las bandas de la β -actina. Resultados similares fueron obtenidos a partir de muestras de HUVEC (datos no mostrados).

Los niveles de ARNm codificante para cav-1 y eNOS (datos normalizados respecto a la intensidad de las bandas de β -actina) para los distintos tratamientos se representaron gráficamente (Figura 64.B). Estos resultados indican que a medida que aumenta la concentración de *t*-RSV, mayor es el nivel de ARNm codificante para eNOS y menor es la cantidad de ARNm codificante para cav-1.

Posteriormente, se estudiaron los efectos del *t*-RSV sobre la expresión de cav-1 mediante *western blot* con muestras de RASMC y HUVEC, control y tratadas con diferentes concentraciones de *t*-RSV. En los dos tipos celulares se observó una disminución del nivel de expresión de cav-1 dependiente de la concentración de *t*-RSV. En la figura 65 se muestra un *western blot* representativo de los lisados totales de cuatro muestras de RASMC; control y tratamientos con *t*-RSV (10, 30 y 50 μ M) durante 24 h.

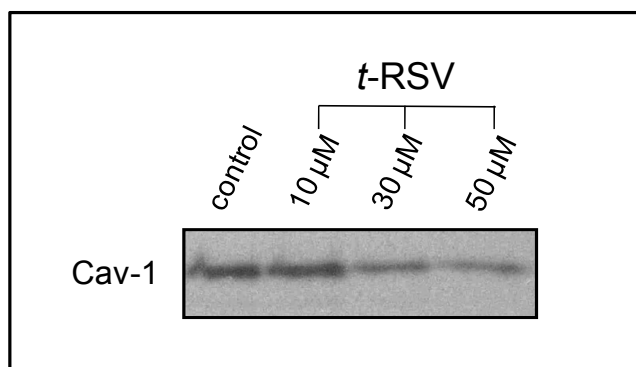


Figura 65. *Western blot* representativo de los lisados de RASMC tratados con *t*-RSV (10, 30 y 50 μ M) durante 24 h. Todas las calles fueron cargadas con 10 ng de proteína total. Similares resultados fueron obtenidos con los lisados de HUVEC.

Además, se evaluó el nivel de expresión de cav-1 en las fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa con muestras de RASMC y HUVEC que previamente habían sido tratadas con *t*-RSV durante 24 h. En la figura 66.A se representa el perfil de distribución proteica (valores de proteína total) de las fracciones obtenidas de un lisado de RASMC (control, en negro) y un lisado tratado con *t*-RSV (50 μ M, 24 h; en rojo). No existen diferencias significativas entre los valores de proteína total de las fracciones correspondientes a las dos poblaciones (controles frente a tratamiento). Sin embargo, los *western blot* marcados con

anticuerpo anti-cav-1 dieron lugar a bandas más débiles en las fracciones de las muestras tratada con *t*-RSV (50 μ M).

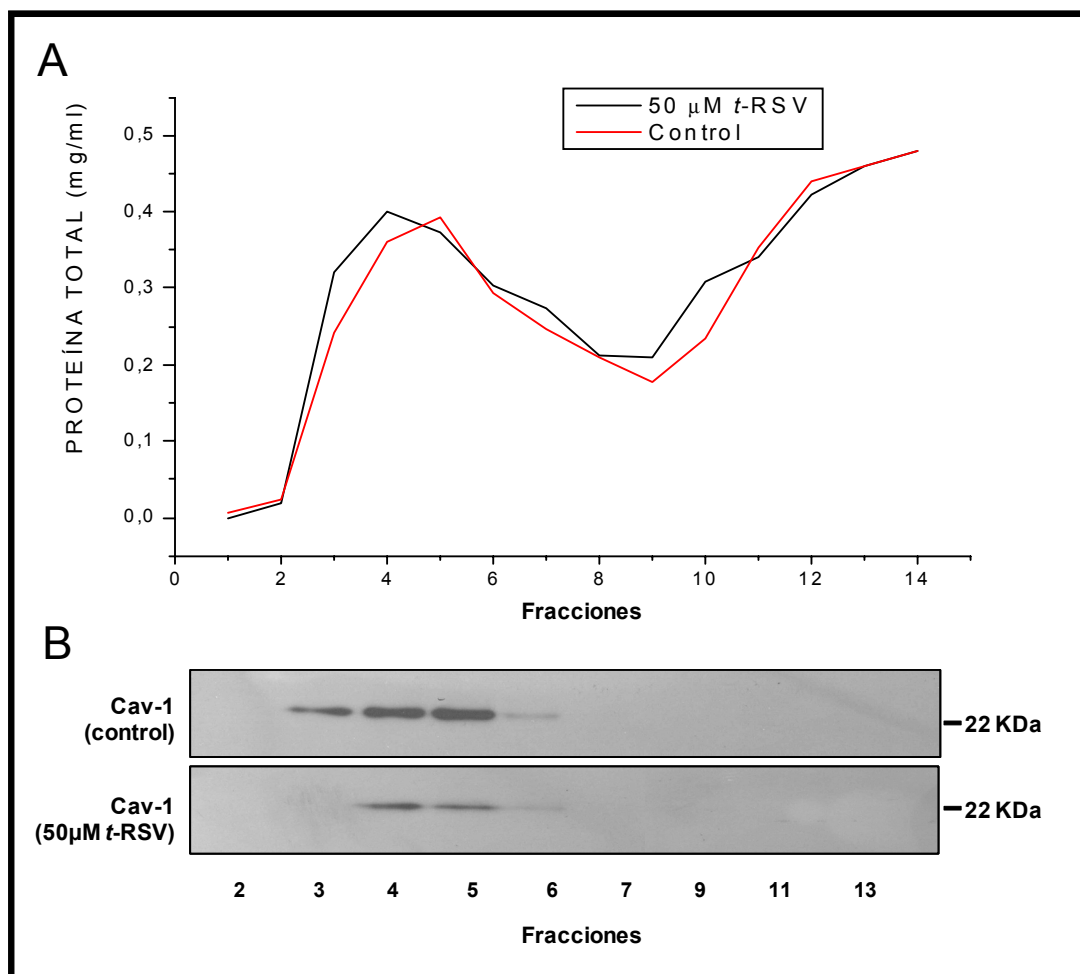


Figura 66.A. Representación de los perfiles proteicos de las fracciones obtenidas tras el aislamiento de *lipid rafts* a partir de muestras de RASM C control y cultivo tratado con *t*-RSV. **B.** *Western blot* representativo de las mismas fracciones marcados con anti-cav-1.

Los resultados obtenidos mediante *western blot* reflejados en las figuras 65 y 66 coincidieron con los obtenidos mediante RT-PCR que indicaron una disminución en los niveles de ARNm de cav-1 inducidos por el *t*-RSV. Además, estos efectos fueron dependientes de la concentración de *t*-RSV.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la primera parte del presente trabajo, hemos llevado a cabo un estudio comparativo de los potenciales efectos de los isómeros *c*-RSV y *t*-RSV sobre los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos procedentes de aorta embrionaria de rata (línea celular A7r5).

Tanto el *c*-RSV como el *t*-RSV aumentaron de forma directa la $[Ca^{2+}]_i$, siendo el *c*-RSV más efectivo, según se desprende de la comparación de las EC_{50} obtenidas para ambos isómeros. Dado que las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ controlan la contracción vascular, sería razonable esperar que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por los dos isómeros del RSV en A7r5 estuviese relacionado con un aumento del tono basal vascular. Sin embargo, ambos isómeros provocan un efecto relajante en el músculo liso vascular. Así, se ha descrito que el *t*-RSV relaja de forma directa el músculo liso vascular de aorta de rata en órgano aislado (Chen y Pace-Asciak, 1996; Orallo y Camiña, 1998) y que el *c*-RSV (10 μ M-0,1mM) produce relajación dependiente de la concentración en anillos de aorta de rata intactos precontraídos con NA (1 μ M) (Fraiz, 2004).

Las aparentes discrepancias entre estos resultados y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por los isómeros del RSV podrían ser debidos a alguna de las siguientes razones:

i) La existencia de una diferencia de sensibilidad al *c*-RSV y *t*-RSV entre las células A7r5 y las células musculares lisas de las preparaciones de aorta de rata utilizadas en los experimentos de vasodilatación. Para caracterizar estas posibles diferencias será preciso en el futuro realizar estudios para determinar si ambos isómeros del RSV también inducen un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células RASMC.

ii) El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ medido con técnicas de análisis de imagen empleando fura-2 en RASMC, no está asociado en todos los casos a un aumento del

tono basal de los anillos de aorta de rata. Así, por ejemplo, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, el aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la TP, un inhibidor de la SERCA (Wictome *et al.*, 1992), en RASMC no se corresponde con una contracción en anillos de aorta de rata (Álvarez-Castro *et al.*, 2004), lo que sugiere que la liberación de Ca^{2+} a partir de los reservorios intracelulares por este fármaco en dichas células no está asociada a la contracción muscular. De modo similar el CPA, también inhibidor de la SERCA, provoca una contracción insignificante de la aorta de rata a pesar de provocar un marcado incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los miocitos de dicha preparación (Tosun *et al.*, 1998). Sin embargo, otros autores han publicado resultados aparentemente contradictorios, al describir la relación entre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la inhibición de la bomba SERCA y la contracción del músculo liso vascular (Low *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999).

iii) Un posible efecto vasoconstrictor del RSV derivado de un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría ser contrarrestado en los miocitos de las preparaciones de aorta aislada de rata por otros mecanismos que contribuyen a su efecto vasorrelajante como, por ejemplo, el efecto inhibitorio sobre la actividad del enzima oxigenasa de NADH/NADPH (Orallo *et al.*, 2002) o su capacidad para inhibir la actividad de la PKC en alguno de los múltiples puntos relacionados con sus efectos contráctiles (Orallo y Camiña, 1998). En este sentido, cabe la posibilidad de que el RSV posea, además, un efecto inhibitorio de los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por diversas vías.

De hecho, ambos isómeros del RSV redujeron de forma significativa los aumentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocados por las concentraciones más elevadas de TP (0,5 y 1 μM) y los provocados por agonistas de GPCR, que actúan a través de la vía de la PLC/IP₃, como la AVP o la ANG II. Además, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, tras una depleción parcial de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} con *c*-RSV o *t*-RSV, los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por AVP o ANG II fueron inhibidos de forma significativa.

En los experimentos realizados con S0Ca^{2+} , tanto el *c*-RSV como el *t*-RSV provocaron un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como consecuencia de la depleción de los depósitos intracelulares. Este aumento es menor que el obtenido en solución externa

SN (1,5 mM de Ca^{2+}). Esta diferencia se debe, en parte, a que en estas condiciones no se produce la entrada de Ca^{2+} desde el exterior inducida por ambos isómeros. Además, cabe la posibilidad de que en ausencia de Ca^{2+} extracelular se produzca una depleción parcial de reservorios intracelulares de Ca^{2+} , asociada a un descenso de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por un incremento de la extrusión del ion al exterior celular, al igual que sucede en RASMC (Kanaide, 1990; Neusser *et al.*, 1994), lo que disminuiría la cantidad de Ca^{2+} intracelular susceptible de ser liberada por el RSV.

El TMB-8 es un inhibidor de la liberación de calcio intracelular que reduce la disponibilidad del calcio en células musculares lisas y en el músculo esquelético, puesto que estabiliza la unión del Ca^{2+} a sus depósitos intracelulares (Chiou *et al.*, 1975). Se ha descrito que bloquea de forma transitoria el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por TP durante unos 20 min (Doutheil y Paschen, 1999) y que elimina el pico inicial de la respuesta contráctil inducida por TP en anillos de aorta de rata (Tepel *et al.*, 1994). En el mismo estudio, Tepel *et al.* demostraron también que la segunda fase de la respuesta a la TP (dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular) no fue reducida por el TMB-8, aunque sí fue completamente inhibida en ausencia de Ca^{2+} extracelular. En concordancia, en nuestros experimentos realizados en 0Ca^{2+} , el TMB-8 inhibió completamente el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la TP. Análogamente, se ha observado un efecto similar del TMB-8 en las respuestas cálcicas provocadas por los isómeros del RSV, lo que induce a pensar que ambos estilbenos, al igual que la TP, liberan calcio a partir de los depósitos intracelulares que son sensibles a la acción del TMB-8.

Las interferencias entre las respuestas inducidas por TP y RSV en ausencia de Ca^{2+} extracelular indican que estos fármacos actúan probablemente en los mismos depósitos intracelulares de este ion. Por este motivo, después de la depleción parcial de los depósitos sensibles a la TP, el aumento de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el *c*-RSV o *t*-RSV está disminuida de forma significativa. Sin embargo, después de la aplicación de dosis bajas de TP, que no inducen un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ *per se*, la respuesta de los dos isómeros está potenciada. Una situación similar se produce cuando los isómeros de RSV son administrados previamente a la TP: la depleción parcial de los reservorios intracelulares con *c*-RSV y *t*-RSV disminuye la respuesta

cálcica a la TP, mientras que la administración de dosis más reducidas de *c*-RSV o *t*-RSV (que no provocan depleción de Ca^{2+} significativa) potencian la respuesta a la TP.

A partir de nuestros resultados no se puede descartar una inhibición de la SERCA por los isómeros del RSV, que podría tener lugar por medio de un mecanismo similar al de la TP. Apoyando esta hipótesis, algunos autores han descrito un efecto inhibitorio de la actividad ATPasa por el *t*-RSV (Zini *et al.*, 1999; Arakaki *et al.*, 2003).

Según el modelo de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE), descrito por Putney (1990), algunos agonistas de receptores de membrana asociados a la PLC o ciertos agentes intracelulares que provoquen vaciado del Ca^{2+} contenido en reservorios intracelulares, pueden aumentar la permeabilidad de la membrana para el Ca^{2+} en las células no excitables. En último término, este efecto permite el relleno de dichos depósitos a través de los SOCC (Putney, 1990; Randriamampita y Tsien, 1993). Esta entrada de Ca^{2+} puede ser inhibida por el SKF 96365, un inhibidor no selectivo de canales de Ca^{2+} que puede reducir parcialmente la CCE a través de los SOCC (Miwa *et al.*, 1999). Sin embargo, se desconoce el grado de implicación de otros canales, además de los SOCC, como por ejemplo, los canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas, y se han presentado resultados contradictorios a este respecto (Samain *et al.*, 2000; Purdy *et al.*, 2001).

En nuestros experimentos realizados en SOCa^{2+} , la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por el *c*-RSV, el *t*-RSV y la TP fue seguida de una CCE, pues la adición de Ca^{2+} al medio extracelular provoca un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células en las que previamente se había deplecionado el Ca^{2+} de los depósitos intracelulares con dichos agentes.

La entrada de Ca^{2+} a través de SOCC inducida por la depleción de reservorios con los isómeros del RSV o la TP fue inhibida parcialmente por Ni^{2+} , un inhibidor de la CCE, y por NIF, que bloquea los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L. Sin embargo, el SKF 96365 sólo inhibió la entrada de Ca^{2+} inducida por la TP, pero no la inducida por el *c*-RSV o el *t*-RSV.

La ausencia de efecto del imidazol SKF 96365 frente al RSV podría ser explicada en base a que, en ciertas condiciones, este imidazol puede provocar un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante liberación de Ca^{2+} intracelular, tal y como se ha

descrito para las células A7r5 (Hughes y Schachter, 1994). Así, el efecto inhibitor del SKF 96365 sobre los SOCC podría ser más evidente cuando la CCE es inducida con TP, que es significativamente más elevada que cuando es inducida con los isómeros del RSV.

Además debería considerarse la posible existencia de otros mecanismos (diferentes a la activación de SOCC) implicados en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por efecto de los isómeros del RSV. Así, en presencia de Ca^{2+} extracelular, el TMB-8 no puede inhibir completamente el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por los isómeros del RSV, lo que sugiere que, bloqueando la liberación de Ca^{2+} de los depósitos, dichos isómeros son todavía capaces de inducir una entrada de Ca^{2+} a través de algún mecanismo que, según lo observado, no se ve afectado por Ni^{2+} , NIF o SKF 96365. Los resultados obtenidos con la TP fueron similares y están en concordancia con los descritos por Tepel *et al.* (1994).

Para profundizar en el conocimiento de los efectos del RSV sobre la homeostasis cálcica en los miocitos vasculares, hemos estudiado el modo en el que los isómeros del RSV interfieren en las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por diversos agonistas (tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular) o por despolarización con una concentración elevada de K^+ en el medio extracelular.

De los tres agonistas utilizados (AVP, ANG II y NA), tan sólo los dos primeros indujeron un incremento significativo de la $[Ca^{2+}]_i$ en un porcentaje suficiente de células que permitiese la realización de un estudio fiable desde un punto de vista estadístico, por lo que el empleo de NA se descartó para experimentos posteriores. En concordancia con nuestros resultados, en la bibliografía existente en referencia a la respuesta cálcica de las células A7r5, gran parte de los estudios han sido realizados utilizando AVP como agonista (ver, por ejemplo, Hughes and Schachter, 1994; Moneer *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2002). En menor medida, también se emplean otros agonistas, entre ellos la ANG II (Seki *et al.*, 1999; Filipeanu *et al.*, 2001). Sin embargo, únicamente tenemos constancia de un trabajo que, utilizando técnicas de electrofisiología (*patch-clamp*), demuestra que la NA (100 μ M, una concentración muy superior a la empleada en este trabajo) induce un incremento de la corriente de entrada de Ba^{2+} a través de canales de Ca^{2+} en este mismo modelo celular

(Mio *et al.*, 1997). Aunque en un principio se pudiese especular con una ausencia de receptores α -adrenérgicos en las células A7r5, algunos autores han descrito lo contrario (Hirata *et al.*, 1985) e incluso han sugerido que la activación de receptores alfa-1-adrenérgicos en células A7r5 puede inhibir la proliferación celular (Wang *et al.*, 2004). Así pues, el motivo de esta ausencia de respuesta cálcica a la estimulación con NA pudiera más bien tener que ver con una alteración en el acoplamiento estímulo-respuesta mediado por este tipo de receptor en este modelo celular.

La respuesta cálcica inducida por AVP y ANG II en las células A7r5 es mediada, al igual que sucede en otras células musculares lisas vasculares, por la activación de receptores específicos del tipo V_1 y AT_2 , respectivamente (Thibonnier *et al.*, 1991; Griendling *et al.*, 1997). Consta de dos fases bien diferenciadas: en primer lugar, un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$, en forma de pico, debido principalmente a la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares; en segundo lugar, la $[Ca^{2+}]_i$ desciende hasta estabilizarse en una meseta sostenida, debida fundamentalmente a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de diferentes tipos de canales permeables al Ca^{2+} (Thibonnier *et al.*, 1991; Byron y Taylor, 1995; Jung *et al.*, 2002).

En cuanto a la liberación de Ca^{2+} intracelular, se ha descrito que en las células musculares lisas la principal fuente de liberación de Ca^{2+} intracelular es el RE y existen dos tipos de mecanismos implicados en este proceso: la CICR, que puede ser activada de manera selectiva por la cafeína y por la rianodina y la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 , activada por agonistas de receptores acoplados a PLC y la subsiguiente generación de IP_3 , que libera Ca^{2+} del RE al unirse a receptores específicos (para más detalles, ver Revisión Bibliográfica).

En nuestros experimentos, ni la cafeína ni la rianodina (empleando las concentraciones indicadas en la bibliografía consultada) provocaron una respuesta cálcica significativa. Estos resultados sugieren que las células A7r5, utilizadas en este estudio, no poseen reservorios implicados en la CICR sensibles a la rianodina, en concordancia con los resultados expuestos con anterioridad por otros autores (Byron y Taylor, 1993, Missiaen *et al.*, 1994). Por el contrario, Berman *et al.* (1994) han

descrito que la rianodina induce en células A7r5 incrementos lentos de $[Ca^{2+}]_i$ que tardan aproximadamente 30 min en estabilizarse.

De acuerdo con el modelo descrito, la aplicación de AVP o ANG II en $S0Ca^{2+}$ provocó un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ transitorio que regresó a la línea base en ~ 3 min, sin presentar por tanto la fase de meseta. Este resultado confirma que el pico de la respuesta cálcica inducida por agonistas es debido fundamentalmente a la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares por estimulación de IP_3R en las células A7r5. Además, el pico de la respuesta en $S0Ca^{2+}$ es significativamente menor que el obtenido en presencia de Ca^{2+} extracelular, lo que sugiere una contribución de la entrada de Ca^{2+} extracelular en la fase inicial transitoria de la respuesta cálcica a este agonista. Estos resultados concuerdan con los publicados anteriormente por otros autores para esta misma línea celular (Hughes y Schachter, 1994)

La depleción de reservorios intracelulares mediante la estimulación con AVP o ANG II redujo significativamente el subsiguiente incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por los isómeros del RSV. Algo similar sucedió cuando ambos agentes fueron aplicados en orden inverso, es decir, tras la inducción con RSV de un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la subsiguiente aplicación de AVP o ANG II también provocó un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, aunque significativamente reducido. Todo ello sugiere que ambos agentes pueden actuar sobre el mismo tipo de reservorios intracelulares y que estos son sensibles al IP_3 . Sin embargo, el *c*-RSV y el *t*-RSV pueden deplecionar además algún reservorio cálcico no movilizado por el IP_3 , ya que cuando se provocó el vaciado completo de los reservorios sensibles a IP_3 mediante aplicaciones sucesivas de AVP, ambos isómeros fueron todavía capaces de provocar un pequeño, pero significativo, incremento de Ca^{2+} adicional. De manera similar, tras una depleción completa de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} mediante aplicaciones sucesivas de AVP, la TP provocó un incremento adicional de la $[Ca^{2+}]_i$.

Estos resultados sugieren que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el RSV en $S0Ca^{2+}$ podría estar mediado por la depleción de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares sensibles al IP_3 . De modo adicional, los isómeros del RSV podrían movilizar Ca^{2+} desde un reservorio intracelular que no es deplecionado por el IP_3 y

que se corresponde, en parte, con el reservorio de Ca^{2+} deplecionado por la TP. Este hecho sostiene la hipótesis de que el *c*-RSV y el *t*-RSV podrían interferir con la actividad de la SERCA de modo similar a como lo hace la TP, como ya comentamos anteriormente, aunque se requieren experimentos adicionales para confirmar esta posibilidad.

A partir de nuestros experimentos no podemos descartar la posibilidad de que el *t*-RSV y el *c*-RSV puedan activar un novedoso mecanismo de CICR que no es mediado por IP_3R ni por receptores de RyR (Kasri *et al.*, 2003), cuya activación por diversos derivados disulfónicos de estilbenos ha sido puesta de manifiesto (Nadif *et al.*, 2005).

Por otro lado, tal y como hemos destacado en el apartado de la Revisión Bibliográfica, los diferentes tipos de canales transmembrana implicados en la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, tanto durante la fase de pico como en la fase de meseta, han sido objeto de múltiples controversias. En nuestros experimentos, la NIF inhibió parcialmente la fase de meseta de la respuesta inducida por AVP, lo que sugiere una contribución de VOCC sensibles a dihidropiridinas (canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L). Por otro lado, el Ni^{2+} , un inhibidor no selectivo de canales catiónicos, bloqueó por completo la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular inducida por la AVP en las células A7r5, en concordancia con lo descrito previamente por Hughes y Schachter (1994), quienes también describieron que este ion no tiene efecto sobre la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por AVP en esta misma línea celular.

En presencia de Ca^{2+} extracelular, tras el incremento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por los isómeros del RSV, ambas fases de la respuesta cálcica a la AVP y a la ANG II se vieron alteradas de forma significativa, dando lugar a una reducción dependiente de la concentración del ratio pico/meseta. Una posible causa de la disminución de la fase de pico es que la cantidad de Ca^{2+} disponible en los reservorios intracelulares sensibles al IP_3 ha sido reducida parcialmente debido a la depleción inducida por el RSV. Esta hipótesis es sustentada por los resultados de los experimentos en ausencia de Ca^{2+} extracelular comentados con anterioridad, en los

cuales se observa que, tras la liberación de Ca^{2+} intracelular por aplicación de los isómeros del RSV, la respuesta a la AVP o la ANG II es significativamente inferior.

En lo concerniente a la fase de meseta de la respuesta cálcica a AVP y ANG II en medio normocálcico, ésta también se vio afectada por la preincubación con los isómeros del RSV, aunque lo fuese de un modo relativo: si consideramos los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal iniciales (previos a la preincubación con *c*-RSV o *t*-RSV) la fase de meseta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a los agonistas no fue significativamente diferente. Por el contrario, si consideramos como niveles basales los alcanzados tras el incremento debido al efecto de los isómeros, la fase de meseta inducida por el agonista fue reducida de modo significativo. En otras palabras, tras la aplicación de los agonistas se produce un pico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y luego su valor desciende hasta mantenerse en niveles similares a los del incremento generado por los isómeros del RSV.

Una posible explicación de este hecho es que la entrada de Ca^{2+} exterior inducida por los agonistas y por el RSV (y responsable de que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sea sostenido) podría tener lugar a través de mecanismos similares:

i) Por un lado intervendría la entrada capacitativa a través de SOCC iniciada tras el vaciado de los reservorios y que es activada por la adición de los isómeros del RSV y también de la AVP. En contra de esta hipótesis, la importancia de la participación de SOCC en la respuesta a AVP en este modelo celular ha sido cuestionada por algunos autores (Gardner y Benoit, 2000).

ii) Por otro lado participaría la activación de otros tipos de canales de Ca^{2+} transmembrana, que no serían los mismos para los agonistas o para los isómeros del RSV. De acuerdo con esta idea, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el RSV es más elevado que la meseta de la respuesta a AVP o ANG II de los controles. De hecho, la entrada de Ca^{2+} inducida por el RSV puede ser también mediada por canales permeables al Ca^{2+} que no son afectados por el Ni^{2+} , la NIF o el SKF 96365, mientras que la entrada sostenida de Ca^{2+} inducida por los agonistas fue completamente bloqueada por Ni^{2+} , de acuerdo con un estudio previo (Hughes y Schachter, 1994).

En otra serie de experimentos, la despolarización de la membrana celular de las células A7r5 mediante la elevación de la concentración de K^+ extracelular provocó

un incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$. La efectividad de la NIF a la hora de inhibir este incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ fue prácticamente del 100%, lo que sugiere que la entrada de Ca^{2+} tiene lugar en gran medida a través de VOCC de tipo L (corriente de entrada $I_{Ca(L)}$). En concordancia, se ha descrito que este tipo de canales se encuentran presentes en este modelo celular (Wu *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 2001).

Asimismo, nuestros resultados en medio despolarizante con elevado K^+ y carente de Ca^{2+} , sugieren que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la reintroducción del Ca^{2+} extracelular es mediado principalmente por corrientes de Ca^{2+} a través de $I_{Ca(L)}$. Aunque se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} a través de $I_{Ca(L)}$ podría activar el mecanismo de CICR en diversas preparaciones, entre ellas la aorta de cobaya o la vena porta de rata (Ito *et al.*, 1991; Ganitkevich e Isemberg, 1992), este no es el caso de las A7r5 empleadas en el presente estudio, ya que carecen de este mecanismo, susceptible de ser activado también por rianodina (ver comentarios anteriores al respecto). En solución despolarizante con elevado K^+ y carente de Ca^{2+} , la incubación con *c*-RSV o *t*-RSV indujo un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que no difiere de modo significativo del obtenido en solución $0Ca^{2+}$.

Aunque se podría esperar que los isómeros del RSV potencien la entrada a través de $I_{Ca(L)}$ debido a la entrada capacitativa adicional de Ca^{2+} tras la depleción de reservorios intracelulares, lo que sucede es que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la reintroducción del Ca^{2+} externo fue reducida de forma significativa. Este hecho sugiere que ambos estilbenos podrían bloquear directamente la entrada de Ca^{2+} a través de $I_{Ca(L)}$. Apoyan esta hipótesis nuestros experimentos de electrofisiología (técnica de *patch-clamp*) realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Verde (Campos-Toimil *et al.*, 2007). En concordancia, otros autores han observado que el *t*-RSV puede inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de $I_{Ca(L)}$ en miocitos ventriculares de rata (Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que el dietilestilbestrol, un estrógeno sintético relacionado estructuralmente con el RSV, puede inhibir la $I_{Ca(L)}$ en las células A7r5 (Nakajima *et al.*, 1995).

Es interesante destacar que los isómeros del RSV muestran un comportamiento bifásico cuando son aplicados sobre una meseta estable $[Ca^{2+}]_i$ inducida por AVP, ANG II o elevada concentración de K^+ . En un primer momento, los isómeros del RSV

provocaron un descenso significativo de dicha meseta. Este descenso tuvo lugar de modo rápido, ya que se puso de manifiesto durante los primeros 5 min a partir de la aplicación de ambos isómeros (recordemos que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el RSV tiene lugar ~10 min después de su aplicación). Una posible explicación para el efecto inhibitorio durante los 5 min iniciales es la inhibición de la $I_{Ca(L)}$ que acabamos de describir, puesto que:

i) La NIF también inhibe parcialmente la meseta cálcica inducida por los agonistas.

ii) Este efecto inhibitorio fue más marcado sobre la meseta cálcica inducida por elevada concentración de K^+ en comparación con la inducida por los agonistas.

iii) El % de inhibición de la $I_{Ca(L)}$ para cada concentración de *t*-RSV o *c*-RSV puesto de manifiesto en los experimentos de patch-clamp (Campos-Toimil *et al.*, 2007) está bien correlacionado con su capacidad para reducir la meseta de $[Ca^{2+}]_i$.

Por otro lado, al menos tres mecanismos podrían explicar porqué la $[Ca^{2+}]_i$ comienza a incrementarse de nuevo al cabo de más de 5 min:

i) Los isómeros del RSV podrían ejercer un efecto dual sobre algunos de los canales de Ca^{2+} que participan en la fase de meseta, una situación inversa a la provocada por el galato de (-)-epigallocatequina sobre la $I_{Ca(L)}$ (Campos-Toimil y Orallo, 2007).

ii) Una depleción adicional de $[Ca^{2+}]_i$ intracelular y la subsiguiente potenciación del flujo de entrada de Ca^{2+} externo.

iii) La activación tardía de un tipo de canales que no estaba participando en la respuesta cálcica inicial: a este respecto, es interesante observar que la respuesta cálcica a los isómeros del RSV sucede en dos fases diferentes: la primera (5-10 min) se correspondería con la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y la activación del flujo de este ion a través de SOCC y la segunda fase (15-20 min) tendría lugar a través de un tipo no identificado de canales. Un efecto similar (activación y bloqueo de diferentes tipos de canales de Ca^{2+} de forma simultánea) ha sido descrito previamente para otros compuestos de origen natural, como el alcaloide rutacarpina (Wang *et al.*, 1999).

A lo largo esta etapa de nuestro estudio no ha habido diferencias cualitativas entre los efectos de los isómeros farmacológicos producidos por el *c*-RSV y el *t*-RSV, de acuerdo con la mayoría de los estudios comparativos previos sobre los efectos biológicos de ambos isómeros, lo que sugiere que su diferente conformación espacial no modifica de modo marcado su interacción con las potenciales dianas implicadas en la señalización cálcica en las células A7r5.

Resumiendo lo discutido hasta ahora, ambos isómeros del RSV ejercen dos acciones diferentes sobre la señalización cálcica en los miocitos vasculares de tipo A7r5:

i) Una inhibición dependiente de la concentración de la $I_{Ca(L)}$.

ii) Un incremento lento de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la depleción de reservorios intracelulares de Ca^{2+} (sensibles o no al IP_3), que es potenciada por la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , aunque también podría participar la activación tardía de otros canales transmembrana permeables al Ca^{2+} .

Como resultado de estas acciones, los isómeros del RSV reducen los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por agonistas de GPCR o por despolarización con una elevada concentración de K^+ y ejercen un efecto bifásico cuando se aplican sobre una meseta cálcica sostenida. El efecto global de los isómeros del RSV descrito aquí podría explicar, al menos en parte, los efectos vasorrelajantes de los isómeros del RSV (ver Revisión Bibliográfica), y de ese modo contribuir a los efectos cardioprotectores a largo plazo debidos al consumo moderado de vino (Orallo et al., 2002). Teniendo en cuenta estas propiedades farmacológicas y asumiendo que los isómeros del RSV posean un comportamiento similar en los seres humanos *in vivo*, estos compuestos podrían tener un potencial interesante como modelo químico para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos con propiedades cardioprotectoras.

