



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Participación del receptor a mineralocorticoides en la regulación  
del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en miocitos lisos de arterias mesentéricas**

**TESIS**

Que presenta:

**IBQ. ROGELIO SALAZAR ENCISO**

Para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de  
**BIOQUÍMICA**

Directora de la tesis: Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega

Ciudad de México

26 Agosto del 2016

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega. Durante el desarrollo del mismo, fui becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de beca **336804**.

Expreso un gran agradecimiento a mis asesores, el Dr. Agustín Guerrero Hernández y el Dr. Jesús Valdés Flores por sus críticas y sugerencias para un mejor desarrollo del proyecto. De igual manera, agradezco al resto de los profesores del Departamento por la formación académica al inicio de la maestría. También agradezco el apoyo a la Dra. Beatriz Xoconostle del Departamento de Biotecnología, por permitirnos el uso del equipo Rotor Gene 6000 en el que se realizaron los experimentos de qPCR en tiempo real.

Un gran, gran agradecimiento además de la ayuda y asistencia técnica por la amistad y apoyo de la QBP Martha Mercado, Juan Carlos García y compañeros de laboratorio: Nohemí, David, Tatiana, Mirelle y Tamara.

Un especial agradecimiento a la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega por permitir integrarme en su laboratorio y participar en este proyecto. De manera personal agradezco su apoyo a mi desarrollo profesional y académico, infinitamente agradecido.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
1.1.    El sistema renina angiotensina aldosterona y su participación en la regulación de la presión arterial .....	10
1.2.    Características estructurales y mecanismo de acción del receptor a mineralocorticoides .....	12
1.3.    Asociación entre la aldosterona y la presencia de hipertensión.....	15
1.3.1. Los efectos genómicos de la aldosterona en la vasculatura .....	16
1.4. Mecanismos de contracción y de relajación de los miocitos lisos vasculares .....	18
1.5.    Características de las chispas de Ca <sup>2+</sup> en los MLVs.....	23
<b>2.    ANTECEDENTES .....</b>	<b>28</b>
2.1.    Regulación directa de la presión arterial por el receptor a mineralocorticoides de los miocitos lisos vasculares .....	28
2.2.    El incremento en los niveles de aldosterona induce la reducción en la expresión y actividad de los canales BK <sub>Ca</sub> en arterias coronarias.....	29
2.3.    La aldosterona aumenta la frecuencia y promueve chispas de Ca <sup>2+</sup> de larga duración en miocitos ventriculares .....	31
<b>3.    JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>4.    HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.    OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
5.2.    Objetivos específicos .....	34
<b>6.    DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>35</b>
<b>7.    MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>

7.1.	Obtención de las arterias mesentéricas .....	37
7.2.	Registro de las chispas de Ca <sup>2+</sup> .....	37
7.2.1.	Análisis de imágenes .....	38
7.3.	Determinación de los niveles de mRNA.....	39
A continuación se describen los diferentes métodos experimentales que se utilizaron para las determinaciones de mRNA en arterias mesentéricas. ....		
7.3.1.	Aislamiento del RNA .....	39
7.3.2.	Transcripción inversa.....	41
7.3.3.	PCR cuantitativa en tiempo real.....	43
7.4.	Expresión proteica .....	43
7.4.1.	Western Blot .....	43
7.5.	Cuantificación de proteínas.....	45
7.6.	Análisis estadístico.....	45
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
8.1.	La aldosterona modifica las propiedades espacio-temporales de las chispas de Ca <sup>2+</sup> de MLVs.....	46
8.2.	Los miocitos lisos de arterias mesentéricas poseen un MR vascular funcional activado por aldosterona.....	51
8.3.	La aldosterona regula la expresión de genes que codifican a proteínas involucradas en la regulación del Ca <sup>2+</sup> en MLVs.....	56
8.4.	La aldosterona incrementa la expresión del canal de Ca <sup>2+</sup> Cav 1.261	
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>72</b>
<b>12.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>73</b>

## ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica
<b>AT<sub>1</sub>R</b>	Receptor de Angiotensina II tipo 1
<b>BKCa</b>	Canal de K <sup>+</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup> de alta conductancia
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>SR</sub></b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ión calcio
<b>CCDV</b>	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo L
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de Angiotensina II
<b>11β-HSD2</b>	11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
<b>K<sup>+</sup></b>	Ión potasio
<b>MLVs</b>	Miocitos lisos vasculares
<b>MR</b>	Receptor a mineralocorticoides
<b>qPCR</b>	Reacción de la cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RT-PCR</b>	Transcripción Reversa de la Reacción de la cadena de la polimerasa
<b>RyRs</b>	Receptores de rianodina
<b>SNA</b>	Sistema Nervioso Autónomo
<b>SRAA</b>	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
<b>SERCA</b>	Bomba ATPasa de Ca <sup>2+</sup> retículo sarco/endoplásmico
<b>SR</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>sSTAR</b>	Proteína reguladora esteroideogénica
<b>STOC</b>	Corriente saliente de K <sup>+</sup> espontánea y transitoria

## RESUMEN

El receptor a mineralocorticoides (MR) es un factor de transcripción activado por aldosterona (Aldo) que participa en la retención de  $\text{Na}^+$  por el riñón e incrementa la presión arterial. El MR y la sintasa de Aldo también se expresan en los miocitos lisos vasculares (MLVs) de las arterias mesentéricas, lo que apunta a un papel relevante de la Aldo en la fisiología vascular; sin embargo, no hay estudios detallados acerca del efecto de la activación de los MR vasculares en la expresión de proteínas claves en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (por ejemplo, canales iónicos, bombas, etc), y de manera más específica en proteínas involucradas en la modulación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  locales conocidas como chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las chispas son generadas por la activación de clústeres de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares/receptores de rianodina (RyRs) y participan en el proceso de vaso-relajación.

En este estudio examinamos el efecto de la activación del MR vascular de arterias mesentéricas incubadas *ex-vivo* con Aldo (10 nM, 24 h) en la actividad *in situ* de los RyRs mediante el análisis de las características espacio-temporales de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de MLVs intactos (con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 y mediante registros en el microscopio confocal en la modalidad de *line scan*). También evaluamos el efecto de Aldo en los niveles de mRNA del RyR2, de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ 1 de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , de la subunidad  $\alpha$ 1c del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje tipo L (CCDV), Cav 1.2 y la bomba SERCA2 por qPCR en tiempo real.

La incubación de las arterias mesentéricas con Aldo incrementó la frecuencia y el tamaño de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  2.3 y 1.11 veces, respectivamente; pero redujo la amplitud de las mismas en un 15.1 %. Adicionalmente, Aldo promovió la aparición de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de duración prolongada (>200 ms). Los resultados de qPCR mostraron que en las arterias mesentéricas hubo un incremento en los niveles de mRNA del MR y del gen blanco del MR que codifica a la cinasa inducible por glucocorticoides y suero (Sgk1), indicando la presencia de MR vasculares funcionales. En estas arterias hubo incremento en los niveles del mRNA de Cav 1.2 y de la subunidad  $\beta$ 1 del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  de 1.47 y de 2.8 veces, respectivamente; así

como una disminución no significativa en los niveles de mRNA del RyR2. No se encontraron cambios en los niveles de mRNA de la bomba SERCA ni de la subunidad  $\alpha$  del canal BK<sub>Ca</sub>. En cuanto a la expresión proteica (determinada por Western Blots) se encontró que Aldo incrementó 3 veces la expresión de Cav 1.2, faltando por determinar la expresión de las otras proteínas. Estos resultados sugieren que el incremento en la frecuencia y tamaño de las chispas de Ca<sup>2+</sup> se debe a un posible incremento en el influjo de Ca<sup>2+</sup> vía los CCDV, lo que aumenta los niveles de Ca<sup>2+</sup> de los reservorios intracelulares estimulando la liberación espontánea vía los RyRs. Estos datos apoyan la hipótesis de que los MLVs expresan un MR funcional y que su activación tiene efectos en la transcripción de proteínas involucradas en la regulación del Ca<sup>2+</sup> intracelular lo que se refleja en cambios en las características de las chispas de Ca<sup>2+</sup>.

## ABSTRACT

The mineralocorticoid receptor (MR) is a transcription factor activated by aldosterone (Aldo). The MR enhances  $\text{Na}^+$  retention by the kidney and increases blood pressure. Both, the MR and the Aldo synthase are also expressed in vascular smooth muscle cells (MLVs) of mesenteric arteries pointing out to a relevant role of Aldo in vascular physiology. However, there are no detailed studies about the effects of vascular MR activation in the expression of key proteins of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (i.e. ion channels, pumps, etcetera), and more specifically in proteins involved in the modulation of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals, named  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. Sparks are generated by the activation of clusters of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels/ryanodine receptors (RyRs) and participate in vaso-relaxation.

In this study we examined the effect of *ex vivo* MR activation of mesenteric arteries incubated with Aldo (10 nM, 24 h) in the *in situ* activity of RyRs, by analyzing  $\text{Ca}^{2+}$  spark properties in intact MLVs (Fluo-4 loaded and by confocal microscopy recordings in *line scan* mode). In addition, we evaluated the Aldo-induced changes in mRNA levels of RyR2, the  $\alpha$  and  $\beta$ 1 subunits of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels, the  $\alpha$ 1c subunit of the L-type voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel (CCDV), Cav1.2 and the SERCA2 pump by real time qPCR.

The incubation of mesenteric arteries with Aldo increased the frequency and size of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks by 2.3 and 1.11-fold, respectively; but it reduced the  $\text{Ca}^{2+}$  spark amplitude by 15.1 %. In addition, Aldo promoted the appearance of long lasting  $\text{Ca}^{2+}$  sparks (> 200 ms). qPCR analyses revealed an increase in mRNA levels of MR and a target gene of MR, the serum/glucocorticoid inducible kinase 1(Sgk1), indicating the presence of functional MR in mesenteric arteries. In these arteries there was an increase in mRNA levels of Cav 1.2 and  $\beta$ 1 subunit of 1.47- and 2.8-fold, respectively; with a slightly reduction in mRNA levels of RyR2. No changes were detected in mRNA levels of SERCA pump or  $\text{BK-}\alpha$  subunit. About the protein expression (determined by Western Blot) it was found a 3-fold increase in Cav1.2. We still have to determine the changes in expression of other proteins. These results suggest that the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency and size is due to an enhanced

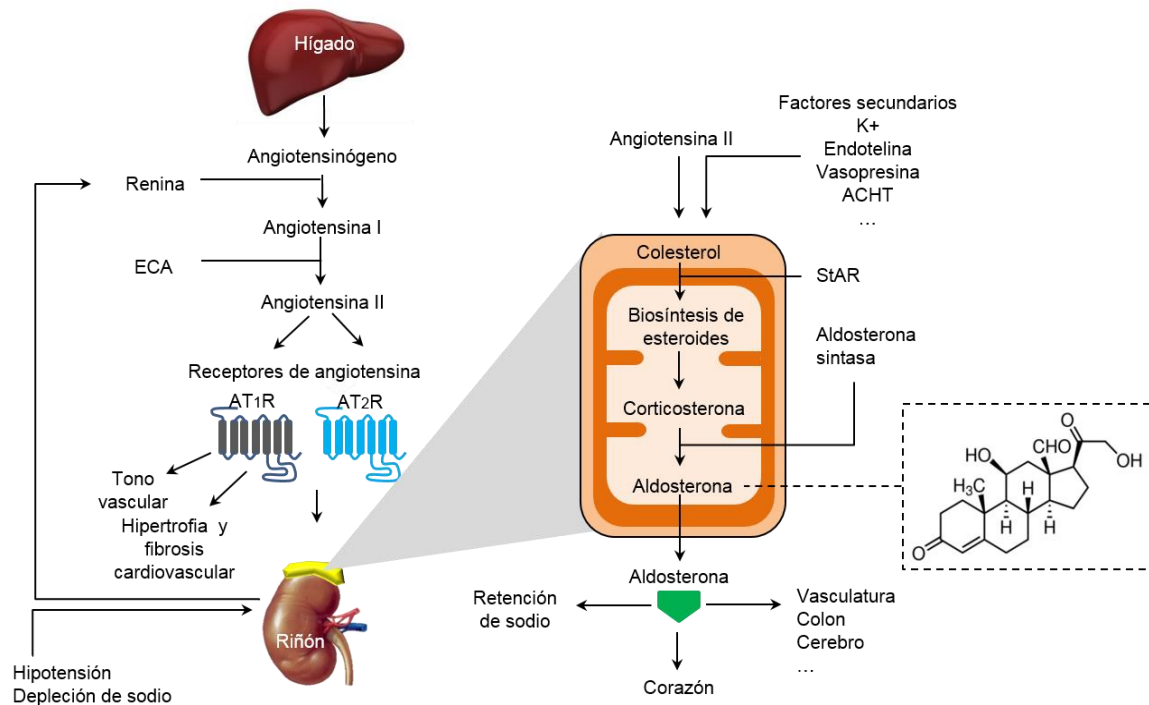


Ca<sup>2+</sup> influx through CCDV; increasing the levels of Ca<sup>2+</sup> within intracellular stores and stimulating spontaneous Ca<sup>2+</sup> release via the RyRs. These data support the hypothesis that MLVs have functional MR and its activation induces changes in the transcription of proteins involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation, these effects are reflected in changes in Ca<sup>2+</sup> spark properties.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. El sistema renina angiotensina aldosterona y su participación en la regulación de la presión arterial

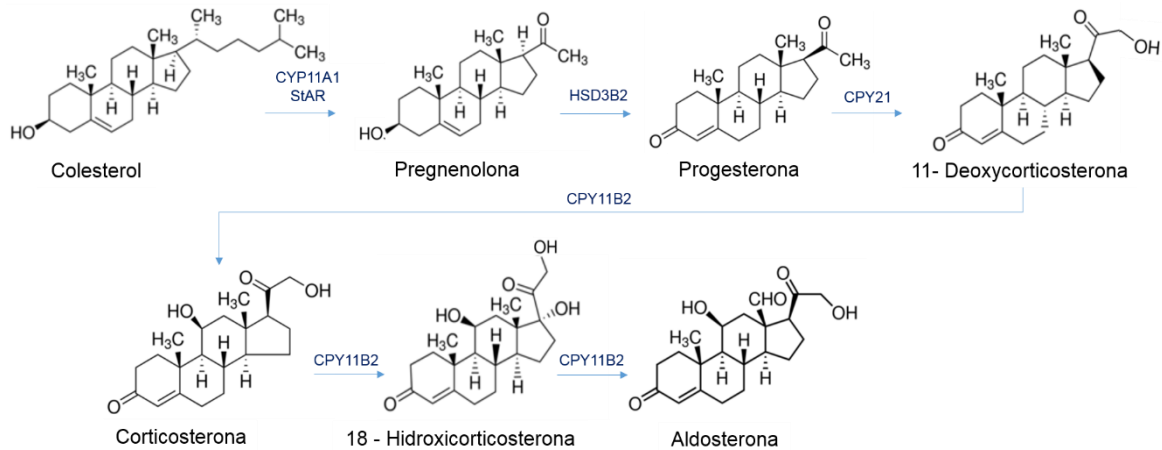
La presión sistémica arterial es determinada por el flujo sanguíneo y la resistencia vascular. El flujo sanguíneo depende del gasto cardíaco y del volumen circulante, mientras que la resistencia vascular es determinada por el estado contráctil de las pequeñas arterias. Múltiples factores, incluyendo el sistema nervioso autónomo (SNA), el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) y numerosas sustancias vasoactivas afectan el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica para regular la presión arterial (Guyenet 2006). El SRAA es el principal sistema hormonal que regula la presión arterial, éste inicia con la renina, liberada por el riñón que escinde al angiotensinógeno proveniente del hígado a angiotensina I, que a su vez es convertida a angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Posteriormente la angiotensina II, que actúa vía el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>R), y una variedad de factores secundarios, como la endotelina, los niveles elevados de K<sup>+</sup> y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), inducen la síntesis de aldosterona en células de la zona glomerulosa adrenal. Una vez sintetizada, la aldosterona es liberada a la circulación promoviendo la retención de Na<sup>+</sup> en el riñón y ejerciendo sus efectos directos en el corazón, la vasculatura y otros órganos blancos (**Figura 1**) (Lothar *et al.*, 2015).



**Figura 1. El sistema renina angiotensina aldosterona.** En este sistema, la renina liberada por el riñón escinde al angiotensinógeno proveniente del hígado a angiotensina I, que a su vez es convertida a angiotensina II por la ECA. Posteriormente la angiotensina II, que actúa vía el receptor AT<sub>1</sub>R, y una variedad de factores secundarios, como la endotelina, los niveles elevados de K<sup>+</sup> y la ACTH, inducen la síntesis de aldosterona en células de la zona glomerulosa adrenal. Una vez sintetizada, la aldosterona es liberada a la circulación promoviendo la retención de Na<sup>+</sup> en el riñón y ejerciendo sus efectos directos en el corazón, la vasculatura y otros órganos blancos (Lothar *et al.*, 2015).

La biosíntesis de aldosterona está regulada en respuesta a varios estímulos, incluyendo la angiotensina II, los niveles elevados de K<sup>+</sup> y la hormona ACTH que pueden generar efectos agudos y crónicos sobre la síntesis y liberación de la misma. La síntesis de aldosterona presenta una fase aguda regulada por la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) necesaria para el transporte del colesterol a la membrana interna mitocondrial. Este estímulo incrementa la expresión y fosforilación de StAR. Por otro lado, la fase crónica de la síntesis de aldosterona ocurre en la mitocondria e implica varias enzimas de la familia de las citocromo P450: la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1); la 21 hidroxilasa (CYP21); la sintasa de aldosterona (CYP11B2), y la deshidrogenasa 3

$\beta$ -hidroxiesteroidea (HSD3B2) de la cuales la CYP11B2 es la enzima limitante que convierte la corticosterona a aldosterona (**Figura 2**). (Hattangady *et al.*, 2012).



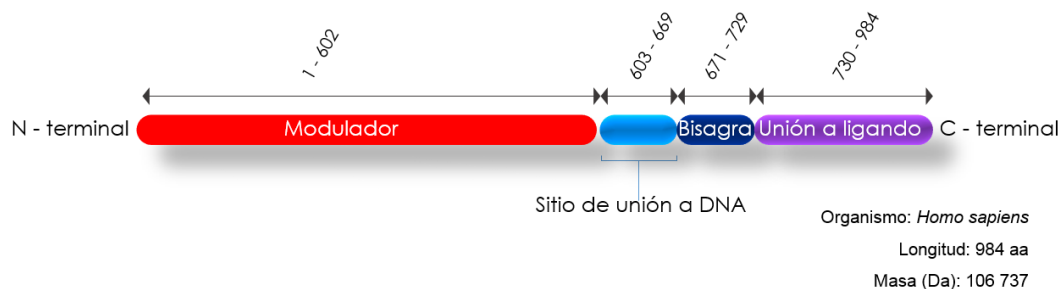
**Figura 2. Enzimas involucradas en la síntesis de la aldosterona.** Se indica la ruta metabólica para la síntesis de aldosterona con las enzimas que participan. En un paso inicial la proteína StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) transporta al colesterol a la mitocondria, en donde el colesterol es escindido por la CYP11A1 (*enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol*) a pregnolona. Pasos adicionales de la vía esteroidogénica incluyen a las enzimas HSD3B2 (*deshidrogenasa 3  $\beta$ -hidroxiesteroidea*), la CYP21 (*21 hidroxilasa*) y la CYP11B2 ( *sintasa de aldosterona*), de la cuales la CYP11B2 es la enzima limitante que convierte la corticosterona a aldosterona (Modificado de Hattangady *et al.*, 2012).

## 1.2. Características estructurales y mecanismo de acción del receptor a mineralocorticoides

La aldosterona ejerce su efecto a través del receptor a mineralocorticoides (MR), un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares activados por hormonas esteroideas. El MR humano es codificado por un único gen, el *Nr3C2* (Receptor Nuclear de la subfamilia 3, grupo C, miembro 2) localizado en el cromosoma 4, locus q31.1, abarca cerca de 75 kb y codifica a una proteína de 984 aa (107 kDa). Está compuesto de 10 exones, los exones 2-9 codifican para los dominios funcionales del MR, los primeros 2 exones (1 $\alpha$  y 1 $\beta$ ) contienen diferentes secuencias 5'-no codificantes. En el caso de la rata

el MR también está codificado por un único gen, que genera una proteína de 981 aa. La identidad entre el MR humano y el MR de rata es del 90.1 %.

El MR está compuesto de diferentes dominios funcionales, un dominio A/B variable (1-602 aa) que contiene la función de transactivación, el dominio de unión a DNA (603-670 aa) que contiene dos motivos proteicos de dedos de zinc que están directamente involucrados en el reconocimiento del elemento de respuesta hormonal (HRE), la región D o región bisagra (671-729 aa) y la región C-terminal (730-984 aa) que constituye el dominio de unión a ligando, este dominio también contiene las señales de localización nuclear, dimerización, transactivación e interacción con las proteínas de choque térmico, coactivadores y correpresores (**Figura 3**) (Lombes *et al.*, 2000).



**Figura 3. Dominios funcionales del MR.** El dominio A/B variable (1-602 aa) contiene la función de transactivación, el dominio de unión a DNA (603-670 aa) contiene dos motivos del tipo de dedos de zinc involucrados en el reconocimiento del elemento de respuesta hormonal (HRE), la región bisagra (671-729 aa) y la región C-terminal (730-984 aa) que constituye el dominio de unión a ligando (Modificado de Lombes *et al.*, 2000).