Por otro lado, un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales, similar al observado en los miocitos vasculares, podría inducir un aumento de la biosíntesis y liberación de NO^{\cdot} y, de este modo, contribuir también al efecto vasorrelajante dependiente de endotelio que ha sido descrito para el *t*-RSV en arterias de diferentes especies animales, incluyendo la aorta de rata (ver Revisión Bibliográfica). De hecho, los fármacos que incrementan la $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales pueden potencialmente

incrementar la síntesis de factores endoteliales (fundamentalmente de NO, dada la sensibilidad al Ca²⁺ de la eNOS; Hobbs *et al.*, 1999) y modificar el tono vascular, tal y como se ha descrito para la TP y el ionóforo A23187, que inducen vasorrelajación dependiente de endotelio en aorta de cobaya (Taniguchi *et al.*, 1999a y 1999b).

Nuestros resultados llevados a cabo con la sonda fluorescente DAF-2, sensible a los incrementos de NO[•], parecen confirmar esta hipótesis. El *t*-RSV incrementó la [Ca²⁺]_i de forma dependiente de la concentración en las células endoteliales humanas (HUVEC). En un 30% de las células, este incremento consistió en una fase transitoria seguida de una meseta sostenida, mientras que en un 50% solamente se observó la fase de meseta. En S0Ca²⁺, el *t*-RSV también incrementó la [Ca²⁺]_i en las células HUVEC, un efecto que pudo ser abolido por completo tras la depleción de los reservorios intracelulares de Ca²⁺ mediante inhibición de la SERCA con TP. Este hecho sugiere que el aumento de la [Ca²⁺]_i inducido por el *t*-RSV es mediado por la liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares sensibles a la TP y la subsiguiente CCE a través de canales SOCC, aunque no se puede descartar que la activación directa de otro tipo de canales transmembrana permeables al Ca²⁺, como los NSCC, pueda estar implicada también.

Estos resultados son similares a los obtenidos en A7r5 donde, como hemos visto, el incremento de [Ca²⁺]_i inducido por ambos isómeros del RSV se debía principalmente a la depleción de Ca²⁺ a partir de un reservorio intracelular también movilizado por TP y a la subsiguiente entrada de Ca²⁺ a través de SOCC y otros canales permeables al Ca²⁺ no sensibles a Ni²⁺, NIF o SKF 96365. Todo ello sugiere una posible acción inhibitoria de la SERCA por parte del RSV en HUVEC, tal y como comentamos con anterioridad para las células A7r5.

Nuestros experimentos de epifluorescencia combinando las sondas fluorescentes sensibles al Ca²⁺ y al NO[•] (fura-2 y DAF-2) mostraron que existe un incremento significativo de la biosíntesis de NO[•] que tiene lugar inmediatamente después del incremento de la [Ca²⁺]_i inducido por el *t*-RSV. Este efecto fue observado estrictamente en aquellas células en que la naturaleza de la respuesta cálcica fue bifásica (pico y meseta). En los experimentos utilizando DAF-2 en monocapas de HUVEC, el *t*-RSV indujo un incremento de la liberación de NO[•] que fue anulado en

presencia de TMB-8, dando consistencia a la hipótesis de que la depleción de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares está directamente implicada. La liberación de NO^{\bullet} inducida por el *t*-RSV se redujo en presencia de Ni^{2+} o SKF 96365 que reducen la entrada capacitativa activada por la inhibición de la SERCA en las células A7r5 (presente trabajo) y HUVEC (Low *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que en aquellas células en las cuales el *t*-RSV induce un incremento importante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la liberación de NO^{\bullet} que se produce es lo suficientemente elevada para ser medida con nuestro protocolo. Apoya esta hipótesis el hecho de que la liberación de NO^{\bullet} sostenida en HUVEC es altamente dependiente de la entrada capacitativa (Lin *et al.*, 2000; Nilius y Droogmans, 2001; Tiruppathi *et al.*, 2006).

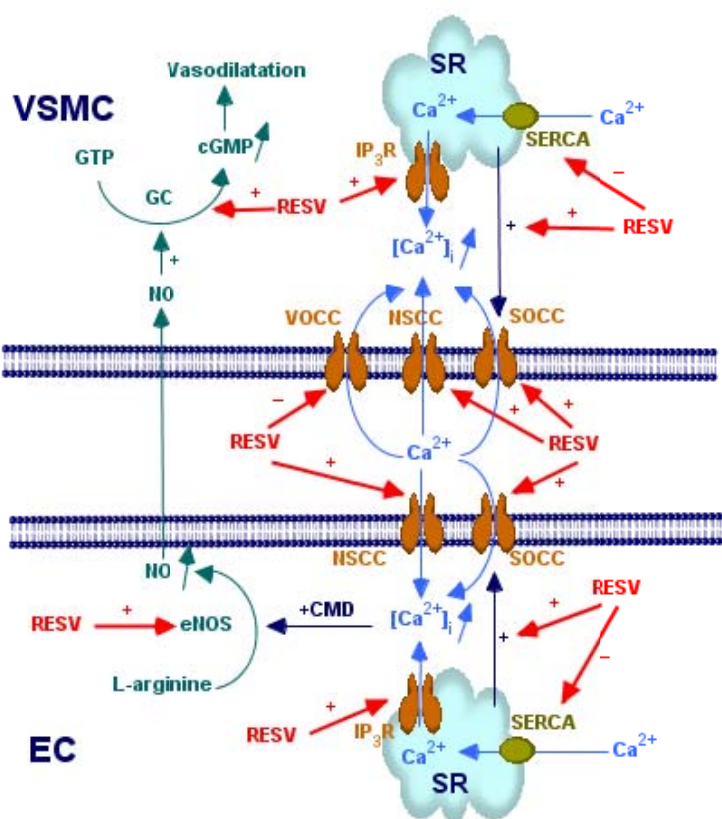


Figura 67. Posibles acciones del RSV sobre la homeostasis del Ca^{2+} y la vía de señalización NO^{\bullet} -GMPc en células musculares lisas vasculares (VSMC) y células endoteliales (EC). GTP: 5'-trifosfato de guanosina, IP_3R : receptor de IP_3 , SR: retículo sarcoplásmico, CMD: calmodulina. Figura tomada de Campos-Toimil *et al.*, 2008.

Así pues, el incremento simultáneo de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la biosíntesis y liberación de NO[•] descrito aquí podría ser importante para comprender las propiedades vasodilatadoras dependientes del endotelio del *t*-RSV. En concordancia con nuestros resultados, Wallerath *et al.* (2002) han medido un incremento significativo de la liberación de NO[•] tras un tratamiento agudo con *t*-RSV (0,1-100 μ M) en células EAA.hy 926 (una línea celular derivada de las HUVEC). Además, el *t*-RSV potenció el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por agonistas, un efecto que podría desencadenar la biosíntesis de NO[•] en células endoteliales de válvulas cardíacas de rata (Buluc y Delmirez-Yilmaz, 2006). El efecto del *t*-RSV sobre la $[Ca^{2+}]_i$ endotelial podría ser responsable, al menos en parte, del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por una mezcla de polifenoles del vino tinto (RWPC) y la subsiguiente liberación de NO[•] y otros factores relajantes endoteliales a partir de células endoteliales bovinas (Martin *et al.*, 2002, Duarte *et al.*, 2004).

Se ha descrito que los efectos cardioprotectores del *t*-RSV son debidos, en parte, a un mecanismo dependiente del NO[•] (Das y Maulik, 2006; Wang *et al.*, 2007). Por ello, la liberación de NO[•] endotelial descrita aquí podría estar implicada en algunos de los efectos cardiovasculares beneficiosos atribuidos al *t*-RSV.

La posibilidad de una activación directa de la eNOS por parte del *t*-RSV puede ser descartada, a raíz de los resultados obtenidos en nuestros experimentos de evaluación de la actividad de la eNOS *in vitro*. En concordancia, en nuestro laboratorio habíamos observado previamente que el *t*-RSV no modifica de modo directo la actividad de la eNOS en la aorta de rata (Orallo *et al.*, 2002).

Sin embargo, la activación de la eNOS por el *t*-RSV en células endoteliales podría tener lugar además por otros mecanismos que impliquen la potenciación de la cascada de fosforilación Src-PI3K-Akt que finaliza con la fosforilación en Ser1171 de la eNOS (ver Revisión Bibliográfica). Recientemente, el grupo de la Dra. Susan Dougherty demostró en una serie de elegantes experimentos que concentraciones nanomolares de *t*-RSV, al igual que de estradiol (E_2), son suficientes para producir una activación de la eNOS mediada por ER α (Klinge *et al.*, 2008). Dicho mecanismo implica la activación de la ruta Gai (ó G α s)-Src-MAPK-Akt. Según este modelo, la estructura caveolar es indispensable para una estimulación de la eNOS dependiente de

ER, pues las caveolas reúnen diversos elementos de dicha ruta (ER α , G α i, Src, PI3K, hsp90, Akt y la eNOS).

El *t*-RSV presenta propiedades estrogénicas y, al mismo tiempo, es capaz de estimular la actividad de la eNOS, probablemente a través de la misma vía de señalización que el estradiol. Teniendo en cuenta la similitud estructural que existe entre el *t*-RSV y el dietilestilbestrol (agonista estrogénico sintético) y los efectos estrogénicos dependientes de *t*-RSV descritos en ensayos *in vitro* (Gehm *et al.*, 2004), el aumento de NO \cdot inducido por el *t*-RSV podría ser debido a una estimulación de los receptores estrogénicos (ER) localizados en los microdominios caveolares.

Aunque los efectos estrogénicos del *t*-RSV fueron descritos hace más de 10 años (Ghem y Levenson, 2006), se desconocían los mecanismos implicados en la activación de la eNOS *in vivo* dependientes de este estilbeno. El trabajo de las doctoras Susan Dougherty y Caroline Klinge es el primero que explica un mecanismo intracelular de la activación de eNOS inducido por concentraciones del orden nM de *t*-RSV. En la figura 68. se muestra un esquema de este mecanismo.

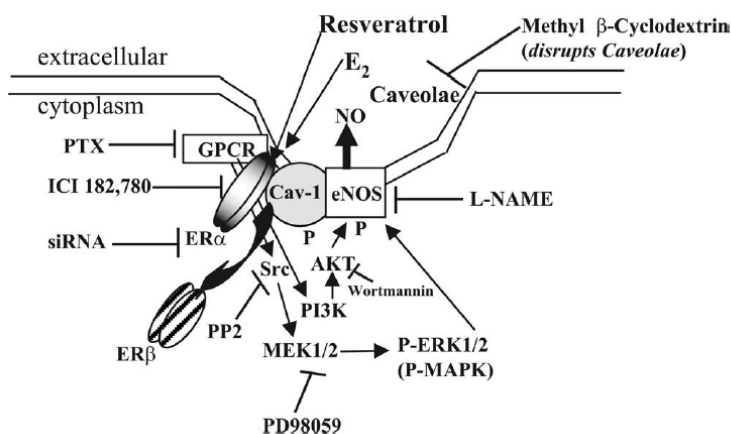


Figura 68. Modelo de activación de la eNOS inducido por la estimulación del receptor estrogénico α (ER α) por concentraciones nanomolares de *t*-RSV o estradiol (E $_2$). Figura tomada de Klinge *et al.*, 2008.

Como mencionamos en la Revisión Bibliográfica, las caveolas son un tipo particular de balsas membrana que actúan como plataformas para la agregación y el reclutamiento de multitud de proteínas de señalización y en algunos casos actúan como moduladores de la actividad de dichas proteínas (Patel *et al.*, 2007; Ostrom e

Insel, 2004). En estos microdominios se concentran proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} y el NO^* (ver Revisión Bibliográfica). Por ello, iniciamos una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio con el objetivo de evaluar los potenciales efectos del *t*-RSV sobre los microdominios caveolares de células vasculares y sobre las proteínas concentradas en ellos.

En esta etapa del trabajo, se llevaron a cabo una serie de experimentos con la finalidad de aislar y caracterizar las caveolas presentes en células vasculares, así como de las proteínas presentes en ellas. En este sentido prestamos especial atención a la distribución IP_3R y de la eNOS por tratarse de elementos fundamentales de la homeostasis cálcica y de la síntesis de NO^* en células vasculares. Por otro lado, hemos estudiado la interacción entre estas proteínas con la caveolina (proteína característica de los microdominios caveolares). Por último, estudiamos los potenciales efectos del *t*-RSV sobre la expresión de dichas proteínas y cómo este estilbeno afecta a la interacción de las mismas con la caveolina

Está ampliamente descrito que las células lineadas inmortalizadas (como son las A7r5) presentan una menor cantidad de caveolas (Thyberg *et al.*, 1997), por este motivo creímos que sería interesante trabajar con un modelo celular de características más similares a las de los miocitos vasculares en condiciones fisiológicas. Por tanto, tal y como se describió en el apartado de Material y Métodos, para los experimentos de subfraccionamiento celular para el estudio de las caveolas, microscopía confocal, co-inmunoprecipitación y RT-PCR se utilizaron (además de las líneas celulares comerciales A7r5 y HUVEC) células musculares lisas de aorta de rata (RASMC) obtenidas mediante cultivo primario.

La obtención de células por este procedimiento no garantiza la pureza total del cultivo y, en ocasiones, pueden aparecer en él otros tipos celulares también presentes en el órgano de partida. En concreto, tanto las células endoteliales de la capa íntima como los fibroblastos presentes en la capa adventicia de la arteria aorta, constituyen una fuente potencial de contaminación para la preparación de cultivo primario de RASMC. Por ello, hemos creído conveniente llevar a cabo la caracterización de los cultivos previamente a la realización de los diferentes experimentos, mediante técnicas de marcaje inmunohistoquímico, combinado con la utilización de un

microscopio confocal. Para dicha caracterización, se emplearon células obtenidas en cultivos que habían demostrado una viabilidad superior al 90-95% por medio de la técnica de exclusión con azul de tripano en el microscopio de contraste de fases.

La inmunotinción con FITC mostró la existencia de un citoesqueleto de actina bien organizado y con una estructura lineal muy definida en las células obtenidas en el cultivo primario. La α -actina es la isoforma específica del citoesqueleto de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos de los mamíferos (Wamhoff *et al.*, 2006). Dado que es característica y exclusiva de las células musculares lisas en la arteria aorta, la presencia de una célula con el núcleo azul y ausencia de marcaje en su citoesqueleto indicaría una contaminación del cultivo por otro tipo celular. De hecho, las células HUVEC no mostraron ningún marcaje con el anticuerpo anti- α -actina, aunque su cromatina sí aparece teñida de azul con el DAPI.

Por otro lado, se ha descrito que los fibroblastos expresan una isoforma diferente de actina (Kashina, 2006) que podría ser reconocida por el anticuerpo empleado. Sin embargo, en nuestros experimentos con fibroblastos (COS-7), utilizando las mismas condiciones de adquisición que con las muestras de cultivo primario, la intensidad de señal de FITC es sensiblemente menor y, además, la disposición del citoesqueleto aparece desordenada. Este resultado es indicativo de una unión no específica del anticuerpo anti- α -actina a algún elemento del citoesqueleto del fibroblasto.

En consecuencia, nuestros resultados confirman la ausencia de contaminación por fibroblastos o células endoteliales en todas las preparaciones de RASMC obtenidas durante este trabajo. La disposición característica de los cultivos en la configuración de “colina y valle” en los sucesivos pases sirve también de confirmación de la pureza del cultivo. Además, en experimentos posteriores, las proteínas expresadas por las células se corresponden con aquellas que cabría esperar según la literatura referente a las RASMC (Barja *et al.*, 1986).

Con el objeto de aislar las caveolas en los tres tipos celulares (A7r5, RASMC y HUVEC) decidimos emplear la técnica de subfraccionamiento por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa empleando una solución fuertemente alcalina sin detergentes, puesto que el uso de detergentes no iónicos deshace las interacciones

propias de la célula entre las proteínas integrales y periféricas presentes en las caveolas. Esta técnica es ampliamente utilizada en la actualidad para el estudio de las caveolas y resulta de gran ayuda como herramienta inicial para la evaluación de la colocalización de proteínas de señalización presentes en estos microdominos.

El subfraccionamiento celular permite separar las proteínas celulares en dos grandes fracciones en función de la densidad de los componentes celulares: la fracción ligera (contiene las caveolas y otras balsas membrana) y la fracción pesada (contiene el resto de las proteínas celulares no asociadas a balsas membrana). Las balsas membrana presentan una densidad menor que otras regiones de la MP, por ello migran hacia gradientes de menor concentración de sacarosa.

Las medidas de la concentración de proteína total, el porcentaje de sacarosa (p/v) para cada fracción y los valores de distribución de proteína total en las distintas fracciones no difirieron de forma significativa entre los tres tipos celulares estudiados. Este hecho sugiere que la relación entre la cantidad de balsas membrana y la superficie de MP con características de “líquido desordenado” es similar en A7r5, RASMC y HUVEC. Además, nuestros resultados indican que los microdominos caveolares colocalizan en las fracciones 3-6 (17-25% de sacarosa) en los tres tipos celulares, puesto que las tres isoformas de la caveolina aparecen exclusivamente en estas fracciones.

A su vez, estos experimentos nos han permitido realizar un estudio comparativo de la expresión de las distintas isoformas de caveolina en A7r5, RASMC y HUVEC. Los miocitos de aorta de rata expresan las tres isoformas de caveolina (cav-1, cav-2 y cav-3), mientras que las células endoteliales sólo expresan las isoformas cav-1 y cav-2. Nuestros resultados están en concordancia con otros que demostraron que los miocitos vasculares (Ostrom *et al.*, 2000; Hnasko y Lisanti, 2003), al igual que los cardiomiocitos (Head *et al.*, 2006; Galbiati *et al.*, 2001; McNally *et al.*, 1998), expresan las tres isoformas de la familia de la caveolina.

Tanto la cav-1 como la cav-2 se expresan en multitud de tipos celulares, mientras que la cav-3 se considera una isoforma específica de células musculares. De todos modos, conviene hacer aquí la siguiente precisión: en los mamíferos, la cav-3 se distribuye mayoritariamente en células esqueléticas, lisas y cardíacas (McNally *et al.*,

1998; Feron *et al.*, 1996; Ostrom *et al.*, 2000; Hnasko y Lisanti, 2003), aunque recientemente se ha descrito su expresión en otros tejidos donde realiza funciones específicas de modulación enzimática: en astrocitos (Nishiyama *et al.*, 1999), en células de la astroglia (Silva *et al.*, 2005), en condrocitos (Kwak *et al.*, 2006) y en células epiteliales ciliadas de las vías respiratorias (Krasteva *et al.*; 2007). Por ello, creemos conveniente aclarar que la cav-3 no es una isoforma específica de tejido muscular, aunque frecuentemente se describa así en los trabajos científicos.

La posible presencia de caveolas en las fracciones ricas en caveolina procedentes de las muestras de células HUVEC es apoyada por nuestras imágenes obtenidas mediante TEM, que mostraron vesículas circulares con formas variadas y tamaños comprendidos entre 70 y 250 nm, similares en morfología y tamaño a las vesículas caveolares mostradas por otros grupos (Sampson *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que las caveolas actúan como plataformas de regulación de multitud de proteínas implicadas en diferentes rutas de señalización celular, una desestabilización o ruptura de la estructura de estos microdominios supone un desacoplamiento de dichas rutas. Una técnica muy extendida en la experimentación básica para romper las balsas membrana sin dañar la integridad de la MP consiste en el uso de agentes secuestradores de colesterol. De este modo, se consigue desestabilizar estos microdominios de manera selectiva, pues son superficies de la MP ricas en colesterol, y por tanto, más susceptibles de ser atacadas por estos agentes (Thyberg, 2002).

En nuestros experimentos, la β -metilciclodextrina (Me β CD), una herramienta farmacológica empleada para mejorar la biodisponibilidad de fármacos de baja solubilidad, incapaz de entrar en las células, pero sí de retirar colesterol de las membranas biológicas (Smart y Anderson, 2002), se empleó para romper la estructura funcional de las caveolas.

Nuestros resultados muestran un desplazamiento de la fracción ligera hacia zonas de mayor concentración de sacarosa tras la incubación de los tres tipos celulares estudiados con Me β CD (10 mM, 2h). Esto es indicativo de que la sustracción de colesterol de las balsas membrana provoca un incremento de densidad en estos microdominios. Probablemente, la pérdida de colesterol esté acompañada de la pérdida

de grandes cantidades de glucoesfingolípidos responsables de la baja densidad de estos microdominios respecto a otras zonas de la MP. Así pues, un menor contenido de colesterol aumenta su densidad y, por este motivo, las caveolas alteradas migran únicamente hasta zonas con un 30-35% de sacarosa (p/v).

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar los efectos del *t*-RSV sobre la estructura general de las balsas membrana. Las condiciones de tratamiento con *t*-RSV escogidas para la realización de estos ensayos fueron 30 ó 50 μ M en la mayoría de los casos por tratarse de una concentración no tóxica y suficiente como para tener efectos medibles.

La incubación de células RASMC y HUVEC con este estilbeno (30 μ M, 24 h) no modificó la estructura de estos microdominios, al menos, en la medida en la que la Me β CD lo hace. Es decir, el *t*-RSV no modificó la densidad de los microdominios. Sin embargo, no tenemos evidencias para concluir que el *t*-RSV no altere de algún modo menos drástico la estructura de la MP. De hecho, recientemente se ha observado que determinadas estructuras químicas de naturaleza estilbénica y flavonoide interaccionan con los fosfolípidos de la MP donde pueden permanecer retenidos. Tarahovsky *et al.* (2008) demostraron que los flavonoides situados en zonas hidrofóbicas de la bicapa lipídica contribuyen a la formación de balsas membrana, mientras que las moléculas de flavonoides localizadas en la interfaz polar de la bicapa pueden fluidificar las membranas. Por lo tanto, estas moléculas podrían modificar/modular/alterar la estructura original de la caveola interfiriendo en la coordinación de los diferentes elementos de una vía de transducción particular.

En relación al tipo de proteínas implicadas en la homeostasis del Ca⁺² y la del NO[•] nuestros resultados demuestran claramente que la eNOS colocaliza con los microdominios caveolares en HUVEC (Figura 56. de Resultados), mientras que la proteína G α q y el ER β se distribuyeron de forma homogénea entre la fracción ligera y la fracción pesada. El hecho de que la proteína G α q sea una proteína soluble y que el ER β se exprese en el núcleo explica la presencia de estas proteínas en la fracción pesada. Al mismo tiempo, otros grupos han descrito la colocalización de estas dos proteínas en la fracción ligera (Kim *et al.*, 2008), lo que concuerda con la presencia de la proteína G α q y el ER β en la fracción ligera mostrada en nuestros resultados.

Los resultados obtenidos en experimentos similares llevados a cabo con miocitos vasculares demuestran la colocalización del IP₃R1, del IP₃R3, de la AC 5/6 y de la SERCA2 en la fracción ligera, por lo que sería fácil pensar que una o varias de estas proteínas residan en las caveolas de los tipos celulares estudiados.

La concordancia existente entre los resultados obtenidos en los estudios de la expresión proteica (*western blot*) y de RT-PCR de la eNOS, indica que, en las condiciones de cultivo empleadas, las células HUVEC y las A7r5 expresan esta enzima de manera constitutiva (aunque estas últimas en cantidades menores, puesto que fue necesario concentrar la muestra para poder detectar esta enzima por *western blot*). Por el contrario, las RASMC carecen de eNOS en las condiciones de cultivo empleadas y además, no presentan ARNm codificante para esta enzima. La ausencia de ARNm codificante para eNOS en los homogeneizados de la capa media de aorta de rata concuerda con la falta de expresión la eNOS en RASMC. Estos resultados sugieren que los miocitos de aorta de rata no expresan esta enzima en condiciones fisiológicas y, por tanto, el cultivo celular de RASMC presenta mayores similitudes con los miocitos vasculares *in vivo* que las células A7r5 en lo que respecta a la expresión de la eNOS.

Una colocalización en las mismas fracciones que la caveolina no es suficiente para concluir que una proteína concreta se localiza en las caveolas, ya que en esas mismas fracciones están contenidas otras balsas membrana de distinta naturaleza y función (por ej. los microdominos recubiertos de clatrina mencionados en la Revisión Bibliográfica). Por ello, además del subfraccionamiento celular, es necesario recurrir a otras técnicas para verificar la presencia de proteínas en los microdominos caveolares.

En este trabajo prestamos especial atención a la interacción entre los receptores de IP₃ y la caveolina en RASMC y entre la eNOS y caveolina en HUVEC. Los resultados obtenidos mediante técnicas de co-inmunoprecipitación en nuestro laboratorio indican que tanto los IP₃R1 como los IP₃R3 interaccionan con la cav-1 en las células RASMC. Los receptores de IP₃ son heterotetrámeros constituidos por distintas subunidades de IP₃R (Mikoshiya, 2007; Taylor y Dellis, 2006). Nuestros miocitos de cultivo primario, al igual que las células A7r5, no expresan la isoforma IP₃R2, por lo que probablemente, los receptores de IP₃ de las RASMC están

constituidos por cualquier combinación posible de cuatro subunidades de las isoformas IP₃R1 y IP₃R3. Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados y los modelos propuestos para explicar la topología del IP₃R que existen en la actualidad, podemos concluir que la cav-1 interacciona con al menos una isoforma de las dos subunidades formadoras del IP₃R que se expresan en RASMC. El tratamiento con *t*-RSV no modificó de modo significativo esta interacción.

Por otra parte nuestros resultados de co-inmunoprecipitación llevados a cabo en HUVEC en ausencia de tratamiento indican que la cav-1, pero no la cav-2, interacciona con la eNOS. Teniendo en cuenta que estas células endoteliales no expresan la isoforma cav-3 y que no existe interacción entre la enzima y la cav-2, podemos concluir que la eNOS interacciona únicamente con una isoforma de la cav-1 en células HUVEC. Estos resultados concuerdan con los de otros grupos de investigación que previamente habían descrito dicha interacción (Krasteva *et al.*, 2007; Sedding *et al.*, 2006). Esto no descarta la posibilidad de que la misma enzima en otros tipos celulares interaccione con otra isoforma diferente. De hecho, se ha descrito que la eNOS interacciona exclusivamente con la cav-3 en la zona apical de células epiteliales del tracto respiratorio (Krasteva *et al.*, 2007).

Los experimentos de microscopía confocal realizados para estudiar estas interacciones sólo aportaron información relativa a la distribución celular de la eNOS y de las diferentes isoformas de IP₃R y caveolina. El marcaje de HUVEC con anti-eNOS mostró una distribución claramente periplasmática, lo que confirma la localización de la eNOS asociada a la cara interna de la membrana plasmática que ya había sido descrita en la década de los noventa (Couet *et al.*, 1997).

Más recientemente, Xu y colaboradores describieron que la cav-1 y la eNOS colocalizan únicamente en zonas periplasmáticas y sugirieron que la cav-1 interacciona con la eNOS para inhibir la actividad de la enzima (Xu *et al.*, 2008).

Nuestras preparaciones de inmunotinción no indican claras evidencias de colocalización entre cav-1 y eNOS, dado que las imágenes de confocal no mostraron píxeles amarillos de colocalización *in situ* (Figura 63.). Estos resultados pueden inducir a pensar que no existe interacción entre estas proteínas. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos descritos en la bibliografía y sobre todo, los resultados obtenidos

en las inmunoprecipitaciones (comentados más adelante) que demuestran una clara interacción entre las parejas de proteínas mencionadas anteriormente, suponemos que dicha interacción es probablemente indirecta. En este caso, otras proteínas diferentes podrían estar implicadas en la formación de un complejo proteico, aunque sería necesario realizar más experimentos para verificar esta posibilidad.

Una vez obtenida información acerca de la distribución de la eNOS y la cav-1 en los diferentes tipos celulares, procedimos al estudio de los efectos del *t*-RSV sobre la expresión de dichas proteínas y sobre las interacciones entre ellas.

Aunque la eNOS fue inicialmente caracterizada como una enzima de expresión constitutiva en células endoteliales, recientes observaciones han puesto de manifiesto que la expresión de la eNOS puede ser positiva o negativamente regulada a nivel transcripcional a través de procesos pato-/fisiológicos (Li *et al.*, 2002). Se han descubierto que ciertos mecanismos epigenéticos, como la metilación del promotor de eNOS y la deacetilación de histonas asociadas al ADN, son capaces de modificar el patrón de expresión de esta enzima, especialmente en situaciones de represión de la transcripción en células que no son endoteliales (Chan *et al.*, 2004; Fish *et al.*, 2005).

Nuestros resultados obtenidos mediante técnicas de *western blot* y RT-PCR demuestran claramente que el *t*-RSV potencia la expresión de la eNOS en HUVEC y A7r5. Además, este efecto es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al estilbeno. En concordancia, resultados similares en HUVEC fueron publicados por otros autores (Leikert *et al.*, 2001; Rathel *et al.*, 2003). En estos trabajos, no sólo se menciona que el *t*-RSV incrementa los niveles de expresión de la eNOS, si no que también induce un aumento en la producción de NO.

El tratamiento de RASMC con *t*-RSV (10-100 μ M, durante tiempos superiores a 12 h) indujo la expresión de la eNOS. En este caso, no podemos hablar de una potenciación de la transcripción de esta enzima, pues en ausencia de tratamiento estas células no expresan eNOS (carecen de ARNm codificante para la enzima eNOS). Además, este efecto del *t*-RSV es también dependiente de la concentración y el tiempo, como indican los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR. Estos resultados no pudieron ser confirmados mediante *western blot*. Es decir, la expresión de la eNOS tras la incubación con *t*-RSV (30 μ M, 24 h) en RASMC no es medible

empleando técnicas convencionales de *western blot*, lo que parece indicar que la cantidad de proteína expresada es pequeña.

Los resultados obtenidos en los experimentos de co-inmunoprecipitación con muestras de RASMC tratadas con *t*-RSV (30 μ M, 24 h) confirman que este estilbeno induce la expresión de la eNOS en los miocitos vasculares. Además, la enzima puede ser detectada en el *pellet* tras precipitar (concentrar) cav-1, pero no cav-3. A su vez, esto indica que la eNOS inducida por el *t*-RSV en células RASMC interacciona específicamente con cav-1, pero no con cav-3, con una selectividad semejante a la que tiene lugar en las células endoteliales (antes comentada).

Los efectos del *t*-RSV sobre la expresión de la cav-1 fueron también estudiados en RASMC y HUVEC. Este estilbeno indujo una disminución de la transcripción del gen CAV-1 en los dos tipos celulares dependiente de la concentración. Estos resultados pudieron ser confirmados mediante técnicas de *western blot*.

Teniendo en cuenta que i) el tratamiento con *t*-RSV aumenta la transcripción de eNOS en HUVEC, induce la transcripción de la enzima en RASMC y, al mismo tiempo, disminuye la expresión de cav-1 en ambos modelos celulares; y que ii) la eNOS interacciona selectivamente con la cav-1 y no con otras isoformas de esta proteína, nos pareció interesante completar este trabajo con el estudio de los efectos del *t*-RSV sobre la interacción entre cav-1 y eNOS. Nuestros resultados (Figura 61.) indican que el *t*-RSV no sólo afecta a la expresión de ambas proteínas, si no que además incrementa la cantidad de enzima libre (no unido a cav-1), según se desprende de la disminución del ratio P/S. Además, este efecto es dependiente de la concentración de estilbeno, ya que cuanto mayor es la concentración de *t*-RSV menor es el valor del ratio P/S.

Estos resultados coinciden con los anteriormente discutidos relativos al incremento en la producción de NO[•] observados en HUVEC tras la incubación de estas células con *t*-RSV, pues como se ha comentado en la revisión bibliográfica, la liberación de la eNOS por parte de la cav-1 permite que la enzima pueda ser fosforilada en Ser 1171 y, de este modo, pueda ser activada por la cinasa Akt.