Además de la aldosterona, el MR funciona como receptor para el cortisol, un 11  $\beta$ -hidroxiglucocorticoide que también activa al MR. La aldosterona y el cortisol se unen al MR con igual afinidad, pero la concentración de cortisol es  $\sim$ 100 veces mayor que la concentración de aldosterona. Dada esta circunstancia, un mecanismo específico que garantiza la selectividad del MR a nivel de unión de ligando en tejidos sensibles a aldosterona depende de la actividad de la enzima 11  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2), que transforma el cortisol a cortisona su 11-ceto derivado que tiene una menor afinidad por el MR (Chapman *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se tiene conocimiento de que el complejo MR:aldosterona es más estable y presenta mayor eficiencia transcripcional que el complejo MR: cortisol, de forma que la aldosterona es un agonista más potente que el cortisol, independientemente de la presencia de la 11 $\beta$ -HSD2 (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2012).

Previo a su activación el MR se localiza en el citoplasma, en ausencia de su ligando forma complejos con las proteínas chaperonas de choque térmico Hsp90 y Hsp70 (Binart *et al.*, 1991). Una vez que se une a su ligando es sometido a una serie cambios conformacionales generando una interacción entre el dominio N-terminal (bisagra) y el dominio C-terminal (unión a ligando) (Rogerson y Fuller 2003), la disociación de algunas proteínas de choque térmico y correpresores, la dimerización, el desenmascaramiento de la señal de localización nuclear y la translocación del receptor al núcleo (Lombes *et al.*, 1994; Nishi *et al.*, 2001), donde se une a secuencias específicas de DNA, elementos específicos de respuesta a hormonas (HRE), y tras la unión de coactivadores estimula la transcripción de genes blancos (**Figura 4**). Se ha observado que la formación de esta interacción es interrumpida por la unión de los antagonistas al receptor, inhibiendo la inducción de la conformación activa e interfiriendo con el reclutamiento de los coactivadores esenciales, y de esta manera se previene la translocación al núcleo o la unión al DNA lo que conduce a la desestabilización del receptor y a su degradación (Geller *et al.*, 2000).

Durante mucho tiempo se pensó que el MR se expresaba exclusivamente en las células epiteliales del riñón y que la aldosterona se secretaba exclusivamente en la glándula adrenal. Sin embargo, diversos estudios han demostrado la presencia de ambos en varios tejidos no renales, incluyendo el corazón (Lombes *et al.*, 2000) y la vasculatura. (Hatakeyama *et al.*, 1994). Décadas atrás, Hatakeyama y colaboradores determinaron en MLVs mediante análisis de RT-PCR la presencia del mRNA de la sintasa de aldosterona, enzima clave para la biosíntesis de aldosterona al igual que el mRNA del MR. (Hatakeyama *et al.*, 1994). Por otro lado, Jaffe y Mendelsohn determinaron a nivel de mRNA y de proteína que la 11 $\beta$ -HSD2

se co-expresa con el MR en MLVs de aorta y arteria coronaria (Jaffe y Mendelsohn, 2005). Estos resultados demuestran que los MLVs son *per se* aldosterogénicos y que poseen los componentes para las acciones directas y selectivas de aldosterona.

### **1.3. Asociación entre la aldosterona y la presencia de hipertensión.**

Un sustancial conjunto de evidencias han implicado al MR y a los niveles elevados de aldosterona en la patogénesis de la hipertensión. El vínculo entre la aldosterona y la hipertensión fue establecido años atrás por Conn en formas de hipertensión secundaria, pero también está presente en la hipertensión esencial (Conn 1955).

Evidencias clínicas consistentes con estudios en modelos experimentales han reportado una correlación entre los niveles elevados de aldosterona en plasma y la presencia de presión arterial elevada (Blacher et al., 1997).

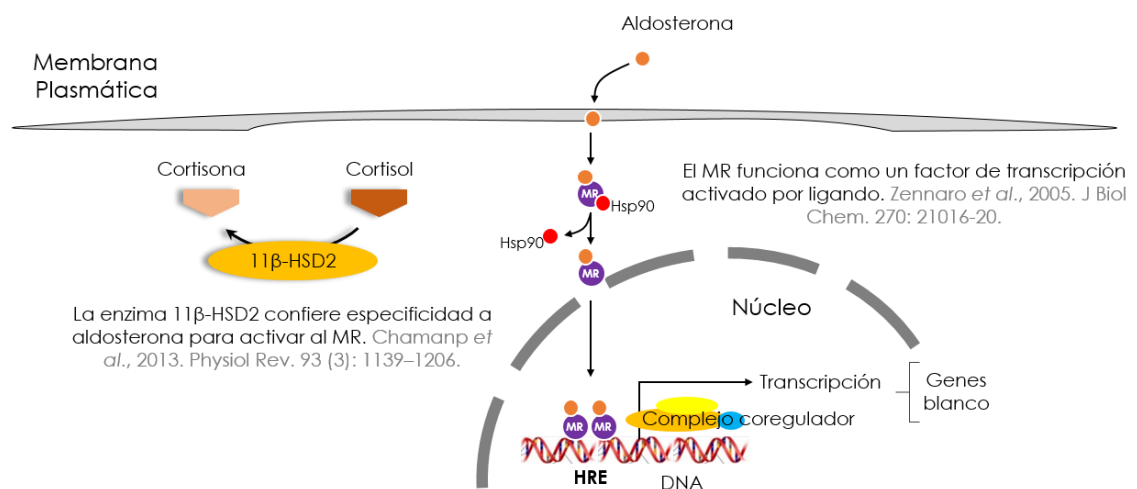
A este respecto Takeda y colaboradores determinaron la producción de aldosterona en arterias mesentéricas de ratas espontáneamente hipertensas propensas a enfermedades cerebrovasculares (SHR-SP). Observando que los niveles elevados de aldosterona en la vasculatura preceden al desarrollo de la hipertensión. Estos resultados sugieren una contribución de la aldosterona que se sintetiza en la vasculatura en el establecimiento de la hipertensión en este modelo experimental (Takeda *et al.*, 1997).

Por otro lado diversos estudios han reportado que a nivel de la vasculatura aldosterona ejerce sus efectos directos al inducir estrés oxidativo (Nakano *et al.*, 2005), inflamación (Caprio *et al.*, 2008), hipertrofia, fibrosis, remodelamiento vascular (Johar y Cave 2006) y disfunción endotelial (Nishizaka *et al.*, 2004). Y estos efectos son mediados selectivamente por el MR, ya que son revertidos con el uso de los antagonistas del MR, como la espironolactona (Benetos *et al.*, 1997; Virdis *et al.*, 2002) y la epleronona (Lacolley *et al.*, 2002; Miyata *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha observado la capacidad del MR para modular la transcripción de genes blancos y subsecuentemente, de las proteínas cuya expresión es inducida o

reprimida por aldosterona y que incluye a elementos constitutivos o reguladores del transporte de iones y canales iónicos (Funder y Mihailidou 2009).

### 1.3.1. Los efectos genómicos de la aldosterona en la vasculatura

De manera clásica aldosterona ejerce sus efectos sobre el sistema vascular a través de vías genómicas (**Figura 4**) de manera dependiente del MR (Briet y Schiffrin 2013). Los efectos genómicos de aldosterona son mediados por la unión de la aldosterona al MR intracelular ( $K_d \approx 1-2$  nM) y la translocación del complejo MR:aldosterona al núcleo donde actúa como un regulador transcripcional después de varias horas (Lösel *et al.*, 2002). Estudios realizados en la vasculatura han demostrado que la aldosterona a concentraciones fisiológicas (1 nM) y patológicas (10 nM) pueden activar la expresión de proteínas blanco en miocitos lisos vasculares (Lombes *et al.*, 2000).



**Figura 4. Mecanismos de acción de la aldosterona.** Antes de su activación el MR se localiza en el citoplasma, donde en ausencia de su ligando forma complejos con las proteínas chaperonas de choque térmico Hsp90 y Hsp70, una vez que se une a su ligando es sometido a una serie de cambios conformacionales generando la disociación de algunas proteínas de choque térmico y correpresores, la dimerización, el desenmascaramiento de la señal de localización nuclear y la translocación del receptor al núcleo donde se une a secuencias específicas de DNA, elementos específicos de respuesta a hormonas (HRE) y tras la unión de coactivadores estimula la transcripción de genes blancos (Modificado de Lothar *et al.*, 2015).



Trabajos en los que han evaluado los perfiles de expresión génica mediante ensayos de microarreglos y de RT-PCR de MLVs tratados con aldosterona, han demostrado la activación de la transcripción de genes mediada por aldosterona. Jaffe y Mendelsohn demostraron que el tratamiento de MLVs de arterias coronarias de humano con aldosterona modula la expresión de genes endógenos que contribuyen a la inflamación vascular y a la modulación de proteínas de la matriz extracelular. Específicamente, la aldosterona mejora la expresión de las colagenasas tipo 1 y 3, importantes mediadores de la fibrosis vascular. En este estudio emplearon un gen reportero, el de la luciferasa, que responde a la activación del MR (MRE) para demostrar que el MR efectivamente induce la transcripción génica. Observaron que la expresión génica es mediada por el MR de manera dosis dependiente, iniciando a concentraciones de 1 nM, consistente con la  $K_d$  aparente reportada para la unión MR:aldosterona y con las concentraciones fisiológicas de la aldosterona. Finalmente, observaron que la activación transcripcional es bloqueada de manera dosis-dependiente por espironolactona, un antagonista del MR (Jaffe y Mendelsohn 2005). Newfell y colaboradores evaluaron el perfil de expresión génica en aorta de ratón tratada *ex vivo* con aldosterona, estableciendo la capacidad de aldosterona para regular el transcriptoma vascular. Entre sus resultados, observaron que cerca de 72 genes son regulados por aldosterona, muchos de los cuales algunos están relacionados con la función fisiológica normal y patológica vascular. La mayoría de las proteínas que codifican estos genes están implicadas en la regulación del estrés oxidativo, la señalización mediada por óxido nítrico (NO), la proliferación vascular, y la formación y degradación de matriz extracelular. Análisis más extensivos sobre el mecanismo de regulación de ciertos genes incluyendo el factor de crecimiento de tejido conectivo, los genes de metalotionina, el factor de crecimiento placentario y la proteína de unión a FK506 (FKBP5) revelaron un incremento en la expresión génica que fue dependiente de la concentración de aldosterona (1, 10, 30 y 100 nM), observando incrementos significativos incluso a 1 nM. En todos los casos la regulación de la expresión génica por aldosterona fue bloqueada totalmente con espironolactona y RU486, antagonistas del GR, así como con actinomicina D, un inhibidor transcripcional,

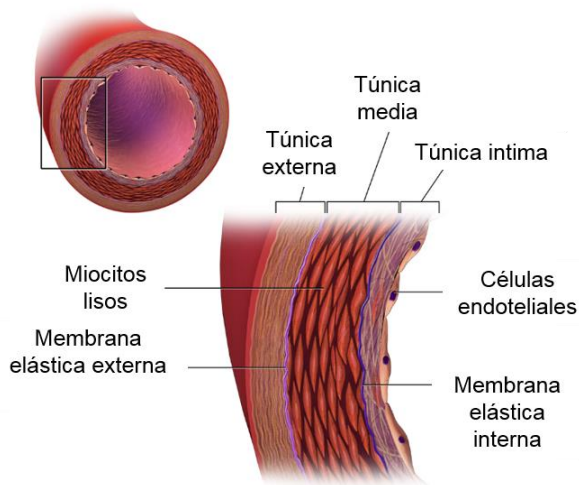
sugiriendo que el MR vascular regula directamente la actividad transcripcional de los MLVs. Además estos cambios en la expresión génica inducidos por aldosterona se reprodujeron en MLVs en cultivo. (Newfell *et al.*, 2011)

Por otro lado, la remoción del endotelio vascular no bloqueó los efectos en la expresión genómica inducidos por aldosterona, lo que confirmó que los efectos observados eran mediados por el MR de los MLVs. Estos resultados en conjunto demuestran una activación directa del MR vascular por la aldosterona, específicamente del MR que se expresa en los MLVs y de sus efectos en la regulación de la expresión génica a concentraciones fisiológicas (1 nM) y patológicas (10-30 nM) (Newfell *et al.*, 2011).

#### **1.4. Mecanismos de contracción y de relajación de los miocitos lisos vasculares**

Las pequeñas arterias de resistencia (con diámetro de ~100 a 250  $\mu\text{m}$ ) son conductos con ramificaciones que están encargados de distribuir la sangre expulsada de las cavidades ventriculares del corazón hacia una gran cantidad de órganos y participan en la regulación de la presión arterial. Cada arterial consta de tres capas concéntricas de tejido. La capa más externa conocida como *túnica íntima* o *adventicia* está compuesta de tejido conectivo y de fibras de colágeno. La *túnica media*, compuesta de tejido elástico y células de musculo liso (o miocitos lisos) que constituyen la capa contráctil de la pared vascular, mantienen la integridad estructural y regulan la distribución del flujo sanguíneo. Finalmente, la capa más interna que está en contacto directo con la sangre es la *túnica íntima*, principalmente compuesta de células endoteliales; y por último, la cavidad interna por la que fluye la sangre se conoce como lumen del vaso. Una característica que define a los miocitos lisos es su habilidad para contraerse, propiedad que refleja la naturaleza excitable de estas células (Owens *et al.*, 2004). (**Figura 5**).

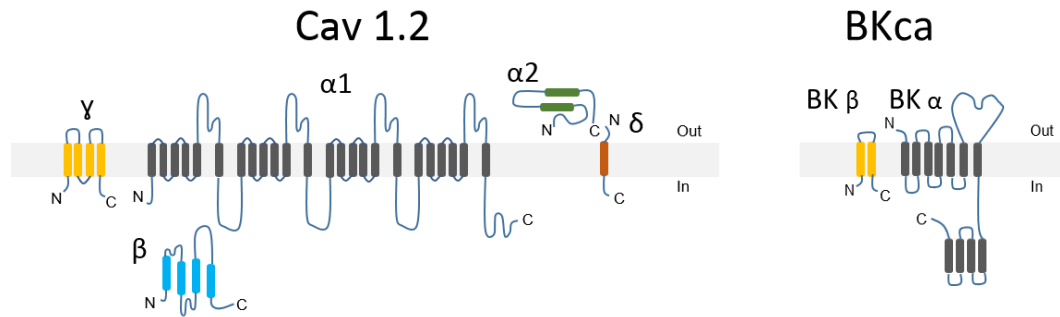
## Estructura de la pared arterial



**Figura 5. Representación esquemática de la estructura en la pared arterial.** Dibujo ilustrativo de un corte transversal de una arteria en donde se indican los diferentes tipos celulares y componentes extracelulares de la pared arterial (modificado de Billaud *et al.*, 2014).

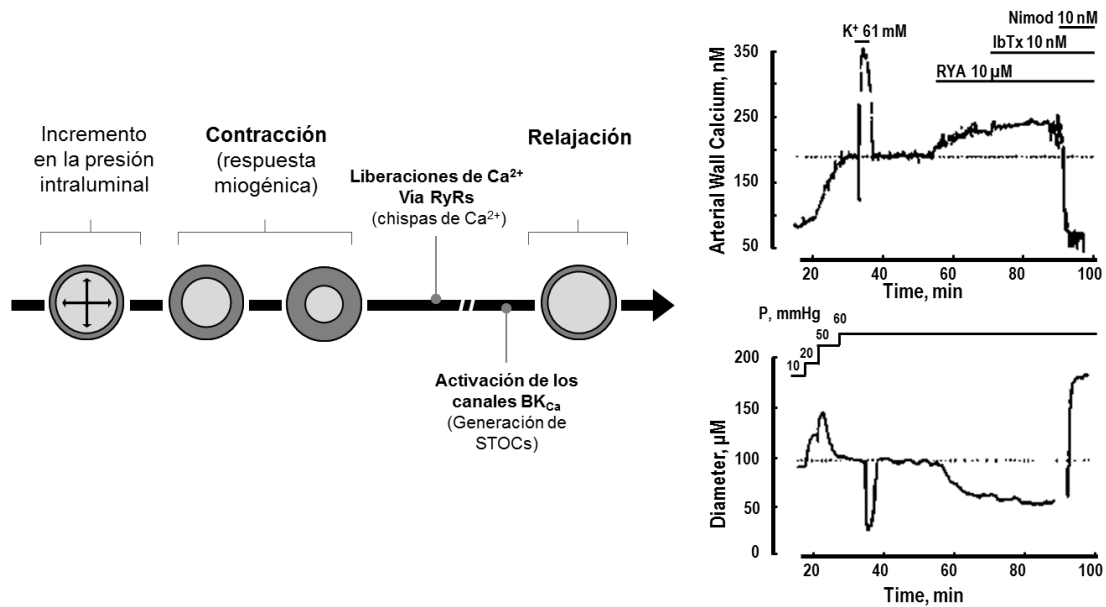
El diámetro de las pequeñas arterias y arteriolas se mantiene principalmente por mecanismos de contracción y relajación presentes en los miocitos lisos vasculares (MLVs). La contractilidad de los MLVs es regulada por cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  global (en todo el citoplasma de la célula) favorece la contracción. El principal mecanismo por el cual se incrementa el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en MLVs es por el influjo de este catión vía los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje tipo L (CCDV) (Hill-Eubanks *et al.*, 2011).

Estructuralmente los CCDV están conformados por subunidades  $\alpha_1$  formadoras del poro del canal (también llamada Cav 1.2) y de las subunidades auxiliares  $\beta$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$  y  $\gamma$  (**Figura 6**). La subunidad  $\alpha_1$  (~190-240 kDa) contiene al sensor de voltaje, y al poro por el cual permea el  $\text{Ca}^{2+}$ , y presenta sitios relacionados con la inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la inhibición por bloqueadores, tiene cuatro dominios repetidos cada uno de los cuales tiene seis secciones transmembrales (S1-S6). La subunidad  $\beta$  accesoria, de la cual existen cuatro isoformas ( $\beta_1$ -4) interactúa con la subunidad  $\alpha_1$  para modular las propiedades del canal (Catterall 2000).



**Figura 6. Topología propuesta para los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L y para los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia que se expresan en la vasculatura.** Izquierda, canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L. Derecha, canal de  $\text{K}^+$  sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia (BKca) (Modificado de .Joseph *et al.*, 2013)

Los CCDV son determinantes para el desarrollo del tono miogénico arterial y el mantenimiento de los niveles de presión arterial. Inicialmente, durante el incremento de la presión intravascular las pequeñas arterias y arteriolas de resistencia muestran una contracción inmediata dependiente del estiramiento comúnmente referido como respuesta miogénica arterial. La respuesta miogénica depende del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los CCDV en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática, causada por el incremento en la presión intravascular aumentando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  global y activando a la maquinaria contráctil (**Figura 7**). La respuesta miogénica puede amplificar el incremento inicial de la presión arterial y por lo tanto elevar la resistencia vascular periférica. Alternativamente, en algunos casos se ha documentado una regulación muy precisa del flujo local, como en la circulación cerebral y coronaria, donde la respuesta miogénica dispara otras respuestas celulares que amortiguan la transmisión de la presión arterial elevada a la microvasculatura del cerebro y corazón, previniendo el daño a los capilares inducido por la presión (Hayashi *et al.*, 1996). De forma más específica, un mecanismo bien caracterizado que se opone a la contracción inducida por el aumento en la presión intravascular y que regula el tono miogénico arterial es el que involucra la activación de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia (canales BK<sub>Ca</sub>) por eventos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  locales y espontáneos (conocidos como chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) mediados por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ /receptores de rianodina (RyRs) (**Figura 7**).



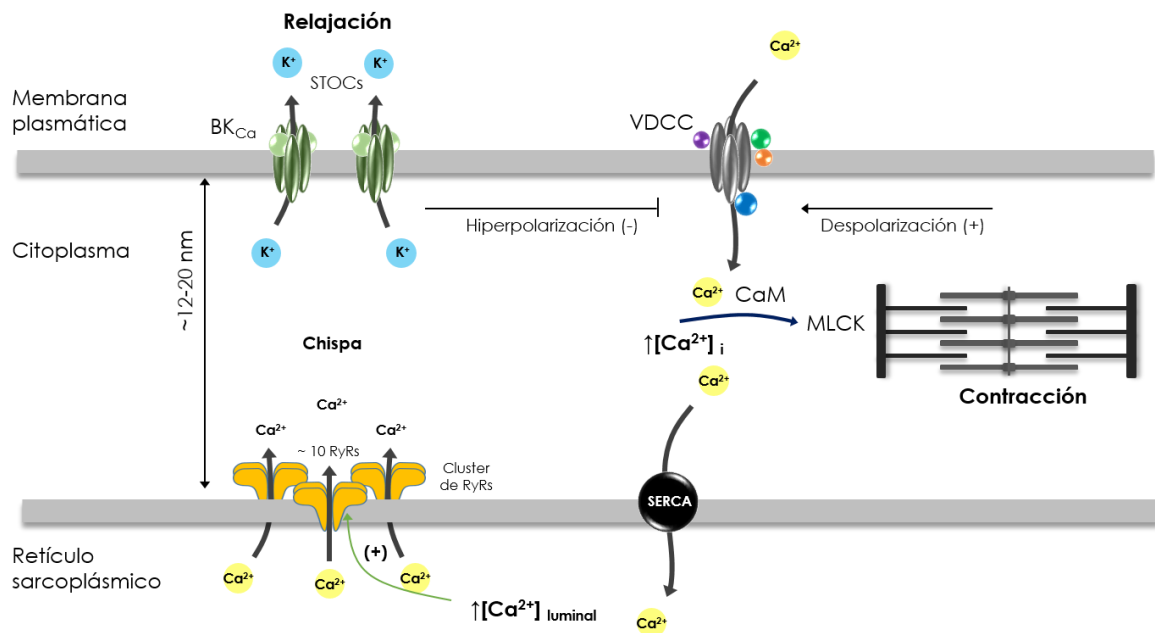
**Figura 7. Respuesta miogénica arterial.** La respuesta miogénica depende del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los CCDV en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática, causada por el incremento en la presión intravascular lo que aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en todo el citoplasma (*ver gráfica superior derecha*) y activa a la maquinaria contráctil reduciendo el diámetro arterial (*ver gráfica inferior derecha*). Sin embargo, un mecanismo que se opone a la contracción inducida por el aumento en la presión intravascular y que regula el tono miogénico arterial es el que involucra la generación de corrientes salientes espontáneas y transitorias (o STOCs) vía los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  por eventos liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  locales y espontáneos (conocidos como chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) mediados por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ /receptores de rianodina (RyRs). El bloqueo de los RyRs con rianodina (RYA  $10 \mu\text{M}$ , *gráfica superior derecha*) o de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  con iberiotoxina (IbTx  $10 \text{nM}$ ) mantiene la respuesta miogénica, evidenciando la participación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los STOCs en la vasorelajación (Modificado de Knot, Standen y Nelson, 1998).

Por otra parte, el potencial de membrana es determinado principalmente por la salida de  $\text{K}^+$  a través de varios canales, incluyendo a los canales de  $\text{K}^+$  operados por voltaje ( $\text{Kv}$ ) y los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Nelson y Quyle 1995).

Estructuralmente los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  están conformados por 4 subunidades  $\alpha$  formadoras del poro del canal y 4 subunidades  $\beta$  reguladoras (**Figura 6**). La subunidades  $\alpha$  tienen siete dominios transmembranales (S0-S6). Mientras que la sensibilidad al voltaje y la formación del poro son determinadas por los dominios de la subunidad  $\alpha$ , la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  es conferida por cuatro dominios intracelulares (S7-S10) y por la interacción del primer dominio transmembrana (S0) de la

subunidad  $\alpha$  con una subunidad auxiliar  $\beta 1$ . La isoforma  $\beta 1$  es específica de los MLVs (Meera *et al.*, 1997).

Un importante elemento que se opone a la contracción inducida por el incremento en la presión y regula el tono miogénico es la activación de los canales  $BK_{Ca}$ . De manera más detallada, la despolarización de la membrana plasmática y el correspondiente incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  vía los VDCC activa la maquina contráctil y de forma simultánea a la bomba SERCA, lo que incrementa el contenido de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares localizados principalmente en el RS aumentando la  $[Ca^{2+}]$  luminal. El incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  luminal conduce a la activación de clústeres de RyRs que generan eventos de liberación de  $Ca^{2+}$  locales y espontáneos que conducen a la activación de los  $BK_{Ca}$  generando corrientes salientes espontaneas y transitorias (STOCs). Los STOCs producen una hiperpolarización compensatoria de la membrana plasmática lo que inactiva a los CCDV (Nelson y Quyle, 1995; Jackson, 1998) (**Figura 8**).



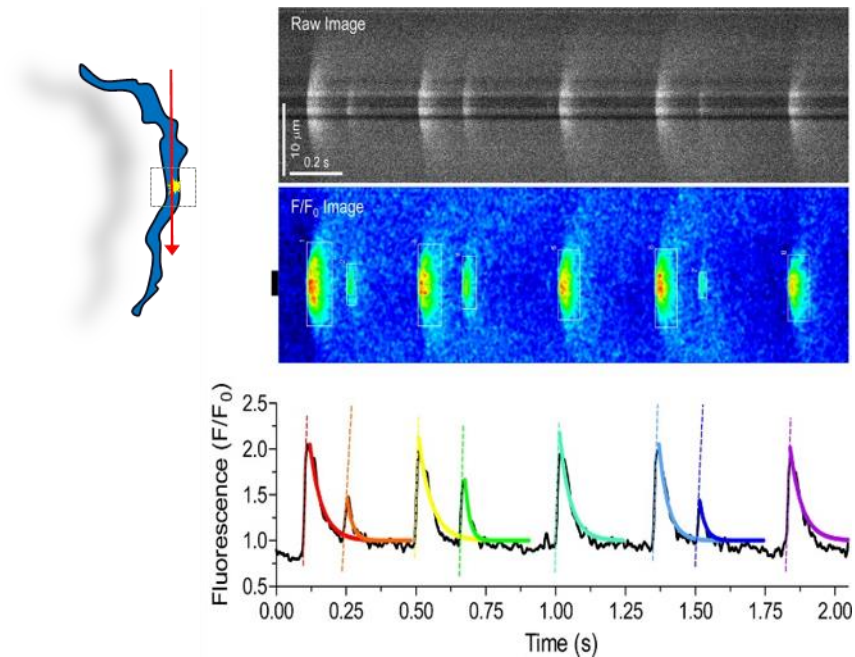
**Figura 8. Mecanismo contracción-relajación en MLVs.** La interacción dinámica de los CCDV, los canales  $BK_{Ca}$  en conjunto con la bomba ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (bomba SERCA) y los receptores de rianodina (RyRs) regulan la dinámica de  $Ca^{2+}$  en los MLVs y desempeñan una función esencial en la modulación del tono vascular de pequeñas arterias de resistencia (Dibujo basado en la revisión de Essin y Gollasch, 2009).

Considerando que la probabilidad de apertura de los CCDV es extremadamente dependiente del voltaje, pequeños cambios en el potencial de membrana podrían producir cambios dramáticos en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y en el estado contráctil de la célula (Nelson *et al.*, 1990, Knot, Standen y Nelson 1998). Por lo tanto, el acoplamiento spark-STOC actúa como un importante sistema para limitar la vasoconstricción causada por un estímulo o por el incremento de la presión intravascular (Brayden y Nelson 1992; Nelson *et al.*, 1995, Knot, Standen y Nelson 1998).

### **1.5. Características de las chispas de $\text{Ca}^{2+}$ en los MLVs**

Las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  son eventos locales de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo sarcoplásmico, que se producen por la apertura coordinada de por lo menos 10 RyRs. Clásicamente las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  son detectadas mediante escaneo en línea de los MLVs cargados con indicadores fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  en microscopía confocal, lo que genera e imágenes de dos dimensiones (distancia vs. tiempo) (**Figura 9**).

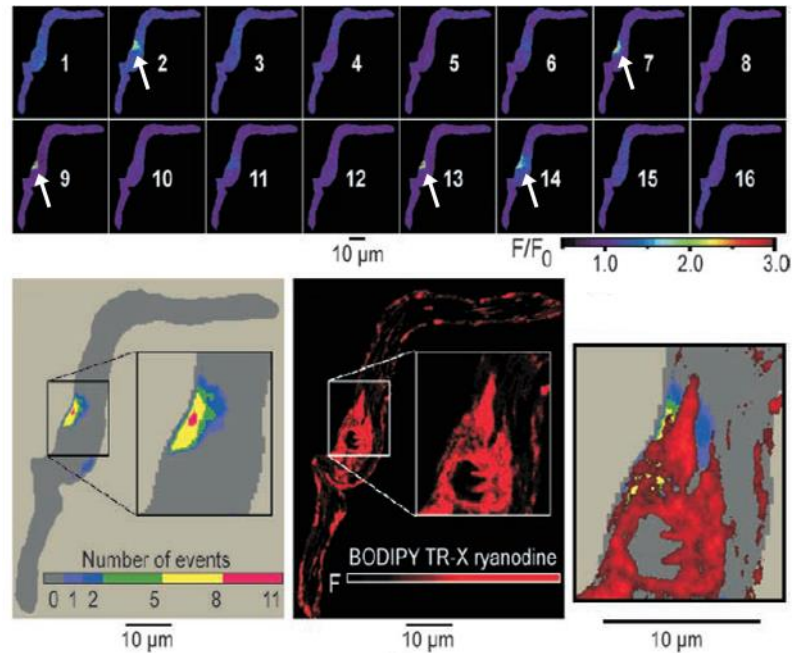
Inicialmente, la existencia de liberaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  espontaneas y transitorias de los reservorios intracelulares fue propuesta por Benham y Bolton en 1986, al registrar STOCs, que dependían en gran medida de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares en miocitos lisos (Benham y Bolton 1986). Posteriormente, con la introducción de la microscopía confocal, fue posible visualizar y registrar por primera vez estos eventos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en células de músculo cardíaco cargadas con el indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-3 (Cheng, Lederer y Cannell 1993). A tales eventos se les denominó chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a que se observaron como incrementos localizados de la señal fluorescente generados por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en pequeñas regiones de la célula. Posteriormente, se observó que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  también ocurrían en miocitos lisos de arterias aisladas. (Nelson *et al.*, 1995).



**Figura 9. Registro de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVs con microscopía confocal.** Para analizar las propiedades temporales y espaciales de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  se utiliza un microscopio confocal en modo line scan, donde una línea sencilla a través de la célula es escaneada repetidamente (*imagen izquierda*), se muestra una imagen de una chispa de  $\text{Ca}^{2+}$  (*imagen superior*) Y en el fondo se muestra el curso temporal del perfil de la fluorescencia ( $F/F_0$ ) (modificado de Picht *et al.*, 2007).

Las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurren en uno o pocos sitios delimitados dentro de la célula de músculo liso, nombrados como sitios de descarga frecuentes o FDS (por sus siglas en inglés de *Frequency Discharge Sites*) (Gordienko, Bolton y Canell 1998) en regiones enriquecidas en RyRs del SR (Gordienko, Greenwood y Bolton 2001). Estos clústeres de RyRs se encuentran cercanos a la membrana plasmática (~12-20 nm), lo que sugiere una comunicación íntima entre los canales iónicos de la membrana plasmática y los RyRs del SR (**Figura 10**).





**Figura 10. Los FDS colocalizan con clústeres de RyRs.** Los sitios de descarga frecuentes coinciden con regiones del SR con alta densidad en RyRs. Imagen secuencial de microscopía confocal donde se muestra la ocurrencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  (incremento de la fluorescencia) en sitios específicos de la célula en la región subplasmalemal (imagen superior), y estas correlacionan con regiones con alta densidad en RyRs (imágenes inferiores). Imágenes de microscopía confocal de miocitos vasculares obtenidos de la vena porta de conejo cargados con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4. BODIPY TR-X, sonda fluorescente para RyR (Gordienko, Greenwood y Bolton 2001).

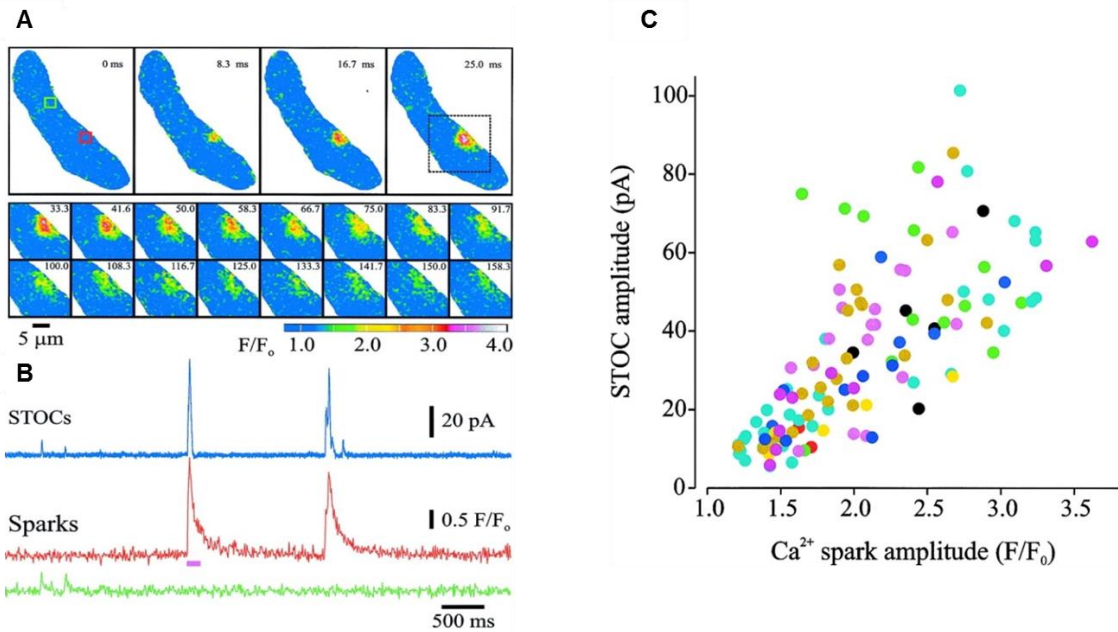
Los RyRs son canales de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular almacenado en el retículo sarcoendoplásmico (Zalk, Lehnart y Marks 2007). Son homotetrameros de cuatro protómeros formadores del canal de  $\sim 560$  kDa, así como subunidades reguladoras, enzimas y proteínas de anclaje formando un complejo macromolecular que excede los tres millones de daltones. En la mayoría de los tejidos los RyRs son activados por el  $\text{Ca}^{2+}$  vía los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, resultando en una rápida liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el SR (Marx *et al.*, 2000). Estudios han revelado que los RyRs adoptan una superestructura cuádruple en forma de hongo, con alrededor del 80 % de su masa en el citosol (tapa del hongo) y un tallo embebido en la membrana del SR (Serysheva *et al.*, 2008). Existen tres genes que codifican a su vez a 3 isoformas del RyR (RyR1 al 3). El RyR1 se encuentra principalmente en el músculo esquelético, mientras que el RyR2 y RyR3 se

encuentran predominantemente en tejido cardiaco y cerebral, respectivamente. Las tres isoformas se han descrito en MLVs donde se expresan en diferentes niveles y regiones de la célula. Sin embargo, la isoforma RyR2 se expresa en mayor abundancia, y se localiza en la región subplasmalemal de la célula y se ha sugerido que es el principal contribuyente a la formación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Coussin *et al.*, 2000; Vaithianathan *et al.*, 2010)

Coussin y colaboradores investigaron la participación de los tres subtipos de RyRs en la formación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVs utilizando secuencias de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra cada uno de los subtipos de RyRs para reducir parcialmente su expresión, observando únicamente que los subtipos RyR1 y RyR2 participan en la formación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Coussin *et al.*, 2000); sin embargo, cabe resaltar que únicamente el RyR2 se localiza en la región subplasmalemal, mientras que el RyR1 se localiza en la región extraperinuclear (Vaithianathan *et al.*, 2010).

A diferencia de las células cardiacas, en las que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  son los “bloques de construcción” de los incrementos transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , debido a que amplifican la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los CCDV e inducen la contracción, se ha sugerido que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en los MLVs tiene una función que se opone a la contracción como se describió anteriormente (Nelson *et al.*, 1995; Knot, Standen y Nelson, 1998). Adicionalmente, los registros simultáneos de STOCs y de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  han revelado que cada chispa de  $\text{Ca}^{2+}$  activa un STOC y que ambos exhiben características temporales similares (**Figura 11**, Pérez *et al.*, 1999). Además la localización espacial de los RyRs y los  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en la región subplasmalemal de la células donde colocalizan, favorecen la hipótesis de un acoplamiento funcional entre las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los STOCs (Lifshitz *et al.*, 2011).

La generación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y de los STOC se bloquea con la aplicación de rianodina y tapsigargina (que inhibe a la bomba SERCA, disminuyendo el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del SR y por lo tanto la probabilidad de apertura de los RyRs) (Nelson *et al.*, 1995; Jaggar *et al.*, 1998).



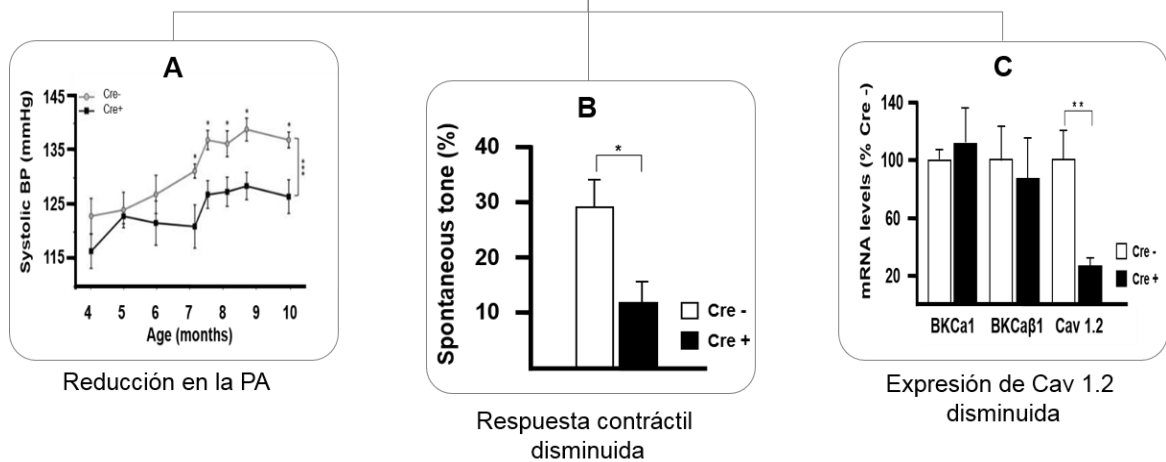
**Figura 11. Las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los STOCs exhiben características temporales similares.** Secuencia de imágenes bidimensionales obtenidas cada 8.33 ms de un MLV cargado con Fluo-3 (**A**, superior) seguido de imágenes subsecuentes de la región de interés (*recuadro punteado*) (**A**, fondo). Registros de STOCs (pA) y chispas ( $F/F_0$ ) ilustrando su asociación temporal. Corriente (azul) promedio de  $F/F_0$  en los recuadros rojo y verde indicados en A, respectivamente (**B**). Gráfica de dispersión de la amplitud de los STOCs (pA) vs., la amplitud de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $F/F_0$ ) donde se observa que están correlacionadas (**C**) (Modificado de Pérez *et al.*, 1999)

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Regulación directa de la presión arterial por el receptor a mineralocorticoides de los miocitos lisos vasculares

McCurley y colaboradores desarrollaron un modelo de ratón deficiente en la expresión del MR en MLVs de forma específica, lo cual es inducido en la edad adulta (SMC-MR-KO). Este modelo experimental ha revelado datos importantes acerca de la participación del MR de MLVs en la regulación de la presión arterial por la modulación intrínseca de la función vascular en arterias de resistencia, particularmente en el envejecimiento. El monitoreo de la presión arterial por telemetría reveló una disminución en la presión arterial en ratones SMC-MR-KO comparado con ratones control donde las diferencias se incrementan con la edad (**Figura 12A**). Al examinar las arterias mesentéricas de resistencia en condiciones presurizadas observaron que las arterias de los ratones SMC-MR-KO desarrollaban menor tono miogénico espontáneo comparado con las arterias de ratones control (**Figura 12B**) y al examinar la actividad y expresión génica de los BKca y el Cav 1.2 en aorta de ratones SMC-MR-KO y ratones control los resultados no revelaron diferencias en la actividad de los BKca al igual que en la expresión del mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Por otra parte, los niveles de mRNA y la actividad de Cav 1.2 fueron sustancialmente reducidos en las aortas de ratones SMC-MR-KO (**Figura 12C**). Por lo tanto se encontró una asociación entre el MR vascular y la actividad del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L (Cav 1.2). Adicionalmente, la respuesta contráctil inducida por el agonista del canal de Cav 1.2, BayK8644, disminuyó significativamente en arterias mesentéricas del ratón VSMC-MR KO, sugiriendo una reducción significativa en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (McCurley *et al.*, 2012).

## Ratones Knockout del MR-SMC (SMC-MR-KO)

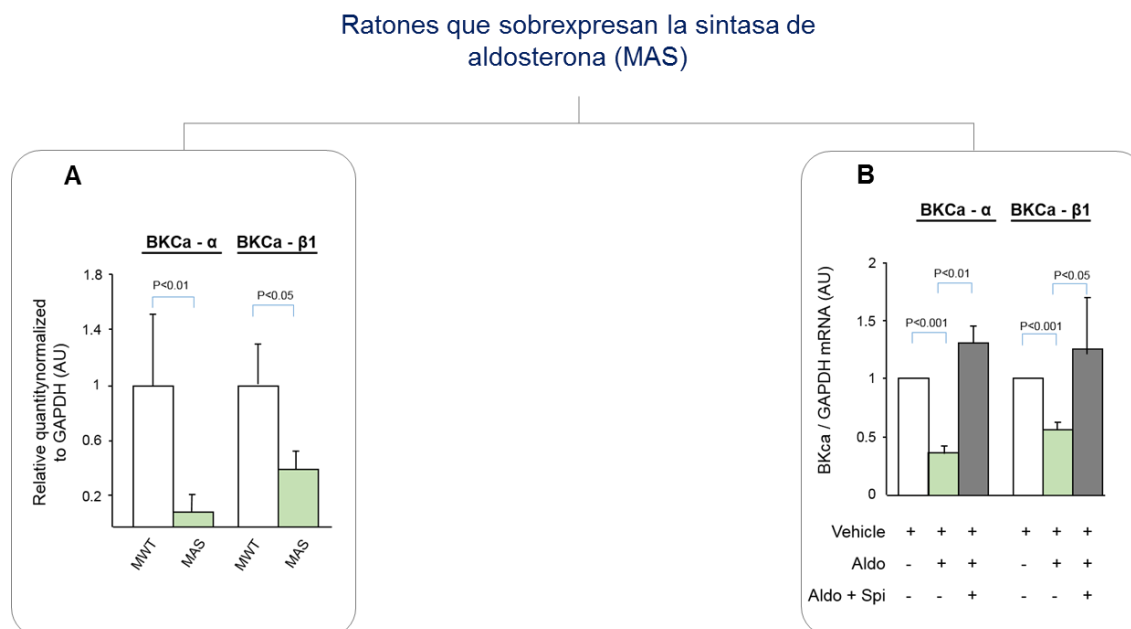


**Figura 12. El MR vascular contribuye directamente a la regulación de la presión arterial y del tono miogénico.** Presión arterial sistólica determinada por telemetría durante 24 h en ratones knock-out del MR en MLVs (SMC-MR-KO) inducido por tamoxifen (Cre+) comparado con ratones control (Cre-) de 4 a 10 meses de edad (A). Tono arterial espontáneo a 70 mmHg calculado como el porcentaje de la reducción en el tono luminal activo (B). Niveles de mRNA de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de BKCa y de Cav 1.2 determinados por análisis de qPCR en aortas aisladas de ratones Cre+ y Cre- envejecidos (C), (McCurley *et al.*, 2012).