En definitiva, a lo largo de este trabajo se ha puesto de manifiesto que el RSV presenta diversas e interesantes acciones farmacológicas sobre las células vasculares. Por un lado, los isómeros *c*-RSV y *t*-RSV poseen una marcada capacidad para alterar la homeostasis cálcica en las células musculares lisas vasculares que podrían justificar, al menos en parte, su capacidad vasorrelajante directa. Por otro lado, el *t*-RSV puede incrementar la liberación de NO• a partir de células endoteliales, un efecto que podría estar relacionado con un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en estas células y con sus efectos beneficiosos a nivel cardiovascular. Además, el hecho de que el *t*-RSV disminuya la expresión de cav-1 e incremente la de eNOS en células vasculares, sugiere que esta molécula, probablemente actuando a nivel caveolar, podría interferir en la homeostasis del NO• provocando un incremento de sus niveles tras tratamientos prolongados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El *c*-RSV y el *t*-RSV ejercen diversas acciones sobre la señalización cálcica en los miocitos embrionarios de aorta de rata (A7r5). Dichas acciones son cualitativamente similares para ambos isómeros:

a) Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ basal, siendo el *c*-RSV significativamente más efectivo que el *t*-RSV, con las siguientes características:

- Depleción de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares sensibles al IP_3 y de otros no sensibles al IP_3 , pero que si son deplecionados por inhibición de la actividad de la SERCA.
- Activación de la CCE a través de SOCC, motivada por la depleción de reservorios de Ca^{2+} intracelular.
- Activación de la entrada de Ca^{2+} transmembrana por medio de la apertura tardía de otro tipo de canales no identificados.
- Ausencia de implicación del mecanismo de CICR, que no fue detectado en este tipo de células.

b) Reducción del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por agonistas de GPCR o por despolarización con K^+ , debida a:

- Disminución del Ca^{2+} disponible en los reservorios intracelulares.
- Bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOCC de tipo L. No se puede descartar un efecto inhibitor sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas a través de canales ROCC u otros canales catiónicos no selectivos permeables al Ca^{2+} (NSCC) diferentes a los implicados en la CCE o de un efecto bifásico (inhibición y posterior activación) sobre alguno de estos canales.

2. El *t*-RSV incrementó la $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de NO[•] de forma simultánea y dependiente de la concentración en las células HUVEC. Sin embargo, no activó de forma directa la enzima eNOS *in vitro*. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el *t*-RSV en HUVEC es debido, al menos en parte, a la depleción de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares por inhibición de la actividad de la SERCA, a la subsiguiente CCE. Además, podrían estar implicados otros tipos de canales permeables al Ca²⁺ todavía sin identificar.
3. La proporción de balsas membrana en las células A7r5, RASMC y HUVEC es similar. Los miocitos de aorta de rata (RASMC y A7r5) expresan las tres isoformas de caveolina (cav-1, cav-2 y cav-3), mientras que las células endoteliales sólo expresan las isoformas cav-1 y cav-2. Dichas proteínas aparecen siempre en las fracciones celulares con una concentración de sacarosa comprendida entre el 17-25%. El tratamiento con *t*-RSV no modificó esta distribución proteica en ninguno de los modelos celulares empleados, sin embargo, indujo una disminución de la transcripción del gen CAV-1 en RASMC y HUVEC, de forma dependiente de la concentración.
4. La eNOS está presente en los microdominios caveolares en las células HUVEC y A7r5, pero no en las RASMC en las condiciones de cultivo empleadas. El tratamiento con *t*-RSV potencia la expresión de la eNOS en HUVEC y A7r5 e induce la expresión de dicha enzima en RASMC, de forma dependiente del tiempo y de la concentración.
5. La eNOS interacciona de forma específica con la cav-1 en HUVEC y en RASMC tratadas con *t*-RSV. Dicha interacción depende de la concentración de *t*-RSV en RASMC, mientras que disminuye tras el tratamiento con *t*-RSV en HUVEC.
6. Sólo las isoformas IP₃R1 e IP₃R3 se expresan en RASMC y A7r5, donde colocalizan en los microdominios caveolares. La cav-1 interacciona con al menos una de ambas isoformas. Esta interacción no es modificada por el tratamiento con *t*-RSV.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Mohsen, M.; Bayele, H.; Kuhnle, G.; Gibson, G.; Debnam, E.; Kaila, S.S.; Rice-Evans, C.; Spencer, J.P. Distribution of [³H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *Br. J. Nut.* 2006; 96: 62-70.
- Aggarwal, B.B. y Shishodia, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71: 1397-1421.
- Aggarwal, B.B.; Bhardwaj, A.; Aggarwal, R.S.; Seeram, N.P.; Shishodia, S.; Takada, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004; 24: 2783-2840.
- Alarcón de la Lastra, C. y Villegas, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol. Nut. Food Res.* 2005; 49: 405-430.
- Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. Nitric Oxide Synthases: Structure, Function, and Inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 596-615.
- Alonso, M.T.; Villalobos, C.; Chamero, P.; Álvarez, J.; García-Sancho, J. Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium* 2006; 40: 513-525.
- Álvarez-Castro, E.; Campos-Toimil, M.; Orallo, F. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2004; 369: 496-506.
- Ambudkar, I.S. Ca²⁺ signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 25-32.
- Andriambeloson, E.; Magnier, C.; Haan-Archipoff, G.; Lobstein, A.; Anton, R.; Beretz, A.; Stoclet, J.C.; Andriantsitohaina, R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutr.* 1998; 128: 2324-2333.
- Araim, O.; Ballantyne, J.; Waterhouse, A.L.; Sumpio, B.E. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. *J. Vasc. Surg.* 2002; 35: 1226-1232.
- Arakaki, N.; Nagao, T.; Niki, R.; Toyofuku, A.; Tanaka, H.; Kuramoto, Y.; Emoto, Y.; Shibata, H.; Magota, K.; Higuti, T. Possible role of cell surface H⁺-ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cancer Res.* 2003; 1: 931-939.
- Arichi, H.; Kumira, Y.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arichi, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* 1982; 30: 1766-1770.

- Assanasen, C.; Mineo, C.; Seetharam, D.; Yuhanna, I.S.; Marcel, Y.L.; Connelly, M.A.; Williams, D.L.; Llera-Moya, M.; Shaul, P.W.; Silver, D.L. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 969-977.
- Barja, F.; Coughlin, C.; Belin, D.; Gabbiani, G. Actin isoform synthesis and mRNA levels in quiescent and proliferating rat aortic smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Lab. Invest.* 1986; 55: 226-233.
- Basly, J.P.; Marre-Fournier, F.; Le Bail, J.C.; Habrioux, G.; Chulia, A.J. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (*E*)- and (*Z*)-resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66: 769-777.
- Bavaresco, L.; Fregoni, C.; Cantu, E.; Trevisan, M. Stilbene compounds: From the grapevine to wine. *Drugs Exper. Clin. Res.* 1999; 25: 57-63.
- Berman, D.M.; Sugiyama, T.; Goldman, W.F. Ca^{2+} stores in smooth muscle cells: Ca^{2+} buffering and coupling to AVP-evoked inositol phosphate synthesis. *Am. J. Physiol* 1994; 266: C276-C283.
- Berridge, M. Calcium signalling in health and disease. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2008; 22: 3-3.
- Berridge, M.J. Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 1995; 312 (Pt 1): 1-11.
- Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-325.
- Berridge, M.J.; Lipp, P.; Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000; 1: 11-21.
- Bertelli, A.A.; Giovannini, L.; Bernini, W.; Migliori, M.; Fregoni, M.; Bavaresco, L.; Bertelli, A. Antiplatelet activity of *cis*-resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1996; 22: 61-63.
- Bodgan, C. Nitric Oxide and the Regulation of Gene Expression. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 66-75.
- Bolotina, V.M. Orai, STIM1 and iPLA₂beta: a view from a different perspective. *J. Physiol.* 2008; 586: 3035-3042.
- Bolton, T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev.* 1979; 59: 606-718.
- Bootman, M.D.; Collins, T.J.; Peppiatt, C.M.; Prothero, L.S.; Mackenzie, L.; de Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S.C.; Seo, J.T.; Berridge, M.J.; Ciccolini, F.; Lipp, P. Calcium signalling-an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2001; 12: 3-10.
- Bradamante, S.; Barenghi, L.; Villa, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc. Drug Rev.* 2004; 22: 169-188.
- Braunstein, T.H.; Inoue, R.; Cribbs, L.; Oike, M.; Ito, Y.; Holstein-Rathlou, N.H.; Jensen, L.J. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. *J. Vasc. Res.* 2009; 46: 138-151.

- Brito, P.; Almeida, L.M.; Dinis, T.C. The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic. Res.* 2002; 36: 621-631.
- Buluc, M. y Demirel-Yilmaz, E. Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium. *Vascul. Pharmacol.* 2006; 44: 231-237.
- Burjonroppa, S. y Fujise, K. Resveratrol as Cardioprotective Agent: Evidence from Bench and Bedside. *Resveratrol in health and disease.* (ISBN: 0-8493-3371-7). B. Aggarwal y S. Shishodia, eds. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis (2006): 539-555.
- Burns, J.; Yokota, T.; Ashihara, H.; Lean, M.E.; Crozier, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3337-3340.
- Byron, K. y Taylor, C.W. Vasopressin stimulation of Ca^{2+} mobilization, two bivalent cation entry pathways and Ca^{2+} efflux in A7r5 rat smooth muscle cells. *J. Physiol.* 1995; 485 (Pt 2): 455-468.
- Byron, K.L. y Taylor, C.W. Spontaneous Ca^{2+} spiking in a vascular smooth muscle cell line is independent of the release of intracellular Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 6945-6952.
- Calderone, V.; Martelli, A.; Testai, L.; Martinotti, E.; Breschi, M.C. Functional contribution of the endothelial component to the vasorelaxing effect of resveratrol and NS 1619, activators of the large-conductance calcium-activated potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2007; 375: 73-80.
- Campos-Toimil, M. y Orallo, F. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels and voltage-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* 2007; 80: 2147-2153.
- Campos-Toimil, M.; Elies, J.; Alvarez, E.; Verde, I.; Orallo, F. Effects of *trans*- and *cis*-resveratrol on Ca^{2+} handling in A7r5 vascular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;
- Campos-Toimil, M.; Elies, J.; Orallo, F. Cardiovascular effects of *trans*- and *cis*-resveratrol. *Recent Progress in Medicinal Plants. Vol. 21: Phytopharmacology and Therapeutic Values III.* (ISBN: 1-9336991-1-6). V.K. Singh, D.K. Majumdar, J.N. Govil y R.Kr. Sharma, eds. Stadium Press LLC, USA (2008) págs. 263-294.
- Cantos, E.; Garcia-Viguera, C.; Pascual-Teresa, S.; Tomas-Berberan, F.A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agricultural Food Chem.* 2000; 48: 4606-4612.
- Cassidy, A.; Hanley, B.; Lamuela-Raventos, R.M. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 1044-1062.
- Caulin-Glaser, T.; Garcia-Cardena, G.; Sarrel, P.; Sessa, W.C.; Bender, J.R. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} mobilization. *Circ. Res.* 1997; 81: 885-892.
- Cavallaro, A.; Ainis, T.; Bottari, C.; Fimiani, V. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human Neutrophils. *Physiol. Res.* 2003; 52: 555-562.

- Chambliss, K.L. y Shaul, P.W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr. Rev.* 2002; 23: 665-686.
- Chambliss, K.L.; Yuhanna, I.S.; Anderson, R.G.; Mendelsohn, M.E.; Shaul, P.W. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.* 2002; 16: 938-946.
- Chambliss, K.L.; Yuhanna, I.S.; Mineo, C.; Liu, P.; German, Z.; Sherman, T.S.; Mendelsohn, M.E.; Anderson, R.G.; Shaul, P.W. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ. Res.* 2000; 87: E44-E52.
- Chan, S.Y.; Empig, C.J.; Welte, F.J.; Speck, R.F.; Schmaljohn, A.; Kreisberg, J.F.; Goldsmith, M.A. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* 2001; 106: 117-126.
- Chan, Y.; Fish, J.E.; D'Abreo, C.; Lin, S.; Robb, G.B.; Teichert, A.M.; Karantzoulis-Fegaras, F.; Keightley, A.; Steer, B.M.; Marsden, P.A. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 35087-35100.
- Chatterjee, A. y Catravas, J.D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul. Pharmacol.* 2008; 49: 134-140.
- Chen, C.K. y Pace-Asciak, C.R. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 1996; 27: 363-366.
- Chen, W.P.; Su, M.J.; Hung, L.M. In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 554: 196-204.
- Cheng, K.T.; Liu, X.; Ong, H.L.; Ambudkar, I.S. Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 12935-12940.
- Chiou, C.Y. y Malagodi, M.H. Studies on the mechanism of action of a new Ca²⁺ antagonist, 8-(N,N-diethylamino)octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.* 1975; 53: 279-285.
- Clapham, D.E. Calcium signaling. *Cell* 1995a; 80: 259-268.
- Clapham, D.E. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* 1995b; 375: 634-635.
- Cohen, A.W.; Combs, T.P.; Scherer, P.E.; Lisanti, M.P. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003a; 285: E1151-E1160.
- Cohen, A.W.; Hnasko, R.; Schubert, W.; Lisanti, M.P. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 1341-1379.
- Cohen, A.W.; Park, D.S.; Woodman, S.E.; Williams, T.M.; Chandra, M.; Shirani, J.; Pereira, d.S.; Kitsis, R.N.; Russell, R.G.; Weiss, L.M.; Tang, B.; Jelicks, L.A.; Factor, S.M.; Shtutin, V.; Tanowitz, H.B.; Lisanti, M.P. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003b; 284: C457-C474.

- Cohen, R.A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995; 38: 105-128.
- Couet, J.; Li, S.; Okamoto, T.; Ikezu, T.; Lisanti, M.P. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 6525-6533.
- Cribbs, L.L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium* 2006; 40: 221-230.
- Crossthwaite, A.J.; Seebacher, T.; Masada, N.; Ciruela, A.; Dufraux, K.; Schultz, J.E.; Cooper, D.M. The cytosolic domains of Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 6380-6391.
- Csutora, P.; Su, Z.; Kim, H.Y.; Bugrim, A.; Cunningham, K.W.; Nuccitelli, R.; Keizer, J.E.; Hanley, M.R.; Blalock, J.E.; Marchase, R.B. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1999; 96: 121-126.
- Cullen, J.P.; Morrow, D.; Jin, Y.; von Offenber, S.N.; Sitzmann, J.V.; Cahill, P.A.; Redmond, E.M. Resveratrol inhibits expression and binding activity of the monocyte chemotactic protein-1 receptor, CCR2, on THP-1 monocytes. *Atherosclerosis* 2007; 195: e125-e133.
- Das, D.K. Protective Effects of Resveratrol Against Ischemia-Reperfusion. *Resveratrol in health and disease. Vol. 20: Oxidative Stress and Disease* (ISBN: 0-8493-3371-7). B.B. Aggarwal y S. Shishodia, eds. Taylor&Francis Group LLC. Boca Raton, FL (2006) págs. 519-537.
- Das, D.K. y Maulik, N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol. Interv.* 2006; 6: 36-47.
- Das, S.; Alagappan, V.K.T.; Bagchi, D.; Sharma, H.S.; Maulik, N.; Das, D.K. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption- A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vasc. Pharmacol.* 2005a; 42: 281-289.
- Das, S.; Cordis, G.A.; Maulik, N.; Das, D.K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2005b; 288: H328-H335.
- Davis, B.J.; Xie, Z.; Viollet, B.; Zou, M.H. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 2006; 55: 496-505.
- Deak, M. y Falk, H. On the chemistry of the resveratrol diastereomers. *Monatshefte fur Chemie* 2003; 134: 883-888.
- Dedio, J.; Konig, P.; Wohlfart, P.; Schroeder, C.; Kummer, W.; Muller-Esterl, W. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J.* 2001; 15: 79-89.

- Dehaven, W.I.; Smyth, J.T.; Boyles, R.R.; Putney, J.W., Jr. Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 17548-17556.
- Delaunois, B.; Cordelier, S.; Conreux, A.; Clement, C.; Jeandet, P. Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol. J.* 2009; 7: 2-12
- Del Pozo, M.A. y Schwartz, M.A. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol.* 2007; 17: 246-250.
- Dell'Agli, M.; Busciala, A.; Bosisio, E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 593-602.
- Dellis, O.; Dedos, S.G.; Tovey, S.C.; Taufiq, U.R.; Dubel, S.J.; Taylor, C.W. Ca²⁺ entry through plasma membrane IP₃ receptors. *Science* 2006; 313: 229-233.
- Dellis, O.; Rossi, A.M.; Dedos, S.G.; Taylor, C.W. Counting functional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors into the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 751-755.
- Delmas, D.; Jannin, B.; Latruffe, N. Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 377-395.
- Di Santo, A.; Mezzetti, A.; Napoleone, E.; Di Tommaso, R.; Donati, M.B.; de Gaetano, G.; Lorenzet, R. Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1089-1095.
- Dietzen, D.J.; Hastings, W.R.; Lublin, D.M. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6838-6842.
- Dobrydneva, Y.; Williams, R.L.; Morris, G.Z.; Blackmore, P.F. Dietary phytoestrogens and their synthetic structural analogues as calcium channel blockers in human platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002; 40: 399-410.
- Dolphin, A.C. The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp. Physiol* 1995; 80: 1-36.
- Dong, H.H. y Ren, H.L. New progression in the study of protective properties of resveratrol in anticardiovascular disease. *Bratisl. Lek. Listy* 2004; 105: 225-229.
- Doutheil, J. y Paschen, W. Effect of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-diethylamino-octyl ester (TMB-8) on neuronal calcium homeostasis, protein synthesis, and energy metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 85: 85-91.
- Drab, M.; Verkade, P.; Elger, M.; Kasper, M.; Lohn, M.; Lauterbach, B.; Menne, J.; Lindschau, C.; Mende, F.; Luft, F.C.; Schedl, A.; Haller, H.; Kurzchalia, T.V. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293: 2449-2452.
- Duarte, J.; Andriambelason, E.; Diebolt, M.; Andriantsitohaina, R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol. Res.* 2004; 53: 595-602.

- Dudzinski, D.M. y Michel, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.* 2007; 75: 247-260.
- Dudzinski, D.M.; Igarashi, J.; Greif, D.; Michel, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006; 46: 235-276.
- Dupree, P.; Parton, R.G.; Raposo, G.; Kurzchalia, T.V.; Simons, K. Caveolae and sorting in the *trans*-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* 1993; 12: 1597-1605.
- Echarri, A.; Muriel, O.; Del Pozo, M.A. Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007; 18: 627-637.
- Echevarria, W.; Leite, M.F.; Guerra, M.T.; Zipfel, W.R.; Nathanson, M.H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5: 440-446.
- El Mowafy, A.M. y White, R.E. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett.* 1999; 451: 63-67.
- Engelman, J.A.; Zhang, X.L.; Lisanti, M.P. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett.* 1998; 436: 403-410.
- Engelman, J.A.; Zhang, X.L.; Razani, B.; Pestell, R.G.; Lisanti, M.P. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 32333-32341.
- Erwin, P.A.; Lin, A.J.; Golan, D.E.; Michel, T. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 19888-19894.
- Feron, O. y Balligand, J.L. Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69: 788-797.
- Feron, O. y Kelly, R.A. The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. *Circ. Res.* 2001; 88: 129-131.
- Feron, O.; Belhassen, L.; Kobzik, L.; Smith, T.W.; Kelly, R.A.; Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 22810-22814.
- Ferrero, M.E.; Bertelli, A.A.E.; Fulgenzi, A.; Pellegatta, F.; Corsi, M.M.; Bonfrate, M.; Ferrara, F.; De Caterina, R.; Giovannini, L.; Bertelli, A. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68: 1208-1214.
- Feske, S.; Gwack, Y.; Prakriya, M.; Srikanth, S.; Puppel, S.H.; Tanasa, B.; Hogan, P.G.; Lewis, R.S.; Daly, M.; Rao, A. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; 441: 179-185.

- Filipeanu, C.M.; Brailoiu, E.; Kok, J.W.; Henning, R.H.; De Zeeuw, D.; Nelemans, S.A. Intracellular angiotensin II elicits Ca^{2+} increases in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 420: 9-18.
- Fish, J.E.; Matouk, C.C.; Rachlis, A.; Lin, S.; Tai, S.C.; D'Abreo, C.; Marsden, P.A. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 24824-24838.
- Fleming, I. y Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 284: R1-12.
- Fleming, I. y Busse, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43: 532-541.
- Flórez, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, A. *Farmacología Humana* 4º ed. Mason, 2003.
- Fontana, J.; Fulton, D.; Chen, Y.; Fairchild, T.A.; McCabe, T.J.; Fujita, N.; Tsuruo, T.; Sessa, W.C. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.* 2002; 90: 866-873.
- Fraiz, N.; Alcaide, C.; Álvarez, E.; Cano, E.; Orallo, F. Comparative study of the cardiovascular and antithrombotic effects of the *cis* and *trans* resveratrol isomers. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2004; 26 (Suppl. A): 161-162.
- Frank, P.G. y Lisanti, M.P. Role of caveolin-1 in the regulation of the vascular shear stress response. *J. Clin. Invest.* 2006a; 116: 1222-1225.
- Frank, P.G.; Cheung, M.W.; Pavlides, S.; Llaverias, G.; Park, D.S.; Lisanti, M.P. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006b; 291: H677-H686.
- Frank, P.G.; Hassan, G.S.; Rodriguez-Feo, J.A.; Lisanti, M.P. Caveolae and caveolin-1: novel potential targets for the treatment of cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des* 2007; 13: 1761-1769.
- Fremont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66: 663-673.
- Fujimoto, T.; Kogo, H.; Nomura, R.; Une, T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J. Cell Sci.* 2000; 113 Pt 19: 3509-3517.
- Fujimoto, T.; Nakade, S.; Miyawaki, A.; Mikoshiba, K.; Ogawa, K. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J. Cell. Biol.* 1992; 119: 1507-1513.
- Fulton, D.; Gratton, J.P.; Sessa, W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 299: 818-824.
- Galbiati, F.; Engelman, J.A.; Volonte, D.; Zhang, X.L.; Minetti, C.; Li, M.; Hou, H., Jr.; Kneitz, B.; Edelmann, W.; Lisanti, M.P. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 2001a; 276: 21425-21433.

- Galbiati, F.; Volonte, D.; Liu, J.; Capozza, F.; Frank, P.G.; Zhu, L.; Pestell, R.G.; Lisanti, M.P. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G₀/G₁ arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 2001b; 12: 2229-2244.
- Gallis, B.; Corthals, G.L.; Goodlett, D.R.; Ueba, H.; Kim, F.; Presnell, S.R.; Figeys, D.; Harrison, D.G.; Berk, B.C.; Aebersold, R.; Corson, M.A. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 30101-30108.
- Galvez, B.G.; Matias-Roman, S.; Yanez-Mo, M.; Vicente-Manzanares, M.; Sanchez-Madrid, F.; Arroyo, A.G. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 2004; 15: 678-687.
- Ganitkevich, V.Y. y Isenberg, G. Contribution of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release to the [Ca²⁺]_i transients in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol.* 1992; 458: 119-137.
- García-Cardena, G.; Fan, R.; Stern, D.F.; Liu, J.; Sessa, W.C. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 1996a; 271: 27237-27240.
- García-Cardena, G.; Martasek, P.; Masters, B.S.; Skidd, P.M.; Couet, J.; Li, S.; Lisanti, M.P.; Sessa, W.C. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 25437-25440.
- García-Cardena, G.; Oh, P.; Liu, J.; Schnitzer, J.E.; Sessa, W.C. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996b; 93: 6448-6453.
- Gardner, J.D. y Benoit, J.N. Effects of capacitative calcium entry on agonist-induced calcium transients in A7r5 vascular smooth muscle cells. *J. Biomed. Sci.* 2000; 7: 304-310.
- Gehm, B.D. y Levenson, A.S. Resveratrol as a Phytoestrogen. *Resveratrol in Health and Disease. Vol. 20: Oxidative Stress and Disease* (ISBN: 0-8493-3371-7) B.B. Aggarwal y S. Shishodia, eds. Tylor&Francis Group LLC. Boca Raton, FL (2006) págs 439-464.
- Gehm, B.D.; Levenson, A.S.; Liu, H.; Lee, E.J.; Amundsen, B.M.; Cushman, M.; Jordan, V.C.; Jameson, J.L. Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004; 88: 223-234.
- Gilabert, J.A. y Parekh, A.B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca²⁺ current I(CRAC). *EMBO J.* 2000; 19: 6401-6407.

- Gilabert, J.A.; Bakowski, D.; Parekh, A.B. Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *EMBO J.* 2001; 20: 2672-2679.
- Glenney, J.R., Jr. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett.* 1992; 314: 45-48.
- Glenney, J.R., Jr. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 20163-20166.
- Glenney, J.R., Jr. y Zokas, L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol* 1989; 108: 2401-2408.
- Goetz, R.M.; Thatte, H.S.; Prabhakar, P.; Cho, M.R.; Michel, T.; Golan, D.E. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1999; 96: 2788-2793.
- Gojkovic-Bukarica, L.; Novakovic, A.; Kanjuh, V.; Bumbasirevic, M.; Lesic, A.; Heinle, H. A role of ion channels in the endothelium-independent relaxation of rat mesenteric artery induced by resveratrol. *J. Pharmacol. Sci.* 2008; 108: 124-130.
- Gollasch, M.; Haase, H.; Ried, C.; Lindschau, C.; Morano, I.; Luft, F.C.; Haller, H. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 1998; 12: 593-601.
- González, E.; Kou, R.; Lin, A.J.; Golan, D.E.; Michel, T. Subcellular targeting and agonist-induced site-specific phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem* 2002; 277: 39554-39560.
- Gratton, J.P.; Bernatchez, P.; Sessa, W.C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 2004; 94: 1408-1417.
- Griendling, K.K.; Ushio-Fukai, M.; Lassegue, B.; Alexander, R.W. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997; 29: 366-373.
- Griffith, O.W. y Stuehr, D.J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57: 707-736.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 3440-3450.
- Gu, X.; Creasy, L.; Kester, A.; Zeece, M. Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 3223-3227.
- Hajnoczky, G.; Robb-Gaspers, L.D.; Seitz, M.B.; Thomas, A.P. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 1995; 82: 415-424.
- Hao, H.D. y He, L.R. Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol. *J. Med. Food* 2004; 7: 290-298.
- Hart, J.H. Role of Phytostilbenes in Decay and Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1981; 19: 437-458.

- Hattori, R.; Otani, H.; Maulik, N.; Das, D.K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282: H1988-H1995.
- Head, B.P.; Patel, H.H.; Roth, D.M.; Murray, F.; Swaney, J.S.; Niesman, I.R.; Farquhar, M.G.; Insel, P.A. Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 26391-26399.
- Henderson, R.M.; Edwardson, J.M.; Geisse, N.A.; Saslowsky, D.E. Lipid rafts: feeling is believing. *News Physiol. Sci.* 2004; 19: 39-43.
- Hirata, Y.; Tomita, M.; Ikeda, M. Characterization of alpha- and beta-adrenergic and angiotensin receptors in cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta. *Jpn. Circ. J.* 1985; 49: 1043-1051.
- Hisamoto, K.; Ohmichi, M.; Kurachi, H.; Hayakawa, J.; Kanda, Y.; Nishio, Y.; Adachi, K.; Tasaka, K.; Miyoshi, E.; Fujiwara, N.; Taniguchi, N.; Murata, Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 3459-3467.
- Hnasko, R. y Lisanti, M.P. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol. Interv.* 2003; 3: 445-464.
- Hobbs, A.J.; Higgs, A.; Moncada, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 191-220.
- Hoth, M.; Button, D.C.; Lewis, R.S. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000; 97: 10607-10612.
- House, S.J.; Potier, M.; Bisailon, J.; Singer, H.A.; Trebak, M. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* 2008; 456: 769-785.
- Howitz, K.T.; Bitterman, K.J.; Cohen, H.Y.; Lamming, D.W.; Lavu, S.; Wood, J.G.; Zipkin, R.E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.L.; Scherer, B.; Sinclair, D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425: 191-196.
- Hsieh, T.C.; Juan, G.; Darzynkiewicz, Z.; Wu, J.M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* 1999; 59: 2596-2601.
- Hughes, A.D. y Schachter, M. Multiple pathways for entry of calcium and other divalent cations in a vascular smooth muscle cell line (A7r5). *Cell Calcium* 1994; 15: 317-330.
- Igarashi, J. y Michel, T. Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36281-36288.

- Iino, M. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* 1990; 95: 1103-1122.
- Irvine, R.F. 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* 1990; 263: 5-9.
- Isshiki, M. y Anderson, R.G. Function of caveolae in Ca^{2+} entry and Ca^{2+} -dependent signal transduction. *Traffic.* 2003; 4: 717-723.
- Ito, K.; Ikemoto, T.; Takakura, S. Involvement of Ca^{2+} influx-induced Ca^{2+} release in contractions of intact vascular smooth muscles. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: H1464-H1470.
- Jagannadham, M.V.; Sharadadevi, A.; Nagaraj, R. Effects of deleting a tripeptide sequence observed in muscular dystrophy patients on the conformation of synthetic peptides corresponding to the scaffolding domain of caveolin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 298: 203-206.
- Jager, U. y Nguyen-Duong, H. Relaxant effect of *trans*-resveratrol on isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung.* 1999; 49: 207-211.
- Jang, D.S.; Kang, B.S.; Ryu, S.Y.; Chang, I.M.; Min, K.R.; Kim, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57: 705-712.
- Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.; Fong, H.H.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehta, R.G.; Moon, R.C.; Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-220.
- Jeandet, P.; Bessis, R.; Maume, B.F.; Sbagui, M. Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *J. Wine Res.* 1993; 4: 79-85.
- Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A.C.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 2731-2741.
- Jenkins, R.B.; Qian, J.; Lee, H.K.; Huang, H.; Hirasawa, K.; Bostwick, D.G.; Proffitt, J.; Wilber, K.; Lieber, M.M.; Liu, W.; Smith, D.I. A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 759-766.
- Joy, S.; Siow, R.; Rowlands, D.; Becker, M.; Wyatt, A.; Aaronson PI; Coen, C.; Kallo, I.; Jacob, R.; Mann, G. The isoflavone Equol mediates rapid vascular relaxation. *The J. Biol. Chem.* 2006; 281: 27335-27345.
- Jung, S.; Strotmann, R.; Schultz, G.; Plant, T.D. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002; 282: C347-C359.
- Kanaide, H. Calcium transients in primary culture rat aortic smooth muscle cells. *Asia Pacific J. Pharmacol.* 1990; 5: 177-183.