## 2.2. El incremento en los niveles de aldosterona induce la reducción en la expresión y actividad de los canales BK<sub>Ca</sub> en arterias coronarias.

Ambroisine y colaboradores evaluaron la función contráctil en respuesta a concentraciones crecientes de acetilcolina en arterias coronarias de ratones que sobreexpresaban la sintasa de aldosterona (MAS) observando una reducción significativa en la relajación inducida por acetilcolina en ratones MAS comparados con ratones control (MWT) (Ambroisine *et al.*, 2007). Para determinar si la función del canal BK<sub>Ca</sub> estaba alterada, indujeron la respuesta contráctil en respuesta a acetilcolina en presencia de IbTx, observando una marcada reducción en la relajación de las arterias coronarias de ambos modelos experimentales (MAS y MWT). Sin embargo, observaron una menor inhibición inducida por IbTx en ratones MAS que en ratones control, sugiriendo alteraciones en la relajación dependiente de los canales BK<sub>Ca</sub>. Para verificar si existían cambios en el nivel de expresión

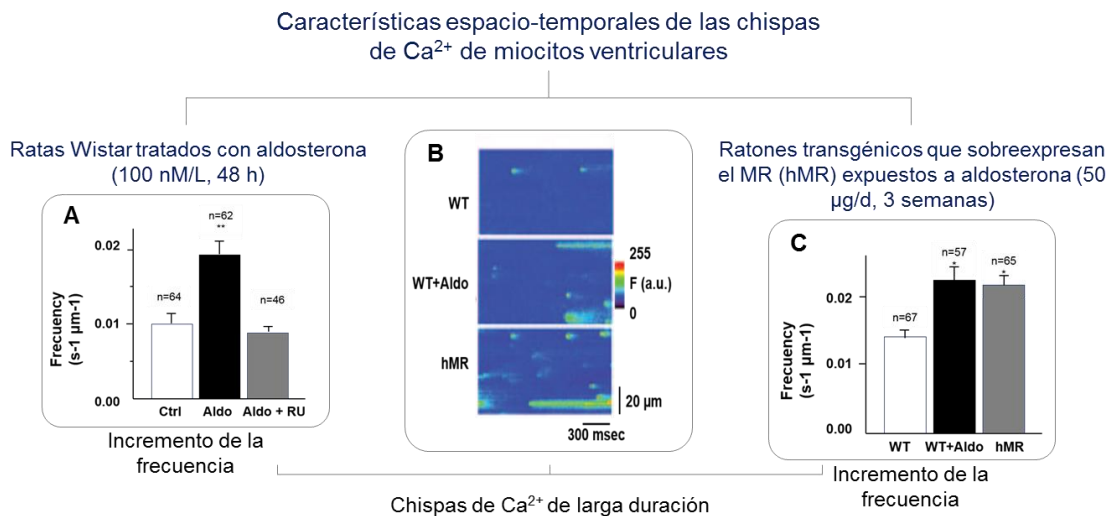
determinaron los niveles de expresión de los canales BKCa en arterias coronarias de ratones MAS mediante ensayos de RT-PCR, observando que la expresión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$  del canal BKCa se encontraba disminuida (**Figura 13**). Para descartar la limitación técnica de la presencia de diferentes tipos celulares que componen las arterias coronarias, estudiaron el efecto de la aldosterona en la expresión de los canales BKCa de MLVs en cultivo, y observaron una reducción en la expresión de ambas subunidades confirmando los datos obtenidos en arterias coronarias aisladas de ratones MAS.



**Figura 13. Efecto de la aldosterona en los niveles de las subunidades formadoras del canal BKCa.** **A**, Niveles de mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales BKCa en arterias coronarias de ratones que sobreexpresan la sintasa de aldosterona (MAS) y sus controles (MWT). **B**, Efecto de la incubación de MLVs con aldosterona en los niveles de mRNA de las subunidades formadoras de los canales BKCa. La expresión del mRNA fue determinada mediante análisis de qPCR. Valores normalizados a Gapdh (n=5-6 para cada grupo). (Tomado de Ambrosine *et al.*, 2007).

### 2.3. La aldosterona aumenta la frecuencia y promueve chispas de Ca<sup>2+</sup> de larga duración en miocitos ventriculares

Gómez y colaboradores examinaron las propiedades *in situ* de los RyRs al visualizar las chispas de Ca<sup>2+</sup> en miocitos ventriculares aislados de ratones transgénicos que sobreexpresan al receptor a mineralocorticoides de humano (hMR) o que fueron expuestos de manera crónica a aldosterona (50 µg/d, durante 3 semanas), así como de miocitos ventriculares de ratas Wistar incubados con aldosterona *in vitro* (100 nM/L, 48 h). Estos investigadores observaron que ambas condiciones experimentales incrementaban la frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup> de forma significativa (**Figura 14A y 14C**). De manera adicional a las chispas de Ca<sup>2+</sup> clásicas, caracterizadas por un incremento breve y localizado en la señal de fluorescencia (constante de decaimiento de ~30 ms y un diámetro de ~2 µm, Cheng *et al.*, 1993), observaron la aparición de chispas de Ca<sup>2+</sup> de mayor amplitud (>4 µm) y larga duración (>80 ms) (**Figura 14B**). La coincubación con el antagonista específico del GR, el RU28318, previno los cambios inducidos por aldosterona en las propiedades de las chispas de Ca<sup>2+</sup> (**Figura 14A**) (Gómez *et al.*, 2009).



**Figura 14. Cambios en la frecuencia y propiedades de las chispas de Ca<sup>2+</sup> inducidos por la activación del MR.** **A**, Frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup> en miocitos ventriculares de ratas Wistar (Ctrl; barra vacía) tratadas con aldosterona (Aldo 100 nM/L; barra color negro) y coincubadas con RU (Aldo+10µM RU28318, barra gris). **B**, Imágenes de chispas de Ca<sup>2+</sup> registradas en miocitos ventriculares de ratones WT (superior), tratadas con aldosterona (WT+Aldo; medio) y que sobreexpresan el MR humano (hMR; inferior). **C**, Comparación de la frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup> en células de ratones WT (barra vacía), tratadas con aldosterona (WT+Aldo; barra color negro) y que sobreexpresan el MR humano (hMR; barra color gris) (Modificado de Gómez *et al.*, 2009).

En conjunto estos resultados sugieren una participación directa de MR vascular en la regulación del Ca<sup>2+</sup> intracelular de MLVs por inducir cambios en la actividad y/o expresión de canales iónicos que participan en la contracción vascular y regulan el tono miogénico contribuyendo directamente a la regulación de la presión arterial, aunque se necesitan más estudios para determinar las bases moleculares de estas alteraciones.



### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los MLVs expresan el MR y poseen todos los componentes moleculares requeridos para las acciones directas y selectivas de aldosterona.

Sin embargo, no existen trabajos que evalúen el efecto de la activación del MR sobre la función *in situ* de los RyRs mediante el análisis de las características espacio-temporales de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVs.

### **4. HIPÓTESIS**

La activación del MR vascular modifica las características de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  por alterar la expresión del RyR, la bomba SERCA, los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y los CCDV.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

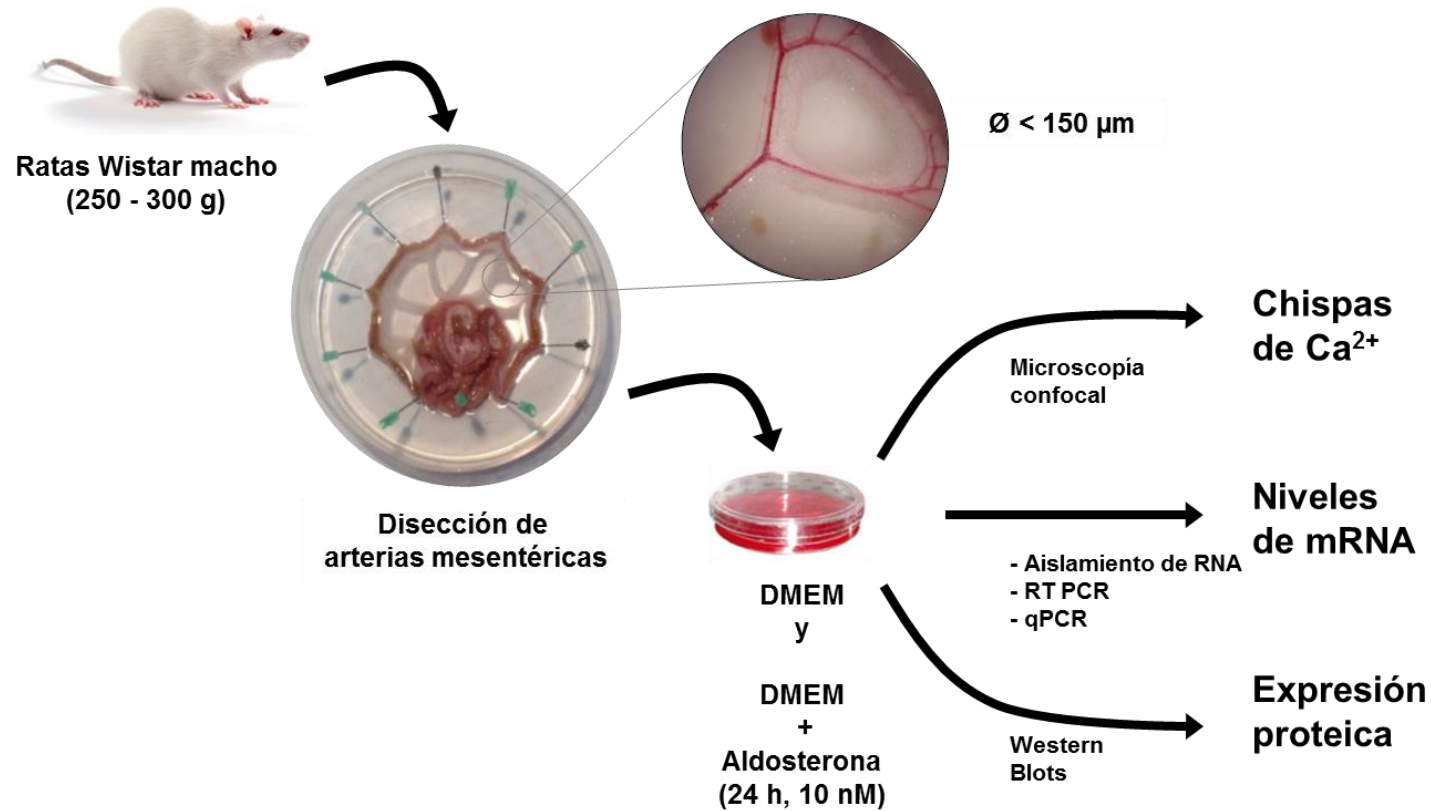
Evaluar el efecto de la activación del MR de arterias mesentéricas en las propiedades de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y la expresión de los RyR, la bomba SERCA, los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y los CCDV

### 5.2. Objetivos específicos

En arterias mesentéricas de ratas Wistar tratadas *ex vivo* con aldosterona (10 nM, 24 h) evaluar:

1. Las características espacio-temporales de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  que se generan de forma espontánea en los MLVs intactos.
2. Los niveles de mRNA del MR, las subunidades formadoras de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , la subunidad  $\alpha$  (Cav 1.2) de los CCDV, la bomba SERCA2 y el RyR2.
3. La expresión proteica de la subunidad  $\alpha$  (Cav 1.2) de los CCDV.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL



**Figura 15. Estrategia experimental.** Inicialmente se extrajo el mesenterio y se disecaron las arterias mesentéricas (diámetro  $<150 \mu\text{m}$ ), se incubaron 24 h a  $37^\circ\text{C}$  en medio DMEM + aldosterona (10 nM). Las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  se visualizaron en miocitos lisos de segmentos de arterias (3-5 mm) cargados con el indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  fluo-4 (10  $\mu\text{M}$ ), el resto del tejido se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  para realizar los análisis de PCR cuantitativa (qPCR) y western blot. Como control se utilizaron arterias incubadas únicamente con medio DMEM.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Obtención de las arterias mesentéricas

Ratas Wistar machos adultos (250-300 g) fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/Kg), posteriormente fueron sacrificadas por exanguinación de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (CICUAL) en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se extrajo el mesenterio de la cavidad abdominal, se lavó para retirar el exceso de sangre y colocó en una placa de disección que contenía solución salina fisiológica a una temperatura de 4 °C, con la siguiente composición (en mM) de: 80 Ác. Glutámico, 80 NaOH, 55 NaCl, 6 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glucosa, 10 HEPES, la solución se ajustó a pH 7.4 con NaOH. Se disectaron las arterias mesentéricas de 6-7 orden, y estas se limpiaron de tejido conectivo periférico y sangre. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 24 h en medio DMEM que contenía: 10 nM aldosterona, 100 U penicilina y 50 µg/ml estreptomina. Posterior a la incubación, varios segmentos de arterias de 3-5 mm y de un diámetro de 100-150 µm se cargaron con el indicador de Ca<sup>2+</sup> Fluo 4- AM (10 µM) disuelto en DMSO y ácido plurónico al 1%, durante 30 min a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, las arterias se montaron en una cámara de registro para visualizarlas en el microscopio confocal con una solución de registro con la siguiente composición (en mM) de: 122 NaCl, 20 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 10 HEPES, la solución se ajustó a pH 7.4 con NaOH. Como control se empleó medio DMEM sin aldosterona. El resto de las arterias se almacenó a -80°C para experimentos posteriores.

### 7.2. Registro de las chispas de Ca<sup>2+</sup>

Las chispas de Ca<sup>2+</sup> fueron visualizadas en los MLVs intactos y posteriormente fueron registradas en la modalidad de *line scan* utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 700) de acuerdo con el protocolo estandarizado por Rueda *et al.*, 2013. La excitación del fluoróforo se realizó por un láser de 488 nm y la emisión se registró a longitudes de onda >510 nm. Se tomaron únicamente

10 imágenes por cada célula y la intensidad del láser se mantuvo de 0.2 % a 0.5%. Se utilizó el software ZEN 2010 y se usó un objetivo Zeiss Aplanachromat 63 x oil immersion (apertura numérica 1.4). El pinhole fue ajustado a 151  $\mu\text{m}$ . El protocolo de imágenes se fijó a una profundidad de 8 bits y un tamaño de 512 x 512 píxeles, la duración de la línea fue de 3.05 ms. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20-23 °C).

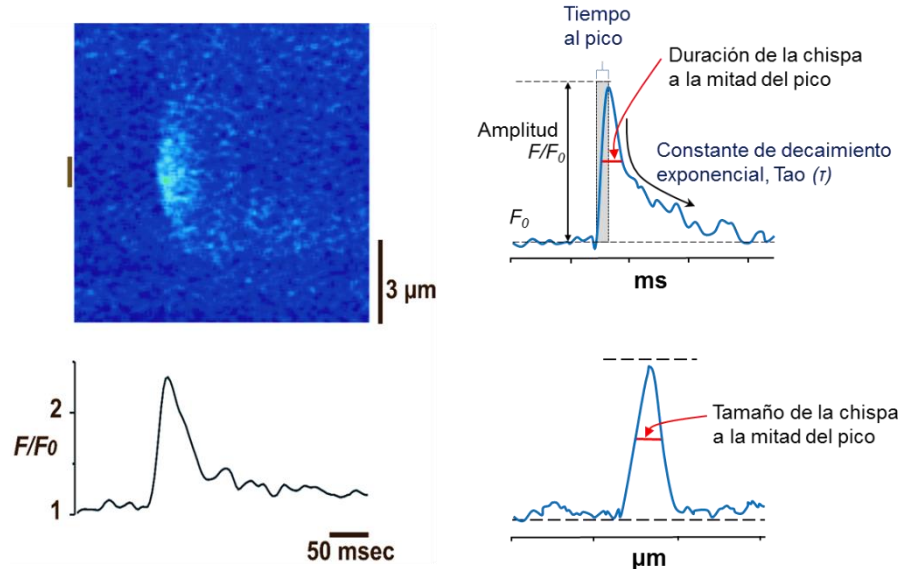
### 7.2.1. Análisis de imágenes

Las imágenes fueron procesadas y analizadas con el lenguaje de programación IDL (de acuerdo con el protocolo elaborado por Ana María Gómez (Inserm UMR-S769, Chatenay-Malabry, Francia). Los parámetros morfométricos de las chispas son aquellos que se relacionan a la duración y tamaño. La amplitud, se calcula como el cociente de la fluorescencia máxima entre la fluorescencia basal ( $F/F_0$ ); la duración se calcula como el tiempo al 50% de la amplitud del pico, en ms; y el tamaño se calcula como la longitud al 50% de la amplitud del pico, en  $\mu\text{m}$  (**Figura 16**).

La frecuencia de las chispas se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia (Eventos/s)} = \frac{\text{Num. de chispas registradas}}{(\text{Num. de registros por célula})(\text{Duración de la línea, s})}$$

Los parámetros cinéticos evaluados fueron: el tiempo al pico (tiempo transcurrido desde el inicio de la chispa hasta la fluorescencia máxima) y la constante de decaimiento exponencial ( $\tau$ ) determinada desde la fluorescencia máxima hasta un decaimiento del 66% con respecto al nivel basal.



**Figura 16. Propiedades espacio-temporales de las chispas de Ca<sup>2+</sup>.** Imagen de fluorescencia de una chispa de Ca<sup>2+</sup> con su respectivo perfil de fluorescencia (*izquierda*). Esquema de las características espacio-temporales de una chispa de Ca<sup>2+</sup> (*derecha*). La chispa de Ca<sup>2+</sup> se obtuvo en un microscopio confocal en el modo line scan proveniente de un miocito liso de arteria mesentérica.

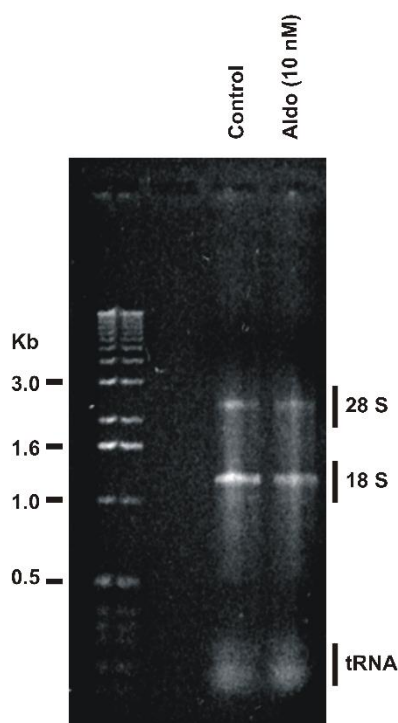
### 7.3. Determinación de los niveles de mRNA.

A continuación se describen los diferentes métodos experimentales que se utilizaron para las determinaciones de mRNA en arterias mesentéricas.

#### 7.3.1. Aislamiento del RNA

El RNA se extrajo de acuerdo con el protocolo Tri Reagent™ (Sigma) con algunas modificaciones. Se prepararon homogenados de arterias mesentéricas (tejido proveniente 3 ratas) con 500 μl de Tri-reagent en un homogenizador de vidrio (Potter-Elvehjem) durante 40 s a 400 rpm hasta obtener una suspensión homogénea, la suspensión se incubó 5 min. a temperatura ambiente seguido de una centrifugación a 12 000 g por 10 min. a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se adiciono 100 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 10 min. a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de reposo se centrifugó nuevamente

a 12,000 g por 10 min. a 4°C, se recuperó la fase acuosa, que contiene el RNA total, y se adicionó 250 µl de isopropanol; se mezcló por inversión y se dejó en reposo 10 min. a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de reposo se centrifugó a 12 000 g por 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante por decantación evitando despegar la pastilla, se resuspendió con 500 µl de etanol al 70 % en agua Depc (Dietilpirocarbonato) y centrifugó a 12 000 rpm por 10 min. a 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante un tiempo no mayor a 5 min y finalmente se resuspendió en 20 µl de agua Depc. El RNA aislado se sometió a digestión con DNasa (0.5 U) con un tiempo de activación de 20 min. a 37 °C, e inactivación 10 min. a 75 °C. La integridad se verificó en un gel de agarosa al 1% en TBE (en mmol/L: Tris base 89, Ácido bórico 89, EDTA 2 pH 8), donde se cargaron 500 ng de RNA. Las cantidades de RNA fueron determinadas por densidad óptica en un espectrofotómetro a 260 nm en luz UV. Como blanco se utilizó agua Depc.