- Kashina, A.S. Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-terminus. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 610-615.
- Kasri, N.N.; Sienaert, I.; Parys, J.B.; Callewaert, G.; Missiaen, L.; Jeromin, A.; De Smedt, H. A novel Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism in A7r5 cells regulated by calmodulin-like proteins. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 27548-27555.
- Kawanabe, Y.; Okamoto, Y.; Hashimoto, N.; Masaki, T. Molecular mechanisms for activation of voltage-independent Ca^{2+} channels by endothelin-1/endothelin-A receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 44 Suppl 1: S219-S223.
- Kimura, Y.; Ohminami, H.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arichi, S. Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med.* 1983; 49: 51-54.
- Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 834: 275-278.
- Klinge, C.; Wickramasinghe NS; Ivanova MM; Dougherty SM Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor α -Scr-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 2008; 22 (7): 2185-2197.
- Krasteva, G.; Pfeil, U.; Filip, A.M.; Lips, K.S.; Kummer, W.; Konig, P. Caveolin-3 and eNOS colocalize and interact in ciliated airway epithelial cells in the rat. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 615-625.
- Kuvin, J.T.; Patel, A.R.; Sidhu, M.; Rand, W.M.; Sliney, K.A.; Pandian, N.G.; Karas, R.H. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am. J. Cardiol.* 2003; 92: 275-279.
- Kwak, J.O.; Lee, W.K.; Kim, H.W.; Jung, S.M.; Oh, K.J.; Jung, S.Y.; Huh, Y.H.; Cha, S.H. Evidence for cyclooxygenase-2 association with caveolin-3 in primary cultured rat chondrocytes. *J. Korean Med. Sci.* 2006; 21: 100-106.
- Langcake, P. y Pryce, R.J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 1976; 9: 77-86.
- Lanz, T.; Tropf, S.; Marner, F.J.; Schroder, J.; Schroder, G. The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 9971-9976.
- Large, W.A. Receptor-operated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2002; 13: 493-501.
- Larsson, P.; Ulfhammer, E.; Karlsson, L.; Bokarewa, M.; Wahlander, K.; Jern, S. Effects of IL-1 β and IL-6 on tissue-type plasminogen activator expression in vascular endothelial cells. *Thromb. Res.* 2008; 123: 342-351.
- Lee, H.; Park, D.S.; Razani, B.; Russell, R.G.; Pestell, R.G.; Lisanti, M.P. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L)

- behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 2002; 161: 1357-1369.
- Lee, H.; Volonte, D.; Galbiati, F.; Iyengar, P.; Lublin, D.M.; Bregman, D.B.; Wilson, M.T.; Campos-Gonzalez, R.; Bouzahzah, B.; Pestell, R.G.; Scherer, P.E.; Lisanti, M.P. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol. Endocrinol.* 2000; 14: 1750-1775.
- Leikert, J.F.; Rathel, T.R.; Wohlfart, P.; Cheynier, V.; Vollmar, A.M.; Dirsch, V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circ.* 2002; 106: 1614-1617.
- Leiro, J.; Alvarez, E.; Arranz, J.A.; Laguna, R.; Uriarte, E.; Orallo, F. Effects of *cis*-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 1156-1165.
- Li, H.; Tian, Z.; Qiu, X.; Wu, J.; Zhang, P.; Jia, Z. A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery. *Physiol. Res.* 2005; 55(4):365-72.
- Li, H.; Wallerath, T.; Munzel, T.; Forstermann, U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 2002; 7: 149-164.
- Li, L.; Haynes, M.P.; Bender, J.R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 4807-4812.
- Li, S.; Couet, J.; Lisanti, M.P. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 1996a; 271: 29182-29190.
- Li, S.; Seitz, R.; Lisanti, M.P. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J. Biol. Chem.* 1996b; 271: 3863-3868.
- Li, S.; Song, K.S.; Koh, S.S.; Kikuchi, A.; Lisanti, M.P. Baculovirus-based expression of mammalian caveolin in Sf21 insect cells. A model system for the biochemical and morphological study of caveolae biogenesis. *J. Biol. Chem.* 1996c; 271: 28647-28654.
- Lin, J.K.; Pan, M.H.; Ho, C.T.; Lin-Shiau, S.Y. Cancer chemoprevention by phytopolyphenols through modulating mitotic and differentiating signal transduction pathways. *Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention* 2003; 851: 50-71.
- Lin, S.; Fagan, K.A.; Li, K.X.; Shaul, P.W.; Cooper, D.M.; Rodman, D.M. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 17979-17985.

- Liou, J.; Kim, M.L.; Heo, W.D.; Jones, J.T.; Myers, J.W.; Ferrell, J.E., Jr.; Meyer, T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr. Biol.* 2005; 15: 1235-1241.
- Lipskaia, L. y Lompre, A.M. Alteration in temporal kinetics of Ca^{2+} signaling and control of growth and proliferation. *Biol. Cell* 2004; 96: 55-68.
- Lisanti, M.P.; Scherer, P.E.; Tang, Z.; Sargiacomo, M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol.* 1994; 4: 231-235.
- Liu, J.; Oh, P.; Horner, T.; Rogers, R.A.; Schnitzer, J.E. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 7211-7222.
- Liu, Z.; Zhang, L.P.; Ma, H.J.; Wang, C.; Li, M.; Wang, Q.S. Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. *Sheng Li Xue. Bao.* 2005; 57: 599-604.
- Lodish, H.F.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J.E. *Molecular Cell Biology.* 2000; 2ª ed. W.H. Freeman and Company. New York, NY.
- Loirand, G. y Pacaud, P. Mechanism of the ATP-induced rise in cytosolic Ca^{2+} in freshly isolated smooth muscle cells from human saphenous vein. *Pflugers Arch.* 1995; 430: 429-436.
- Low, A.M.; Berdik, M.; Sormaz, L.; Gataiance, S.; Buchanan, M.R.; Kwan, C.Y.; Daniel, E.E. Plant alkaloids, tetrandrine and hernandezine, inhibit calcium-depletion stimulated calcium entry in human and bovine endothelial cells. *Life Sci.* 1996; 58: 2327-2335.
- Luetterforst, R.; Stang, E.; Zorzi, N.; Carozzi, A.; Way, M.; Parton, R.G. Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J. Cell Biol.* 1999; 145: 1443-1459.
- Lungu, A.O.; Jin, Z.G.; Yamawaki, H.; Tanimoto, T.; Wong, C.; Berk, B.C. Cyclosporin A inhibits flow-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase by altering cholesterol content in caveolae. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 48794-48800.
- MacLennan, D.H.; Asahi, M.; Tupling, A.R. The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 986: 472-480.
- Malviya, A.N. y Rogue, P.J. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 1998; 92: 17-23.
- Maniatis, N.A.; Brovkovich, V.; Allen, S.E.; John, T.A.; Shajahan, A.N.; Tirupathi, C.; Vogel, S.M.; Skidgel, R.A.; Malik, A.B.; Minshall, R.D. Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ. Res.* 2006; 99: 870-877.
- Marin, J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J. Auton. Pharmacol.* 1993; 13: 127-176.

- Martin, S.; Andriambeloson, E.; Takeda, K.; Andriantsitohaina, R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 1579-1587.
- Martínez, J. y Moreno, J.J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 59: 865-870.
- McIntosh, D.P.; Tan, X.Y.; Oh, P.; Schnitzer, J.E. Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis *in vivo*: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2002; 99: 1996-2001.
- McNally, E.M.; de Sa, M.E.; Duggan, D.J.; Bonnemann, C.G.; Lisanti, M.P.; Lidov, H.G.; Vainzof, M.; Passos-Bueno, M.R.; Hoffman, E.P.; Zatz, M.; Kunkel, L.M. Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7: 871-877.
- Miatello, R.; Vázquez, M.; Renna, N.; Cruzado, M.; Zumino, A.P.; Risler, N. Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am. J. Hypertens.* 2005; 18: 864-870.
- Mikoshiba, K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J. Neurochem.* 2007; 102: 1426-1446.
- Mineo, C. y Shaul, P.W. Circulating cardiovascular disease risk factors and signaling in endothelial cell caveolae. *Cardiovasc. Res.* 2006; 70: 31-41.
- Mineo, C.; Deguchi, H.; Griffin, J.H.; Shaul, P.W. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ. Res.* 2006; 98: 1352-1364.
- Mio, Y.; Suga, S.; Osanai, T.; Kanazawa, T.; Onodera, K.; Wada, J.; Kamimura, N.; Wakui, M. Oxidized LDLs but not native LDLs augment Ba²⁺ currents through L-type Ca²⁺ channels of the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *Cell Signal.* 1997; 9: 367-372.
- Missiaen, L.; Parys, J.B.; De Smedt, H.; Himpens, B.; Casteels, R. Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP. *Biochem. J.* 1994; 300 (Pt 1): 81-84.
- Miura, T.; Muraoka, S.; Ikeda, N.; Watanabe, M.; Fujimoto, Y. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacology & Toxicology* 2000; 86: 203-208.
- Miwa, S.; Iwamuro, Y.; Zhang, X.F.; Inoki, T.; Okamoto, Y.; Okazawa, M.; Masaki, T. Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn. J. Pharmacol.* 1999; 80: 281-288.
- Moneer, Z.; Dyer, J.L.; Taylor, C.W. Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative Ca²⁺-entry pathways regulated by vasopressin. *Biochem. J.* 2003; 370: 439-448.
- Monier, S.; Parton, R.G.; Vogel, F.; Behlke, J.; Henske, A.; Kurzchalia, T.V. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Biol. Cell* 1995; 6: 911-927.

- Montagnani, M.; Chen, H.; Barr, V.A.; Quon, M.J. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca^{2+} but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 30392-30398.
- Munro, S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 2003; 115: 377-388.
- Naderali, E.K.; Doyle, P.J.; Williams, G. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin. Sci. (Lond)* 2000; 98: 537-543.
- Naderali, E.K.; Smith, S.L.; Doyle, P.J.; Williams, G. The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats. *Clin. Sci. (Lond)* 2001; 100: 55-60.
- Nadif, K.N.; Bultynck, G.; Parys, J.B.; Callewaert, G.; Missiaen, L.; De Smedt, H. Suramin and disulfonated stilbene derivatives stimulate the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release mechanism in A7r5 cells. *Mol. Pharmacol.* 2005; 68: 241-250.
- Nakajima, T.; Kitazawa, T.; Hamada, E.; Hazama, H.; Omata, M.; Kurachi, Y. 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 294: 625-635.
- Neusser, M.; Tepel, M.; Golinski, P.; Holthues, J.; Spieker, C.; Zhu, Z.; Zidek, W. Different calcium storage pools in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J. Hypertens.* 1994; 12: 533-538.
- Nilius, B. y Droogmans, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 1415-1459.
- Nishiyama, K.; Trapp, B.D.; Ikezu, T.; Ransohoff, R.M.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Kanazawa, I.; Hsiao, K.K.; Lisanti, M.P.; Okamoto, T. Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 1999; 19: 6538-6548.
- Nofer, J.R.; van der, G.M.; Tolle, M.; Wolinska, I.; von Wnuck, L.K.; Baba, H.A.; Tietge, U.J.; Godecke, A.; Ishii, I.; Kleuser, B.; Schafers, M.; Fobker, M.; Zidek, W.; Assmann, G.; Chun, J.; Levkau, B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J. Clin. Invest* 2004; 113: 569-581.
- Nomomura, S.; Kanagawa, H.; Makimoto, A. Chemical constituents of polygonaceous plants: I. Studies on the components of ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.). *Yakugaku Zasshi* 1963; 83: 988-990.
- Norkin, L.C.; Anderson, H.A.; Wolfrom, S.A.; Oppenheim, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol.* 2002; 76: 5156-5166.
- Oh, P.; McIntosh, D.P.; Schnitzer, J.E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell. Biol.* 1998; 141: 101-114.
- Okamoto, T.; Schlegel, A.; Scherer, P.E.; Lisanti, M.P. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 5419-5422.

- Ong, H.L. y Barritt, G.J. Transient receptor potential and other ion channels as pharmaceutical targets in airway smooth muscle cells. *Respirology*. 2004; 9: 448-457.
- Ong, H.L.; Cheng, K.T.; Liu, X.; Bandyopadhyay, B.C.; Paria, B.C.; Soboloff, J.; Pani, B.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Singh, B.B.; Gill, D.L.; Ambudkar, I.S. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 9105-9116.
- Orallo, F. Biological effects of *cis*- versus *trans*-resveratrol. *Resveratrol in health and disease*. Vol. 20: Oxidative Stress and Disease (ISBN: 0-8493-3371-7). B.B. Aggarwal y S. Shishodia, eds. Taylor & Francis Group LLC. Boca Raton, FL (2006) págs. 577-600.
- 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; 121: 1627-1636.
- Orallo, F. y Camiña, M. Study of the endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilator effects of resveratrol in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124: 108P.
- Orallo, F.; Alvarez, E.; Camiña, M.; Leiro, J.M.; Gomez, E.; Fernandez, P. The possible implication of *trans*-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 294-302.
- Orlichenko, L.; Huang, B.; Krueger, E.; McNiven, M.A. Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 4570-4579.
- Ostrom, R.S. e Insel, P.A. Methods for the study of signaling molecules in membrane lipid rafts and caveolae. *Methods Mol. Biol.* 2006; 332: 181-191.
- Ostrom, R.S. e Insel, P.A. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 143: 235-245.
- Ostrom, R.S. New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentation in membrane microdomains. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 473-476.
- Ostrom, R.S.; Bunday, R.A.; Insel, P.A. Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 19846-19853.
- Ostrom, R.S.; Violin, J.D.; Coleman, S.; Insel, P.A. Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 2000; 57: 1075-1079.
- Pacaud, P.; Loirand, G.; Baron, A.; Mironneau, C.; Mironneau, J. Ca²⁺ channel activation and membrane depolarization mediated by Cl⁻ channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 104: 1000-1006.
- Pace-Asciak, C.R.; Hahn, S.; Diamandis, E.P.; Soleas, G.; Goldberg, D.M. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and

- eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 1995; 235: 207-219.
- Palade, G.E. Fine structure of blood capillaries. *J. Apply. Physiol.* 1953; 24: 1424-
- Palomino, O.; Gómez-Serranillos, M.P.; Slowing, K.; Carretero, E.; Villar, A. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2000; 870: 449-451.
- Pani, B. y Singh, B.B. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* 2009;
- Pani, B.; Ong, H.L.; Liu, X.; Rauser, K.; Ambudkar, I.S.; Singh, B.B. Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 17333-17340.
- Parton, R.G. y Hancock, J.F. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell. Biol.* 2004; 14: 141-147.
- Patel, H.H.; Murray, F.; Insel, P.A. Caveolae as Organizers of pharmacologically Relevant Signal Transduction Molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 48: 14.1-14.33.
- Paul, B.; Masih, I.; Deopujari, J.; Charpentier, C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine from India. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 68: 71-76.
- Pawson, T. y Scott, J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997; 278: 2075-2080.
- Pelkmans, L. y Helenius, A. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 2002; 3: 311-320.
- Pendurthi, U.R.; Williams, J.T.; Rao, L.V. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 419-426.
- Penumathsa, S.V.; Thirunavukkarasu, M.; Zhan, L.; Maulik, G.; Menon, V.P.; Bagchi, D.; Maulik, N. Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMPK/AKT/eNOS signaling pathway in diabetic myocardium. *J. Cell Mol. Med.* 2008;
- Periasamy, M. y Kalyanasundaram, A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007; 35: 430-442.
- Pervaiz, S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 2003; 17: 1975-1985.
- Pike, L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 1597-1598.

- Pinton, P.; Giorgi, C.; Siviero, R.; Zecchini, E.; Rizzuto, R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008; 27: 6407-6418.
- Popescu, L.M.; Gherghiceanu, M.; Mandache, E.; Cretoiu, D. Caveolae in smooth muscles: nanocontacts. *J. Cell Mol. Med.* 2006; 10: 960-990.
- Purdy, K.E. y Arendshorst, W.J. Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001; 12: 19-28.
- Putney, J.W., Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7: 1-12.
- Putney, J.W., Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990; 11: 611-624.
- Rakici, O.; Kiziltepe, U.; Coskun, B.; Aslamaci, S.; Akar, F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *Int. J. Cardiol.* 2005; 105: 209-215.
- Randriamampita, C. y Tsien, R.Y. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 1993; 364: 809-814.
- Rathel TR; Leikert J Ju; 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 (1): 136-142.
- Razani, B.; Engelman, J.A.; Wang, X.B.; Schubert, W.; Zhang, X.L.; Marks, C.B.; Macaluso, F.; Russell, R.G.; Li, M.; Pestell, R.G.; Di Vizio, D.; Hou, H., Jr.; Kneitz, B.; Lagaud, G.; Christ, G.J.; Edelmann, W.; Lisanti, M.P. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 38121-38138.
- Razani, B.; Wang, X.B.; Engelman, J.A.; Battista, M.; Lagaud, G.; Zhang, X.L.; Kneitz, B.; Hou, H., Jr.; Christ, G.J.; Edelmann, W.; Lisanti, M.P. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 2002a; 22: 2329-2344.
- Razani, B.; Woodman, S.E.; Lisanti, M.P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 2002b; 54: 431-467.
- Renaud, S. y de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-1526.
- Rodman, D.M.; Reese, K.; Harral, J.; Fouty, B.; Wu, S.; West, J.; Hoedt-Miller, M.; Tada, Y.; Li, K.X.; Cool, C.; Fagan, K.; Cribbs, L. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ. Res.* 2005; 96: 864-872.
- Rothberg, K.G.; Heuser, J.E.; Donzell, W.C.; Ying, Y.S.; Glenney, J.R.; Anderson, R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992; 68: 673-682.
- Rotondo, S.; Rajtar, G.; Manarini, S.; Celardo, A.; Rotillo, D.; de Gaetano, G.; Evangelista, V.; Cerletti, C. Effect of *trans*-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on

- human polymorphonuclear leukocyte function. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123: 1691-1699.
- Rybin, V.O.; Grabham, P.W.; Elouardighi, H.; Steinberg, S.F. Caveolae-associated proteins in cardiomyocytes: caveolin-2 expression and interactions with caveolin-3. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285: H325-H332.
- Samain, E.; Bouillier, H.; Miserey, S.; Perret, C.; Renaud, J.F.; Safar, M.; Dagher, G. Extracellular signal-regulated kinase pathway is involved in basic fibroblast growth factor effect on angiotensin II-induced Ca^{2+} transient in vascular smooth muscle cell from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35: 61-67.
- Sampson, L.J.; Davies, L.M.; Barrett-Jolley, R.; Standen, N.B.; Dart, C. Angiotensin II-activated protein kinase C targets caveolae to inhibit aortic ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc. Res.* 2007; 76: 61-70.
- Sanders, K.M. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 1438-1449.
- Sargiacomo, M.; Scherer, P.E.; Tang, Z.; Kubler, E.; Song, K.S.; Sanders, M.C.; Lisanti, M.P. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1995; 92: 9407-9411.
- Sargiacomo, M.; Sudol, M.; Tang, Z.; Lisanti, M.P. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 1993; 122: 789-807.
- Sato, M.; Maulik, G.; Bagchi, D.; Das, D.K. Myocardial protection by protykin, a novel extract of *trans*-resveratrol and emodin. *Free Radic. Res.* 2000; 32: 135-144.
- Sbaa, E.; Frerart, F.; Feron, O. The double regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolae and caveolin: A paradox solved through the study of angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2005; 15: 157-162.
- Scherer, P.E.; Lisanti, M.P.; Baldini, G.; Sargiacomo, M.; Mastick, C.C.; Lodish, H.F. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell. Biol.* 1994; 127: 1233-1243.
- Scherer, P.E.; Okamoto, T.; Chun, M.; Nishimoto, I.; Lodish, H.F.; Lisanti, M.P. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1996; 93: 131-135.
- Scherer, P.E.; Tang, Z.; Chun, M.; Sargiacomo, M.; Lodish, H.F.; Lisanti, M.P. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16395-16401.
- Schilling, K.; Opitz, N.; Wiesenthal, A.; Oess, S.; Tikkanen, R.; Muller-Esterl, W.; Icking, A. Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol. Biol. Cell.* 2006; 17: 3870-3880.

- Schlegel, A. y Lisanti, M.P. A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 21605-21617.
- Schroeder, R.; London, E.; Brown, D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1994; 91: 12130-12134.
- Schubert, W.; Frank, P.G.; Woodman, S.E.; Hyogo, H.; Cohen, D.E.; Chow, C.W.; Lisanti, M.P. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 40091-40098.
- Schwartz, Z.; Sylvia, V.L.; Del Toro, F.; Hardin, R.R.; Dean, D.D.; Boyan, B.D. 24R,25-(OH)(2)D(3) mediates its membrane receptor-dependent effects on protein kinase C and alkaline phosphatase via phospholipase A₂ and cyclooxygenase-1 but not cyclooxygenase-2 in growth plate chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* 2000; 182: 390-401.
- Sedding, D.G. y Braun-Dullaeus, R.C. Caveolin-1: Dual role for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc. Med.* 2006; 16: 50-55.
- Seddon, M.; Shah, A.M.; Casadei, B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc. Res.* 2007; 75: 315-326.
- Seki, T.; Yokoshiki, H.; Sunagawa, M.; Nakamura, M.; Sperelakis, N. Angiotensin II stimulation of Ca²⁺-channel current in vascular smooth muscle cells is inhibited by lavendustin-A and LY-294002. *Pflugers Arch.* 1999; 437: 317-323.
- Setoguchi, M.; Ohya, Y.; Abe, I.; Fujishima, M. Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. *J. Physiol.* 1997; 501 (Pt 2): 343-353.
- Shajahan, A.N.; Wang, A.; Decker, M.; Minshall, R.D.; Liu, M.C.; Clarke, R. Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 5934-5943.
- Shaul, P.W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* 2002; 64: 749-774.
- Shin, J.S. y Abraham, S.N. Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes. Infect.* 2001; 3: 755-761.
- Shridhar, V.; Sun, Q.C.; Miller, O.J.; Kalemkerian, G.P.; Petros, J.; Smith, D.I. Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene* 1997; 15: 2727-2733.
- Siemann, E.H. y Creasy, L.L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992; 43: 49-52.

- Silva, W.I.; Maldonado, H.M.; Velazquez, G.; Rubio-Davila, M.; Miranda, J.D.; Aquino, E.; Mayol, N.; Cruz-Torres, A.; Jardon, J.; Salgado-Villanueva, I.K. Caveolin isoform expression during differentiation of C6 glioma cells. *Int J. Dev. Neurosci.* 2005; 23: 599-612.
- Singer, S.J. y Nicholson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175: 720-731.
- Smani, T.; Patel, T.; Bolotina, V.M. Complex regulation of store-operated Ca^{2+} entry pathway by PKC-epsilon in vascular SMCs. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C1499-C1508.
- Smart, E.J. y Anderson, R.G. Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol.* 2002; 353: 131-139.
- Smart, E.J.; Graf, G.A.; McNiven, M.A.; Sessa, W.C.; Engelman, J.A.; Scherer, P.E.; Okamoto, T.; Lisanti, M.P. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19: 7289-7304.
- Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 1997a; 30: 91-113.
- Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* 1997b; 11: 287-313.
- Soleas, G.J.; Grass, L.; Josephy, P.D.; Goldberg, D.M.; Diamandis, E.P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.* 2002; 35: 119-124.
- Song, K.S.; Li, S.; Okamoto, T.; Quilliam, L.A.; Sargiacomo, M.; Lisanti, M.P. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 1996a; 271: 9690-9697
- Song, K.S.; Sargiacomo, M.; Galbiati, F.; Parenti, M.; Lisanti, M.P. Targeting of a G alpha subunit (G_i alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 1997; 43: 293-303.
- Song, K.S.; Scherer, P.E.; Tang, Z.; Okamoto, T.; Li, S.; Chafel, M.; Chu, C.; Kohtz, D.S.; Lisanti, M.P. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1996b; 271: 15160-15165.
- Su, J.L.; Lin, M.T.; Hong, C.C.; Chang, C.C.; Shiah, S.G.; Wu, C.W.; Chen, S.T.; Chau, Y.P.; Kuo, M.L. Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1-10.
- Su, J.L.; Yang, C.Y.; Zhao, M.; Kuo, M.L.; Yen, M.L. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 19385-19398.

- Subbaramaiah, K.; Chung, W.J.; Michaluart, P.; Telang, N.; Tanabe, T.; Inoue, H.; Jang, M.; Pezzuto, J.M.; Dannenberg, A.J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 21875-21882.
- Sullivan, J.C.; Goodchild, T.T.; Cai, Z.; Pollock, D.M.; Pollock, J.S. Endothelin(A) (ETA) and ETB receptor-mediated regulation of nitric oxide synthase 1 (NOS1) and NOS3 isoforms in the renal inner medulla. *Acta Physiologica* 2007; 191: 329-336.
- Szewczuk, L.M.; Forti, L.; Stivala, L.A.; Penning, T.M. Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 22727-22737.
- Takahashi, S. y Mendelsohn, M.E. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 30821-30827.
- Takaoka, M.J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes.fil.). *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.* 1940; 3: 1-16.
- Takemura, H.; Hughes, A.R.; Thastrup, O.; Putney, J.W., Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 12266-12271.
- Tang, Z.; Scherer, P.E.; Okamoto, T.; Song, K.; Chu, C.; Kohtz, D.S.; Nishimoto, I.; Lodish, H.F.; Lisanti, M.P. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 2255-2261.
- Taniguchi, H.; Hirano, H.; Tanaka, Y.; Tanaka, H.; Shigenobu, K. Possible involvement of Ca^{2+} entry and its pharmacological characteristics responsible for endothelium-dependent, NO-mediated relaxation induced by thapsigargin in guinea-pig aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999a; 51: 831-840.
- Taniguchi, H.; Tanaka, Y.; Hirano, H.; Tanaka, H.; Shigenobu, K. Evidence for a contribution of store-operated Ca^{2+} channels to NO-mediated endothelium-dependent relaxation of guinea-pig aorta in response to a Ca^{2+} ionophore, A23187. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1999b; 360: 69-79.
- Tarahovsky, Y.S.; Muzafarov, E.N.; Kim, Y.A. Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity. *Mol. Cell. Biochem.* 2008; 314: 65-71.
- Taylor, C.W. y Dellis, O. Plasma membrane IP_3 receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34: 910-912.
- Tepel, M.; Ruess, C.; Mehring, N.; Neusser, M.; Zidek, W. Effect of inhibition of sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase on vasoconstriction and cytosolic Ca^{2+} in aortic smooth muscle from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 1994; 16: 493-506.

- Tepikin, A.V.; Voronina, S.G.; Gallacher, D.V.; Petersen, O.H. Pulsatile Ca^{2+} extrusion from single pancreatic acinar cells during receptor-activated cytosolic Ca^{2+} spiking. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 14073-14076.
- Thibonnier, M.; Bayer, A.L.; Simonson, M.S.; Kester, M. Multiple signaling pathways of V1-vascular vasopressin receptors of A7r5 cells. *Endocrinology* 1991; 129: 2845-2856.
- Thomas, S.R.; Chen, K.; Keaney, J.F., Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 6017-6024.
- Thyberg, J. Caveolae and cholesterol distribution in vascular smooth muscle cells of different phenotypes. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 185-195.
- Thyberg, J.; Roy, J.; Tran, P.K.; Blomgren, K.; Dumitrescu, A.; Hedin, U. Expression of caveolae on the surface of rat arterial smooth muscle cells is dependent on the phenotypic state of the cells. *Lab. Invest.* 1997; 77: 93-101.
- Tiruppathi, C.; Ahmmed, G.U.; Vogel, S.M.; Malik, A.B. Ca^{2+} signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation.* 2006; 13: 693-708.
- Torihashi, S.; Fujimoto, T.; Trost, C.; Nakayama, S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 19191-19197.
- Tosun, M.; Paul, R.J.; Rapoport, R.M. Coupling of store-operated Ca^{2+} entry to contraction in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 285: 759-766
- Trela, B.C. y Waterhouse, A.L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agricultural Food Chem.* 1996; 44: 1253-1257.
- Trepakova, E.S.; Csutora, P.; Hunton, D.L.; Marchase, R.B.; Cohen, R.A.; Bolotina, V.M. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 26158-26163.
- Trincheri, N.F.; Nicotra, G.; Follo, C.; Castino, R.; Isidoro, C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis* 2007; 28: 922-931.
- Uchida, R.; Yamazaki, J.; Ozeki, S.; Kitamura, K. State-dependent inhibition of L-type Ca^{2+} channels in A7r5 cells by cilnidipine and its derivatives. *Jpn. J. Pharmacol.* 2001; 85 (3): 260-270.
- Udenigwe, C.C.; Ramprasath, V.R.; Aluko, R.E.; Jones, P.J. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr. Rev.* 2008; 66: 445-454.
- Uittenbogaard, A.; Shaul, P.W.; Yuhanna, I.S.; Blair, A.; Smart, E.J. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 11278-11283.

- Vallot, O.; Combettes, L.; Jourdon, P.; Inamo, J.; Marty, I.; Claret, M.; Lompre, A.M. Intracellular Ca^{2+} handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1225-1235.
- van Breemen, C. y Saida, K. Cellular mechanisms regulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 1989; 51: 315-329.
- van Ginkel, P.R.; Sareen, D.; Subramanian, L.; Walker, Q.; Darjatmoko, S.R.; Lindstrom, M.J.; Kulkarni, A.; Albert, D.M.; Polans, A.S. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 5162-5169.
- van Meer, G. y Burger, K.N. Sphingolipid trafficking-sorted out? *Trends Cell. Biol.* 1992; 2: 332-337.
- Venema, V.J.; Ju, H.; Zou, R.; Venema, R.C. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 28187-28190.
- Venkatachalam, K. y Montell, C. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 2007; 76: 387-417.
- Vidavalur, R.; Otani, H.; Singal, P.K.; Maulik, N. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp. Clin. Cardiol.* 2006; 11: 217-225.
- Vig, M.; Peinelt, C.; Beck, A.; Koomoa, D.L.; Rabah, D.; Koblan-Huberson, M.; Kraft, S.; Turner, H.; Fleig, A.; Penner, R.; Kinet, J.P. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* 2006; 312: 1220-1223.
- Vitaglione, P.; Sforza, S.; Galaverna, G.; Ghidini, C.; Caporaso, N.; Vescovi, P.P.; Fogliano, V.; Marchelli, R. Bioavailability of *trans*-resveratrol from red wine in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 495-504.
- Vitrac, X.; Desmouliere, A.; Brouillaud, B.; Krisa, S.; Deffieux, G.; Barthe, N.; Rosenbaum, J.; Merillon, J.M. Distribution of [^{14}C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 2003; 72: 2219-2233.
- Volonte, D.; Galbiati, F.; Pestell, R.G.; Lisanti, M.P. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr14) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 8094-8103.
- Wallerath, T.; Li, H.; Godtel-Ambrust, U.; Schwarz, P.M.; Forstermann, U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric. Oxide.* 2005; 12: 97-104.
- Wallerath, T.; Poleo, D.; Li, H.; Forstermann, U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 471-478.
- Wamhoff, B.R.; Bowles, D.K.; Owens, G.K. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ. Res.* 2006; 98: 868-878.

- Wang, G.J.; Wu, X.C.; Chen, C.F.; Lin, L.C.; Huang, Y.T.; Shan, J.; Pang, P.K. Vasorelaxing action of rutaecarpine: effects of rutaecarpine on calcium channel activities in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289: 1237-1244.
- Wang, Y.; Hou, R.; Li, P.; Li, J.; Yan, J.; Yin, F.; Han, C.; Zhang, Y. Gene expression profiles in response to the activation of adrenoceptors in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 2004; 31: 602-607.
- Wang, Y. y Leung, L.K. Pharmacological concentration of resveratrol suppresses aromatase in JEG-3 cells. *Toxicol. Lett.* 2007; 173: 175-180.
- Wenzel, E. y Somoza, V. Metabolism and bioavailability of *trans*-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 472-481.
- Wenzel, E.; Soldo, T.; Erbersdobler, H.; Somoza, V. Bioactivity and metabolism of *trans*-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 482-494.
- Wictome, M.; Henderson, I.; Lee, A.; East, J.M. Mechanism of inhibition of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum by thapsigargin. *Biochem. J.* 1992; 283: 525-529.
- Williams, T.M. y Lisanti, M.P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005; 288: C494-C506.
- Williams, T.M. y Lisanti, M.P. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Annu. Med.* 2004; 36: 584-595.
- Woodman, S.E.; Schlegel, A.; Cohen, A.W.; Lisanti, M.P. Mutational analysis identifies a short atypical membrane attachment sequence (KYWFYR) within caveolin-1. *Biochem.* 2002; 41: 3790-3795.
- Wu, J.M.; Wang, Z.R.; Hsieh, T.C.; Bruder, J.L.; Zou, J.G.; Huang, Y.Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2001; 8: 3-17.
- Wu, S.N.; Hwang, T.L.; Jan, C.R.; Tseng, C.J. Ionic mechanisms of tetrandrine in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 327: 233-238.
- Xu, Y.; Buikema, H.; van Gilst, W.H.; Henning, R.H. Caveolae and endothelial dysfunction: filling the caves in cardiovascular disease. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 585: 256-260.
- Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1955; 1: 445-458.
- Yamaguchi, T.; Kurosaki, F.; Suh, D.Y.; Sankawa, U.; Nishioka, M.; Akiyama, T.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1999; 460: 457-461.
- Yamamoto, M.; Okumura, S.; Oka, N.; Schwencke, C.; Ishikawa, Y. Downregulation of caveolin expression by cAMP signal. *Life Sci.* 1999; 64: 1349-1357

- Yamamoto, M.; Unno, T.; Matsuyama, H.; Kohda, M.; Masuda, N.; Nishimura, M.; Ishii, T.; Komori, S. Two types of cation channel activated by stimulation of muscarinic receptors in guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *J. Pharmacol. Sci.* 2008; 108: 248-257.
- Yao, K.; Xu, B.; Liu, Y.P.; Ferro, A. Effects of beta-adrenoceptor stimulation on endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation of human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2003; 24: 219-224.
- Zeng, W.; Yuan, J.P.; Kim, M.S.; Choi, Y.J.; Huang, G.N.; Worley, P.F.; Muallem, S. STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol. Cell* 2008; 32: 439-448.
- Zhang, L.P.; Yin, J.X.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Wang, Q.S.; Zhao, J. Effect of resveratrol on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006a; 27: 179-183.
- Zhang, S.L.; Yeromin, A.V.; Zhang, X.H.; Yu, Y.; Safrina, O.; Penna, A.; Roos, J.; Stauderman, K.A.; Cahalan, M.D. Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2006b; 103: 9357-9362.
- Zhang, X.; Wen, J.; Bidasee, K.R.; Besch, H.R., Jr.; Wojcikiewicz, R.J.; Lee, B.; Rubin, R.P. Ryanodine and inositol trisphosphate receptors are differentially distributed and expressed in rat parotid gland. *Biochem. J.* 1999; 340 (Pt 2): 519-527
- Zhang, Y.; Guo, X.; Saitz, R.; Levy, D.; Sartini, E.; Niu, J.; Ellison, R.C. Secular trends in alcohol consumption over 50 years: the Framingham Study. *Am. J. Med.* 2008; 121: 695-701.
- Zini, R.; Morin, C.; Bertelli, A.; Bertelli, A.A.; Tillement, J.P. Effects of resveratrol on the rat brainrespiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999; 25: 87-97.

ANEXOS

ENGLISH SUMMARY

Introduction

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene, RSV) was first isolated from the roots of white hellebore (*Veratrum grandiflorum*) in 1940 (Takaoka, 1940), and later, in 1963, from the roots of *Polygonum cuspidatum*, a plant used in traditional Japanese medicine (Nonomura *et al.*, 1963). It seems that RSV might be partly responsible for the cardiovascular benefits associated with red wine consumption.

It has been suggested that RSV relaxes different isolated arteries, has potent antiinflammatory and antioxidant effects, and can also protect isolated hearts from ischemia-reperfusion injury (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Naderali *et al.*, 2000; Naderali *et al.*, 2001). Despite the increasing interest in the effects of RSV on the cardiovascular system, inconsistencies between studies mean that the mechanism of its vasodilatory effect is not completely defined.

RSV-induced vasorelaxation may either be endothelium-dependent (attenuated by L-NAME) or endothelium-independent (Novakovic *et al.*, 2006; Calderone *et al.*, 2007). The mechanism of endothelium-independent vasorelaxation induced by RSV is uncertain. RSV might become incorporated into smooth muscle membrane, where it could either couple with a membrane receptor or interact directly with membrane ion channels, thus inducing endothelium-independent vasorelaxation (Jager y Nguyen-Duong, 1999). Also, in different experimental models, RSV can activate adenylyl cyclase (AC) and membrane-bound guanylyl cyclase (GC) and inhibit cGMP-specific phosphodiesterase-5 (Dell'Agli *et al.*, 2005).

Similarly, our lab has reported that in rat aorta *t*-RSV exhibits: i) a characteristic endothelium-dependent vasorelaxant effect which seems to be due to the inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase and the subsequent decrease of basal cellular superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) generation and, therefore, of nitric oxide (NO^*) biotransformation (Orallo *et al.*, 2002) and ii) an endothelium-independent vasodilator effect, which appears to be mediated by an inhibition of protein kinase C (PKC) (Orallo and Camiña, 1998). The endothelium-dependent component is probably the most relevant, since it is observed at lower drug concentrations ($<10 \mu M$) than the endothelium-independent effect ($>50 \mu M$). Much less is known about the pharmacological activity of the *cis*-RSV possibly as a result of the fact that this isomer (unlike *t*-RSV) is not commercially available.

c-RSV significantly attenuates several components of the macrophage response to proinflammatory stimuli (Leiro *et al.*, 2004), and a few studies have demonstrated only

quantitative differences in the activity of the two isomers; for example, in their ability to decrease collagen-induced platelet aggregation (Bertelli *et al.*, 1996), in their estrogenic/ antiestrogenic and ROS scavenging properties, or inhibition of COX-1.

Vascular tone directly depends on cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) levels in smooth muscle cells. Thus, any action of RSV on calcium signaling in these cells may be related to its endothelium-independent vascular actions. Again, there is little information on this subject. Orallo and Camiña, using $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in rat aortic rings, have suggested that the vasorelaxant effect of *t*-RSV is not mediated by blockage of Ca^{2+} influx through transmembrane receptor-operated calcium channels, Rotondo *et al.* (1998) reported a *t*-RSV-associated inhibition of agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in polymorphonuclear leukocytes, and Dobrydneva *et al.* (2002) purported that *t*-RSV inhibits Ca^{2+} influx in thrombin-stimulated human platelets.

Bearing in mind the above considerations and with the aim of providing new data on the effects of RSV on vascular smooth muscle cells, we here report the first detailed comparative study of the effects of both *t*-RSV and *c*-RSV on calcium signaling in single A7r5 cells (a cell line derived from fetal rat aorta), hoping to clarify how RSV affects smooth muscle cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels.

We also have investigated whether *t*-RSV increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), leading to a simultaneous augmentation of nitric oxide (NO^*) production.

Finally, we have studied the effects of *t*-RSV on the caveolar signaling protein interactions, such as that between caveolin 1 (cav-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), as well as IP_3 receptors (IP_3Rs).

Methods

Primary Cell Culture and Cell Lines

The investigation conforms with the *European Guiding Principles in the Care and Use of Animals* (2003/65/CE). Male Wistar rats (Iffa-Credo) weighing 250–300 g were maintained and humanely killed by cervical dislocation, in accordance with the University of Santiago de Compostela *Code of ethical practice for research/experimentation involving the use of animals*. The descending thoracic aorta was separated and placed in Hank's Balance Salt Solution (HBSS) supplemented with penicilin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and amphotericine B (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (HBSS with antibiotics). The dissected thoracic aortas were cleaned. Adhering fat and connective tissues were carefully removed using forceps, while endothelium was removed using a sterile needle and thread.

Primary cell culture of rat aortic smooth muscle cells (RASMC) consisted of a two-step digestion process. First, aorta was incubated with 0.2 U/ml of collagenase B reconstituted in HBSS with antibiotics at 37 °C during 10 min. Then, in the hood *adventitia* was removed under the lens. Second, *tunica media* was incubated with 2.5 U/ml of collagenase B and 40 U/ml of elastase both reconstituted in HBSS with antibiotics in a shaker incubator (37°C) for 1 h and 15 min. Cells were dispersed with a sterile Pasteur pipette. Cell suspension was filtered through a 60 µm guaze and then resuspended with Dulbecco's modified Eagle medium and F12 medium (DMEM/F12, 1:1) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-(+)-ascorbic acid (0.05 mM), L-proline (1 µM), and 10% fetal bovine serum. Cells were seeded in 25 cm² culture flasks at a 20,000 cells/cm² density and were kept at 37 °C and 5% CO₂ in the incubator. Medium was renewed every 2-3 days.

The trypan blue exclusion test was used in order to determine cell viability. RASMC were characterized by confocal microscopy using specific fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal anti- α -smooth muscle actin to label smooth muscle cells and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in order to label all nuclei presented in culture.

In this experimental work we also have performed assays on two different cell lines: A7r5, smooth muscle cell line obtained from embryonic rat aorta; and HUVEC, human umbilical vein endothelial cells, both provided by American Type Culture Collection (ATCC).

Measurement of intracellular Ca²⁺

The cytosolic Ca²⁺ concentration was estimated in A7r5 and HUVEC loaded with fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) using a dual excitation digital Ca²⁺ imaging system (P130/MLE/400 Optoscan) equipped with an intensified CCD camera (C651-ICCD, Cairn Research Ltd, UK). Cells were loaded with 2.5 µM Fura-2 AM for 1 h at 37 °C and placed on the coverslip in a 2 ml perfusion chamber mounted on an epifluorescence microscope (Axiovert 135; Karl Zeiss). To remove extracellular fura-2 AM, cells were washed several times with 1.5 mM Ca²-HBS (Hepes-buffered saline) containing (mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.5, HEPES 10, and glucose 11, pH 7.4). Cells were illuminated with a 75W xenon lamp at 340 ± 10 and 380 ± 10 nm (P130/MLE/400 Optoscan, Cairn Research) , and from regions that encompassed single cells, emitted light was collected with a CCD camera at 510 nm. All experiments were performed at 35–37°C, and images were acquired at 1 Hz, and stored on compact disk for later analysis. Background fluorescence was collected automatically and subtracted from the acquired fluorescence video images during each experiment. The ratio of fluorescence (*R*) excited at the two excitation wavelengths was used to estimate intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i), as described by Grynkiewicz *et al.* (1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (S_{f_2} / S_{b_2}) [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)]$$

The values for S_{f_2} (fluorescence measured at 380 nm in Ca^{2+} -free solution), S_{b_2} (fluorescence measured at 380 nm in Ca^{2+} -saturating conditions), R_{\min} (minimum ratio) and R_{\max} (maximum ratio) were determined from *in situ* calibrations of fura-2 for each cell. The dissociation constant for Ca^{2+} binding (K_d) under our experiment conditions was assumed to be 224 nM. To determine R_{\min} , cells were dialysed at the end of each experiment with 0.5 μM ionomycin in Ca^{2+} -free PSS containing 10 mM EGTA. R_{\max} was determined from cells dialysed with 0.5 μM ionomycin in PSS containing 10 mM CaCl_2 .

In a second set of experiments, we simultaneously measured $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and intracellular NO^{\bullet} in endothelial cells (HUVEC). HUVEC were kept in culture with FBS-free culture medium containing L-arginine (100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Then, they were incubated for 60 min at 37°C in normal bathing solution containing fura-2 AM (2.5 $\mu\text{mol/L}$) and DAF-2 DA (5 $\mu\text{mol/L}$), a cell membrane-permeable NO^{\bullet} -sensitive fluorescent dye, and treated as for $[\text{Ca}^{2+}]_i$ imaging experiments. Cells loaded with both fluorescent probes were excited alternately as described above for fura-2 imaging and at 490 ± 10 nm (200 ms exposure time) for DAF-2 imaging. Excitation light from monochromator (P130/MLE/400 Optoscan; Cairn Research, UK) was reflected off a 500 nm dichroic mirror and emitted fluorescence was collected through an emission filter of 510 ± 20 nm. Ratiometric Ca^{2+} images and NO^{\bullet} images were generated at 10 s intervals, using 4 averaged images at each wavelength, and digitally stored for their posterior analysis with MetaFluor company software.

We also have measured NO^{\bullet} release from HUVEC monolayers. Confluent HUVEC in 96-well plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; composition in mmol/L: 137 NaCl, 2.7 KCl, 0.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 KH_2PO_4 ; pH 7.4). Cells were then incubated in PBS containing L-arginine (100 $\mu\text{mol/L}$) for 10 min at 37 °C. After that, HUVEC were treated for 20 min with PBS containing Ni^{2+} (300 $\mu\text{mol/L}$), SKF 96365 (30 $\mu\text{mol/L}$), TMB-8 (100 $\mu\text{mol/L}$), L-NAME (500 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle. Subsequently, HUVEC were incubated in PBS containing DAF-2 (0.1 $\mu\text{mol/L}$). This low concentration of DAF-2 was chosen in order to reduce the contribution of DAF-2 auto-fluorescence (measured in wells without cells), which was subtracted from the measured total fluorescence, according to the experimental protocol previously detailed by Rathel *et al.* (2003). This method allows the quantification of NO^{\bullet} in human EC in the nanomolar range.

Under these conditions, *t*-RSV (1, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$), thapsigargin (TP, 0.5 $\mu\text{mol/L}$), ionomycin (0.5 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle (controls) were added to the corresponding well plates. In some experiments, sodium nitroprusside (SNP, 100 $\mu\text{mol/L}$) was used as a positive control for the technique. Then, the fluorescence of supernatants was measured at room temperature using a Titertek Multiskan PLUS MKII multi-well plate reader (Titertek, Huntsville, AL, USA). The excitation and emission wavelengths were 490 nm and 515 nm, respectively.

Membrane fractionation and immunoblotting

A confluent flask (150 cm²) of cells (A7r5, RASMC or HUVEC) was washed in PBS, which were scraped into 500 mM Na₂CO₃ at pH 11 (1 ml), homogenized, sonicated and then mixed with 1 ml of 90% sucrose in 25 mM MES and 150 mM NaCl, pH 6.5. Lipid rafts were then separated from other membrane compartments using a discontinuous sucrose gradient. The sample (2 ml) was over-layered with 1.5 ml of 35% sucrose and 1 ml of 5% sucrose (each in 25 mM MES, 150 mM NaCl and 250 mM Na₂CO₃, pH 6.5). After centrifugation (Beckman SW55 rotor at 24,000 rpm for 16 h at 4 °C), samples (300 µl) were collected for immunoblotting and analysis of sucrose concentration by refractometry.

For immunoblotting, samples (13 µl) were separated by SDS/PAGE on 4–12% Bis-Tris gradient gels (Invitrogen), transferred to Immobilon membranes (Millipore), blocked and incubated with primary and secondary antisera using standard methods. The primary antibodies were: monoclonal against caveolin-1 (1:1000), caveolin-2 (1:1000), caveolin-3 (1:1000), eNOS (1:500), IP₃R1 (1:1000) and AT₁ (1:750) (all BD Biosciences), and goat polyclonal antisera against ERα vasopressin receptor (1:100; Santa Cruz Biotechnology) and β-adaptin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibodies were used: goat anti-mouse (1:2000; Sigma) and donkey anti-goat (1:1000; AbCam). Immunoreactivity was detected using SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce) and bands were then quantified using Fluo-Chem FC2 MultiImage (Alpha Innotech).

Immunoprecipitation

This technique was used to study the possible interaction between cav-1 and eNOS as well as caveolin (cav-1 and cav-3) and IP₃R (IP₃R1 and IP₃R3). Briefly, confluent cells from a 150 cm² dish were washed in cold PBS and scraped using 1 ml solubilisation buffer (140mM NaCl, 5mM NaF, and 10mM Tris; pH 7.4) with 1% Triton X-100 and protease cocktail inhibitor (MiniComplete, Roche). Then, cell lysate was gently syringed, sonicated (3x 10 s) on ice, and rotated at 4 °C for 1 h. After that, lysate was spinned at 5,000 rpm for 5min at 4 °C. Appropriate primary antisera was added together with protein A/G agarose plus beads and incubated at 4°C for 4h or over-night (O/N). From this step two fractions were separated: *pellet* and supernatant and then were analyzed by immunoblotting (see above).

RNA Isolation and Reversetranscription-PCR analyses

Isolation of RNA from A7r5, RASMC and HUVEC was performed using a silica column system with the NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). Samples were treated with RNase-free DNase I for elimination of any remaining DNA on the column. Then RNA was eluted under low ionic strength conditions with RNase-free water.

For retrotranscription-PCR (RT-PCR) experiments, 1.75 μg of total RNA (per PCR-tube, 25 μL) was mixed with random hexamers (0.5 μg), recombinant retrotranscriptase M-MLV-RT (1000 U, Promega), 10 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), retrotranscription buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol, pH 8.5), and RNase inhibitors (40 U/ μL), and heated 1 h at 37 °C. PCR was carried out with 1 μL of retrotranscription product mixed with PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol, pH 8.5), 0.16 mM each dNTP, 0.4 μM primers (see primers table on page 97), and 1 U of Taq DNA polymerase. Extension reaction was performed according to the following protocol: i) denaturation at 94 °C for 5 min; ii) 35 cycles of template denaturation at 94 °C for 30 s, annealing with the oligonucleotides for 45 s at annealing temperature (approximately $T_m - 5$ °C), and DNA extension at 72 °C for 90 s; iii) finally, a long extension at 72 °C for 10 min. Each cDNA sample was resolved by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide and bands were visualized under a UV lamp.

Unless otherwise stated, traces are typical of at least three experiments, and results are shown as mean \pm S.E.M for at least three independent experiments.

Results

1. *t*-RSV and *c*-RSV increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels in A7r5.

To investigate how the *trans* and *cis* isomers of resveratrol (*t*-RSV and *c*-RSV), two natural polyphenols present in wines (Figure 2, page 12), induce an increase of intracellular calcium levels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and to compare the effects of both isomers on calcium signaling in single A7r5 cells (a smooth muscle cell line derived from fetal rat aorta) hoping to clarify how the RSV isomers affects smooth muscle cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels.

Measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were made from isolated A7r5 cells (ATCC 1444-CRL), using a digital imaging system with the Ca^{2+} -sensitive fluorescent probe fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM, Molecular Probes). All experiments were performed with 1.5 mM CaCl_2 -containing bathing solution, except when calcium-free external solution is indicated. Results achieved from this investigation were:

- Cumulative applications of *t*-RSV or *c*-RSV (0.1-100 μ M) cause a concentration-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 27, page 111), which does not return to the resting level within 1 h, even after washing out the drugs.
- Application of Ni^{2+} (300 μ M) or nifedipine (1 μ M) significantly reduce the *t*-RSV- or *c*-RSV-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ (reduction of maximal response to both isomers are ~50% in the case of Ni^{2+} and ~20% in the case of nifedipine). However, SKF 96365 (30 μ M) did not significantly modify the *t*-RSV- or *c*-RSV-induced $[Ca^{2+}]_i$ -sustained plateau (Figure 28).
- TP affects the *t*-RSV and *c*-RSV-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ depending on the concentration used (Table 2, page 114). The TP-induced plateau was significantly inhibited by Ni^{2+} (300 μ M), nifedipine (1 μ M) and SKF 96365 (30 μ M); reduction of the maximal response to 1 μ M TP was ~65%, ~25%, and ~30% respectively (Figure 29).
- At low concentrations of *t*-RSV or *c*-RSV (100 nM), the increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by the subsequent administration of TP (10, 100, 500 nM) was significantly potentiated. A higher concentration of *t*-RSV or *c*-RSV (10 μ M), which induce a marked increase in $[Ca^{2+}]_i$, did significantly potentiate the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by TP (10, 100 nM), but did reduce the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by TP (0.5, 1 μ M) (Table 3, page 117).
- RSV-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ were potentiated by a previous application of low concentrations of TP (10, 100 nM). However, higher concentrations of TP (0.5, 1 μ M) did significantly inhibit the *t*-RSV- or *c*-RSV-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. These interactions correlate well with the results obtained in a 1.5 mM $CaCl_2$ -containing bath solution (Figure 30).
- In the absence of Ca^{2+} , preincubation with TMB-8 (100 μ M), an inhibitor of intracellular Ca^{2+} release, completely inhibited the $[Ca^{2+}]_i$ increases induced by TP (0.5 μ M) or by both isomers of RSV (10 μ M). However, preincubation with TMB-8 in the presence of 1.5 mM external Ca^{2+} , TP (0.5 μ M), *t*-RSV (10 μ M) or *c*-RSV (10 μ M) were still able to induce a slow, sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$, which suggests that these agents can induce a transmembrane Ca^{2+} influx by mechanisms other than the activation of store-operated Ca^{2+} channels (SOCCs).

Our results suggest that *t*-RSV- and *c*-RSV cause a sustained elevation in $[Ca^{2+}]_i$, *c*-RSV being significantly more effective than the *t*- isomer. Furthermore, *t*-RSV and *c*-RSV induce a depletion of Ca^{2+} from the same intracellular stores released by TP and subsequent capacitative influx of Ca^{2+} . A direct activation of transmembrane Ca^{2+} influx through another type of channel is also implicated.

2. Biphasic effects of *t*-RSV and *c*-RSV on agonist- and high K⁺-induced increases on [Ca²⁺]_i in A7r5.

In order to investigate whether *t*-RSV and *c*-RSV (Figure 2, page 12), modify agonist- and high-K⁺-induced increases in intracellular calcium levels ([Ca²⁺]_i) in vascular smooth muscle cells (A7r5) and also to study whether *t*-RSV and *c*-RSV affect transmembrane Ca²⁺ entry through voltage-operated channels in A7r5 cells. Digital imaging of [Ca²⁺]_i by means of fura-2 and whole cell patch-clamp experiments in A7r5 cells (a cell line derived from foetal rat aorta; ATCC 1444-CRL).

Arginine vasopressin (AVP) caused a transient elevation in [Ca²⁺]_i followed by a sustained rise that was partially inhibited by nifedipine (~30%) and completely abolished by Ni²⁺. According to our previous results, pre-incubation with *t*-RSV or *c*-RSV caused a sustained elevation in basal [Ca²⁺]_i. In these conditions, both the transient and the sustained rise of [Ca²⁺]_i elicited by the subsequent application of AVP were significantly reduced (Figure 32).

When the isomers of resveratrol were applied on the plateau phase of the AVP-induced response, a biphasic change in [Ca²⁺]_i was observed: first, a reduction of the plateau during the first 5 min (32% and 21% of reduction for 30 μM *t*-RSV and *c*-RSV, respectively), followed by an increase (starting after ~10 min) until similar values to those of the agonist-induced plateau were reached (Figure 34). Similar results were obtained for both isomers on angiotensin II-induced increases in [Ca²⁺]_i.

In Ca²⁺-free high K⁺ (60 mM) depolarizing medium, reintroduction of CaCl₂ (1.5 mM) caused a sustained rise in [Ca²⁺]_i. Pre-incubation of the cells with *t*-RSV or *c*-RSV significantly reduced this high K⁺-induced [Ca²⁺]_i response. When the isomers were administered during the high- K⁺-induced sustained increase in [Ca²⁺]_i, they caused a biphasic response: first, a reduction of [Ca²⁺]_i (during the first 5 min), followed by an increase (starting after ~10 min).

Our results suggest that both *t*-RSV and *c*-RSV exert a biphasic effect on agonist- and K⁺-induced changes in [Ca²⁺]_i in rat aortic myocytes.

- An inhibitory effect (probably due to a blockade of L-type Ca²⁺ channels) which may explain, at least in part, the endothelium-independent vasorelaxant effects exhibited by both resveratrol isomers in isolated rat aortic rings.
- A potentiation, which is likely due to a previously described release of intracellular Ca²⁺ and activation of extracellular Ca²⁺ entry.

3. *t*-RSV and *c*-RSV increase [Ca²⁺]_i and NO[•] levels in HUVEC.

In order to investigate whether the *trans* and *cis* isomers of RSV induce an increase of intracellular calcium levels ([Ca²⁺]_i) and an augmentation in the production of

nitric oxide (NO[•]) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) simultaneous imaging of [Ca²⁺]_i and NO[•] in isolated HUVEC (ATCC 1730-CRL) by combined use of fura-2 and the NO[•]-sensitive fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein (DAF-2).

Cumulative application of *t*-RSV or *c*-RSV (1-60 μM) induces a sustained increase in [Ca²⁺]_i in HUVEC.

After the application of a single concentration (30 μM) of *t*-RSV or *c*-RSV (30 μM), HUVEC cells respond as follows:

- In ~30% of the cells, both *t*-RSV or *c*-RSV induced an increase in [Ca²⁺]_i with a transient and a sustained component (increase in [Ca²⁺]_i: 342.7±15.1 nM and 108.2±9.3 nM for *t*-RSV and 369.4±26.9 nM and 93.7±19.2nM for *c*-RSV; n≥10). In this group of cells, a simultaneous increase in NO[•] was measured (~25 % of the increase in NO[•] induced by 0.5 μM ionomycin).
- In ~50 % of the cells, *t*-RSV or *c*-RSV induced a slow and sustained rise in [Ca²⁺]_i (maximal values of [Ca²⁺]_i reached 178.7±25.1 nM and 165.2±16.3 nM, respectively; n≥10). In this case, there was not a significant increase in NO[•].
- Approximately 20% of the cells did not respond to the application of *t*-RSV or *c*-RSV. These cells responded to ionomycin, which also induced an increase NO[•].

t-RSV and *c*-RSV induce an increase in [Ca²⁺]_i in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Because of the Ca²⁺ sensitivity of endothelial constitutive NO[•] synthase, substances that increase endothelial cell [Ca²⁺]_i potentially modify the production of endothelial factors (notably NO[•]) and vascular tone, as reported for TP, which induces endothelium-dependent relaxation of guinea-pig rat aorta (Taniguchi *et al.*, 1999). A similar effect is here described for RSV isomers. This effect could contribute to the endothelium-dependent vasorelaxant effect reported for *t*-RSV in rat aorta (Orallo *et al.*, 2002).

4. IP₃ receptors and caveolin interactions in RASMC.

Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃Rs) release Ca²⁺ from intracellular stores, but their mechanisms of activation and roles in mediating Ca²⁺ entry are unclear. Different Ca²⁺ agonists cause a rapid and transient increase in [Ca²⁺]_i due to the release of stored Ca²⁺ and subsequent Ca²⁺ entry induced by store depletion. Caveolae have also been shown to play a crucial role in Ca²⁺ signal transduction mechanisms. In RASMC, caveolin 1 (cav-1) and caveolin 3 (cav-3) have been proposed to be scaffolding proteins involved in the recruitment of specific proteins into caveolae. Preliminary experiments suggest associations between specific isoforms of caveolin and IP₃Rs.

In this part of the work we asked ourselves the following questions: i) What IP₃Rs isoforms are expressed in RASMC? ii) What caveolin isoforms are expressed in

RASMC? iii) Are IP₃Rs and caveolins located in same compartments? iv) Does any interaction exist between IP₃Rs and caveolins?

Membranes are separated into caveolae-rich fractions (3 to 5) and non-caveolar fractions (6 to 14). G_{αq/11} protein is present in caveolae rich fractions and non-caveolar fractions. β-adaptin was used as a control to check different protein distribution among different fractions. In other set of experiments the subcellular distribution of IP₃R and cav-1 were studied in RASMC using confocal. Cells were fixed, permeabilized, and subsequently labelled with polyclonal anti-caveolin-1 and monoclonal anti-IP₃R3 primary antibodies, and Alexa-555 anti-rabbit and Alexa-488 anti-mouse secondary antibodies. The results derived from this research were the following:

- Only IP₃R1 and IP₃R3 are expressed in RASMC.
- Only cav-1 and cav-3 are expressed in the RASMC.
- Most IP₃Rs are localized in close proximity to caveolae rich membranes.
- IP₃R1 and IP₃R3 interact with cav-1, but not with cav-3 in RASMC.

We also studied caveolin distribution in membrane fractions of A7r5, RASMC and HUVEC separated on a discontinuous sucrose gradient. Figure 54 (page 151) shows caveolin isoforms distribution in these cells. Caveolin 1, 2 and 3, along with eNOS, IP₃R1 and IP₃R3, were concentrated in less dense sucrose fractions, as expected for both lipid rafts and caveolae. However, both G_{αq} and ERβ receptor, although not excluded from the caveolin-rich fractions, were present in larger amounts in the noncaveolar fractions. The distribution of both receptors was similar to that of β-adaptin, which is known to be excluded from caveolae (Figure 57, page 154). There was no obvious difference in the distribution of the proteins tested between membrane fractions of control cells and *t*-RSV treated cells (data not shown).

5. *t*-RSV enhances eNOS gene expression and induces down-regulations of cav-1 in a concentration dependent manner in HUVEC and RASMC.

We report here the first comparative study of the potential effects of *trans*-resveratrol (*t*-RSV) on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels in fresh rat aortic tunica media homogenates (FRAH), a commercially available vascular smooth muscle cell line (A7r5), and smooth muscle cells isolated from rat thoracic aorta (RASMC).

Detection of eNOS was performed by western blotting (WB) using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a control (Figure 44, page 137). Determination of eNOS mRNA levels was achieved by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Three different primers were used: β-actin (as a PCR control), cav-1 (since eNOS colocalizes with the caveolar marker, caveolin-1), and eNOS [see

page 97]. Confocal experiments were performed with fixed *t*-RSV-treated RASMC, immunostained for cav-1 and eNOS (Figure 62, page 158).

RASMC and FRAH (*homegeneizado*) do not express eNOS (Figure 44), as assessed by WB. In order to verify this result with mRNA quantification, rt-PCR assays were performed. eNOS mRNA was not detected in FRAH or in RASMC in absence of any treatment. However, significant eNOS mRNA levels were found in A7r5 under the same experimental conditions. Pre-treatment of cells with low concentration of *t*-RSV (<30 μ M) for 24 h did not modify eNOS mRNA levels, in either A7r5 or RASMC (data not shown). However, higher concentrations of *t*-RSV (>30 μ M) enhanced eNOS gene expression in RASMC (Figure 64). In fact, *t*-RSV was found to elevate eNOS gene expression in a concentration-dependent manner.

In the absence of any treatment, rt-PCR experiments show that RASMC do not express eNOS. Since no eNOS cDNA was detected, there cannot be eNOS RNA in the RASMC samples. A7r5 show eNOS cDNA after amplification. These results are in agreement with WB data presented in figure 44 eNOS cDNA was also found in HUVEC.

24 h treatment of RASMC with 50 μ M of *t*-RSV induces eNOS expression. eNOS, CAV-1 and β -actin rt-PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels. Clear eNOS expression is evident in RASMC treated with 50 μ M of *t*-RSV. β -actin levels remain constant, but CAV-1 seems to be decreased in *t*-RSV-treated RASMC.

RASMC were treated with different concentrations of *t*-RSV. After 24 hours, RT-PCR was performed. This 2% agarose gel is representative of 3 independent experiments with similar results. Saliently, we observed a concentration-dependent up-regulation of eNOS mRNA by *t*-RSV. In contrast, we found that CAV-1 expression was down-regulated when RASMC were incubated with *t*-RSV and this effect seemed to be dependent on concentration. β -actin was used for standardization.

In a final set of experiments the subcellular distribution of eNOS and cav-1 were studied in RASMC treated with *t*-RSV and HUVEC using confocal and appropriate antibodies. Preliminary results failed to indicate colocalization between eNOS and cav-1 in RASMC, but *in situ* association between these proteins should not be discounted.

This work has been supported by grants from Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain; FISS PI061537), Ministerio de Educación y Ciencia (Spain; 1807463A781), and Xunta de Galicia (Spain; PGIDIT05BTF20302PR and INCITE07PXI203039ES).

CONCLUSIONS

1. *c*-RSV and *t*-RSV exert conflicting influences over calcium signaling in embryonic rat aorta myocytes (A7r5). These actions are similar quality for both isomers and consist of:

- a) First, an increase of $[Ca^{2+}]_i$, where *c*-RSV is slightly, but significantly, more effective than *t*-RSV, with the following features:
 - Ca^{2+} depletion of IP_3 -sensitive reservoir and another non- IP_3 -sensitive reservoir which can be depleted by SERCA inhibition.
 - Activation of CCE through SOCC, caused by intracellular Ca^{2+} store depletion.
 - Activation of Ca^{2+} influx through “late opening” unidentified channels.
 - Loss of CICR mechanism, which cannot be measured in these cells.
- b) Second, a decrease of $[Ca^{2+}]_i$ induced either by GPCR agonists or by depolarizing high- K^+ Ca^{2+} -free medium, caused by:
 - Decreased Ca^{2+} within intracellular reservoirs.
 - Blockade of Ca^{2+} influx through L type VOCC. There is no evidence to reject the possibility of an inhibitory effect on Ca^{2+} influx through ROCC, or any other non-selective cationic Ca^{2+} permeable channels different from those involved in CCE, or a biphasic effect (inhibition following by activation) on any of these channels.

2. *t*-RSV increased $[Ca^{2+}]_i$ and NO^{*} production simultaneously in a concentration-dependent manner in HUVEC. However, it did not activate eNOS directly *in vitro*. *t*-RSV-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in HUVEC is caused by depletion of intracellular reservoirs triggered by SERCA inhibition and subsequent CCE. Furthermore, other unidentified Ca^{2+} -permeable channels could be involved.
3. The ratio of membrane rafts in A7r5, RASMC and HUVEC is similar. Rat aortic myocytes (A7r5 and RASMC) express all three caveolin isoforms (cav-1, cav-2 and cav-3), while endothelial cells (HUVEC) express only cav-1 and cav-2. Caveolin isoforms are always obtained within fractions containing 17-25% sucrose (w/v). *t*-RSV did not affect the protein distribution of any cellular model studied; however, *t*-RSV induced down-regulation of cav-1 in RASMC and HUVEC in a concentration-dependent manner.
4. eNOS is localized in caveolar microdomains in HUVEC and A7r5, but not in RASMC under the cell culture conditions used here. *t*-RSV treatment potentiated eNOS expression in HUVEC and A7r5 and induced eNOS expression in RASMC in a time- and concentration-dependent manner.
5. eNOS specifically interacts with cav-1 in HUVEC or *t*-RSV-treated RASMC. This interaction is *t*-RSV-dependent in RASMC, while it is decreased after *t*-RSV-treatment in HUVEC.
6. Only IP₃R1 and IP₃R3 are expressed in RASMC, where they localize within caveolar microdomains. Cav-1 associates with one or both isoforms, and this interaction is not modified by *t*-RSV.