**Figura 17. Extracción de RNA total.** Imagen representativa de un gel de verificación de la integridad de RNA (agarosa al 1%). Se cargaron 500 ng de RNA posterior al tratamiento con DNasa (0.5 U). El RNA se extrajo de acuerdo con el protocolo Tri Reagent™ (Sigma®, San Louis, Missouri USA) con ligeras modificaciones.



### 7.3.2. Transcripción inversa

La transcripción inversa del RNA de arterias mesentéricas se realizó con el kit SuperScrip™ II Reverse Transcriptasa (Invitrogen) en un termociclador Gene Amp (Applied Biosystem). De acuerdo con las especificaciones del proveedor, se preparó un volumen de reacción inicial de 12 µl que contenía 1 µl de Oligo dT (15 µg/ml), 1000 ng de RNA total, 1 µl de mezcla de dNTP's (10 mM cada uno) y agua Depc, se incubó a 65°C por 5 minutos, posterior a la incubación se enfrió a 4 °C y el contenido del tubo se colectó mediante una breve centrifugación, se adicionó una segunda mezcla que contenía 4 µl de buffer 5X First-Strant (142 mM Tris-HCl, pH 8.3 a temperatura ambiente; 214 mM KCl; 8.5 mM MgCl<sub>2</sub>); 2 µl de DTT (0.1 M) y 1 µl de RNAsin (40 U/µl) (un inhibidor de RNAsas), se mezcló suavemente y se incubó a 42°C durante 2 minutos. A esta nueva mezcla se adicionó 1 µl de SuperScrip™ II RT (0.1 U) y se incubó a 42°C durante 50 minutos, posterior a la incubación la reacción se inactivó a 70 °C por 15 minutos. Finalmente, se eliminó el RNA excedente de la mezcla incubándola a 37 °C durante 20 minutos con 2.5 µl de RNasa A (10 µg/ml). El cDNA resultante se amplificó por PCR con primers sentido y antisentido (10 pmol/ µl cada uno) específicos para los genes de interés (Tabla 1), 2.5 µl de Buffer 10X de MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/µl) y H<sub>2</sub>O estéril para completar un volumen de reacción de 25 µl. La PCR consistió de 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C, 1 minuto a 72°C y un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos esperados de la RT-PCR se verificaron en un gel de agarosa al 2% (p/v), se empleó buffer TAE 1X, las condiciones de corrida fueron 100 V, 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.03 mg/ml) y se visualizó en un transiluminador de UV.

Tabla 1. Primers usados para la detección de los transcritos en arterias mesentéricas.

Gen	Nº de acceso	Primer	Tm (° C)	Secuencia	Longitud	Producto esperado (pb)
<b>Kcnma1</b>	NM_031828.1	F	65.4	5´- AAA CAA GTA ATT CCA TCA AGC TGG TG -3´	26	137
		R	66.5	5´- CGT AAG TGC CTG GTT GTT TTG G -3´	22	
<b>Kcnmb1</b>	NM_019273.1	F	68.1	5´- ACC AAT CTC TTC TGC ACA GCA GC -3´	23	189
		R	68.1	5´- AGA GCT GTG ACT GGC AGT TCC TT -3´	23	
<b>Cacna1a</b>	XM_008763216.1	F	66.5	5´- TTC CCA ACT GGA GTC ACA ATG -3´	21	88
		R	57.30	5´- TGT CCT CAG ACA GGC AAC TG -3´	20	
<b>Cacna1b</b>	XM_006237175.2	F	58.47	5´- GAA GGG AGC AAG AAC CAC TG -3´	20	148
		R	56.31	5´- GCC AAA AAC TGC TTG GAA AG -3´	20	
<b>Cacna1c</b>	XM_008763216.1	F	58.57	5´- CTT GCT GTC TCC CGA GTT TC -3´	20	90
		R	57.67	5´- ATG CAG CAT CAC GGT CAT TA -3´	20	
<b>Nr3c2</b>	NM_013131.1	F	57	5´- CAT TCC AGA AAA CGT GTC AA -3´	20	95
		R	60	5´- AAG CCT CAT CTC CAC ACA CC -3´	20	
<b>Ryr2</b>	NM_032078.2	F	61	5´- CAA ACA GGG CAG AAG ACA CC -3´	20	103
		R	60	5´- CTC TGA GGG TGC TCC ACC T -3´	19	
<b>Atp2a2</b>	NM_001110139.2	F	59	5´- ACC TGG AAG ATT CTG CGA AC -3´	20	86
		R	60	5´- AAT CCT GGG AGG GTC CAG -3´	18	
<b>Sgk1</b>	NM_019232.3	F	59.83	5´- CTG CTC GAA GTA CCC TCA CC -3´	20	128
		R	57.14	5´- GCA TGC ATA GGA GTT GTT GG -3´	20	
<b>Sm22</b>	NM_031549.2	F	59.97	5´- GTT TGG CCG TGA CCA AGA AC -3´	20	129
		R	61.65	5´- GGA GGC CAA TGA CGT GCT TC -3´	20	
<b>Rpl32</b>	NM_013226.2	F	57.43	5´- GCT GCT GAT GTG CAA CAA A -3´	19	115
		R	57.66	5´- GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG -3´	20	
<b>Ywhaz</b>	XM_006241529.2	F	58.58	5´- AGA CGG AAG GTG GTG AGA AA -3´	20	127
		R	54.82	5´- GAA GCA TTG GGG ATC AAG A -3´	19	

### **7.3.3. PCR cuantitativa en tiempo real**

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó con la sonda fluorescente SYBR Green (Qiagen) en un equipo Rotor-Gene Q, serie 2.0.2 (Qiagen) De acuerdo con las especificaciones del proveedor se preparó una mezcla con volumen final de 12.5  $\mu$ l con los siguientes componentes: 6.24  $\mu$ l de SYBR Green™, 25 ng de cDNA y 0.64  $\mu$ M de cada uno de los primers para los genes de interés. La qPCR se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: 2 minutos a 40 °C, 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 10 segundos a 72°C y 1 una rampa de 60-95°C con incrementos de 1 °C en cada paso. Los genes que codifican para la proteína L32 ribosomal 60S (*Rpl32*), la proteína de músculo liso alfa-22 (*Sm22*) y la proteína zeta/delta 14-3-3 (*Ywhaz*) fueron seleccionados como genes de referencia (Sabourin *et al.*, 2016). La ecuación de Pfaffl (Pfaffl 2001) incluyendo la normalización a la media geométrica del nivel de mensajero de los genes de referencia seleccionados se empleó para la cuantificación. Los valores de expresión de mRNA fueron expresados relativo al mRNA de arterias control. La especificidad de los primers se determinó mediante un gel de agarosa (2 %) de los productos de PCR y mediante el análisis de las curvas de alineamiento.

## **7.4. Expresión proteica**

### **7.4.1. Western Blot**

Se prepararon homogenados a partir de arterias mesentéricas almacenadas a -80 °C en un homogenizador (Potter-Elvehjem) con solución de homogenización con la siguiente composición: Tris base 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA (pH 8.0) 0.1 mM, EGTA (pH 8.0) 0.1 mM, Leupeptina 12  $\mu$ M, PMSF 0.1 mM, Benzamidina 0.5 mM y Aprotinina 10  $\mu$ g/ml. Se realizaron 5 pulsos de 45 s a una velocidad de 400 rpm con reposos de 30 s entre cada pulso. Se dejó reposar durante 15 min y se repitieron los pasos anteriores (las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso). El volumen de solución de homogenización inicial fue 150  $\mu$ l con incrementos de 50  $\mu$ l hasta alcanzar un volumen final de 250  $\mu$ l. Finalmente después

de una centrifugación a 1000 g por 10 min. 4 °C se colectó el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford, como estándar se utilizó suero albumina bovina.

Las muestras se incubaron por 20 min. a 37°C en buffer de carga 6X en una relación de volumen de 5:1, con la siguiente composición: Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 65.5 mM; Glicerol, 10 %; SDS, 2 %; β-mercaptoetanol, 5 % y bromofenol, 1%. La proteína de las muestras fue separada por electroforesis en un gel discontinuo de 4, 8 y 12 % de poliacrilamida. Se cargaron cantidades equivalentes (7 µg) de proteína total proveniente del sobrenadante de homogenados de arterias mesentéricas tratadas con aldosterona y sus respectivos controles. Se utilizó un marcador de alto peso molecular de (10 a 200 kDa). Las condiciones de corrida fueron 90 V durante 1 h, seguido de 100 V por aproximadamente 1.5 h a temperatura ambiente (~25 °C). Después de la separación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en una cámara de electroforesis húmeda a 100 V por 2 h a 4°C. las membranas fueron bloqueadas con 5 % de leche descremada en buffer de fosfatos-Tween 20 0.1 % (PBS-T) por 1 h a temperatura ambiente, y lavadas con PBS-T (3 lavados de 10 min.) Subsecuentemente las membranas fueron incubadas por 2 h a 37 °C con un anticuerpo policlonal dirigido contra la región N-terminal de Cav 1.2 α-1c (dilución 1:200) (Millipore) y Gapdh (dilución 1:100 000) (Ambion) después de 3 lavados de 10 min. con PBS-T las membranas se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con IgG anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano (dilución 1:5000) finalmente se realizaron 3 lavados de 10 min. con PBS-T. Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia, y se determinó la cantidad de proteína mediante densitometría en un equipo KODAK Image Station.

La composición del PBS fue la siguiente en mM: NaCl, 137; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 y KCl, 2.7, pH 7.4.

### **7.5. Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteína de los homogenados de arterias mesentéricas se determinó por el método de Bradford, con una curva de calibración de albumina sérica bovina. En una microplaca se depositaron 5  $\mu$ l de homogenados, 5  $\mu$ l de agua miliQ y 250  $\mu$ l de reactivo de Bradford 1x, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas EPOCH (BIOTEK).

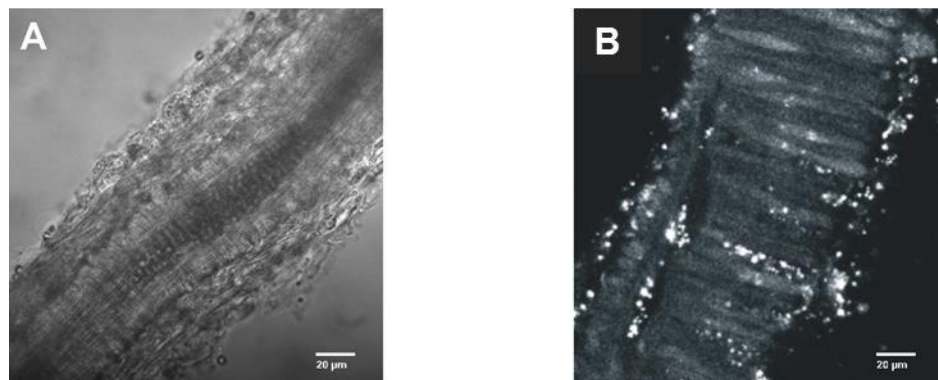
### **7.6. Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Los datos fueron analizados con la prueba de *T*-test con el programa Origin Pro 8. Aquellos valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. La aldosterona modifica las propiedades espacio-temporales de las chispas de $\text{Ca}^{2+}$ de MLVs

Las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  representan la apertura espontánea y coordinada de un número indeterminado de RyRs dentro de un clúster (Jaggar *et al.*, 1998). Su frecuencia y propiedades espacio-temporales, por ejemplo: la amplitud, duración y tamaño, reflejan la actividad *in situ* de los RyRs (Shen *et al.*, 2004). Para investigar el efecto de la activación del MR vascular de arterias mesentéricas incubadas *ex vivo* con aldosterona (10 nM, 24 h) en la función *in situ* de los RyRs analizamos las características de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de MLVs en segmentos de arterias mesentéricas cargadas con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 y mediante microscopia confocal. La **Figuras 18A y 18B** muestran imágenes representativas de segmentos de arterias mesentéricas observadas con luz transmitida y de fluorescencia, respectivamente. En la Figura **18B** se puede observar la capa de tejido constituida mayoritariamente por miocitos lisos.



**Figura 18. Imágenes de microscopia confocal.** Imagen de luz transmitida (**A**) y fluorescencia (**B**) de segmentos de arterias mesentéricas cargada con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo 4 (10  $\mu\text{M}$ ). Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, Jena, Germany), se usó un objetivo Zeiss Aplanachromat 63 x oil immersion (apertura numérica 1.4). La barra horizontal en el fondo representa la escala de cada imagen.

Los registros de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizaron de manera aleatoria en segmentos de arterias provenientes de diferentes animales. De las imágenes obtenidas (**Figura 19A**) determinamos que el 69 % de los MLVs de arterias control presentaron chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneas, mientras que en el caso de arterias tratadas con aldosterona este porcentaje fue del 72% (**Tabla 2**). Al realizar un análisis de la cantidad de chispas registradas por célula observamos que aldosterona induce un incremento en la aparición de estos eventos locales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chispas por célula:  $6.4 \pm 0.68$  en control vs.,  $14.0 \pm 2.12$  en presencia de Aldo 10 nM. **Tabla 2**). Estos datos indican que la aldosterona incrementa la incidencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero no incrementa el número de células que presentan estos eventos.

Tratamiento	Células Registradas	Células con chispas	Células sin chispas	Chispas por célula	Muestras <sup>1</sup>
<b>Control</b>	58	40	18	$6.4 \pm 0.68$	4
<b>Aldo (10 nM)</b>	60	43	17	$14.0 \pm 2.12^*$	4

<sup>1</sup> Tejido proveniente de 3 ratas

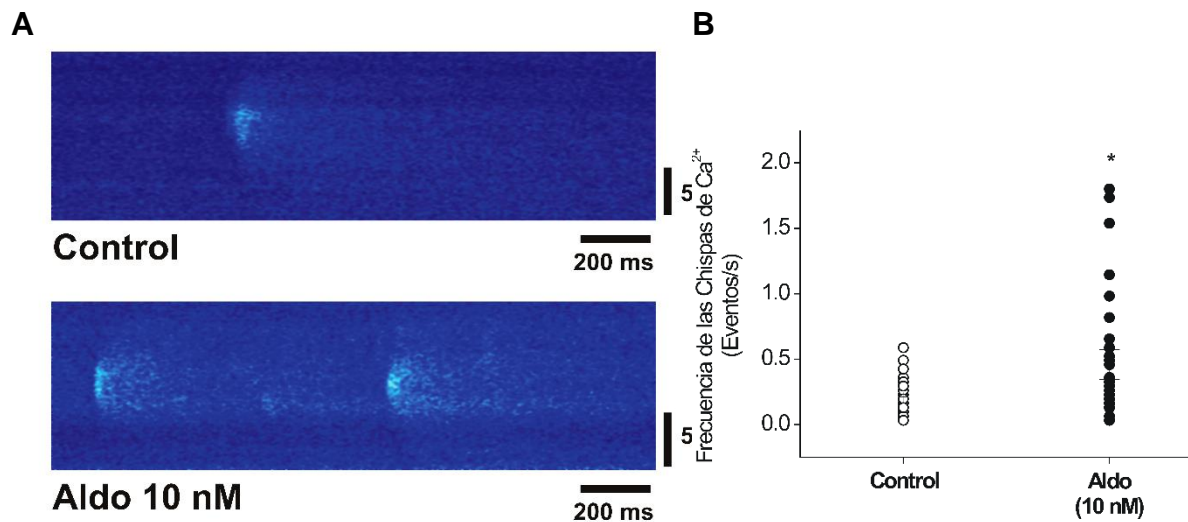
\* $P < 0.05$

**Tabla 2. Registro de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en miocitos lisos.** Datos provenientes de arterias control y tratadas con aldosterona. Cada muestra proviene del tejido de 3 ratas. Los registros se realizaron de manera aleatoria en segmentos de arterias diferentes.

Un análisis detallado de las propiedades espacio-temporales de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Tabla 3**) reveló que la frecuencia de las mismas incrementó 2.3 veces en las células tratadas con aldosterona en comparación con las células control, corroborando también de esta manera que la aldosterona incrementa la incidencia de estos eventos locales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo un análisis detallado de los datos sugieren que podrían existir dos poblaciones de células, unas que responden a aldo y otra que no lo hace (**Figura 19B**). También se observó que el tratamiento con aldosterona incrementó el tamaño de las chispas en un 11.1% (**Figura 21A**), mientras que disminuyó la amplitud de las mismas en un 15.1 % (**Figura 21C**).

Propiedades de las chispas de Ca <sup>2+</sup>	Control	Aldosterona (10 nM, 24 h)
<b>Frecuencia (Eventos/s)</b>	0.21 ± 0.02 (39)	0.49 ± 0.07 (43)**
<b>Duración (ms)</b>	76 ± 0.82 (185)	89.50 ± 5.40 (313)
<b>Tamaño (μm)</b>	1.92 ± 0.06 (185)	2.13 ± 0.05 (313)*
<b>Amplitud (F/F<sub>0</sub>)</b>	2.18 ± 0.05 (185)	1.85 ± 0.03 (313)*
<b>Tiempo al pico (ms)</b>	44.87 ± 3.46 (185)	44.07 ± 3.14 (313)
<b>Constante de decaimiento exponencial, τ (ms)</b>	80.68 ± 8.12 (185)	94.67 ± 12.12 (313)

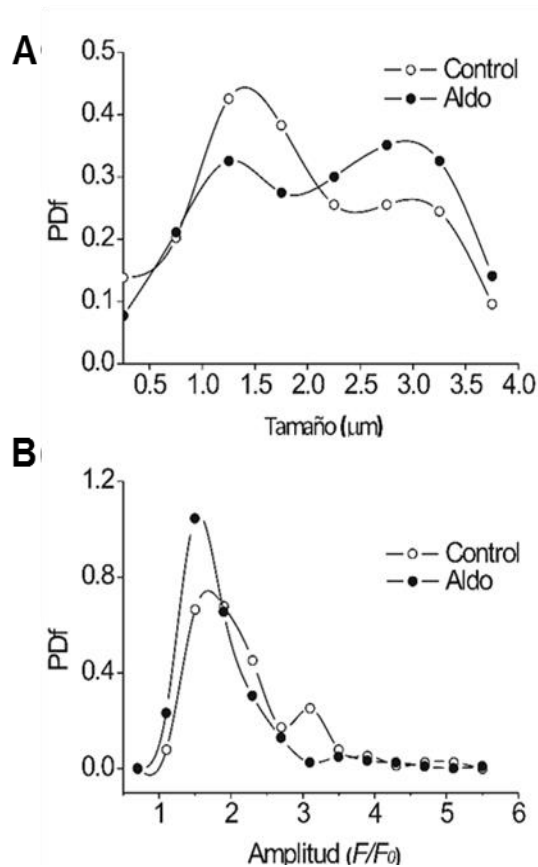
**Tabla 3. Características de las chispas de Ca<sup>2+</sup>.** Datos de las propiedades de las chispas de Ca<sup>2+</sup> determinadas en miocitos lisos de arterias mesentéricas. Los valores representan la media ± el error estándar. Los valores entre paréntesis representan células (frecuencia) y eventos de Ca<sup>2+</sup> (duración tamaño, amplitud, tiempo al pico y la constante de decaimiento exponencial). \*P<0.05, \*\*P<0.01



**Figura 19. Análisis de la frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup>.** Imágenes de chispas de Ca<sup>2+</sup> obtenidas en modo *line scan* de miocitos lisos provenientes de arterias control (*imagen superior, A*) y tratadas con aldosterona (*imagen inferior, A*). Comparación de la frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup> (**B**) en miocitos lisos de arterias control (*n*=39, *Figuras vacías*) y tratadas con aldosterona (*n*=42, *Figuras llenas*). Los valores entre paréntesis sobre las barras en B indican células analizadas. Los datos representan la media ± el error estándar. \* P<0.01

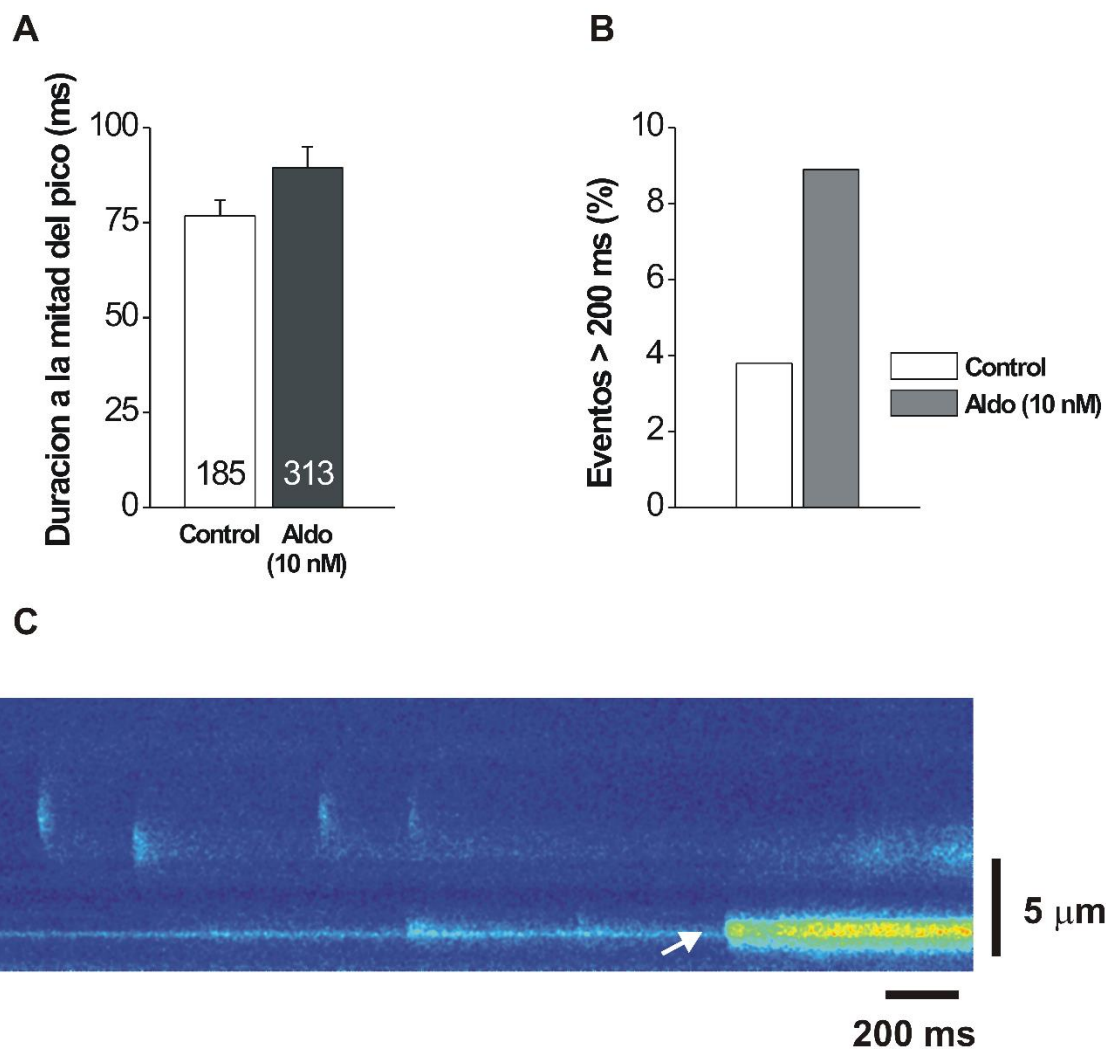


El histograma de distribución normalizado (PDF por las siglas en inglés de *Probably density function*) de los tamaños (**Figura 20A**) y las amplitudes de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 20B**) reflejó que el tratamiento con aldosterona incrementó el número de chispas con tamaños entre 2.5 y 3.5  $\mu\text{m}$ , reduciendo aquellas de tamaños entre 1.0 y 2.0  $\mu\text{m}$  (**Figura 20A**). Por otra parte, el histograma de distribución normalizado de las amplitudes de las chispas mostró que la aldosterona incrementó el número de chispas con amplitudes de  $\sim 1.5 F/F_0$  en detrimento de aquellas chispas con amplitudes  $> 2.0 F/F_0$  (**Figura 20B**).



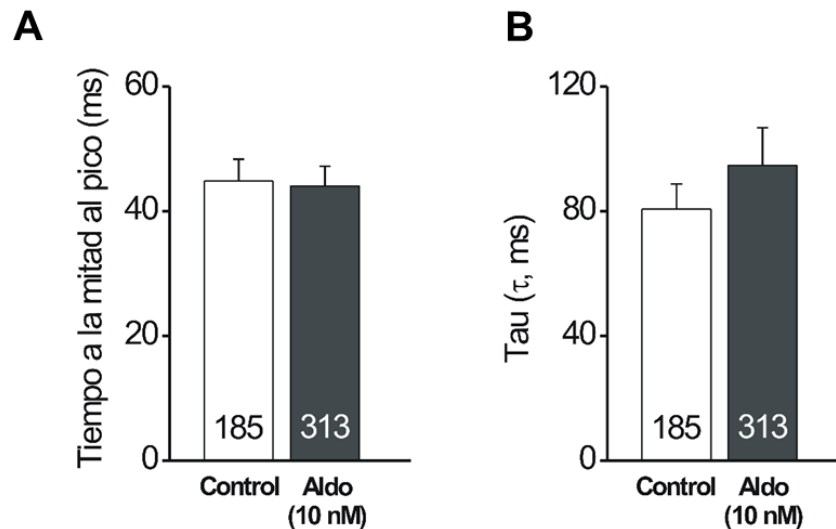
**Figura 20. Análisis del tamaño y amplitud de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Comparación del tamaño y la amplitud de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Función de densidad de probabilidad (PDF) de los tamaños (**A**) y amplitudes (**B**) de las chispas en MLVs de arterias control ( $n=185$ , círculos vacíos) y tratadas con aldosterona, 10 nM ( $n=313$ , círculos color llenos). Las curvas representan funciones gaussianas ajustada a los datos.

En cuanto a la duración de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ , el tratamiento con aldosterona no modificó esta característica de manera significativa (**Figura 21A**); sin embargo, un análisis más detallado mostró un incremento de 2.3 veces en la aparición de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de duración prolongada ( $>200$  ms) tras el tratamiento con aldosterona (**Figura 21B y 21C**).



**Figura 21. Análisis de la duración de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Comparación de la duración de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ , en MLVs de arterias control (*barras vacías*) y tratadas con aldosterona (*barras llenas*) (**A**). Los números sobre las barras indican el número de chispas analizadas. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar. Aldosterona incrementa la aparición de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de duración prolongada (**B**). Imagen bidimensional de microscopía confocal de un MLVs de un segmento de arteria tratada con aldosterona donde se ilustran chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de duración normal y chispas de duración prolongada (**C**, *Flecha blanca*). Los porcentajes fueron calculados analizando los números de eventos en descritos en A.

No se observaron cambios en el tiempo al pico ni en la constante de decaimiento exponencial de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  registradas en MLVs tras el tratamiento con aldosterona (**Figura 22A y 22B**).



**Figura 22. Análisis de las características cinéticas de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Comparación del tiempo a la mitad del pico (**A**), la tau (**B**) de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en miocitos lisos de arterias control (*barras vacías*) y tratadas con aldosterona (*barras llenas*). Los números sobre las barras indican chispas analizadas. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar. \*  $P < 0.05$

Los resultados obtenidos son consistentes con otros estudios en los cuales han reportado que aldosterona incrementa la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  e induce la aparición de chispas de larga duración (Gómez *et al.*, 2009). Sin embargo, nosotros observamos una disminución en la amplitud de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual no ha sido reportado con anterioridad.

## 8.2. Los miocitos lisos de arterias mesentéricas poseen un MR vascular funcional activado por aldosterona

Los efectos genómicos de aldosterona comprenden la unión de aldosterona al MR intracelular y la translocación del complejo MR:aldosterona al núcleo donde actúa como un regulador de la expresión génica de proteínas blanco (Lombes *et al.*,

2000). Entre los genes evaluados se incluyó como un control positivo de los efectos genómicos de aldosterona: la cinasa inducible por glucocorticoides y suero (*Sgk1*), un miembro de la familia de genes de la proteína cinasa de serina/treonina (Lombes *et al.*, 2000). El mRNA de *Sgk1* es expresado en la mayoría de los tejidos de rata adulta y codifica una proteína de 49 kDa. Esta proteína aumenta con el tratamiento con glucocorticoides de una manera paralela a la acumulación de su mRNA. Además de los glucocorticoides y suero se ha descrito que otras hormonas y mediadores incrementan la transcripción de *Sgk1* incluyendo a los mineralocorticoides. La regulación transcripcional de *Sgk1* es una respuesta primaria, ya que su promotor contiene un elemento de respuesta a glucocorticoides consenso que es compartido por el MR (Webster *et al.*, 1993). Por lo tanto, para evaluar la funcionalidad del MR vascular nos planteamos determinar los niveles de mRNA de *Nr3c2* (gen del MR) y de *Sgk1* mediante análisis de qPCR en tiempo real a partir de arterias mesentéricas incubadas 24 h con aldosterona 10 nM, comparados con arterias incubadas 24 h con vehículo (control).

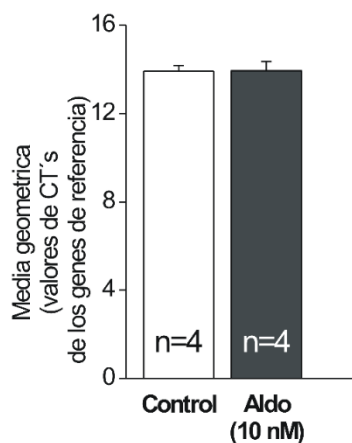
Previo a la determinación de los cambios en *Nr3c2* y *Sgk1* validamos que los niveles de mRNA de los genes de referencia seleccionados (*Rpl32*, *Sm22* e *Ywhaz*) no cambiaran de manera significativa con el tratamiento de aldosterona, mediante el análisis de los valores de CT's (*threshold cycle*, ciclo de umbral de detección) de las reacciones de qPCR en arterias control y con tratamiento (Aldo 10 nM). Corroboramos que efectivamente la aldosterona no modificó los valores de CT's (**Tabla 4**) ni la media geométrica de los mismos (**Figura 23**).

Nosotros empleamos la media geométrica de los valores de los CT's de las reacciones de qPCR de los genes de referencia seleccionados (*Rpl32* e *Ywhaz* genes que se expresan de manera constitutiva en las células y *Sm22* como un marcador de células de músculo liso) para calcular los niveles de expresión de los genes evaluar. La media geométrica considera todos los valores de la distribución y es menos sensible que la media aritmética a los valores extremos. Empleamos la media geométrica por razones de comparación de nuestros resultados con trabajos similares realizados en arterias coronarias (datos no mostrados) en colaboración

con el Dr. Jean Pierre Benitáh (Inserm, U769; Université de Paris-Sud, IFR141, Labex Lermite, Châtenay-Malabry, France). Es de notarse que el uso de la media geométrica es poco común para cálculos de este tipo, siendo más común el uso de la media aritmética o promedio; sin embargo, nuestros resultados muestran que el valor de ambas medias (geométrica y aritmética) es similar, tanto en arterias control como en aquellas tratadas con aldosterona (**Tabla 5**).

Gen	Proteína que codifica	Valores de CT's			
		Control	n	Aldo 10 nM	n
<b>Rpl32</b>	Proteína Ribosomal L32	12.1 ± 0.4	4	11.9 ± 0.4	4
<b>Ywhaz</b>	Tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa Proteína de activación zeta	15.2 ± 0.3	4	14.8 ± 0.4	4
<b>Sm22</b>	Transgreлина-2	14.7 ± 0.2	4	15.4 ± 0.7	4

**Tabla 4. Genes de referencia.** Valores de CT's (*threshold cycle*, ciclo de umbral de detección) de *Rpl32*, *Sm22* e *Ywhaz* en arterias control y tratadas con aldosterona. No se observaron cambios significativos ( $P > 0.05$ ).



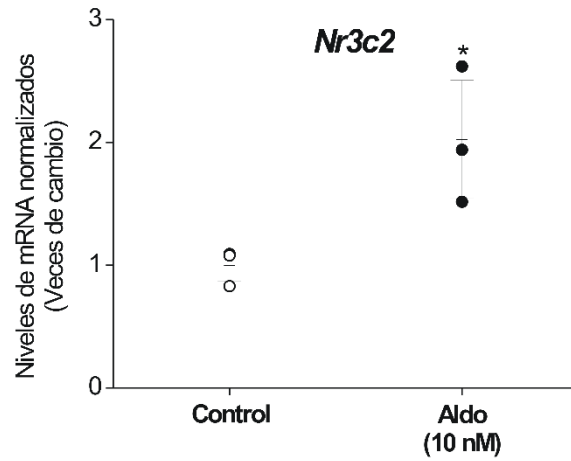
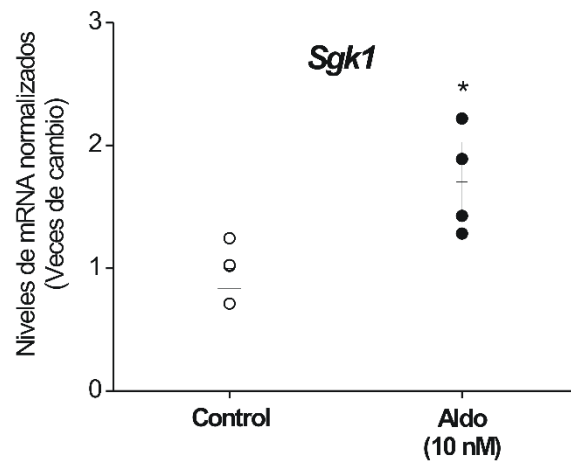
**Figura 23. Genes de referencia.** Media geométrica de los valores de CT's (*threshold cycle*, ciclo de umbral de detección) de *Rpl32*, *Sm22* e *Ywhaz*; obtenidos de análisis de qPCR en arterias mesentéricas control (*barras vacías*) y tratadas con aldosterona, 10 nM (*Barras llenas*). No se observaron cambios significativos.

Control		Aldo 10 nM	
MG	MA	MG	MA
13.92±0.26 (4)	13.98±0.26 (4)	13.93±0.42 (4)	14.02±0.42 (4)

**Tabla 5. Cálculo de los valores de CT's de los genes de referencia.** Valores de CT's (*threshold cycle*, ciclo de umbral de detección) de los genes de referencia seleccionados (*Rpl32*, *Sm22* e *Ywhaz*) en arterias control y tratadas con aldosterona. Valores calculados mediante la MG (*Media geométrica*) y la MA (*Media aritmética*). No se observaron diferencias significativas entre los valores calculados por distintos métodos, ni por el tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de *n* experimentos representados entre paréntesis.

Confirmada la confiabilidad de los genes de referencia, el cambio relativo en los niveles de mRNA de los genes de interés por el tratamiento con Aldo, se calculó mediante la ecuación de Pfaffl y se normalizó con respecto a los valores obtenidos en las arterias sin tratamiento.

Nuestros datos muestran un incremento significativo en los niveles de transcritos de ambos genes *Nr3c2* y *Sgk1* de 2.02 y 1.7 veces respectivamente tras el tratamiento con aldosterona (**Figura 24A y 24B**). Estos datos concuerdan con estudios previos en arterias coronarias y en cultivos celulares, que han demostrado el efecto directo de aldosterona para activar al MR vascular a concentraciones fisiológicas (1 nM) y patológicas (10 nM), y regular la expresión génica de proteínas blanco (Lombes *et al.*, 2000; Jaffe y Mendelsohn 2005; Newfell *et al.*, 2011). Mientras que el incremento en la cantidad de transcritos de *Nr3c2* sugiere que aldosterona ejerce un efecto de regulación positiva sobre la transcripción del propio receptor. Esto ha sido reportado con anterioridad a nivel de proteína en otros tipos celulares (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2012), pero no en MLVs.

**A****B**

**Figura 24. Efecto de aldosterona sobre la expresión del MR y SGK1.** Niveles de expresión del mRNA de *Nr3c2* (**A**) y *Sgk1* (**B**) determinados mediante análisis de qPCR en arterias mesentéricas control (*círculos vacíos*) y tratadas con aldosterona, 10 nM (*Círculos llenos*). Valores normalizados a la media geométrica de la expresión del mRNA de *RPL32*, *SM22* e *YWHAZ*. \*  $P < 0.05$  vs control.

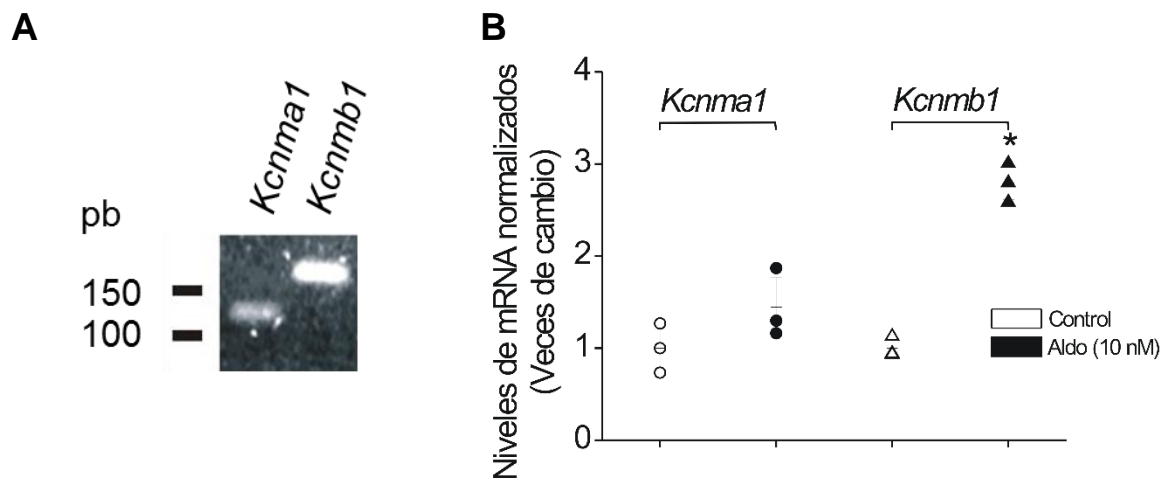
### 8.3. La aldosterona regula la expresión de genes que codifican a proteínas involucradas en la regulación del Ca<sup>2+</sup> en MLVs

Los canales iónicos median el influjo de Ca<sup>2+</sup> y la salida de K<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática de los MLVs (Joseph *et al.*, 2013). La interacción dinámica de los CCDV, los canales BK<sub>Ca</sub> en conjunto con la actividad de la bomba SERCA y los RyRs forma una unidad funcional que regula las propiedades espacio-temporales de las chispas de Ca<sup>2+</sup> (Essin y Gollasch, 2009). Un cuerpo creciente de evidencias indica que aldosterona vía el MR induce alteraciones en la expresión de canales iónicos en miocitos lisos en diferentes camas vasculares (Ambroisine *et al.*, 2007; McCurley *et al.*, 2012).

Para evaluar la posibilidad de que las alteraciones observadas en las características espacio-temporales de las chispas de Ca<sup>2+</sup> por aldosterona se relacionan con modificaciones en la expresión y/o actividad de las proteínas que regulan el Ca<sup>2+</sup> intracelular, nos planteamos determinar la cantidad de transcritos de los genes *Kcnma1* y *Kcnmb1* correspondientes a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales BK<sub>Ca</sub>, las isoformas vasculares de la subunidad  $\alpha$ -1c formadora del poro de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (Cav1.2-Ex1a, Cav1.2-Ex1b y Cav1.2-Ex1c), el RyR2 (*Ryr2*) y la bomba SERCA (*Atp2a2*) mediante análisis qPCR.

Uno de los mecanismos que inactivan a los CCDV y desencadenan la relajación en los MLVs es la activación de las corrientes salientes y espontáneas de K<sup>+</sup> vía los canales BK<sub>Ca</sub>, las cuales dependen de las chispas de Ca<sup>2+</sup> (Pérez *et al.*, 1999; Ledoux *et al.*, 2006;). De esta manera, para determinar si los transcritos del canal BKCa también se modifican por efecto del tratamiento con aldosterona medimos los cambios en la cantidad de mensajero de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal (genes *Kcnma1* y *Kcnmb1*, respectivamente). Observando un incremento la cantidad de mensajero de *Kcnmb1* sin cambios en *Kcnma1* (**Figura 25B**).



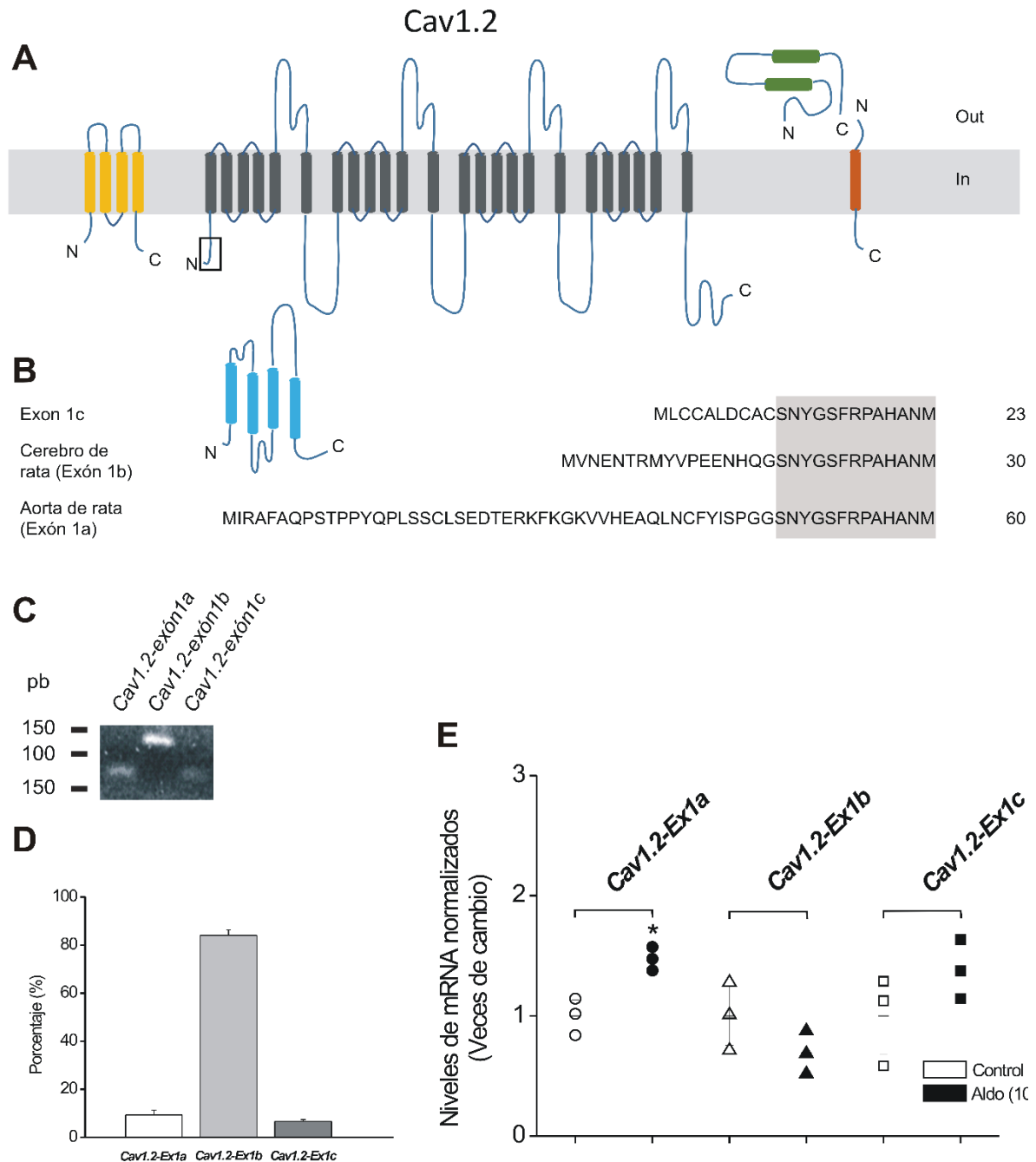


**Figura 25. Expresión del mRNA de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de los BKCa.** Análisis representativo de productos de PCR punto final de las subunidades  $\alpha$  (*carril 1*) y  $\beta$  (*carril 2*) de los BKCa (**A**). Niveles de expresión del mRNA de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de los BKCa determinados mediante análisis de qPCR en arterias mesentéricas control (*figuras vacías*) y tratadas con aldosterona, 10 nM (*figuras llenas*) (**B**). Valores normalizados a la media geométrica del nivel de mensajero de los genes de referencia seleccionados. \*  $P < 0.05$  vs su respectivo control.