Trans- and cis-resveratrol increase cytoplasmic calcium levels in A7r5 vascular smooth muscle cells

Manuel Campos-Toimil, Jacobo Elíes and Francisco Orallo

Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (A Coruña), Spain

The effects of *trans*- and *cis*-resveratrol on cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were studied using fura-2 in vascular smooth muscle cells (A7r5). Both isomers of resveratrol caused a sustained elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, *cis*-resveratrol being significantly more effective than the *trans*-isomer. The resveratrol-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was significantly potentiated by the previous application of low concentrations of thapsigargin, partially inhibited by nifedipine or Ni^{2+} , and not affected by SKF 96365. In the absence of extracellular Ca^{2+} , both isomers of resveratrol induced a transient, slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which was inhibited by the previous depletion of intracellular stores with thapsigargin and completely blocked by preincubation with TMB-8, an inhibitor of intracellular calcium release. Reintroduction of Ca^{2+} in the external solution after the resveratrol-induced release of Ca^{2+} activated the Ca^{2+} influx through store-operated calcium channels. The resveratrol-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+} partially reduced the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by the subsequent application of thapsigargin. Our results suggest that *trans*- and *cis*-resveratrol induce a depletion of Ca^{2+} from the same intracellular stores released by thapsigargin and subsequent capacitative influx of Ca^{2+} . Additionally, a direct activation of transmembrane Ca^{2+} influx through another type of channel may be also implicated.

Keywords: A7r5 / Calcium / Fura-2 / Resveratrol / Thapsigargin

Received: December 22, 2004; revised: February 6, 2005; accepted: February 11, 2005

1 Introduction

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene, RESV) is a natural phenolic component of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae), abundant in the skin of grapes and present in wines, especially red wines. RESV is not unique to *Vitis* but is also present in at least 72 other plant species (distributed in 12 families and 31 genera; e.g., *Veratrum*, *Arachis*, *Morus*, and *Trifolium*), some of which are components of the human diet, such as mulberries and peanuts. In wines, RESV exists as *cis*- and *trans*-isomers [1, 2] (Fig. 1). To date most of the studies on the biological effects of RESV have considered the *trans*-isomer (*t*-RESV), which has shown a wide range of pharmacological actions including anti-inflammatory, anticarcino-

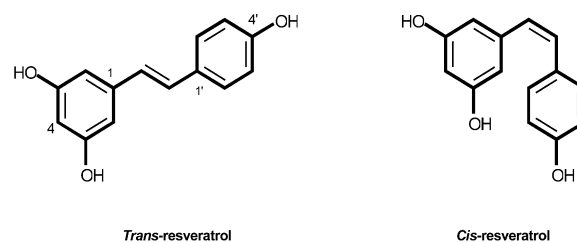


Figure 1. Chemical structures of *t*-RESV (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene) and *c*-RESV (3,4',5-trihydroxy-*cis*-stilbene).

genic, antioxidant, estrogenic, platelet antiaggregatory, and antimicrobial properties (for reviews, see e.g. [2–4]). Some of these activities have been implicated in the cardiovascular protective effects attributed to *t*-RESV and red wine [5, 6].

Despite the above described considerations, the *in vitro* vasodilator activity of *t*-RESV in rat aorta has surprisingly received little research attention. Thus, Fitzpatrick *et al.* [7] have reported that *t*-RESV (at concentrations up to 0.1 mM) is unable to relax rat aortic rings, whereas Chen and Pace-Asciak [8] have reported that *t*-RESV (>30 μM) induces relaxation of phenylephrine-precontracted endothelium-intact rat aorta, and at higher concentrations (> 60 μM) also

Correspondence: Francisco Orallo, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Campus Universitario Sur, E-15782 Santiago de Compostela (A Coruña), Spain

E-mail: fforallo@usc.es

Fax: +34-(9)81-594595

Abbreviations: *c*-RESV, *cis*-resveratrol; **fura-2 AM**, fura-2 acetoxymethyl ester; **SKF 96365**, 1-(β -[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl)-1*H*-imidazole hydrochloride; **SOCC**, store-operated calcium channel; ***t*-RESV**, *trans*-resveratrol; **THAPS**, thapsigargin; **TMB-8**, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-diethylamino-octyl ester 8

induces the relaxation of endothelium-denuded rat aorta. Similarly, we have reported that *t*-RESV exhibits in rat aorta: (i) a characteristic endothelium-dependent vasorelaxant effect which seems to be due to the inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase and the subsequent decrease of basal cellular superoxide radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generation and, therefore, of nitric oxide (NO) biotransformation [5] and (ii) an endothelium-independent vasodilator effect, which appears to be mediated by an inhibition of protein kinase C (PKC) [9]. The endothelium-dependent component is probably the most relevant, since it is observed at lower drug concentrations ($< 10 \mu\text{M}$) than the endothelium-independent effect ($> 50 \mu\text{M}$).

Much less is known about the pharmacological activity of the *cis*-isomer (*c*-RESV) possibly as a result of the fact that this isomer (unlike *t*-RESV) is not commercially available. *c*-RESV significantly attenuates several components of the macrophage response to proinflammatory stimuli [10], and a few studies have demonstrated only quantitative differences in the activity of the two isomers; for example, in their ability to decrease the collagen-induced platelet aggregation [11], in their estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties [12], or in the cyclooxygenase-1 assay [13].

Vascular tone directly depends on cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) levels in smooth muscle cells. Thus, any action of RESV on calcium signaling in these cells may be related to its endothelium-independent vascular actions. Again, there is little information on this subject. Orallo and Camiña [9], using $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in rat aortic rings, have suggested that the vasorelaxant effect of *t*-RESV is not mediated by blockage of Ca^{2+} influx through transmembrane receptor-operated calcium channels, Rotondo *et al.* [14] reported a *t*-RESV-associated inhibition of agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in polymorphonuclear leukocytes, and Dobrydneva *et al.* [15, 16] described that *t*-RESV inhibits Ca^{2+} influx in thrombin-stimulated human platelets.

Bearing in mind the above considerations and with the aim of providing new data on the effects of RESV on vascular smooth muscle cells, we here report the first detailed comparative study of the effects of both *t*-RESV and *c*-RESV on calcium signaling in single A7r5 cells (a cell line derived from fetal rat aorta), hoping to clarify how RESV affects smooth muscle cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels.

2 Materials and methods

2.1 Cell culture

A7r5 smooth muscle cells, a well-established vascular smooth muscle cell line obtained from embryonic rat aorta,

were obtained from the American Type Culture Collection (CRL1446; Rockville, MD, USA). The cells were grown in DMEM/F-12 (1:1) supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum (10%), L-glutamine (2 mM), penicillin G ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), streptomycin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), and amphotericin B ($0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Cells were kept in culture at 37°C with 5% CO_2 in air. The cells were subcultured in 75 cm^2 tissue culture flasks and, for experiments, in 35 mm Petri dishes in which a 20 mm diameter hole had been cut in the base and replaced by a thin (0.1 mm) glass coverslip. Cells were seeded at low density ($\sim 1500 \text{ cells cm}^{-2}$) and allowed to grow for at least 24 h in culture medium (see above). Cells were kept in culture for 2–5 days before the experiments.

2.2 Measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in isolated vascular smooth muscle cells

A7r5 cells (plated on Petri dishes as described above) were incubated for 60 min at 37°C in normal bathing solution (composition in mM: NaCl 140, KCl 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5, MgCl_2 2, HEPES 10, glucose 11, pH 7.4) containing $2.5 \mu\text{M}$ fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM), then gently washed twice with normal bathing solution and allowed to rest for >15 min in the incubator, to allow the hydrolysis of fura-2/AM into Ca^{2+} -sensitive free acid form by cell esterases. Cells were placed on an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) and continuously superfused at $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ with normal bathing solution except during the application of drugs. For experiments in extracellular Ca^{2+} -free medium, CaCl_2 was replaced by 10 mM EGTA. Measurements were made from isolated cells or small groups of dispersed cells (up to 8 cells) viewed with a $63 \times$ oil immersion objective (Zeiss Plan-Neofluar, $63 \times /1.25$ oil) using a digital imaging system. Fura-2 was excited alternately at 340 ± 10 and 380 ± 10 nm (100 ms exposure time for both wavelengths) using a 75 W Xenon lamp (XBO 75W/2). Excitation light from the monochromator (P130/MLE/400 Optoscan; Cairn Research, UK) was reflected off a 400 nm dichroic mirror. Emitted fluorescence was collected through a 510 ± 20 nm emission filter and measured with an intensified CCD camera (C651-ICCD; Cairn Research). Ratiometric Ca^{2+} images were generated at 2–20 s intervals, using 4 averaged images at each wavelength. Images were digitally stored and analyzed using MetaFluor software (Universal Imaging Corporation, USA). The short exposition to the 340/380 nm never induced a partial isomerization of *t*-RESV to *c*-RESV. Drugs (or vehicles, for the corresponding control experiments) were added in volumes of 10–50 μL to a final incubation volume of 2 mL of bathing solution. All procedures and experiments were performed at room temperature ($\sim 20^\circ\text{C}$) to minimize compartmentalization and cell extrusion of the fluorescent dye.

2.3 Drugs and chemicals

Amphotericin B, DMSO, *t*-RESV, ionomycin, nifedipine, penicillin G, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-diethylamino-octyl ester 8 (TMB-8), 1-(β -[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl)-1*H*-imidazole hydrochloride (SKF 96365), and streptomycin were purchased from Sigma (Alcobendas, Spain). Thapsigargin (THAPS) was from RBI (Natick, MA, USA). DMEM/F-12 and fetal bovine serum were from Gibco (Barcelona, Spain). Fura-2 AM was from Molecular Probes (Madrid, Spain). All other reagents were of analytical grade. *c*-RESV was prepared at the Departamento de Química Orgánica (Universidad de Santiago de Compostela) following the method previously described [10]. Stock solutions of these compounds were prepared and stored at -20°C as follows: SKF 96365 (10 mM) and TMB-8 (10 mM) in distilled water; ionomycin (1 mM), nifedipine (10 mM), *t*-RESV (100 mM), *c*-RESV (100 mM), and THAPS (1 mM) in DMSO. From these stock solutions, dilutions in physiological buffer were freshly prepared every day as were needed for experiments. The final concentration of DMSO never exceeded 0.01%. Fura-2-AM (2.5 μM) was prepared daily in physiological buffer containing 0.1% DMSO. Appropriate precautionary measures were taken throughout the procedure to avoid degradation of light-sensitive compounds (*t*-RESV, *c*-RESV, and nifedipine) and extensive photobleaching due to the photosensitivity of the fura-2 molecule.

2.4 Data presentation and statistical analysis

Unless otherwise specified, results shown in the text and figures are expressed as means \pm 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, where appropriate.

For each cell, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was then calculated from the 340/380 nm fluorescence ratio as described by Grynkiewicz *et al.* [17]. Ratios were converted to free Ca^{2+} by the equation: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\min}/R_{\max} - R) (F_{\min 380}/F_{\max 380})$, where K_d is the affinity constant of fura-2 for Ca^{2+} , R is the 340/380 nm fluorescence ratio, R_{\min} and R_{\max} are the limiting ratios for minimal (0 mM Ca^{2+} and 10 mM EGTA in the bath) and saturating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (10 mM Ca^{2+} in the bath) both in the presence of 10 μM ionomycin. $F_{\min 380}/F_{\max 380}$ is the ratio of fluorescence of fura-2 at 380 nm in the presence of minimal to that of saturating $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined by averaging resting Ca^{2+} values measured for 10 s on cells from different preparations. Only data obtained from cells that responded to

the Ca^{2+} ionophore ionomycin (0.5 μM), in the presence of 1.5 mM of external CaCl_2 , at the end of the experiments were used. From the cumulative-response curves, the 50% efficacy concentration (EC_{50}) for the effect of *t*-RESV or *c*-RESV was calculated using a sigmoidal curve-fitting analysis program (Origin 6.0).

3 Results

3.1 Effects of *t*-RESV and *c*-RESV on basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$

In a calcium-containing external solution, the mean basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level in A7r5 was 82.7 ± 4.3 nM ($n = 66$), and was unchanged throughout the experimental time course. Cumulative addition of *c*-RESV or *t*-RESV (0.1–100 μM) caused a concentration-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 2), which did not return to the resting level within 1 h, even after washing out the drugs. Maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels reached were 246.7 ± 35.6 nM, $n = 14$ and 270.0 ± 27.9 nM, $n = 17$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values; $p > 0.05$ between them. EC_{50} : 16.5 ± 4.4 μM and 6.8 ± 1.3 μM , for *t*-RESV and *c*-RESV, respectively; $p < 0.05$. The

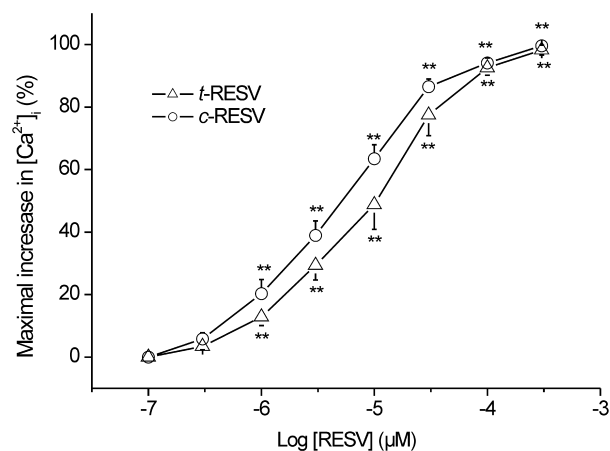


Figure 2. Cumulative concentration-response curves for *t*-RESV- or *c*-RESV-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing external solution in A7r5 cells. Responses are expressed as % of the maximal response obtained for each compound, considering the basal values as 0%. Each point represents the mean of 14 or 17 experiments for *t*-RESV and *c*-RESV, respectively, with SEM indicated by vertical bars. Statistical significance with respect to basal values: ** $p < 0.01$.

percentage of cells responding to *c*-RESV and *t*-RESV in a given culture did not vary greatly, and was on average $\sim 90\%$ of the cells that responded to 0.5 μM ionomycin at the end of the experiments.

3.2 Effects of Ni^{2+} , nifedipine, and SKF 96365 on RESV-induced rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

A single application of *t*-RESV or *c*-RESV (10 μM) caused a sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels: 201.9 ± 41.3 nM, $n = 19$ and 212.6 ± 39.8 nM, $n = 16$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values; $p > 0.05$ between them). Application of Ni^{2+} (300 μM) significantly inhibited the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -sustained plateau when it was administered 20 min after the application of *t*-RESV or *c*-RESV (reduction of the maximal response to both isomers of RESV: $\sim 50\%$; Fig. 3a). Similarly, application of nifedipine (1 μM) partially reduced the *t*-RESV- or *c*-RESV-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (reduction of the maximal response to both isomers of RESV: $\sim 20\%$; Fig. 3a). However, SKF 96365 (30 μM) did not significantly modify the *t*-RESV- or *c*-RESV-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -sustained plateau (Fig. 3a).

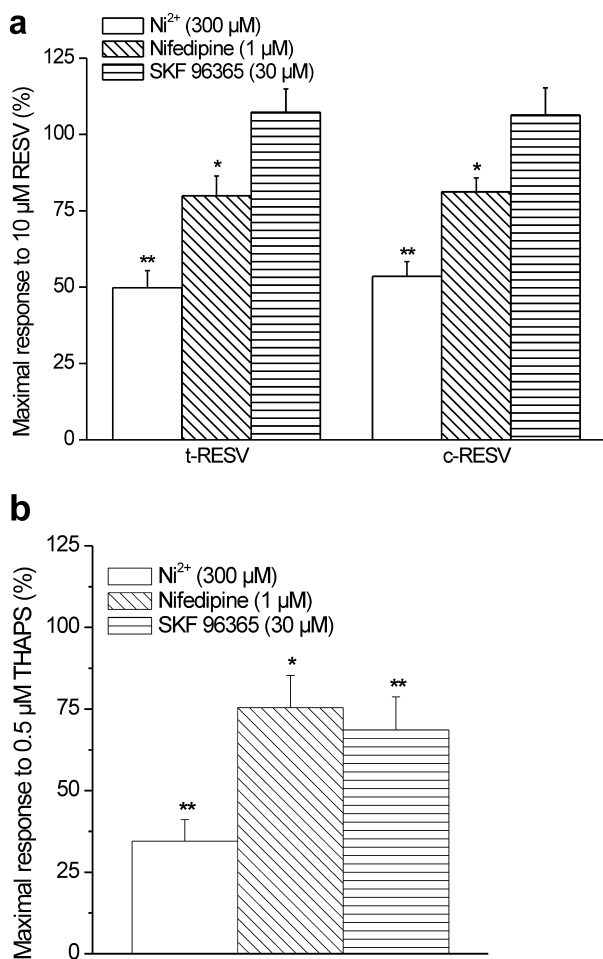


Figure 3. Effects of Ni^{2+} , nifedipine or SKF 96365 on the maximal increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (considered as the 100%) induced by (a) RESV or (b) THAPS in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing external solution. Each bar represents the mean \pm SEM (indicated by vertical lines) of at least 12 cells. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ versus control values.

3.3 Interferences between THAPS- and RESV-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

3.3.1 Effects of previous administration of THAPS on RESV-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

In a 1.5 mM CaCl_2 -containing bathing solution, previous incubation with THAPS affects the *t*-RESV- and *c*-RESV-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, depending on the concentration used (Table 1). THAPS (10 nM) did not significantly modify basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ ~ 5 min after the application of THAPS: 82.0 ± 8.1 nM, $n = 10$; $p > 0.05$) and THAPS (100 nM) induced a slow transient increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 5 min after the application of THAPS: 159.0 ± 15.4 nM, $n = 14$; $p < 0.01$). 10 min after the application of THAPS (10, 100 nM), *t*-RESV or *c*-RESV (10 μM) induced an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that was significantly higher than in the absence of THAPS (Table 1). The subsequent application of a higher concentration of both isomers of RESV (30 μM) induced an additional increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the presence of 10 nM THAPS but not in the presence of 100 nM THAPS (Table 1).

Higher concentrations of THAPS induced an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, consisting of an initial peak after 3–5 min ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ ~ 5 min after the application of 0.5 or 1 μM THAPS: 332.6 ± 34.3 nM, $n = 16$ and 361.3 ± 36.9 nM, $n = 14$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values; $p > 0.05$ between them) that decreased to a sustained plateau ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ ~ 15 min after the application of 0.5 or 1 μM THAPS: 143.1 ± 13.3 nM, $n = 16$ and 168.2 ± 16.8 nM, $n = 14$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values; $p > 0.05$ between them). The THAPS-induced plateau was significantly inhibited by Ni^{2+} (300 μM), nifedipine (1 μM) or SKF96365 (30 μM) (reduction of the maximal response to 1 μM THAPS: $\sim 65\%$; $\sim 25\%$ and $\sim 30\%$, respectively; Fig. 3b). The application of *t*-RESV or *c*-RESV (10, 30 μM) on the sustained plateau induced by THAPS (0.5, 1 μM) induced an additional increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which was not significantly higher, or even significantly reduced, compared to the values obtained in absence of THAPS (Table 1).

The additive increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by the application of THAPS and *t*-RESV or *c*-RESV was inhibited in part by Ni^{2+} (300 μM ; $\sim 60\%$ reduction) and nifedipine (1 μM , $\sim 20\%$ reduction), but not by SKF 96365 (30 μM) (data not shown).

3.3.2 Effects of previous administration of RESV on THAPS-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

In a 1.5 mM CaCl_2 -containing bathing solution, THAPS-induced rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were significantly affected by a previous administration of RESV. Lower concentrations of *t*-RESV or *c*-RESV (100 nM) did not induce by themselves significant increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Under these conditions, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by the subsequent administration

Table 1. Effects of the previous administration of THAPS on the *t*-RESV- and *c*-RESV-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ (nM) in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing external solution in A7r5 cells

		<i>t</i> -RESV		<i>c</i> -RESV	
		10 μ M	30 μ M	10 μ M	30 μ M
Control		201.9 \pm 41.3	258.9 \pm 33.1	212.6 \pm 39.8	245.0 \pm 26.6
Previous THAPS	10 nM	299.2 \pm 22.2**	336.7 \pm 32.0**	278.3 \pm 37.7*	327.4 \pm 22.3**
	100 nM	343.4 \pm 31.1**	345.2 \pm 44.9**	326.8 \pm 26.4**	319.1 \pm 25.8**
	500 nM	220.3 \pm 30.1	208.2 \pm 19.0*	229.3 \pm 19.1	216.32 \pm 21.52
	1 μ M	189.2 \pm 16.2	178.2 \pm 15.6**	201.5 \pm 24.8	177.2 \pm 21.7**

Each value is mean \pm SEM of at least 12 cells. Level of statistical significance: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ with respect to control values.

Table 2. Effects of the previous administration of *t*-RESV- and *c*-RESV on the THAPS-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ (nM) in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing external solution in A7r5 cells

		THAPS							
		10 nM		100 nM		500 nM		1 μ M	
		Peak	Plateau	Peak	Plateau	Peak	Plateau	Peak	Plateau
Control		82.0 \pm 8.1	78.3 \pm 5.5	159.0 \pm 15.4	90.6 \pm 7.4	332.6 \pm 34.3	143.1 \pm 13.3	361.3 \pm 36.9	168.2 \pm 16.7
Previous <i>t</i> -RESV	100 nM	129.8 \pm 21.2**	85.9 \pm 7.1	208.1 \pm 31.1**	116.4 \pm 15.0*	395.0 \pm 24.4*	177.3 \pm 19.0**	377.9 \pm 28.9	184.3 \pm 23.4
	10 μ M	198.4 \pm 30.0**	135.3 \pm 16.9**	215.2 \pm 28.9**	142.2 \pm 28.1**	256.3 \pm 22.0**	122.1 \pm 19.5	235.4 \pm 33.7**	119.8 \pm 15.1**
Previous <i>c</i> -RESV	100 nM	135.2 \pm 17.2**	90.6 \pm 10.0	210.8 \pm 19.1**	122.4 \pm 27.0	401.9 \pm 29.3**	190.2 \pm 22.6**	398.1 \pm 30.0	192.3 \pm 24.5
	10 μ M	205.4 \pm 21.6**	140.0 \pm 17.7**	233.8 \pm 31.5**	139.8 \pm 18.4**	277.2 \pm 27.8**	130.1 \pm 17.5	244.4 \pm 31.1**	122.3 \pm 23.3**

Each value is mean \pm SEM of at least 10 cells. Level of statistical significance: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ with respect to control values.

of THAPS (10, 100, 500 nM) was significantly potentiated (Table 2). However, the response to the higher concentration of THAPS (1 μ M) was not significantly modified (Table 2). A higher concentration of *t*-RESV or *c*-RESV (10 μ M), which induced a marked increase in $[Ca^{2+}]_i$ (see above), did significantly potentiate the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by THAPS (10, 100 nM), but did reduce the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by THAPS (0.5, 1 μ M) (Table 2).

3.4 Effects of *t*-RESV and *c*-RESV on basal $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+}

In a free-calcium external solution, the average basal $[Ca^{2+}]_i$ was 65.7 ± 5.7 nM ($n = 33$; $p < 0.05$ with respect to that obtained in 1.5 mM Ca^{2+} external solution), and was unchanged throughout the experimental time course. Addition of *c*-RESV or *t*-RESV (10 μ M) induced a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ that reaches its maximum after 8–10 min and returns to its basal levels after ~25 min. The maximal $[Ca^{2+}]_i$ level reached were 115.6 ± 12.5 nM, $n = 18$ and 111.2 ± 13.0 nM, $n = 15$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values; $p > 0.05$ between them. Repetitive and cumulative addition of both RESV isomers was able to induce new increases in $[Ca^{2+}]_i$ although the maximal level continued to be reduced until the complete absence of response after 3–4 applications.

After a single application of *t*-RESV or *c*-RESV (10 μ M), the replacement of the free- Ca^{2+} solution by a calcium-containing one (1.5 mM $CaCl_2$), induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ following the model of the classic capacitative entry pathway [18]. The maximal $[Ca^{2+}]_i$ levels reached were 163.1 ± 18.3 nM, $n = 9$ and 158.4 ± 26.1 nM, $n = 7$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values; $p > 0.05$ between them). *t*-RESV or *c*-RESV (100 μ M) induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ that was significantly higher than that induced by lower concentrations (10 μ M) of these agents. Under these conditions cells did not respond to a second application of the drugs (data not shown).

3.5 Interferences between THAPS- and RESV-induced rises in $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+}

In a free-calcium external solution, the addition of THAPS (0.5 μ M) induced a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ that reached its maximum after 3–5 min (maximal $[Ca^{2+}]_i$ level: 184.3 ± 20.9 nM, $n = 12$; $p < 0.01$ with respect to basal values) and returned to its basal levels after ~10 min. After the application of THAPS, the replacement of the free- Ca^{2+} solution by a calcium-containing one (1.5 mM $CaCl_2$), induced a capacitative Ca^{2+} entry (maximal $[Ca^{2+}]_i$: 163.1 ± 25.1 nM, $n = 10$; $p < 0.01$ with respect to basal values).

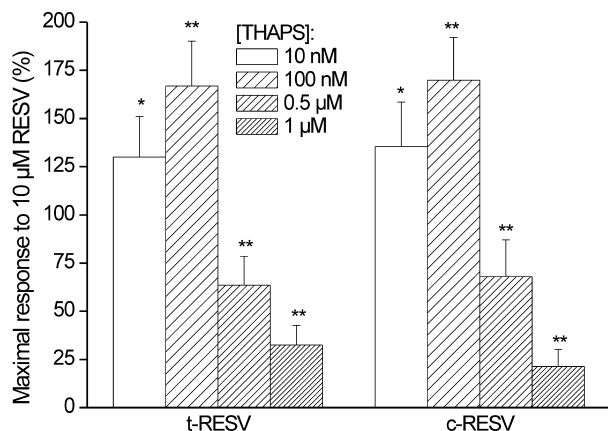


Figure 4. Effects of previous application of THAPS on the maximal increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (considered as the 100%) induced by *t*-RESV or *c*-RESV in the absence of extracellular Ca^{2+} . Each bar represents the mean \pm SEM (indicated by vertical lines) of at least 10 cells. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ versus control values.

The interactions between THAPS and both isomers of RESV correlates well with the results obtained in a 1.5 mM CaCl_2 -containing bath solution. Thus, the RESV-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were potentiated by a previous application of low concentrations of THAPS (10, 100 nM). However, higher concentrations of THAPS (0.5, 1 μM) did significantly inhibit the *t*-RESV- or *c*-RESV-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 4).

Furthermore, after partial depletion of intracellular Ca^{2+} stores with *t*-RESV or *c*-RESV (10 μM), THAPS-induced (0.5 μM) increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were significantly reduced (maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 111.9 ± 12.5 nM, $n = 11$ and 98.0 ± 14.2 nM, $n = 13$ after *t*-RESV and *c*-RESV, respectively; $p < 0.01$ with respect to values in the absence of RESV). Under the conditions when *t*-RESV or *c*-RESV were not able to release more intracellular Ca^{2+} (*i.e.*, after application of 100 μM *t*-RESV or *c*-RESV of after cumulative applications of 10 μM *t*-RESV or *c*-RESV), subsequent application of THAPS (0.5 μM) did not increase basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels.

3.6 Effects of TMB-8 on *t*-RESV-, *c*-RESV-, or THAPS-induced rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

In the absence of extracellular Ca^{2+} , 5 min of preincubation with the intracellular Ca^{2+} antagonist TMB-8 (100 μM) did completely inhibit the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases induced by THAPS (0.5 μM) or by both isomers of RESV (10 μM). However, after 5 min of preincubation with TMB-8 (100 μM) in the presence of 1.5 mM external Ca^{2+} , THAPS (0.5 μM), *t*-RESV (10 μM), or *c*-RESV (10 μM) were still able to induce a slow, sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$

levels: 142.5 ± 16.0 nM, $n = 9$, 129.1 ± 15.1 nM, $n = 12$ and 119.7 ± 18.3 nM, $n = 8$, respectively; $p < 0.01$ with respect to basal values), suggesting that these agents can induce a transmembrane Ca^{2+} influx by other mechanism than the activation of store-operated Ca^{2+} channels (SOCCs). These increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were not significantly inhibited by the application of Ni^{2+} (300 μM), nifedipine (1 μM), or SKF 96365 (30 μM).

4 Discussion

This is the first comparative study of the potential effects of both isomers of RESV on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in A7r5 cells. In our experiments, the pharmacological effects caused by *t*-RESV and *c*-RESV were qualitatively similar, *i.e.*, they directly increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which suggests that the different spatial conformation of *c*-RESV (*versus* that of the *trans*-isomer) does not seem to modify markedly its interaction with the potential cellular targets in A7r5 cells. In this connection, it is interesting to note that, according to their EC_{50} values, *c*-RESV was slightly, but significantly more effective than *t*-RESV.

Since $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations directly regulate vascular contraction, it would be reasonable to speculate that the RESV-induced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels in A7r5 is correlated to an augmentation of the resting tone of isolated rat aorta. However, previous reports have shown that *t*-RESV directly relaxes rat aortic smooth muscle [8, 9] (see Section 1). These discrepancies could be due to the following reasons:

- i) A different sensitivity to RESV of the A7r5 cloned cell line compared to the rat aortic smooth muscle cells (RASMCs) isolated from the medial layer of rat aorta (for detailed method of preparation, see [19]). In order to exclude or confirm this possibility, further investigations are currently being conducted in our laboratory to establish whether RESV also induces increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in RASMCs.
- ii) The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured by fura-2 imaging techniques in isolated RASMCs is not always accompanied by an augmentation of the basal tone in rat aortic rings. In fact, THAPS-induced transient rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in RASMC, in the absence of extracellular Ca^{2+} , is not accompanied by a contraction in rat aorta rings [20], suggesting that intracellular Ca^{2+} release by this drug in RASMCs is not coupled to muscular contraction. However, controversial results have been reported on the relationship between $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation after inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and contraction in vascular smooth muscle [20–22].
- iii) The RESV-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in A7r5 cells may be counteracted in the myocytes of isolated rat aortic preparations by other mechanisms contributing to the vasorelaxant effects of RESV, *i.e.*, the inhibitory effects of RESV

on NADH/NADPH oxidase enzymatic activity [5] or the capacity to inhibit some of the steps of the contractile effect induced by PKC [9] (see also Section 1). In this regard, the possibility of RESV acting as an inhibitor of agonist-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ by another mechanism (*i. e.*, a blockade of nonselective cation channels) can not be discarded from our experiments. In fact, in the present work, both *t*-RESV and *c*-RESV did significantly reduce the increases in $[Ca^{2+}]_i$ induced by the higher concentrations of THAPS (0.5–1 μ M). Furthermore, in another set of experiments performed in our laboratory, *t*-RESV did significantly decrease the plateau of the response to vasopressin, before inducing a slow increase in $[Ca^{2+}]_i$ in A7r5 cells (unpublished observations). Finally, after partial depletion of intracellular Ca^{2+} stores by RESV, the response to a subsequent application of an agonist acting through a phospholipase C and inositol 1,4,5-triphosphate-mediated mechanism, could be significantly reduced. Supporting this hypothesis, pre-incubation with low concentrations of *t*-RESV significantly reduces the vasopressin-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+} in A7r5 cells (unpublished observations). Thus, it seems that the effects of RESV isomers on $[Ca^{2+}]_i$ in A7r5 cells depend on the state of refilling of the intracellular stores and, under some conditions, an inhibitory effect may be more important than the $[Ca^{2+}]_i$ -increasing effect described here. Further studies are needed to confirm this possibility.