Los canales CCDV son la principal entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cav 1.2) en los miocitos arteriales (Gollash y Nelson 1997). El gen de Cav 1.2 puede ser sometido a splicing alternativo en 19 de 55 exones o bien a cambios en el sitio de inicio de la transcripción conduciendo a una diversidad estructural y funcional (Tang *et al.*, 2004) que genera 37 isoformas en humano y al menos 5 isoformas en rata. Los miocitos de arterias de resistencia pueden expresar también diferentes isoformas de las otras subunidades que constituyen al canal completo confiriéndole propiedades biofísicas tejido-específicas.

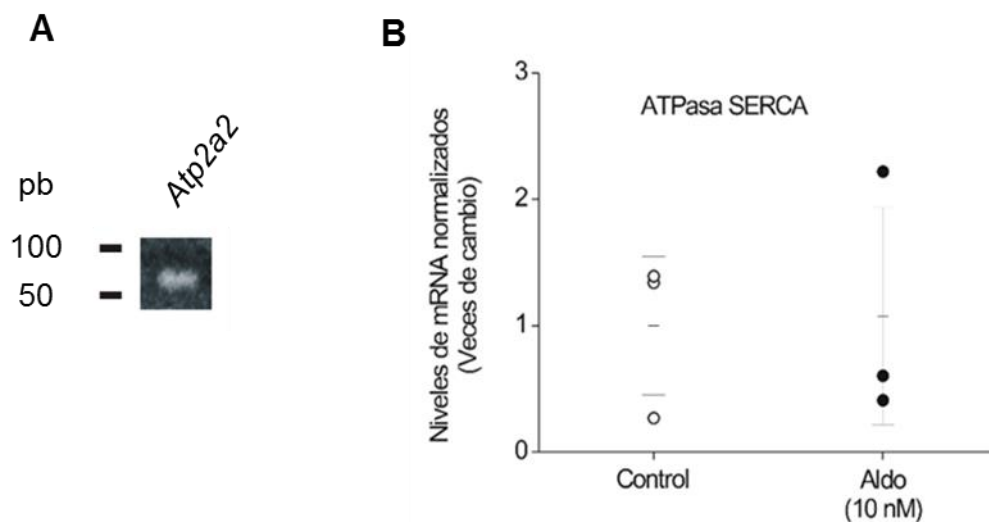
Se han descrito tres isoformas de Cav1.2 que se generan a partir de cambios en el inicio de la transcripción y que involucran solamente al exón 1, generando las variantes de exón1a, exón1b y exón1c, que resultan en cambios en la región N-terminal. La variante Cav1.2-exón1a se encuentra en corazón y aorta (Mikami *et al.*, 1989; Koch, Ellinor y Schwartz, 2001), el Cav1.2-exón1b se detecta en cerebro (Snutch *et al.*, 2001) y recientemente se ha descrito en miocitos de arterias

cerebrales una nueva isoforma rica en cisteína en la región N-terminal denominada Cav1.2-exón1c (Cheng *et al.*, 2007) (**Figura 26A y 26B**). Los análisis de PCR revelaron la presencia de transcritos de las tres isoformas de Cav 1.2 (exón 1a, 1b y 1c) en miocitos lisos de arterias mesentéricas (**Figura 26E**) y el tratamiento con aldosterona incrementó los niveles de mRNA de Cav1.2-exon1a en 1.47 veces. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las otras isoformas (Cav1.2-Ex1b y Cav1.2-Ex1c) (**Figura 26E**). Es importante mencionar que el transcrito predominante fue el de Cav1.2-Ex1b (**Figura 26C y 26D**).

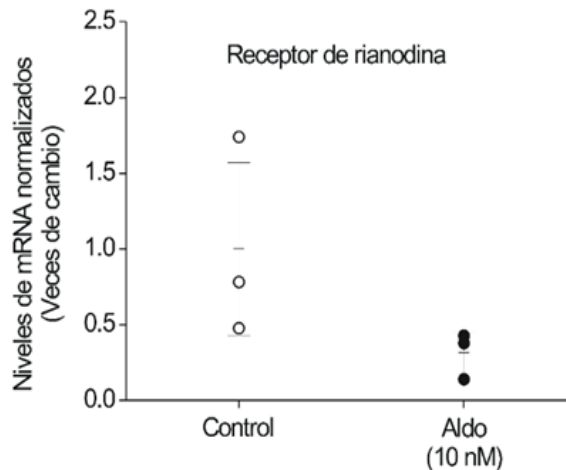


**Figura 26. Identificación y comparación de los exones 1a, 1b y 1c de Cav 1.2.** Topología propuesta del CCDV (modificado de .Joseph *et al.*, 2013), en el recuadro se resalta la localización de las isoformas en la región N-terminal de Cav 1.2 (A). Alineamiento de secuencias de aminoácidos codificadas por el exón 1a, 1b y 1c de Cav 1.2 con parte de la secuencia codificada por el exón 2 mostrado en gris (B) (modificado de Cheng *et al.*, 2007). Análisis representativo de productos de PCR punto final de las tres isoformas de Cav 1.2; exón 1a (*carril 1*), exón 1b (*carril 2*) y exón 1c (*carril 3*) (C). Isoformas que se expresan en MLVs de arterias mesentéricas (D). Niveles de expresión del mRNA de las tres isoformas de la región N-terminal de Cav 1.2 determinados en arterias mesentéricas control (*figuras vacías*) y tratadas con aldosterona, 10 nM (*figuras llenas*) mediante análisis de qPCR (E). Valores normalizados a la media geométrica del nivel de mensajero de los genes de referencia seleccionados. \*  $P < 0.05$  vs su respectivo control.

La bomba SERCA recaptura el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia el retículo sarcoplásmico incrementando el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios y activando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vía RyRs. Dada la importancia de estas proteínas en la formación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  también evaluamos los niveles de mRNA de SERCA (**Figura 27**) y el RyR2 (**Figura 28**) (principal isoforma involucrada en la formación de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Estos datos sugieren que no hay un efecto claro de aldo en la expresión de la bomba SERCA, sin embargo aunque observamos cambios significativos en los niveles de mensajeros de ambas proteínas, si podemos decir que se observó una tendencia a la reducción del mRNA del RyR2 posterior al tratamiento con aldosterona.



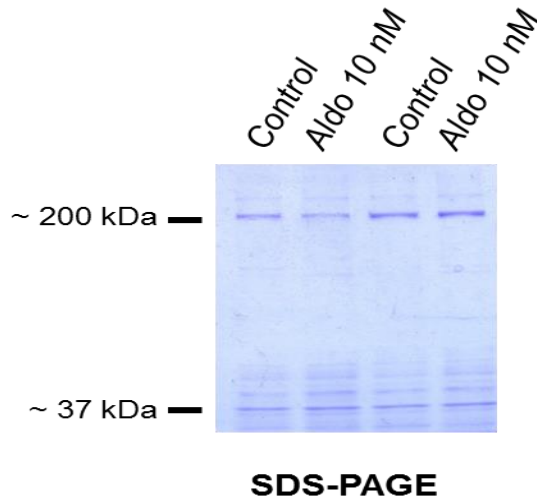
**Figura 27. Expresión de *Atp2a2*.** Análisis representativo de productos de PCR punto final (**A**) y niveles de expresión de *Atp2a2* (**B**) determinados en arterias mesentéricas control (*círculos vacíos*) y tratadas con aldosterona, 10 nM (*círculos llenos*) mediante análisis de qPCR. Valores normalizados a la media geométrica del nivel de mensajero de los genes de referencia seleccionados.



**Figura 28. Expresión de *Ryr2*.** Niveles de expresión de *Ryr2* determinados en arterias mesentéricas control (*círculos vacíos*) y tratadas con aldosterona, 10 nM (*círculos llenos*) mediante análisis de qPCR. Valores normalizados a la media geométrica del nivel de mensajero de los genes de referencia seleccionados.

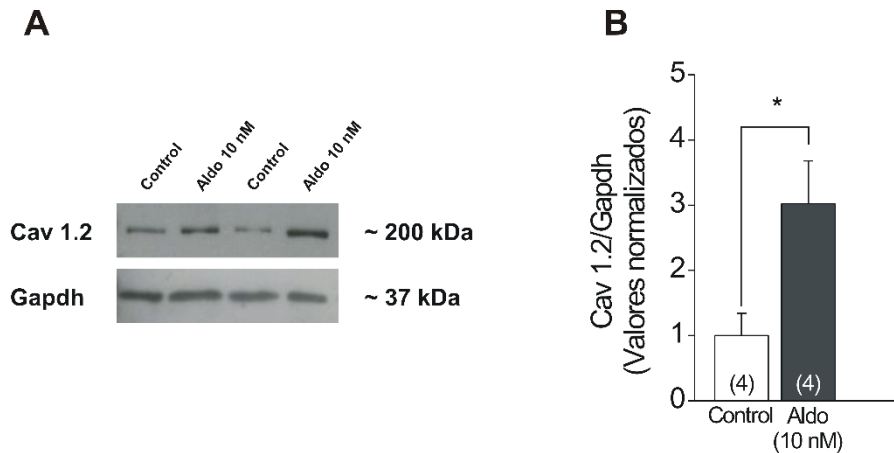
#### 8.4. La aldosterona incrementa la expresión del canal de $Ca^{2+}$ Cav 1.2

Análisis previos de qPCR donde determinamos los niveles de mRNA de Cav 1.2, revelaron que el tratamiento con aldosterona incrementa los niveles de transcritos de la isoforma Cav1.2-Ex1a. Siguiendo la lógica de que las alteraciones en las propiedades espacio-temporales de las chispas de  $Ca^{2+}$  se pueden asociar a cambios en el influjo de  $Ca^{2+}$  por los CCDV, nos planteamos examinar los niveles de expresión de Cav 1.2 mediante ensayos de Western Blot en arterias mesentéricas tratadas con aldosterona y controles. La **Figura 29** muestra un gel en gradiente de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie en el cual se cargaron 7  $\mu$ g de proteína por carril, de homogenados de arterias control y tratadas con aldosterona. Esta proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para cuantificar la expresión de Cav1.2.



**Figura 29.** Separación de las proteínas de los homogenados de arterias mesentéricas en un gel en gradiente de poliacrilamida (4,8 y 12%) teñido con azul de Coomassie. En cada carril se cargaron 7 µg de proteína total de homogenados de arterias control y tratadas con aldosterona.

La **Figura 30A** muestra un Western Blot representativo donde se ilustra la banda inmunoreactiva de ~200 kDa correspondiente a Cav 1.2. Como control de carga se usó Gapdh. La expresión de Cav1.2 fue 3 veces mayor en arterias tratadas con aldosterona que en arterias control (**Figura 30B**). La densidad de la señal de Gapdh no fue estadísticamente significativa entre preparaciones de arterias control y tratadas con aldosterona.



**Figura 30. Niveles de expresión de Cav 1.2.** Análisis de inmunoblots de la expresión de Cav 1.2 en arterias mesentéricas control (*carriles 1y 3*) y tratadas con aldosterona (*carriles 2 y 4*) (**A**). La densidad de la banda inmunoreactiva de ~200 kDa fue mayor en arterias tratadas con aldosterona que en arterias control (**B**). Se usó Gapdh como control de carga, el cual mostró una expresión similar en todos los carriles.

## 9. DISCUSIÓN

Antes del presente trabajo se conocía muy poco del efecto de la aldosterona y la subsecuente activación del MR vascular en las propiedades de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en miocitos lisos vasculares. A este respecto, el presente trabajo es de los primeros en proporcionar evidencias de alteraciones en la actividad *in situ* del RyR vascular inducidas por un tratamiento con aldosterona y que están posiblemente asociadas a cambios en la expresión de proteínas involucradas en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

La aldosterona es una hormona esteroidea que ejerce sus principalmente efectos por la unión al MR, un factor de transcripción activado por ligando perteneciente a la familia de receptores nucleares (Zennaro *et al.*, 1995). Las acciones clásicas de aldosterona implican la internalización del MR y el reclutamiento de promotores que regulan la transcripción de genes blanco (Lössel, Feuring y Wheling, 2002).

Dentro de los genes evaluados incluimos a *Sgk1* como un control positivo de los efectos genómicos de aldosterona, una proteína que incrementa por aldosterona y es blanco del MR (Newfell *et al.*, 2011). Nuestros resultados revelaron un incremento en los transcritos de *Sgk1* (**Figura 24B**), estos resultados sugieren que los miocitos lisos de arterias mesentéricas expresan un MR funcional con la capacidad de regular la actividad transcripcional bajo las condiciones de estudio establecidas (aldosterona 10 nM, 24 h). Si bien se han descrito efectos rápidos o no genómicos de aldosterona mediados por un receptor distinto al MR, un receptor acoplado a proteínas G (GPCR30) (Gros *et al.*, 2011), estos efectos no son compatibles con los tiempos manejados en este estudio (24 h). Por otro lado, nuestros resultados de qPCR revelaron un incremento en los transcritos del MR (**Figura 24A**). Ha sido bien descrito que la actividad del MR es modulada por una variedad de coreguladores que pueden interactuar con él y pueden ser represores o activadores de la transcripción (Yang y Young, 2009). Sin embargo, poco se sabe sobre la autoregulación de la expresión del MR por aldosterona, mientras unos indican que aldosterona no afecta la expresión del MR (Leopold *et al.*, 2007) otros

sugieren que niveles elevados de aldosterona en la vasculatura preceden a incrementos del mensajero del MR (Takeda *et al.*, 1997). Nuestros resultados sugieren que el incremento de transcritos del MR observado se debe a una regulación positiva del MR por aldosterona al menos a nivel de mensajero y en las condiciones establecidas, sin embargo se requieren de más estudios para confirmar si estos cambios se traducen a nivel de proteína.

Estudios han descrito presencia y participación del MR en la vasculatura donde está implicado en la regulación de la presión arterial, la transcripción de Cav 1.2 y la expresión de los canales BK<sub>Ca</sub> (Hatakeyama *et al.*, 1994; Ambroisine *et al.*, 2007; McCurley *et al.* 2012). Proteínas que de manera conjunta con la bomba SERCA y los RyRs operan como una unidad funcional para regular las características espacio-temporales de las chispas de Ca<sup>2+</sup> en miocitos lisos vasculares (Essin y Gollasch 2009).

Se ha descrito que la aldosterona altera las propiedades de las chispas de Ca<sup>2+</sup> en cardiomiocitos de animales que sobreexpresan al hMR o bien que han sido tratados en cultivo durante 24 y 48 h con la hormona (Gómez *et al.*, 2009). Varias líneas de evidencia indican que el cambio en las propiedades de las chispas de Ca<sup>2+</sup> está asociado a alteraciones en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. A este respecto Gómez y colaboradores describieron que la exposición ya sea *ex vivo* o *in vivo* a aldosterona incrementa la frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup> e induce la aparición de chispas de Ca<sup>2+</sup> de duración prolongada en los miocitos cardiacos (Gómez *et al.*, 2009). Los cambios en las características de las chispas de Ca<sup>2+</sup> pueden deberse por modificaciones en la expresión de los RyRs, o bien, cambios en proteínas que modulan su actividad y en el trabajo de Gomez y colaboradores (Gómez *et al.*, 2009) se determinó que la aparición de chispas de Ca<sup>2+</sup> de duración prolongada estaba asociada a la disminución de la proteína FKBP12.6.

De manera similar, nosotros observamos que el tratamiento *ex vivo* con aldosterona incrementa la frecuencia y el tamaño de las chispas de Ca<sup>2+</sup> (**Figura 20A y 20C**) y promueve la aparición de chispas de duración prolongada (**Figura 21**). De manera interesante observamos que el tratamiento con aldosterona tiende a



disminuir los niveles de transcritos del RYR2 (**Figura 28**). Por tal razón intentamos evaluar los niveles de expresión de los RyRs, sin embargo no tuvimos éxito (datos no mostrados). En nuestro trabajo, la expresión de FKBP12.6 no fue evaluada.

Por otra parte las modificaciones en las propiedades de las chispas sugieren que la aldosterona podría inducir una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células. Esta hipótesis es apoyada por estudios que han descrito que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  son reguladas por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV, ya que la frecuencia y amplitud se incrementa con la activación de los CCDV en miocitos lisos de arterias intactas (Jaggar *et al.*, 1998). Mientras que otros han observado que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurren inmediatamente después de una despolarización que induce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arnaudeau *et al.*, 1996). De igual manera, la despolarización de los miocitos lisos arteriales incrementa la probabilidad de apertura de los CCDV, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y presumiblemente la carga de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ . A este respecto se ha confirmado que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  regula las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en miocitos lisos, ya que la ablación genética de fosfolamban un inhibidor endógeno de SERCA conduce a la elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  y a un incremento en la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVs (Wellman y Nelson, 2003). Por el contrario la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  se reduce en presencia de antagonistas de los CCDV o inhibidores de la bomba SERCA (Nelson *et al.*, 1995) corroborando la importancia de la regulación luminal del RyR vascular. Considerando la capacidad del MR como regulador transcripcional de proteínas que regulan el flujo de iones a través de la membrana plasmática de los MLVs (Ambroisine *et al.*, 2007; McCurley *et al.*, 2012), cabe la posibilidad de que las alteraciones observadas en las propiedades de las chispas están asociadas a cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  como consecuencia de alteraciones en la expresión de proteínas que regulan la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto evaluamos los niveles de mensajero de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales BKCa, las isoformas del CCDV (Exón 1a, 1b y 1c), y la bomba SERCA.

Se ha descrito anteriormente que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  son activadores funcionales de los canales BKCas produciendo a los STOCs (Pérez *et al.*, 1999). Los STOCs hiperpolarizan de manera transitoria a la célula y disminuyen la

probabilidad de apertura de los CCDV, de esta manera se reduce la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula limitando la vasoconstricción (Brayden y Nelson 1992; Nelson *et al.*, 1995, Knot, Standen y Nelson, 1998). Los canales  $BK_{Cas}$  están compuestos por la subunidad  $\alpha$  formadora del poro y la subunidad accesoria  $\beta$ . Se ha descrito que la subunidad  $\beta 1$  es exclusiva de los MLVs, (Brenner *et al.*, 2000). Estudios en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa la sintasa de aldosterona muestran que el aumento en los niveles circulantes de aldosterona se encontró asociado a una disminución en la expresión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$  de los canales  $BK_{Ca}$  en arterias coronarias y corazón (Ambroisine *et al.*, 2007). Sin embargo el grupo de trabajo de McCurley y colaboradores en su modelo transgénico de ratón al que deletaron el MR específicamente en miocitos lisos vasculares, no observaron cambios en los niveles de mensajero de ambas subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$  de los canales  $BK_{Ca}$  en arterias coronarias en comparación con el control (McCurley *et al.*, 2012). Por tal razón evaluamos los niveles de mensajero de ambas subunidades formadoras del canal. Contrario a lo reportado, bajo nuestras condiciones experimentales observamos un incremento en la subunidad  $\beta 1$  sin cambios en la subunidad  $\alpha$  (**Figura 25**). Aunque los experimentos no sean compatibles coinciden en la capacidad de aldosterona para inducir alteraciones en los canales  $BK_{Cas}$ . Mientras que la subunidad  $\alpha$  es la formadora del canal, la subunidad  $\beta 1$  le confiere la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  causando efectos dramáticos en su activación por cambios fisiológicos de  $Ca^{2+}$  (Cox y Aldrich, 2000). Por lo que podemos sugerir que los cambios observados en los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta 1$ , en el caso de que se traduzcan a más proteína, podrían ser resultado de un mecanismo compensatorio por el aumento en el influjo de  $Ca^{2+}$  y en la actividad *in situ* del RyR más que a un efecto directo del MR.