In our experiments in free- Ca^{2+} external solution, both *t*-RESV and *c*-RESV induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ as a consequence of the depletion of intracellular stores. TMB-8, an inhibitor of intracellular Ca^{2+} release that reduces Ca^{2+} availability in smooth and skeletal muscles by stabilizing Ca^{2+} binding to cellular Ca^{2+} stores [23], has been shown to transiently block THAPS-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ for about 20 min [24] and to abolish the initial peak of the contractile response induced by THAPS in rat aortic strips [25]. In the same work, Tepel *et al.* [25] have also shown that the second phase of the response to THAPS was not inhibited by TMB-8, but it was completely abolished in the absence of extracellular Ca^{2+} . According to this, in our experiments in the absence of extracellular Ca^{2+} , TMB-8 completely abolished the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by THAPS. A similar effect of TMB-8 was observed on *t*-RESV- or *c*-RESV-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$, suggesting that both stilbenes, as well as THAPS, release Ca^{2+} from intracellular stores which are sensitive to the action of TMB-8.

The interferences between THAPS- and RESV-induced responses in the absence of extracellular Ca^{2+} indicate that these drugs are probably acting on the same intracellular stores. Thus, after partial depletion of THAPS-sensitive intracellular stores, the *t*-RESV- and *c*-RESV-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ were significantly reduced. However, after applications of lower concentrations of THAPS

(which did not induce an increase of $[Ca^{2+}]_i$ by themselves), the response to both isomers of RESV was significantly potentiated. A similar situation was produced when the RESV isomers were administered before THAPS. The possibility of RESV inhibiting sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in a similar way that THAPS can not be ruled out, since an inhibition of ATPase activity has already been described for *t*-RESV [26, 27].

It has been described that depletion of intracellular Ca^{2+} pools, either by membrane agonists or by intracellular agents, increases membrane permeability to Ca^{2+} in non-excitable cells, which, in turn, permits the refilling of depleted stores through SOCCs, in accordance with the so-called “capacitative model” [18, 28]. This Ca^{2+} influx can be inhibited with SKF 96365 [29]. However, the involvement of other channels, such as dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels, is not clear, and contradictory results have been reported [30, 31].

Here, the release of Ca^{2+} from intracellular stores induced by THAPS, *t*-RESV, or *c*-RESV was followed by a transmembrane capacitative Ca^{2+} influx, since reintroduction of external Ca^{2+} in THAPS-, *t*-RESV-, or *c*-RESV-depleted cells elicited a sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$. The RESV- and the THAPS-induced influx of Ca^{2+} through SOCCs was partially inhibited by Ni^{2+} , an inhibitor of capacitative Ca^{2+} entry or nifedipine, a voltage-dependent L-type Ca^{2+} channel blocker. However, SKF 96365, a nonselective Ca^{2+} channel inhibitor that also reduces Ca^{2+} influx through SOCC (see above), only inhibited the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by THAPS, but not by *t*-RESV or *c*-RESV. This lack of effects of SKF 96365 could be explained on the basis that, under some conditions, this imidazole has been reported to increase intracellular $[Ca^{2+}]_i$ by releasing Ca^{2+} from intracellular stores in A7r5 cells [32]. Then, the inhibitory effect of SKF 96365 on SOCCs could be more evident on THAPS-induced capacitative Ca^{2+} influx, which was significantly higher than that induced by the RESV isomers.

Mechanisms other than the activation of SOCCs could also be implicated in the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by both isomers of RESV, since in the presence of 1.5 mM extracellular Ca^{2+} TMB-8 was not able to completely inhibit the rise in $[Ca^{2+}]_i$, suggesting that, when the release of Ca^{2+} from intracellular stores was blocked, *t*-RESV or *c*-RESV were still able to induce a transmembrane Ca^{2+} influx, which was not significantly affected by Ni^{2+} , nifedipine or SKF 96365. A similar result was obtained for THAPS, in good agreement with the results of Tepel *et al.* [25] (see above).

In conclusion, we have described for the first time that *t*-RESV and *c*-RESV, either acting at the plasma membrane and/or by direct diffusion or active transport into the cytoplasm, induce an unexpected increase in $[Ca^{2+}]_i$; the *cis*-isomer being slightly but significantly more effective than the

trans-isomer. This increase in [Ca²⁺]_i is mediated by depletion of Ca²⁺ from the same intracellular stores released by thapsigargin, and subsequent influx of Ca²⁺ through Ni²⁺- and nifedipine-sensitive SOCCs, although a direct activation of transmembrane Ca²⁺ influx through another type of channel that were not affected by Ni²⁺, nifedipine, or by SKF 96365 may be also implicated.

Taking into account the previous reports on the effects of *t*-RESV in rat aortic preparations (see Section 1), the RESV-induced increase in Ca²⁺ seems to be not relevant for inducing contraction of rat aortic smooth muscle. However, a similar increase in [Ca²⁺]_i in endothelial cells could induce an increase of the NO release, and thus contribute to the endothelium-dependent vasorelaxant effect reported for *t*-RESV in rat aorta [5, 8]. In fact, substances that increase endothelial cell [Ca²⁺]_i potentially influence the production of endothelial factors (notably NO, because of the Ca²⁺ sensitivity of constitutive NO synthase in the endothelium) [33] and underlying vascular tone, as reported for the ionophore A23187 and for THAPS, which induce endothelium-dependent relaxation of Guinea-pig rat aorta [34, 35].

*This work was supported in part by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2002-0245; RYC2002-10), Spanish Pharmacological Society/Almirall-Prodesfarma Laboratories (Pharmacology Award 2003) and Xunta de Galicia (PGIDIT02BTF20301PR), Spain. The authors are grateful to Dr. Eugenio Uriarte and Elías Quezada (Department of Organic Chemistry of the University of Santiago de Compostela, Spain) for kindly providing us with *c*-RESV.*

5 References

- [1] Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M., The world of resveratrol. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001, 492, 159–182.
- [2] Pervaiz, S., Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 2003, 17, 1975–1985.
- [3] Fremont, L., Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000, 66, 663–673.
- [4] Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., *et al.*, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004, 24, 2783–2840.
- [5] Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J. M., *et al.*, The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* 2002, 61, 294–302.
- [6] Bradamante, S., Barenghi, L., Villa, A., Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc. Drug Rev.* 2004, 22, 169–188.
- [7] Fitzpatrick, D. F., Hirschfield, S. L., Coffey, R. G., Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* 1993, 265, H774–H778.
- [8] Chen, C. K., Pace-Asciak, C. R., Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 1996, 27, 363–366.
- [9] Orallo, F., Camiña, M., Study of the endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilator effects of resveratrol in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 124, 108P.
- [10] Leiro, J., Álvarez, E., Arranz, J. A., Laguna, R., *et al.*, Effects of *cis*-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 75, 1156–1165.
- [11] Bertelli, A. A., Giovannini, L., Bernini, W., Migliori, M., *et al.*, Antiplatelet activity of *cis*-resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1996, 22, 61–63.
- [12] Basly, J. P., Marre-Fournier, F., Le Bail, J. C., Habrioux, G., Chulia, A. J., Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci.* 2000, 66, 769–777.
- [13] Waffo-Teguo, P., Hawthorne, M. E., Cuendet, M., Merillon, J. M., *et al.*, Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutr. Cancer* 2001, 40, 173–179.
- [14] Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., *et al.*, Effect of *trans*-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 123, 1691–1699.
- [15] Dobrydneva, Y., Williams, R. L., Blackmore, P. F., *trans*-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 1999, 128, 149–157.
- [16] Dobrydneva, Y., Williams, R. L., Morris, G. Z., Blackmore, P. F., Dietary phytoestrogens and their synthetic structural analogues as calcium channel blockers in human platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002, 40, 399–410.
- [17] Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y., A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 3440–3450.
- [18] Putney, J. W., Jr., Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990, 11, 611–624.
- [19] 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, 121, 1627–1636.
- [20] Álvarez-Castro, E., Campos-Toimil, M., Orallo, F., (–)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn Schmiedebert's Arch. Pharmacol.* 2004, 369, 496–506.
- [21] Tosun, M., Paul, R. J., Rapoport, R. M., Coupling of store-operated Ca²⁺ entry to contraction in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 285, 759–766.
- [22] Zhang, X. F., Iwamuro, Y., Enoki, T., Okazawa, M., *et al.*, Pharmacological characterization of Ca²⁺ entry channels in endothelin-1-induced contraction of rat aorta using LOE 908 and SKF 96365. *Br. J. Pharmacol.* 1999, 127, 1388–1398.
- [23] Chiou, C. Y., Malagodi, M. H., Studies on the mechanism of action of a new Ca²⁺-antagonist, 8-(*N,N*-diethylamino)octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.* 1975, 53, 279–285.
- [24] Doutheil, J., Paschen, W., Effect of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-diethylamino-octyl ester (TMB-8) on neuronal calcium homeostasis, protein synthesis, and energy metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 1999, 85, 85–91.

- [25] Tepel, M., Ruess, C., Mehring, N., Neusser, M., Zidek, W., Effect of inhibition of sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase on vasoconstriction and cytosolic Ca^{2+} in aortic smooth muscle from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 1994, 16, 493–506.
- [26] Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., Tillement, J. P., Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999, 25, 87–97.
- [27] Arakaki, N., Nagao, T., Niki, R., Toyofuku, A., *et al.*, Possible role of cell surface H^{+} -ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cancer Res.* 2003, 1, 931–939.
- [28] Randriamampita, C., Tsien, R. Y., Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 1993, 364, 809–814.
- [29] Miwa, S., Iwamuro, Y., Zhang, X. F., Inoki, T., *et al.*, Ca^{2+} entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn. J. Pharmacol.* 1999, 80, 281–288.
- [30] Samain, E., Bouillier, H., Miserey, S., Perret, C., *et al.*, Extracellular signal-regulated kinase pathway is involved in basic fibroblast growth factor effect on angiotensin II-induced Ca^{2+} transient in vascular smooth muscle cell from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000, 35, 61–67.
- [31] Purdy, K. E., Arendshorst, W. J., Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 19–28.
- [32] Hughes, A. D., Schachter, M., Multiple pathways for entry of calcium and other divalent cations in a vascular smooth muscle cell line (A7r5). *Cell Calcium* 1994, 15, 317–330.
- [33] Hobbs, A. J., Higgs, A., Moncada, S., Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, 39, 191–220.
- [34] Taniguchi, H., Hirano, H., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K., Possible involvement of Ca^{2+} entry and its pharmacological characteristics responsible for endothelium-dependent, NO-mediated relaxation induced by thapsigargin in Guinea-pig aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51, 831–840.
- [35] Taniguchi, H., Tanaka, Y., Hirano, H., Tanaka, H., Shigenobu, K., Evidence for a contribution of store-operated Ca^{2+} channels to NO-mediated endothelium-dependent relaxation of Guinea-pig aorta in response to a Ca^{2+} ionophore, A23187. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1999, 360, 69–79.

Effects of *trans*- and *cis*-resveratrol on Ca^{2+} handling in A7r5 vascular myocytes

Manuel Campos-Toimil^a, Jacobo Elías^a, Ezequiel Álvarez^b, Ignacio Verde^b, Francisco Orallo^{a,*}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario Sur, E-15782, Santiago de Compostela, Spain

^b Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Rua infante Dom Henrique, 6200-506, Covilhã, Portugal

Received 2 April 2007; received in revised form 1 August 2007; accepted 6 August 2007

Available online 14 August 2007

Abstract

Although the natural polyphenol resveratrol possesses a direct vasorelaxant effect, its effects on cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in vascular cells remain still unclear. Here, we have investigated the effects of the isomers *trans*- and *cis*-resveratrol on agonist- and high- K^+ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases and on voltage-activated transmembrane Ca^{2+} fluxes using imaging and patch-clamp techniques in vascular A7r5 myocytes. Arginine vasopressin (AVP) or angiotensin II caused a biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that was reduced by preincubation with *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol. Both isomers also reduced the agonist-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in absence of extracellular Ca^{2+} . In high- K^+ Ca^{2+} -free solution, reintroduction of Ca^{2+} caused a sustained rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that was reduced by preincubation with *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol. When the isomers were applied during the plateau phase of the agonist- or the high- K^+ -induced response, a biphasic change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed: a transient reduction of the plateau (<5 min) followed by an increase (>10 min). Finally, *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol inhibited voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents ($I_{\text{Ca(L)}}$). In conclusion, resveratrol isomers exert a dual effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ handling in A7r5 myocytes: 1) a blockade of $I_{\text{Ca(L)}}$ and 2) an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by depletion of intracellular Ca^{2+} stores (which interferes with the agonist-induced release of intracellular Ca^{2+}) and influx of Ca^{2+} , mainly due to activation of capacitative Ca^{2+} entry, although other Ca^{2+} -permeable channels are also involved. Taken together, these effects may explain, in part, the endothelium-independent vasorelaxant effects of resveratrol in rat aorta.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: A7r5; Calcium; Fura-2; Patch-clamp; Resveratrol

1. Introduction

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene), is a polyphenolic component of a wide variety of plants which is present in grapes and wines (especially red wines) in significant amounts. Resveratrol has been reported to possess a wide range of biological activities, including anti-inflammatory, anticarcinogenic, antioxidant, estrogenic, platelet antiaggregatory, and antimicrobial properties (for review see, *e.g.*, Soleas et al., 1997; Aggarwal et al., 2004; Baur and Sinclair, 2006; Orallo, 2006b). Although resveratrol exists as *cis* and *trans* isomers, most studies to date on the biological effects of resveratrol have considered the *trans* isomer (Orallo, 2006a,b), possibly as a result of the fact that this isomer is the only one available commercially.

Many studies have also described properties of resveratrol that could be implicated in the prevention of cardiovascular diseases (for review see, *e.g.*, Burjonrappa and Fujise, 2006; Campos-Toimil et al., in press). In rats, *trans*-resveratrol has been shown to prevent increase in blood pressure in hypertensive rats (Mizutani et al., 2000). *In vivo* protection by *trans*-resveratrol against increase in systolic blood pressure, and subsequent cardiac hypertrophy, has also been reported by Liu et al. (2005a). Despite the above considerations, the *in vitro* vasorelaxant activity of resveratrol is presently somewhat controversial. For example, *trans*-resveratrol (at concentrations up to 100 μM), was unable to relax phenylephrine-precontracted smooth muscle of rat aortic rings (Fitzpatrick et al., 1993). On the other hand, Chen and Pace-Asciak (1996) reported that *trans*-resveratrol (>30 μM) concentration-dependently inhibited the contractile response to noradrenaline or phenylephrine in isolated endothelium-intact rat aorta. This inhibitory effect was blocked by pretreatment of the

* Corresponding author. Tel.: +34 981 594488x14895; fax: +34 981 594595.

E-mail address: fforallo@usc.es (F. Orallo).

aortic rings with the nitric oxide synthase inhibitor *N* ω -nitro-L-arginine. These authors also shown that, at higher concentrations (>60 μ M), resveratrol relaxed endothelium-denuded aortic rings, but this effect could not be reversed by *N* ω -nitro-L-arginine.

Similarly, we have reported that *trans*-resveratrol exhibits in rat aorta: a) a characteristic endothelium-dependent vasorelaxant effect (at concentrations <10 μ M), probably mediated by an inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase (Orallo et al., 2002) and b) an endothelium-independent vasodilator effect (at concentrations >50 μ M), which appears to be partially mediated by an inhibition of protein kinase C (Orallo and Camiña, 1998).

Since vascular tone directly depends on $[Ca^{2+}]_i$ levels in smooth muscle cells, any action of resveratrol on calcium signalling in these cells may be related to the endothelium-independent vasorelaxant action of the drug. Surprisingly, in a previous study we have shown that *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol caused a sustained elevation in $[Ca^{2+}]_i$ in single A7r5 cells (a cell line derived from foetal rat aorta), although the resveratrol-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ seems to be unrelated to rat aorta contractility (Campos-Toimil et al., 2005). However, from our experiments we could not discard the possibility of resveratrol acting as an inhibitor of agonist-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$.

The aim of the present study was to further elucidate the effects of resveratrol isomers on Ca^{2+} handling in vascular cells by evaluating, for the first time, their effects on the agonist- and the high- K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ changes using a fura-2 based Ca^{2+} imaging setup in A7r5 vascular myocytes. Additionally, using the whole-cell patch-clamp technique we have examined the role of resveratrol isomers in the activation of voltage-operated Ca^{2+} entry in these cells. In all the experiments we have compared *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in order to investigate whether they have different actions or, on the contrary, the difference on their effects is merely quantitative.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

A7r5 smooth muscle cells, a well-established vascular smooth muscle cell line obtained from embryonic rat aorta (American Type Culture Collection; CRL1446; Rockville, MD, USA), were grown and kept in culture as described elsewhere (Campos-Toimil et al., 2005). The culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium (1:1 v/v) supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum (FBS, 10% v/v), L-glutamine (2 mM), penicillin G (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and amphotericin B (0.25 μ g/ml). Cells kept in culture at 37 °C with 5% CO_2 in air. For imaging experiments, the cells were subcultured at low density (\sim 1500 cells/cm²) in 35 mm Petri dishes in which a 20 mm diameter hole had been cut in the base and replaced by a thin (0.1 mm) glass coverslip. Cells were allowed to grow for at least 24 h in culture medium and kept in culture for 2–5 days before the experiments.

For patch-clamp experiments, confluent cells were trypsinized and 50–100 μ l of the cell suspension was transferred to a 15 ml plastic tube containing 3–4 ml of FBS-free culture

medium that was kept at 4 °C for 2–5 h until the realization of the electrophysiological experiments. Then, 5–10 μ l of the FBS-free cell suspension was added to a Petri dish, previously kept at 4 °C with bovine serum albumin (0.2% w/v), containing the patch-clamp extracellular solution (see below for composition).

2.2. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in isolated vascular smooth muscle cells

$[Ca^{2+}]_i$ imaging experiments were carried out as previously described (Campos-Toimil et al., 2005). Briefly, A7r5 cells were incubated for 60 min at 37 °C in normal bathing solution (composition in mM: NaCl 140, KCl 5, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.5, $MgCl_2$ 2, HEPES 10, glucose 11, pH 7.4) containing 2.5 μ M fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM), then gently washed and allowed to rest for >15 min in the incubator. Cells were placed on an inverted microscope and continuously superfused at 0.5 ml/min with normal bathing solution except during the application of drugs. For experiments in extracellular Ca^{2+} -free medium, $CaCl_2$ was replaced by 10 mM EGTA. Pairs of fluorescence images at 340 ± 10 nm and 380 ± 10 nm were obtained every 2–20 s from isolated cells or small groups of dispersed cells (up to 6 cells). Images were digitally stored and analyzed using MetaFluor software (Universal Imaging Corporation, PA, USA).

Drugs (or vehicles, for the corresponding control experiments) were added in volumes of 10 to 50 μ l to a final incubation volume of 2 ml of bathing solution. All procedures and experiments were performed at room temperature (\sim 20 °C) to minimize compartmentalization and cell extrusion of the fluorescent dye.

2.3. Whole-cell patch-clamp recording

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill et al., 1981; Verde et al., 1999) was used to record the voltage-dependent L-type Ca^{2+} current ($I_{Ca(L)}$) in A7r5 cells. The control extracellular solution contained (mM): NaCl 107.1, CsCl 40.0, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.8, Na-pyruvate 5.0, $NaHCO_3$ 4.0, NaH_2PO_4 0.8, HEPES 10.0, glucose 5.0, pH 7.4 adjusted with NaOH. Patch pipettes (2–4 M Ω) were filled with intracellular solution (mM): CsCl 119.8, $CaCl_2$ 0.06, $MgCl_2$ 4.0, Na-ATP 3.1, Na-GTP 0.4, EGTA 5.0, HEPES 10.0, tetraethylammonium sodium salt 10.0, pH 7.4 adjusted with CsOH. K^+ currents were blocked by replacing all K^+ ions with intracellular and extracellular Cs^+ . Solutions were filtered (0.22 μ m) before use.

The cells were maintained at -80 mV holding potential (V_h) and routinely depolarised every 8s to 0 mV test potential during 500 ms. Currents were not compensated for capacitance and leak currents. All experiments were carried out at room temperature (21–25 °C) and the temperature did not vary by more than 1 °C in a given experiment. The cells were voltage clamped using an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA). Currents were sampled at a frequency of 10 kHz and filtered at 0.1 kHz using an analog-to-digital interface Digidata 1322A (Axon Instruments Inc.) connected to a

compatible computer with the Pclamp8 software (Axon Instruments Inc.). Control or drug-containing solutions were applied to the exterior by placing the cell at the opening of 250 μm inner diameter capillary flowing at a rate of 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

2.4. Drugs and chemicals

Angiotensin II, amphotericin B, arginine vasopressin (AVP), bovine serum albumin, dimethylsulfoxide (DMSO), *trans*-resveratrol, L-glutamine, ionomycin, nifedipine, penicillin G, tetraethylammonium sodium salt and streptomycin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Thapsigargin was from RBI (Natick, MA, U.S.A.). Ryanodine was from ICN Biochemicals (Asse-Relegem, Belgium). Trypsin/EDTA was from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain). Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium and FBS were from Gibco-Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Fura-2 AM was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). *cis*-resveratrol was prepared at the *Departamento de Química Orgánica (Universidad de Santiago de Compostela, Spain)* following the method previously described (Leiro et al., 2004). All other reagents were of analytical grade.

Stock solutions of these compounds were prepared and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ as follows: angiotensin II (1 mM), AVP (1 mM), Ni^{2+} (10 mM) in deionized water; ionomycin (1 mM), nifedipine (10 mM), ryanodine (10 mM), thapsigargin (1 mM), *trans*-resveratrol (100 mM) and *cis*-resveratrol (100 mM) in DMSO. For patch-clamp experiments, stock solutions of nifedipine (10 mM), *trans*-resveratrol (100 mM) and *cis*-resveratrol (100 mM) were prepared in absolute ethanol. From these stock solutions, appropriate dilutions in distilled water or extracellular solution were freshly prepared every day as were needed for experiments. Final concentration of DMSO and ethanol never exceeded 0.01% and 0.1% (v/v), respectively. Fura-2 AM (5 μM) was prepared daily in physiological buffer containing DMSO (0.1% v/v).

Studies involving light-sensitive compounds (*trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol and nifedipine) were carried out in the dark. For imaging experiments, appropriate precautionary measures were taken throughout the procedure to avoid degradation of light-sensitive compounds and extensive photobleaching due to the photosensitivity of the fura-2 molecule.

2.5. Data presentation and statistical analysis

Unless otherwise specified, results shown in the text and figures are expressed as mean \pm 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.

For each cell, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was then calculated from the 340/380 nm fluorescence ratio as described by Grynkiewicz et al. (1985). For more details see Campos-Toimil

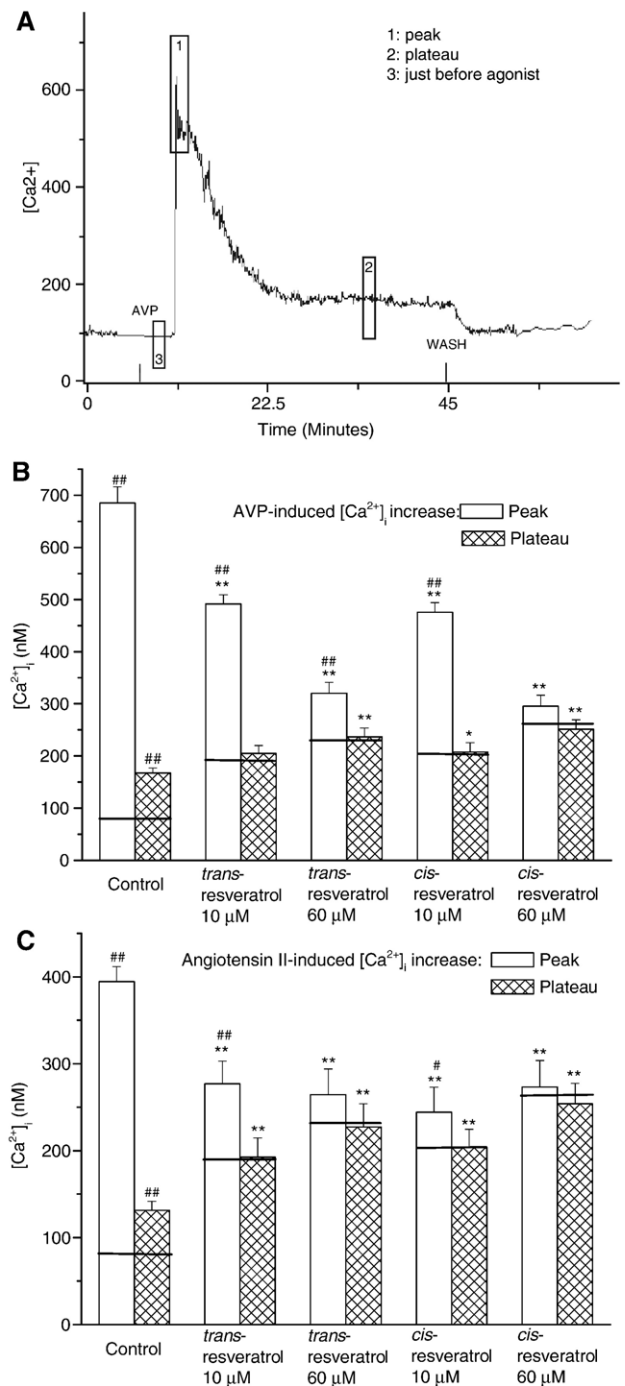


Fig. 1. (A) Original tracing illustrating the AVP-induced biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a single A7r5 cell. Effects of the preincubation with *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol (20 min) on the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by 0.5 μM AVP (B) or 0.1 μM angiotensin II (C) in A7r5 cells. Each bar represents the mean \pm S.E.M. (indicate by vertical lines) of, at least, 15 cells. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ values just before the addition of AVP or angiotensin II in control and resveratrol-treated cells are indicated by horizontal lines (see also Table 1). Level of statistical significance: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ with respect to the corresponding control value. ## $P < 0.01$ with respect to the corresponding $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level before agonist application.

et al. (2005). Basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined by averaging resting Ca^{2+} values measured for 10 s on cells from different preparations. Only data obtained from cells that responded to

the Ca^{2+} ionophore ionomycin (0.5 μM), in the presence of 1.5 mM of external CaCl_2 , at the end of the experiments were used.

$I_{\text{Ca(L)}}$ amplitudes were automatically calculated between the maximum current peak and the stable current plateau near the final of the pulse. $I_{\text{Ca(L)}}$ variations were studied in control extracellular solution containing or not drugs.

3. Results

3.1. AVP- or angiotensin II-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing medium

In a calcium containing solution, mean basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was 80.8 ± 4.4 nM ($n=67$), and, in absence of any treatment, it was unchanged throughout the experimental time course.

AVP (0.5 μM) caused a biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 1A,B): first, a transient elevation (peak) in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ within 1–2 min (maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached: 685.2 ± 30.9 nM, $n=67$, $P < 0.01$ with respect to basal value) followed by a sustained plateau ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: 167.7 ± 9.5 nM, $n=67$, $P < 0.01$ with respect to basal and peak values). This plateau was maintained for, at least, 45 min in the presence of the agonist and returned to basal value after wash. The plateau phase of the AVP-induced response was partially inhibited by 1 μM nifedipine ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: 128.2 ± 8.5 nM, $n=18$, $P < 0.05$) and completely abolished by 300 μM Ni^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: 80.6 ± 7.2 nM, $n=7$, $P < 0.01$; $P > 0.05$ with respect to basal value).

The application of angiotensin II (0.1 μM) induced a biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that was qualitatively similar to that induced by AVP (Fig. 1C), with a transient peak of 394.5 ± 17.1 nM and a sustained plateau of 131.3 ± 10.5 nM ($n=31$, $P < 0.01$ with respect to basal value), which was stable for, at least, 45 min in the continuous presence of the agonist. The plateau phase of the angiotensin II-induced response was partially inhibited by 1 μM nifedipine ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: 99.7 ± 4.2 nM, $n=18$, $P < 0.05$) and completely abolished by 300 μM Ni^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: 75.3 ± 7.0 nM, $n=10$, $P < 0.01$; $P > 0.05$ with respect to basal value).

3.2. Effects of the preincubation with resveratrol isomers on the AVP- or angiotensin II-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing medium

In order to investigate the effects of *trans*- and *cis*-resveratrol (10, 60 μM) on the biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by AVP

Table 1

Maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM) induced by *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in 1.5 mM Ca^{2+} -containing solution (sustained increase) and in a high- K^+ (60 mM) Ca^{2+} -free solution (transient increase)

		1.5 mM Ca^{2+}	High- K^+ / Ca^{2+} -free
<i>trans</i> -resveratrol	10 μM	190.4 ± 9.9^b (41)	101.6 ± 13.1^a (12)
	60 μM	231.5 ± 9.8^b (37)	145.4 ± 13.2^b (10)
<i>cis</i> -resveratrol	10 μM	203.1 ± 10.3^b (36)	116.9 ± 9.9^b (11)
	60 μM	$263.8 \pm 10.5^{b,c}$ (32)	152.2 ± 15.8^b (12)

Level of statistical significance: ^a $P < 0.05$ or ^b $P < 0.01$ with respect to basal values; ^c $P < 0.05$ with respect to *trans*-resveratrol. The number of experiments (n) is given in brackets.

Table 2

Ratio peak/plateau for the absolute $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels induced by AVP (0.5 μM) and angiotensin II (0.1 μM) in the absence (control) and in the presence of resveratrol isomers

	Control	10 μM		60 μM	
		<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol	<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol
AVP	4.08	2.39	2.29	1.35	1.17
Angiotensin II	3.00	1.43	1.19	1.16	1.07

or angiotensin II, they were added to the bath 20 min before application of the agonists and caused a slow sustained elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Table 1). In these conditions, the peak phase of the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elicited by the subsequent application of AVP (0.5 μM) was significantly reduced and the plateau phase was completely inhibited (Fig. 1B). Similar results were obtained using angiotensin II (0.1 μM) as agonist (Fig. 1C).

It is important to note here that, considering the absolute $[\text{Ca}^{2+}]_i$ values, the agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak is reduced by resveratrol isomers, while the plateau is increased, suggesting that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise induced by resveratrol preincubation is maintained after the application of AVP or angiotensin II (Fig. 1). To achieve a better understanding, we have also made a comparison between control and resveratrol-treated values using the ratio peak/plateau (considering the absolute $[\text{Ca}^{2+}]_i$ values), which was reduced in a concentration-dependent fashion by the isomers and it was lower for *cis*-resveratrol than for *trans*-resveratrol (Table 2).

3.3. Effects of the application of the resveratrol isomers on the plateau phase of the AVP- or angiotensin II-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a 1.5 mM Ca^{2+} -containing medium

The plateau phase of the AVP- and angiotensin II-induced rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in A7r5 cells is mainly due to influx of extracellular Ca^{2+} (see Discussion). To evaluate the effects of resveratrol isomers on Ca^{2+} influx during this phase, they were added to the bath once the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plateau was stabilized. When the isomers of resveratrol (60 μM) were applied during the plateau phase of the AVP- or angiotensin II-induced response, a biphasic change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed: 1) an initial transient reduction of the agonist-evoked plateau that occurs during the first 5 min; 2) a sustained increase, starting ~ 10 min after the application of the isomers, that stabilizes ~ 15 –20 min later in values similar or higher to those of the previous agonist-induced plateau (Fig. 2A–C).

Note that, at a concentration of 10 μM , only *cis*-resveratrol induced a significant increase of the AVP- or angiotensin II-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plateau after 20 min of incubation (Fig. 2B,C).