Por otro lado determinamos que la presencia de transcritos de las 3 variantes del exón1 de Cav 1.2 en los MLVs de arterias mesentéricas, contrario a lo reportado por Cheng y colaboradores quienes no detectaron la presencia de transcritos del exón 1a en miocitos de arterias cerebrales, sugirieron que esta isoforma es prevalente en miocitos cardiacos, mientras que el exón 1c es probablemente la isoforma predominante de Cav 1.2 en miocitos arteriales (Cheng *et al.*, 2007).

Nuestros resultados de qPCR revelaron que la posible isoforma predominante es la de Cav1.2-exón1b (**Figura 26D**). De manera interesante observamos que el tratamiento con aldosterona incrementa los niveles de transcritos del exón 1a sin cambios significativos en las otras isoformas (exón 1b y 1c) (**Figura 26E**), si bien no es la isoforma predominante, el incremento del exón 1a sugiere la capacidad de aldosterona para modular la transcripción de esta proteína. Esta idea es apoyada por estudios en miocitos ventriculares donde determinaron que la aldosterona incrementa la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L ( $I_{\text{Ca}}$ ) este efecto involucra la regulación génica ya que inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas, cicloheximida y actinomicina D, reducen el efecto de aldosterona sobre la  $I_{\text{Ca}}$  (Bénitah y Vassort, 1999).

Benitah y Vassort también determinaron en miocitos ventriculares de rata que aldosterona incrementa significativamente la densidad de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L ( $I_{\text{Ca}}$ ) de manera dependiente del MR (Benitah y Vassort, 1999), donde los valores elevados de  $I_{\text{Ca}}$  fueron asociados con concentraciones elevadas de aldosterona (Perrier *et al.*, 2005). De igual manera Lalevé y colaboradores describieron que aldosterona incrementa la  $I_{\text{Ca}}$  en miocitos cardiacos neonatales de rata, además observaron un incremento en la subunidad 1c (Cav 1.2) del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L tras el tratamiento con aldosterona (Lalevé *et al.*, 2005). Estos experimentos apoyan la hipótesis de que en los MLVs el incremento observado en la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  tras el tratamiento con aldosterona podría deberse a un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mayor por el incremento en la expresión y/o actividad de los CCDV. Esta observación es apoyada por estudios que reportan un acoplamiento entre la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través de los VDCC y las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jaggar *et al.*, 1998; Wellman y Nelson, 2003).

Nuestros resultados de Western blot revelaron un incremento en la densidad de la banda inmunoreactiva de ~200 kDa correspondiente a Cav 1.2 en arterias mesentéricas tratadas con aldosterona (**Figura 30**). Estos resultados proporcionan evidencia directa del incremento de la expresión de la subunidad formadora del poro del canal de los CCDV, Cav 1.2 y que estos cambios en la expresión son mediados

vía el MR, además ayudan a explicar el mecanismo involucrado en la regulación de las chispas de  $Ca^{2+}$ .

Cabe mencionar que el análisis de las secuencias N-terminal de las isoformas reportadas en rata, revelaron que únicamente la isoforma Cav1.2-exón1b posee la secuencia de aminoácidos (MVNENTRMYIPEENHQ) que es reconocida por el anticuerpo utilizado, sugiriendo que la isoforma que incrementa como consecuencia del tratamiento con aldosterona es la Cav1.2-exón1b. Este efecto también ha sido observado en arterias coronarias tratadas con aldosterona (*Mesquita T, comunicación personal*). No se tiene claro el mecanismo por el cual de manera inicial hay un incremento en los niveles de transcritos de la isoforma Cav1.2-Exón1a mientras los cambios a nivel proteína se traducen en la isoforma Cav1.2-Exón1b. Estas observaciones sugieren que la expresión de Cav1.2-exón1b posiblemente sea regulada por mecanismos post-transcripcionales. Estos resultados, además apoyan la idea que la isoforma predominante de Cav1.2 en las arterias mesentéricas es la Cav1.2-exón1b.

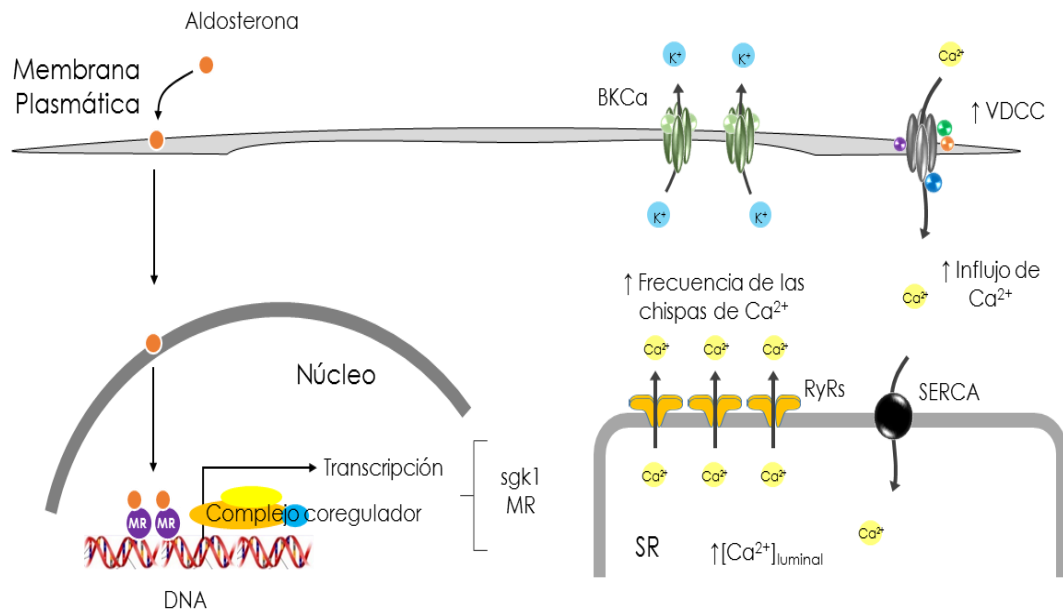
Un punto importante es que el emplear un modelo *ex vivo* de tratamiento de las arterias con aldosterona permite asegurar que los cambios observados en la expresión de estos genes sean debido a un efecto directo de aldosterona en los vasos en lugar de una posible respuesta vascular secundaria debido a que aldosterona afecta otros tejidos, particularmente el riñón y el corazón. Se decidió trabajar con arterias completas en lugar de células aisladas debido a que la función vascular es regulada por una compleja señalización paracrina entre los distintos tipos celulares (células de músculo liso y células endoteliales principalmente) y creemos que esta estrategia rinde más relevancia biológica.

El presente trabajo es de los primeros en proporcionar evidencias de la regulación de la expresión de Cav 1.2 por aldosterona vía el MR en arterias de resistencia, particularmente en arterias mesentéricas. Si bien se ha descrito la participación del MR y los niveles elevados de aldosterona, en la regulación de los transcritos de Cav 1.2 y la expresión de los BKca, estos han sido en aorta y coronaria, mientras que nuestros análisis fueron realizados en arterias mesentéricas

de resistencia, con capacidad para regular la presión arterial sistémica. De esta manera las alteraciones observadas posiblemente estén asociadas al desarrollo de la hipertensión, como se ha sugerido en modelos experimentales, en los cuales se ha observado una sobreexpresión de los CCDV en la hipertensión asociada al aldosteronismo.

## 10. CONCLUSIONES

1. Las arterias mesentéricas poseen un MR funcional que es activado por aldosterona, lo cual fue evidenciado por un incremento en los niveles de mRNA de SGK1 y del MR.
2. La incubación *ex vivo* de las arterias mesentéricas con aldosterona (10 nM, 24 h) incrementa la frecuencia y el tamaño de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  e induce la aparición de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  de duración prolongada en los MLVs intactos.
3. La aldosterona vía el MR regula la actividad transcripcional de proteínas involucradas en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en miocitos lisos vasculares. La aldosterona incrementó los niveles de mRNA de Cav1.2-exon 1a, de la subunidad  $\beta$  del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y disminuyó ligeramente los niveles de mRNA del RyR2, sin cambios significativos en los niveles de mRNA de la bomba SERCA y de la subunidad  $\alpha$  del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ .
4. La aldosterona incrementa los niveles de expresión de Cav 1.2, la subunidad formadora del poro de los CCDV.
5. En conjunto nuestros resultados sugieren que la activación del MR vascular por aldosterona modifica las propiedades de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  por incrementar el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los CCDVs.



**Figura 31. Mecanismo propuesto del efecto de aldosterona sobre las chispas de Ca<sup>2+</sup>.** La aldosterona activa al MR que regula la actividad transcripcional de genes blancos e incrementa la expresión de los CCDV de esta manera hay una mayor entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula con el subsecuente incremento en la carga de Ca<sup>2+</sup> del SR aumentando la frecuencia de las chispas de Ca<sup>2+</sup>.

## 11. PERSPECTIVAS

- Analizar las características de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en células de arterias incubadas con aldosterona+RU 28316 (antagonista del MR).
- Cuantificar los niveles de expresión de la bomba SERCA y del RyR.
- Medir la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico mediante la aplicación de pulsos de cafeína.
- Medir la actividad enzimática de la bomba SERCA en homogenados de arterias.
- Evaluar la actividad de los CCDV por ensayos de electrofisiología mediante la técnica de patch clamp en miocitos lisos aislados
- Evaluar la actividad contráctil de arterias mesentéricas en presencia de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras.



## 12. REFERENCIAS

- Ambroisine M, Favre J, Oliviero P, Rodriguez C, Gao J, Thuillez C, Samuel J, Richard V, and Delcayre C. 2007. Aldosterone-induced coronary dysfunction in transgenic mice involves the calcium-activated potassium (BKCa) channels of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. **116**: 2435-2443.
- Arnaudeau S, Macrez-Lepretre N, and Mironneau J. 1996. Activation of calcium sparks by angiotensin II in vascular myocytes. *Biochem Biophys. Res Commun*. **222**: 809-815.
- Basset M, Suzuki T, Sasano H, White P, and Rainey W. 2004. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol*. **2004**; **18**: 279–290.
- Benetos A, Lacolley P and Safar ME. 1997. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **17**: 1152-1156.
- Benham CD and Bolton TB. 1986. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol*; **381**: 385-406.
- Benitah JP and Vassort G. 1999. Aldosterone upregulates Ca<sup>2+</sup> current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res*. **85**:1139-1145.
- Billaud M, Lohman AW, Johnstone SR, Biber LA, Mutcler S and Isakson BE. 2014. Regulation of cellular communication by signaling microdoamins in the blood vessel wall. *Pharmacol Rev*. **66**: 513-569.
- Binart N, Lombes M, Rafestin-Oblin ME and Baulieu EE. 1991. Characterization of human mineralocorticoid receptor expressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 10681-5.
- Blacher J, Amah G, Girerd X, Kheder A, Ben MH, London GM and Safar ME. 1997. Association between increase plasma levels of aldosterone and decrease

- systemic arterial compliance in subjects with essential hypertension. *Am J Hypertens.* **10**: 1326-1334.
- Bolton TB and Imaizumi Y. 1996. Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells. *Cell calcium.* **20**: 141-152.
- Brayden JE and Nelson MT. 1992. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science.* **256**: 532-535.
- Briet M and Schiffrin EL. 2013. Vascular actions of aldosterone. *J. Vas. Res.* **50**: 89-99.
- Caprio M, Newfell BG, Sala M, Baur W, Fabbri A, Rosano G, Mendelsohn ME and Jaffe IZ. 2008. Functional mineralocorticoids receptors in human vascular endothelial cells regulated intracellular adhesion molecule1- expression and promoted leukocyte adhesion. *Circ Res*; **102**: 1359-1367.
- Caterrall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. 2000. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**: 521-555.
- Chapman K, Holmes M and Seck J. 2013. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev.* **93** (3): 1139–1206.
- Cheng H, Lederer WJ and Canell MB. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* **262**: 740-744.
- Cheng I, Liu J, Asuncion-Chin M, Blaskova E, Bannister JP, Dopico AM, and Jaggar JH. 2007. A novel CaV 1.2 N terminus expressed in smooth muscle cells of resistance size arteries modifies channel regulation by auxiliary subunits. *J Biol Chem.* **282** (40): 29211–29221.
- Conn JW. 1955. Presidential address: Part I. Painting background. Part II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med.* **45**:3-17.

- Coussin F, Macrez N, Morel JL and Mironneau J. 2000. Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in vascular myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**: 9596-9603.
- Cox DH and Aldrich RW. 2000. Role of the  $\beta$ 1 subunit in large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel gating energetics mechanisms of enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity. *J. Gen. Physiol.* **116**: 411–432.
- Essin K and Gollasch M 2009. Role of Ryanodine Receptor Subtypes in Initiation and Formation of Calcium Sparks in Arterial Smooth Muscle: Comparison with Striated Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: 1-15.
- Funder JW and Mihailidou AS. 2009. Aldosterone and mineralocorticoid receptors: Clinical studies and basic biology. *Mol Cell Endocrinol.*; **301**: 2-6.
- Geller DS, Farhi A, Pikerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A., *et al.* 2000. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science*. **289**: 119-23.
- Gómez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, Pereira L, Zissimopoulos S, Zhu X, Schaub R, Perrier E, Perrier R, Céline- Latouche C, Richard S, Picot M, Jaisser F., Lai A, Valdivia HH and Benitah JP. 2009. Mineralocorticoid modulation of  $\alpha$ Anthony Lai F. A., Valdivia H. H., Benitah J. P. 2009. Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. 2009. *Circulation*. **119**: 2179-2187.)
- Gomez-Sanchez EP and Gomez-Sanchez CE. 2012. Central regulation of blood pressure by the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **24**; 350(2): 289–298.
- Gordienko DV, Bolton TB and Cannell MB. 1998. Variability in spontaneous subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells. *Journal of Physiology*; **507**: 707-720.

- Gordienko DV, Greenwood IA. and Bolton TB. 2001. Direct visualization of sarcoplasmic reticulum regions discharging  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in vascular myocytes. *Cell Calcium*; **29**: 13-28.
- Gros R, Ding Q, Sklar LA., Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorzyczewski J and Feldman RD. 2011. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*; **57**: 442–451.
- Guyenet PG. 2006. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. **7**: 335-346.
- Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R and Yamamoto H. 1994. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. **269**: 24316 – 24320.
- Hattangady N, Olala L, Bollag W and Rainey W. 2012. Acute and Chronic Regulation of Aldosterone Production. *Mol Cell Endocrinol*. **350**(2): 151–162.
- Jackson WF. 1998. Potassium channels and regulation of microcirculation. *Microcirculation*. **5**: 85-89.
- Jaffe I and Mendelsohn M. 2005. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Cir Res*. **96**: 643-650.
- Jaggar JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, Knot HJ, Bonev AD and Nelson MT. 1998.  $\text{Ca}^{2+}$  channels, ryanodine receptors and  $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated  $\text{K}^+$  channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand*. **164** (4):577-87.
- Johar S and Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ and Shah AM. 2006. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J*. 1546-1548.

- Joseph BK., Thakali KM, Moore CL. and Rhee SW. 2013. Ion channel remodeling during hypertension: implications for novel therapeutic approaches. *Pharmacol Res.* **70** (1): 126-138.
- Knot HJ, Standen NB and Nelson MT. 1998. Ryanodine receptor regulate arterial diameter and wall  $[Ca^{2+}]$  in cerebral arteries of rat via  $Ca^{2+}$  - dependent  $K^+$  channels. *J Physiol.*; **508**:211-221.
- Koch WJ, Ellinor PT and Schwartz A. 2001. cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. Evidence for the existence of alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* **265** (29): 17786-91.
- Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A and Safar M. 2002. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterones-salt induced-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation.* **106**: 2028-2853.
- Lalevée N, Rebsamen MC, Barrère-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Bénitah JP and Rossiera MF. 2005. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research* **67**: 216-224.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD and Hamilton SL. 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**: a003996.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE and Nelson MT. 2006. Calcium-activated potassium channel and the regulation of vascular tone. *Physiology*, **21**: 69 – 78.
- Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner A. W., Liao R., Handy D. E., Stanton R. C., Pitt B, and Loscalzo J. 2007. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med.* **13**(2): 189–197.

- Lifshitz LM, Carmichael J, Lai FA, Sorrentino V, Bellvé K, Fogarty KE and ZhuGe R. 2011. Spatial organization of RYRs and BK channels underlying the activation of STOCs by Ca<sup>2+</sup> sparks in airway myocytes. *J Gen Physiol.* **138**: 195-209.
- Lombes M, Farman N, Bonvalet JP, Zennaro MC. 2000. Identification and role of aldosterone receptors in the cardiovascular system. *Ann Endocrinol (Paris)*; **61**: 41- 6.
- Lösel R, Feuring M and Wheling M. 2002. Non-genomic aldosterone action: from the cell membrane to human physiology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*; **83**: 167-171.
- Lothar A, Moser M, Bode C, Feldman R and Hein L. 2015. Mineralocorticoid receptor in the heart and vasculature: New Insights for old hormones. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* **55**: 289-312.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N and Marks AR. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* **101**:365–376.
- McCurley A, Pires P, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, Chambon P, Hill MA., Dorrance AM., Mendelsohn ME and Jaffe IZ. 2012. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med.* **18** (9): 1429–1433.
- Meera P, Wallner M, Song M and Toro L. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 14066-14071.
- Mendelsohn ME. 2005. In hypertension, the kidney it not always the heart of the matter. *J Clin Invest*; **115**: 840 - 4.

- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S and Numa S. 1989. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*. **340** (6230): 230-3.
- Miyata K, Hitomi H, Guo P, Zhang GX, Kimura S, Kiyomoto H, Hosomi N, Kagami S, Khono M and Nishiyama A. 2008. Possible involvement of Rho-Kinase in aldosterone-induced vascular smooth muscle remodeling. *Hypertension Res*. **31**: 1407-1413.
- Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T and Matsuoka H 2005. Cardioprotective mechanism of spironolactone associated with the angiotensin-converting-enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase, NAD(P)H oxidase/lectin oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension Res*. **28**: 925-936.
- Nelson MT and Quyle JM. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol. American Journal of physiology-Cell physiology*. **268**: C799-C822.
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ and Lederer WJ. 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*; **270**: 633-637.
- Newfell B, Iyer L, Mohammad N, McGraw A, Ehsan A, Rosano, Huang P, Mendelsohn M. and Jaffe IZ. 2011. Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. **31** (8):1871-1880.
- Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA., Renfro KY and Calhoun DA. 2004. Impaired endothelium dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subject with hyperaldosteronism. *Circulation*; **109**: 2857-2861.

- Owens GK, Kumar MS and Wamhoff BR. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* **84**: 767-801.
- Pérez GJ, Bonev AD, Patlak JB and Nelson MT. 1999. Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol.* **113**:229–38.
- Perrier R, Richard S, Sainte-Marie Y, Rossier BC, Jaisser F and Bénitah JP. 2005. A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current in mice. *J Physiol* **569**. 153–162.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* **29** (9): e45.
- Picht E, Zima AV, Blatter LA and Bers DM. 2007. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* **3**: C1073-C1081
- Rogerson FM. and Fuller PJ. 2003. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **200**: 45-55.
- Rueda A, Fernández-Velasco, Benitah JP and Gómez AM. 2013. Abnormal Ca<sup>2+</sup> sparks/STOC coupling in cerebral artery smooth muscle cells of obese type 2 diabetic mice. *PLOS ONE*; **8**: e53321.
- Sabourin J, Bartoli F, Antignys F, Gomez AM and Jean-Pierre B. 2016. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> Channels. New targets of aldosterone in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* **25**: 13394 –13409.
- Serysheva, Ludtke SJ, Baker ML, Cong Y, Topf M, Eramian D, Sali A, Hamilton SL and Chiu W. 2008. Subnanometer-resolution electron cryomicroscopy-based domain models for the cytoplasmic region of skeletal muscle RyR channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 9610–9615.



- Shen JX., Wang S, Song LS, Han T and Cheng H. 2004. Polymorphism of Ca<sup>2+</sup> sparks evoked from in-focus Ca<sup>2+</sup> release units in cardiac myocytes. *Biophys J.* **86** (1 Pt 1):182-90.
- Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP and Gilbert MM. 2001. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron.* **7** (1): 45-57.
- Takeda Y, Miyamori I, Inaba S, Furukawa K, Hatakeyama H, Yoneda T, Mabuchi H and Takeda R. 1997. Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension.* **29** (1): 45-48
- Tang ZZ, Liang MC, Lu S, Yu D, Yu CY, Yue DT and Soong TW. 2004 Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human I-type voltage-gated calcium channel, Cav1.2 alpha1 subunit. *J Biol Chem.* **279** (43): 44335-43.
- Vaithianathan T, Narayanan D, Asuncion-Chin M, Jeyakumar TL, Liu J, Fleischer S, Jaggar JH and Dopico AM. 2010. Subtype identification and functional characterization of ryanodine receptors in rat cerebral artery myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **299**: C264–C278.
- Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM and Sciffrin EL. 2002. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension.* **20**: 504-510.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC and Firestone GL. 1993. Characterization of sgk, a novel member of the Serine/Threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and Cellular Biology.* p. 2031-2040
- Wellman GC and Nelson MT. 2003. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive ion channels. *Cell Calcium.* **34**: 211-229.

- Yang J and Young MJ. 2009. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J. Mol. Endocrinol.* **43**:53–64.
- Zalk R, Lehnart SE and Marks AR. 2007. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annual review of biochemistry.* **76**: 367–385.
- Zennaro MC, Keightey MC, Kotelevtsev Y, Conway G, Soubrier F and Fuller JP. 1995. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem.* **270**: 21016-20.