3.4. Effects of the resveratrol isomers on the AVP- or angiotensin II-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a Ca^{2+} -free medium

The agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak was significantly inhibited by resveratrol isomers (see above). To evaluate if they inhibit the release of Ca^{2+} from intracellular IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores, we have measured their effects on the AVP- and the angiotensin II-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Ca^{2+} -free solution. In these

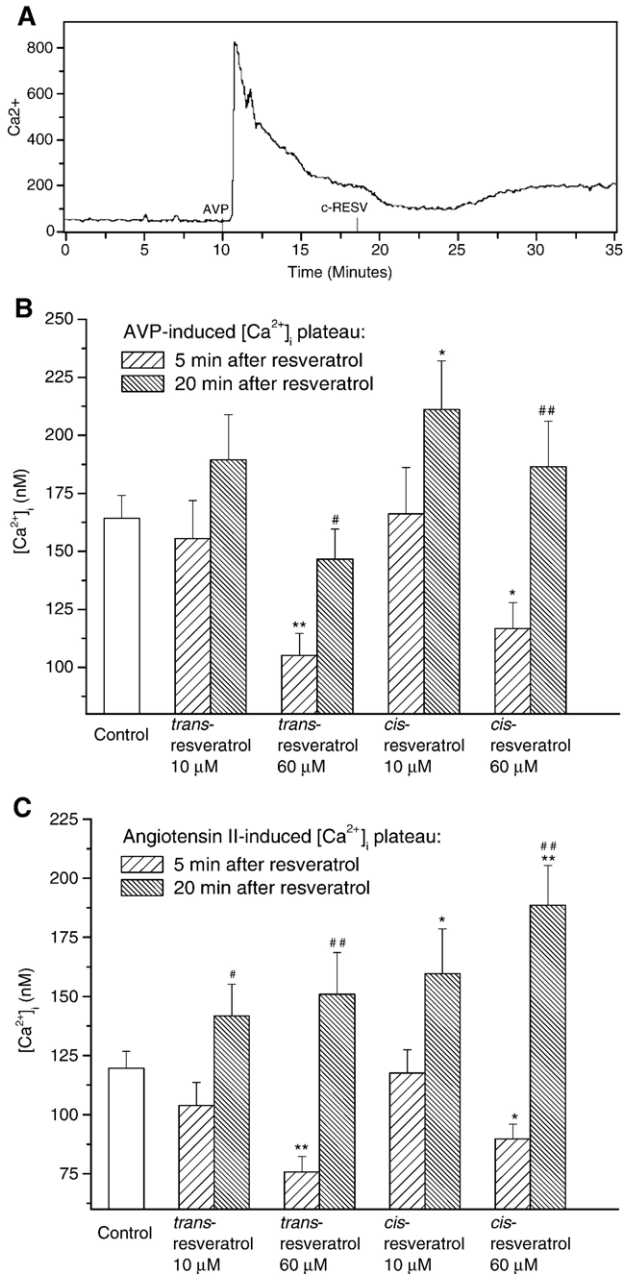


Fig. 2. (A) Representative recording illustrating the effects of *cis*-resveratrol (c-RESV, 60 μ M) applied on the plateau phase of the 0.5 μ M AVP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. Changes on the plateau phase of the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by 0.5 μ M AVP (B) or 0.1 μ M angiotensin II (C) 5 or 20 min after the application of *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol. Each bar represents the mean \pm S.E.M. (indicate by vertical lines) of, at least, 14 cells. Level of statistical significance: * P <0.05 and ** P <0.01 with respect to control values; # P <0.05 and ### P <0.01 with respect to the $[Ca^{2+}]_i$ measured 5 min after the application of the resveratrol isomers.

conditions, basal $[Ca^{2+}]_i$ was 67.3 ± 3.0 nM ($n=121$; P <0.05 with respect to the basal value in extracellular 1.5 mM Ca^{2+} -containing solution). Treatment with AVP (0.5 μ M) or angiotensin II (0.1 μ M) induced an increase $[Ca^{2+}]_i$ consisting in a fast peak that returned to basal value in ~ 5 min (Fig. 3A,B). After that, substitution of the free- Ca^{2+} by a 1.5 mM Ca^{2+} external solution (normal bathing solution) induced an increase

in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3A,C), probably due to Ca^{2+} entry through store-operated Ca^{2+} channels (Putney, 1990) although, according to previous data, nifedipine-sensitive Ca^{2+} channels may also be implicated (Campos-Toimil et al., 2005).

The addition of resveratrol isomers (10, 60 μ M) at the beginning of the experiment induced a significant transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Table 3) that returned to basal value after ~ 20 –25 min. In these conditions, the increase in $[Ca^{2+}]_i$

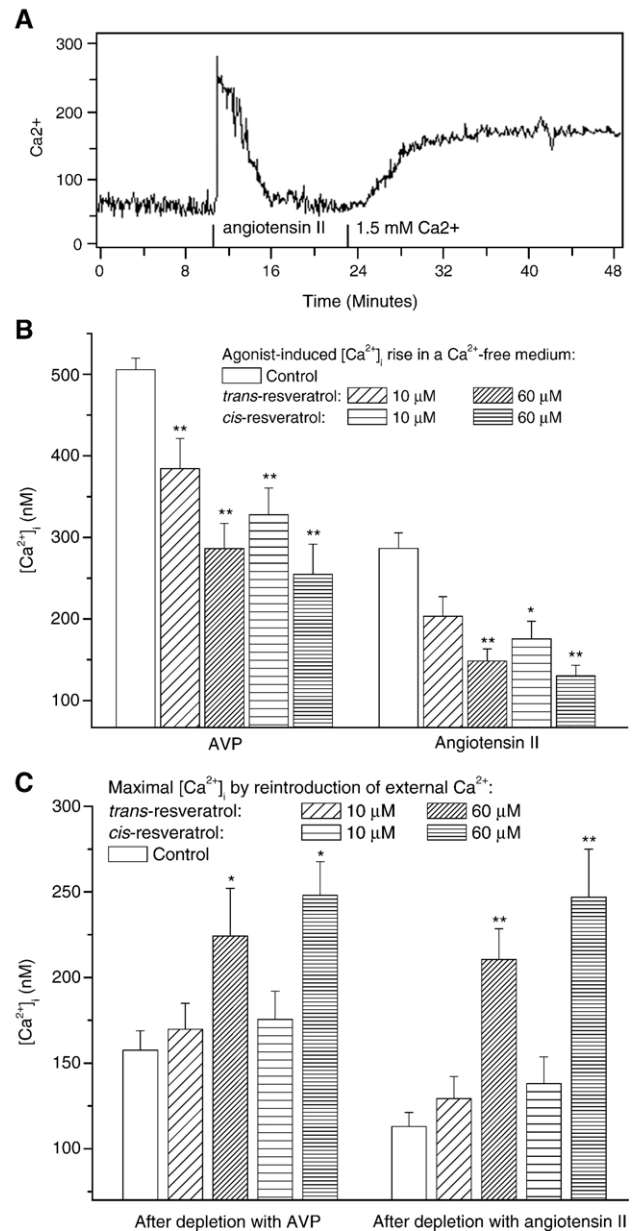


Fig. 3. (A) Representative recording illustrating the $[Ca^{2+}]_i$ rises induced by angiotensin II (0.1 μ M) in Ca^{2+} -free solution and by the subsequent reintroduction of 1.5 mM Ca^{2+} -containing external solution. Effects of resveratrol isomers on the increases in $[Ca^{2+}]_i$ induced by AVP (0.5 μ M) or angiotensin II (0.1 μ M) in Ca^{2+} -free solution (B) and on the increase in $[Ca^{2+}]_i$ measured after reintroduction of Ca^{2+} (1.5 mM) in the extracellular solution (C). Each bar represents the mean \pm S.E.M. (indicate by vertical lines) of, at least, 10 cells. Level of statistical significance: * P <0.05 and ** P <0.01 with respect to control values.

Table 3
Maximal $[Ca^{2+}]_i$ (nM) induced by *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in Ca^{2+} -free medium before the application of any agonist, after the application of AVP (0.5 μ M) or angiotensin II (0.1 μ M) and after several consecutive applications of 0.5 μ M AVP (after ≥ 3 AVP)

	<i>trans</i> -resveratrol		<i>cis</i> -resveratrol	
	10 μ M	60 μ M	10 μ M	60 μ M
Before agonist	109.7 \pm 11.8 ^b (25)	156.6 \pm 11.1 ^b (25)	118.8 \pm 10.4 ^b (24)	167.5 \pm 15.8 ^b (27)
After AVP	70.3 \pm 9.8 (12)	120.3 \pm 14.2 ^b (12)	73.9 \pm 12.1 (12)	132.2 \pm 14.1 ^b (14)
After ≥ 3 AVP	73.6 \pm 8.1 (10)	93.3 \pm 6.8 ^a (12)	75.3 \pm 9.6 (9)	109.4 \pm 12.2 ^b (9)
After angiotensin II	80.4 \pm 8.8 (10)	138.3 \pm 19.2 ^b (12)	79.1 \pm 9.0 (11)	156.2 \pm 21.9 ^b (10)

Level of statistical significance: ^a $P < 0.05$ or ^b $P < 0.01$ with respect to basal values. There were no significant differences between both isomers. The number of experiments (n) is given in brackets.

induced by the subsequent application of AVP (0.5 μ M) or angiotensin II (0.1 μ M) was significantly reduced (Fig. 3B).

After the agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise, *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol (60 μ M, but not 10 μ M) were still able to increase $[Ca^{2+}]_i$, which was maximal after 10 min (Table 3). The elevation in $[Ca^{2+}]_i$ measured after reintroduction of 1.5 mM Ca^{2+} was significantly potentiated in the presence of resveratrol isomers (60 μ M, but not 10 μ M) (Fig. 3C).

In order to achieve a complete depletion of AVP-sensitive Ca^{2+} intracellular stores, several administrations of this agonist (0.5 μ M) were made in the absence of extracellular Ca^{2+} . Depending on the cell, the AVP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ was completely absent after two or three consecutive applications. This lack of response to AVP was not due to receptor desensitization, since AVP was able to elicit an increase in $[Ca^{2+}]_i$ after reintroducing Ca^{2+} in the extracellular solution (data not shown). After depletion of AVP-sensitive Ca^{2+} stores, *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol (60 μ M) or thapsigargin (0.5 μ M) were still able to induce a significant increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Table 3; maximal $[Ca^{2+}]_i$ reached with thapsigargin: 158.4 \pm 22.4 nM, $n = 10$, $P < 0.01$ with respect to basal value). On the other hand, *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol (10 μ M) were without effect.

3.5. Effects of ryanodine on $[Ca^{2+}]_i$ in Ca^{2+} -free medium

The alkaloid ryanodine has been shown to activate specific receptors implicated in the mechanism of Ca^{2+} induced Ca^{2+} release. However, several authors have questioned the existence of such mechanism in A7r5 cells (see Discussion). To confirm or deny this lack of effect of ryanodine, we have evaluated its effects on $[Ca^{2+}]_i$ in Ca^{2+} -free medium. In these conditions, ryanodine (0.1–1 μ M) did not induce significant changes in $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_i$ 3 min after application of 1 μ M ryanodine: 68.9 \pm 8.8 nM, $n = 18$, $P > 0.05$ with respect to basal value). The subsequent application of *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol (60 μ M) provoked an increase in $[Ca^{2+}]_i$ not significantly different from that induced in the absence of ryanodine (data not shown).

3.6. Effects of the resveratrol isomers on the high- K^+ -induced increase in $[Ca^{2+}]_i$

The possibility of an action of resveratrol isomers on voltage-operated Ca^{2+} channels contributing significantly to their relaxant effects in vascular smooth muscle led us to carry out

these experiments, in which cell membranes were depolarized by using a high- K^+ Ca^{2+} -free extracellular solution. The replacement of 1.5 mM Ca^{2+} -containing extracellular solution by a depolarizing high- K^+ (60 mM) Ca^{2+} -free solution induced a decrease in basal $[Ca^{2+}]_i$ levels (66.5 \pm 4.2 nM; $n = 68$; $P < 0.05$ with respect to the value in extracellular 1.5 mM Ca^{2+} -containing solution) which was maintained for, at least, 2 h. Reintroduction of Ca^{2+} (1.5 mM) in the extracellular medium provoked a sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$ (maximal $[Ca^{2+}]_i$ reached: 227.9 \pm 22.1 nM; $n = 16$; $P < 0.01$ with respect to basal value) (Fig. 4A,B). This response was abolished in the continuous presence of nifedipine (1 μ M) (maximal $[Ca^{2+}]_i$: 69.3 \pm 8.5 nM; $n = 7$; $P > 0.05$ with respect to basal value).

The incubation with *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol (10, 60 μ M) provoked a significant transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ that returned to basal value after ~ 20 –25 min (Table 1). Then, reintroduction of Ca^{2+} (1.5 mM) in the extracellular solution, in the presence of both resveratrol isomers, induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ significantly lower than that provoked in the absence of the stilbenes (except for 10 μ M *trans*-resveratrol; Fig. 4A,B).

The application of resveratrol isomers (10, 60 μ M) during the $[Ca^{2+}]_i$ plateau induced by reintroduction of Ca^{2+} significantly reduced this plateau during the first 5 min. Then $[Ca^{2+}]_i$ starts to rise again until reaching values higher to those of the initial plateau (Fig. 4B,C). Note that the effects of 60 μ M *cis*-resveratrol are significantly different from those obtained with the same concentration of *trans*-resveratrol.

3.7. Inhibition of $I_{Ca(L)}$ by the resveratrol isomers

This set of experiments was performed with the purpose of confirming the inhibition of voltage-operated Ca^{2+} channels by resveratrol isomers in A7r5 cells. In whole-cell clamped cells, *trans*-resveratrol (10–100 μ M) and *cis*-resveratrol (30–100 μ M) inhibited a voltage-dependent sustained $I_{Ca(L)}$ in a concentration-dependent way, *trans*-resveratrol being significantly more effective than the *cis* isomer. Lower concentrations of both isomers were without effect (Fig. 5).

4. Discussion

AVP or angiotensin II induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in A7r5 cells that is mediated, as well as in other vascular myocytes, by activation of specific vasopressin V_1 and angiotensin AT_2 receptors, respectively (Thibonnier et al., 1991; Griendling

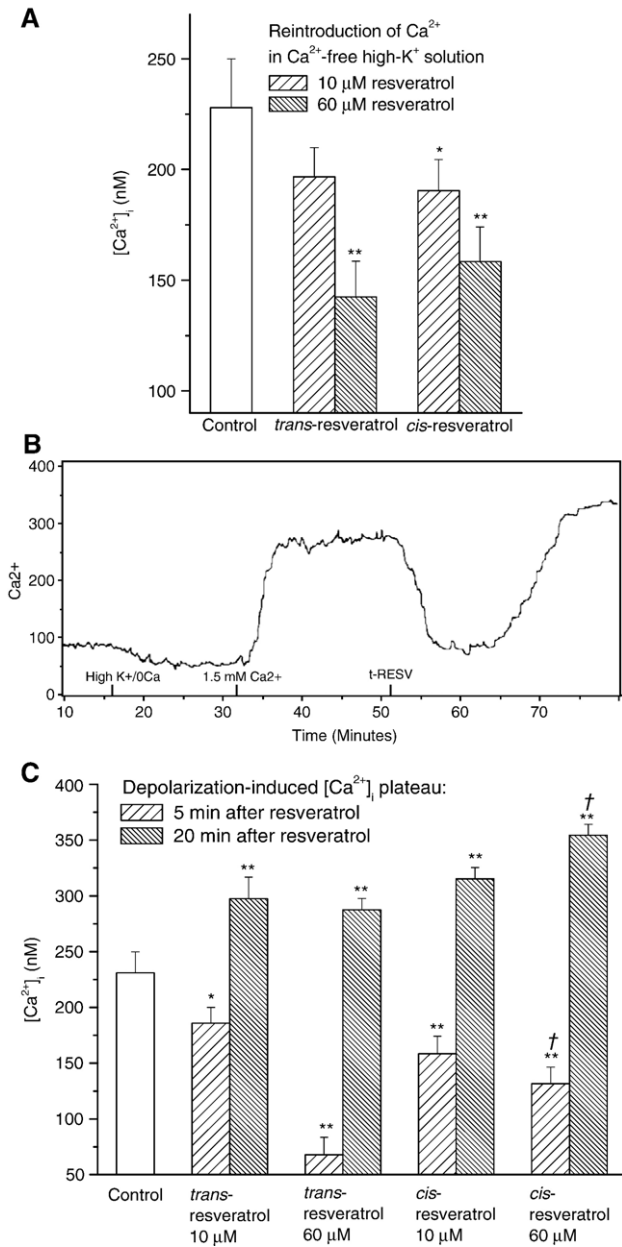


Fig. 4. In high-K⁺ (60 mM) Ca²⁺-free depolarizing medium, the reintroduction of CaCl₂ (1.5 mM) caused a sustained increase in [Ca²⁺]_i in A7r5 cells. (A) This increase in [Ca²⁺]_i was significantly inhibited by 20 min of preincubation with *trans*-resveratrol (60 μM) or *cis*-resveratrol (10, 60 μM). (B) Original tracing showing the effects of the application of *trans*-resveratrol (t-RESV, 60 μM) once the sustained [Ca²⁺]_i increase was stabilized. (C) [Ca²⁺]_i values measured 5 or 20 min after the application of *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol during the sustained plateau of this response (C). Each bar represents the mean±S.E.M. (indicated by vertical lines) of, at least, 11 cells; **P*<0.05 or ***P*<0.01 with respect to control values; †*P*<0.01 with respect to *trans*-resveratrol.

et al., 1997). This response consists of a transient increase in [Ca²⁺]_i, mainly due to the release of Ca²⁺ from intracellular stores, followed by a sustained plateau, mainly due to the influx of Ca²⁺ through several types of transmembrane Ca²⁺-permeable channels (Thibonnier et al., 1991; Byron and Taylor, 1995; Jung et al., 2002). In vascular myocytes, Ca²⁺ is released from intracellular stores via IP₃-sensitive (IP₃ receptors) and ryanodine sensitive channels (ryanodine receptors). However,

A7r5 cells used here do not have functional ryanodine receptors, since they did not respond to ryanodine, according to previous reports (Byron and Taylor, 1993; Missiaen et al., 1994) and contrary to the results of Berman et al. (1994).

Our results in absence of extracellular Ca²⁺ confirm that the peak of the agonist-induced response is mainly due to Ca²⁺ release from intracellular stores through IP₃ receptors, although this peak is significantly lower than the obtained in a Ca²⁺-containing solution, agreeing well with the results reported by Hughes and Schachter (1994) using the same cell line. The previous depletion of intracellular stores by agonists significantly reduced the increase in [Ca²⁺]_i evoked by resveratrol isomers. Similarly, after a transitory increase in [Ca²⁺]_i induced by resveratrol isomers in absence of extracellular Ca²⁺, the subsequent increase in [Ca²⁺]_i induced by application of AVP or angiotensin II was significantly reduced. However, after the complete depletion of IP₃-sensitive stores by consecutive applications of AVP, resveratrol isomers or thapsigargin were still able to increase [Ca²⁺]_i.

From these results and taking in account our previous report (Campos-Toimil et al., 2005), the resveratrol-induced increase in [Ca²⁺]_i in absence of extracellular Ca²⁺ seems to be mediated by the depletion of Ca²⁺ from IP₃-sensitive intracellular stores. Additionally, resveratrol isomers may mobilize Ca²⁺ from a store that was not depleted by IP₃, which corresponds, in part, to the intracellular pool of Ca²⁺ depleted by thapsigargin. This fact supports the hypothesis of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol interfering with sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in a similar way that thapsigargin, although further experiments are required to verify this possibility. From our experiments we cannot discard the possibility of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol activating a novel Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism that is neither mediated by IP₃ receptors nor by ryanodine receptors (Kasri et al., 2003), which has been shown to be stimulated by disulfonated stilbene derivatives (Nadif et al., 2005).

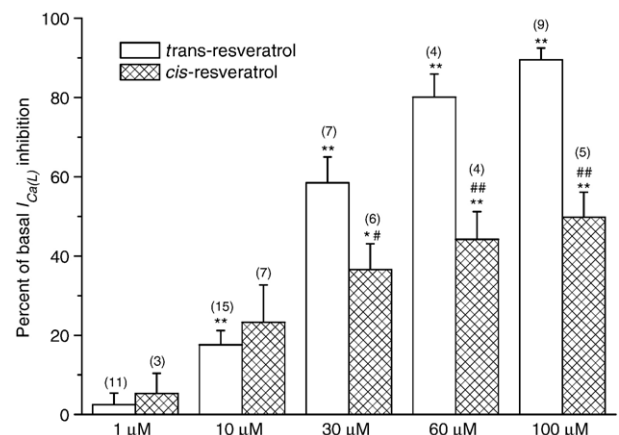


Fig. 5. Inhibition of the I_{Ca(L)} by *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol measured in whole-cell patch-clamp experiments in A7r5 cells. Each bar represents the mean±S.E.M. (indicated by vertical lines) of the number of experiments indicated between brackets at the top of the bar; **P*<0.05 or ***P*<0.01 with respect to control values with vehicle; #*P*<0.05 or ##*P*<0.01 with respect to *trans*-resveratrol.

In a Ca^{2+} -containing solution, after the sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol, both phases of the calcium response to AVP and angiotensin II were significantly modified, leading to a concentration-dependent reduction in the peak/plateau ratio calculated for the calcium response. A possible reason for the reduction of the peak phase is that the IP_3 -sensitive stores were partially depleted by resveratrol isomers, as suggested by the experiments in Ca^{2+} -free solution (see above).

On the other hand, Ca^{2+} influx into A7r5 cells induced by agonists and resveratrol isomers may take place, in part, via similar mechanisms (an influx of extracellular Ca^{2+} activated by depletion of intracellular stores). However, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by resveratrol isomers is higher than the AVP- or angiotensin II-induced plateau in the controls, suggesting that not all the transmembrane Ca^{2+} channels activated by the agonist or the resveratrol isomers are precisely the same. In fact, the influx of Ca^{2+} induced by resveratrol isomers may be also mediated by Ca^{2+} -permeable channels that are not affected by Ni^{2+} (Campos-Toimil et al., 2005) while, in the present work, sustained agonist-induced Ca^{2+} influx was completely blocked by Ni^{2+} , in accordance with a previous report (Hughes and Schachter, 1994).

From our results in depolarizing high- K^+ Ca^{2+} -free solution, it seems that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoked by the reintroduction of extracellular Ca^{2+} is mainly mediated through $I_{\text{Ca(L)}}$. Although it has been shown that Ca^{2+} influx through $I_{\text{Ca(L)}}$ may activate calcium-induced Ca^{2+} release in several preparations, including guinea pig aorta or rat portal vein (Ito et al., 1991; Ganitkevich and Isenberg, 1992), this is not the case for A7r5 cells in this study, since they lack of this mechanism, which is also activated by ryanodine (see above). In high- K^+ Ca^{2+} -free solution, incubation with *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol induced an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which is not significantly different to that obtained in Ca^{2+} -free solution. Although it could be expected that resveratrol isomers will potentiate Ca^{2+} entry through $I_{\text{Ca(L)}}$ because of the additional capacitative Ca^{2+} influx after depletion of Ca^{2+} stores, the fact is that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after reintroduction of 1.5 mM Ca^{2+} was significantly reduced. This suggests that both stilbenes may act directly blocking Ca^{2+} entry through $I_{\text{Ca(L)}}$, a hypothesis also supported by our patch-clamp results. In good agreement, other authors have recently shown that *trans*-resveratrol may inhibit Ca^{2+} currents through $I_{\text{Ca(L)}}$ in rat ventricular myocytes (Liu et al., 2005b; Zhang et al., 2006; Chen et al., 2007). Furthermore diethylstilbestrol, a synthetic estrogen structurally related to resveratrol, have been shown to inhibit $I_{\text{Ca(L)}}$ in A7r5 cells (Nakajima et al., 1995).

Interestingly, resveratrol isomers displayed a biphasic effect when they were applied on a AVP-, angiotensin II- or high- K^+ -induced stable $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plateau. A possible explanation for the initial 5 min inhibitory effect is the above described inhibition of $I_{\text{Ca(L)}}$ since: i) nifedipine also partially inhibited the plateau phase of the calcium response induced by the agonists; ii) this inhibitory effect was stronger on the high- K^+ -induced plateau compared to the agonist-induced plateau; and iii) the % of inhibition of $I_{\text{Ca(L)}}$ for each concentration of *trans*-resveratrol or *cis*-resveratrol correlates well with their ability to reduce the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plateau. On the other hand, at least three mechanisms

could explain why $[\text{Ca}^{2+}]_i$ starts to rise again after >5 min: i) resveratrol isomers may exert a dual effect on some of the Ca^{2+} channels participating in the plateau phase, an inverse situation to that provoked by (–)-epigallocatechin-3-gallate on $I_{\text{Ca(L)}}$ (Campos-Toimil and Orallo, 2007); ii) an additional depletion of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ followed by the subsequent potentiation of extracellular Ca^{2+} influx; and iii) the later activation of a type of channel that was not participating in the initial Ca^{2+} response: in this respect, it is interesting to note that the calcium response to resveratrol isomers occurs in two different phases: the first one (5–10 min) corresponding to the release of intracellular Ca^{2+} and store activated Ca^{2+} influx and the second one (15–20 min) takes place through a non-identified type of channels (Campos-Toimil et al., 2005; unpublished observations). A similar effect (simultaneous activation and blockade of different Ca^{2+} channels) has been previously described for other natural compounds, as the alkaloid rutaecarpine (Wang et al., 1999).

Throughout this study there were no qualitative differences between the effects of resveratrol isomers, in good agreement with most comparative studies on the biological effects of *cis*-resveratrol vs. *trans*-resveratrol (Campos-Toimil et al., 2005; Orallo, 2006a), suggesting that the different conformation does not modify markedly its interaction with the potential cellular targets involved in Ca^{2+} signalling in A7r5 cells.

To summarize, both resveratrol isomers exert two different actions on the Ca^{2+} signalling in A7r5 myocytes: i) a concentration-dependent inhibition of $I_{\text{Ca(L)}}$ and ii) a slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by depletion of IP_3 -sensitive and IP_3 -non-sensitive intracellular Ca^{2+} stores, that is potentiated by the activation of store-operated Ca^{2+} entry, although the later activation of another transmembrane Ca^{2+} -permeable channel may be also involved. As a result of these actions, resveratrol isomers reduce agonist- and high- K^+ -induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and exert a biphasic effect when applied on the sustained plateau. The overall effects of resveratrol isomers described here may explain, at least in part, the endothelium-independent vasorelaxant effects exhibited by resveratrol isomers in isolated rat aortic rings (see Introduction), thus contributing to the cardioprotective effects induced by the long-term moderate wine consumption (Orallo et al., 2002). Bearing in mind these pharmacological properties and assuming that resveratrol isomers exhibit similar behaviour in humans *in vivo*, it can be concluded that they may have interesting potential as an original chemical model for the design and subsequent development of new drugs with cardioprotective properties.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (Spain; RYC2002-10), *Ministerio de Sanidad y Consumo* (Spain; FISS PI061537), *Xunta de Galicia* (Spain; PGIDIT05BTF20302PR), Spanish Pharmacological Society/Almirall-Prodesfarma Laboratories (Pharmacology Award 2003) and “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (Portugal; SFRH/BPD/14458/2003).

Francisco Orallo is especially grateful to Almirall-Prodesfarma Laboratories and the Spanish Pharmacological Society for granting him the 2003 Pharmacology Award.

The authors are grateful to Dr. Eugenio Uriarte and Elías Quezada (Department of Organic Chemistry of the University of Santiago de Compostela, Spain) for kindly providing us with *cis*-resveratrol.

References

- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y., 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24, 2783–2840.
- Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493–506.
- Berman, D.M., Sugiyama, T., Goldman, W.F., 1994. Ca^{2+} stores in smooth muscle cells: Ca^{2+} buffering and coupling to AVP-evoked inositol phosphate synthesis. *Am. J. Physiol* 266, C276–C283.
- Burjonrappa, S., Fujise, K., 2006. Resveratrol as cardioprotective agent: evidence from bench and bedside. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds.), *Resveratrol in Health and Disease*. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton, FL, USA, pp. 539–555.
- Byron, K.L., Taylor, C.W., 1993. Spontaneous Ca^{2+} spiking in a vascular smooth muscle cell line is independent of the release of intracellular Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 268, 6945–6952.
- Byron, K., Taylor, C.W., 1995. Vasopressin stimulation of Ca^{2+} mobilization, two bivalent cation entry pathways and Ca^{2+} efflux in A7r5 rat smooth muscle cells. *J. Physiol* 485 (Pt 2), 455–468.
- Campos-Toimil, M., Orallo, F., 2007. Effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate in Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels and voltage-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* 80, 2147–2153.
- Campos-Toimil, M., Elies, J., Orallo, F., 2005. *Trans*- and *cis*-resveratrol increase cytoplasmic calcium levels in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 396–404.
- Campos-Toimil, M., Elies, J., Orallo, F., in press. Cardiovascular effects of *trans*- and *cis*-resveratrol. In: Singh, V.K., Govil, J.N., (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants Vol. 21: Phytopharmacology and Therapeutic Values III*. Stadium Press LLC, Houston, USA.
- Chen, C.K., Pace-Asciak, C.R., 1996. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 27, 363–366.
- Chen, W.P., Su, M.J., Hung, L.M., 2007. *In vitro* electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. *Eur. J. Pharmacol.* 554, 196–204.
- Fitzpatrick, D.F., Hirschfeld, S.L., Coffey, R.G., 1993. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* 265, H774–H778.
- Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G., 1992. Contribution of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release to the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol* 458, 119–137.
- Griendling, K.K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., Alexander, R.W., 1997. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. *New concepts. Hypertension* 29, 366–373.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.
- Hughes, A.D., Schachter, M., 1994. Multiple pathways for entry of calcium and other divalent cations in a vascular smooth muscle cell line (A7r5). *Cell Calcium* 15, 317–330.
- Ito, K., Ikemoto, T., Takakura, S., 1991. Involvement of Ca^{2+} influx-induced Ca^{2+} release in contractions of intact vascular smooth muscles. *Am. J. Physiol* 261, H1464–H1470.
- Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., Plant, T.D., 2002. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282, C347–C359.
- Kasri, N.N., Sienaert, I., Parys, J.B., Callewaert, G., Missiaen, L., Jeromin, A., De Smedt, H., 2003. A novel Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism in A7r5 cells regulated by calmodulin-like proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 27548–27555.
- Leiro, J., Álvarez, E., Arranz, J.A., Laguna, R., Uriarte, E., Orallo, F., 2004. Effects of *cis*-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J. Leukoc. Biol.* 75, 1156–1165.
- Liu, Z., Song, Y., Zhang, X., Liu, Z., Zhang, W., Mao, W., Wang, W., Cui, W., Zhang, X., Jia, X., Li, N., Han, C., Liu, C., 2005a. Effects of *trans*-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32, 1049–1054.
- Liu, Z., Zhang, L.P., Ma, H.J., Wang, C., Li, M., Wang, Q.S., 2005b. Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. *Sheng Li Xue. Bao.* 57, 599–604.
- Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., Himpens, B., Casteels, R., 1994. Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP. *Biochem. J.* 300 (Pt 1), 81–84.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., Yamori, Y., 2000. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 46, 78–83.
- Nadif, K.N., Bultynck, G., Parys, J.B., Callewaert, G., Missiaen, L., De Smedt, H., 2005. Suramin and disulfonated stilbene derivatives stimulate the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release mechanism in A7r5 cells. *Mol. Pharmacol.* 68, 241–250.
- Nakajima, T., Kitazawa, T., Hamada, E., Hazama, H., Omata, M., Kurachi, Y., 1995. 17 β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 625–635.
- Orallo, F., 2006a. Biological effects of *Cis*- versus *Trans*-resveratrol. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds.), *Resveratrol in Health and Disease*. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton, FL, USA, pp. 577–600.
- Orallo, F., 2006b. Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol. *Curr. Med. Chem.* 13, 87–98.
- Orallo, F., Camiña, M., 1998. Study of the endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilator effects of resveratrol in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 124, 108.
- Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J.M., Gómez, E., Fernández, P., 2002. The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* 61, 294–302.
- Putney Jr., J.W., 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11, 611–624.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91–113.
- Thibonnier, M., Bayer, A.L., Simonson, M.S., Kester, M., 1991. Multiple signaling pathways of V1-vascular vasopressin receptors of A7r5 cells. *Endocrinology* 129, 2845–2856.
- Verde, I., Vandecasteele, G., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., 1999. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 127, 65–74.
- Wang, G.J., Wu, X.C., Chen, C.F., Lin, L.C., Huang, Y.T., Shan, J., Pang, P.K., 1999. Vasorelaxing action of rutaecarpine: effects of rutaecarpine on calcium channel activities in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1237–1244.
- Zhang, L.P., Yin, J.X., Liu, Z., Zhang, Y., Wang, Q.S., Zhao, J., 2006. Effect of resveratrol on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 179–183.

