



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

MECANISMOS QUE CONTROLAN LA ENTRADA DE CALCIO EXTRACELULAR QUE SE ASOCIAN A LA RESPUESTA DE HIPERPERMEABILIDAD VENULAR

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Doctor en
Ciencias con mención en Ciencias Fisiológicas

Por

PIA CAROLINA BURBOA SCHETTINO

DIRECTOR DE LA TESIS: XAVIER FIGUEROA FOESSEL

Junio, 2020

INFORME DE APROBACIÓN

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi novio Camilo Arrigorriaga, mi madre Sonia Schettino y mis hermanos Sara Burboa y Jaime Halabi. Ustedes son mi pilar en cada paso que doy, siempre están en mis pensamientos y corazón.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de mi tesis, muchas personas contribuyeron en mi avance y culminación de este trabajo. Quisiera agradecer primero a mi tutor de tesis, el Dr. Xavier Figueroa, por permitirme formar parte de su laboratorio y aceptar que lo llevara por el lado oscuro vascular, por su infinita paciencia y conocimiento en ayudarme a moldear esta tesis, a desafiar mi pensamiento crítico y guiarme con sus conversaciones y consejos, me quedo con los mejores recuerdos. Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Inés, sin duda mi tesis no se habría logrado sin tu ayuda y tremenda disposición en ayudarme en el modelo animal, a Mauricio por ayudarme en mis primeros experimentos con calcio y de electrofisiología, a Mariela, por transmitirme su disciplina de trabajo y ayudarme en las mediciones de captación de etidio y protocolos de laboratorio, a Hilda y Andrea, sin duda con ustedes vivimos diversas experiencias en el laboratorio, su apoyo junto con Mariela fue el pilar para discutir sobre nuestras tesis, la vida y traspasar más allá para tener una gran amistad.

Finalmente agradezco a mi familia: mi madre y hermanos que son mi apoyo y la fuerza que me mueve día a día. A mi novio Camilo, tú eres mi compañero, amigo y apoyo que necesitaba para finalizar esto.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

Beca Doctorado Nacional CONICYT, 2014 - 2018

Becas CONICYT de asistencia a eventos cortos nacionales, 2016

Becas CONICYT de asistencia a eventos cortos nacionales, 2017

Gastos Operacionales CONICYT, 2016 y 2017

Fondos de la Dirección de Postgrado para eventos cortos 2016

Proyecto FONDECYT 1150530

ÍNDICE DE MATERIAS

INFORME DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FUENTES DE FINANCIAMIENTO.....	v
ÍNDICE DE MATERIAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURA.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Hiperpermeabilidad.....	8
2. La Hiperpermeabilidad depende de calcio.....	12
3. Óxido nítrico en Hiperpermeabilidad.....	18
4. Mecanismo dependiente de voltaje en hiperpermeabilidad.....	19
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Animales.....	25
2. Preparación de la red vascular mesentérica intacta de rata.....	25
3. Cultivo de células endoteliales de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.....	28
4. Electroforesis y Western blot.....	28
5. Inmunofluorescencia.....	30
6. Proximity Ligation Assay (PLA).....	33
7. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales de vénulas postcapilares mesentéricas de rata.....	34
8. Actividad de hemicanales en vénulas postcapilares intactas de la red vascular de mesenterio de rata.....	35
9. Actividad de hemicanales en células endoteliales de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.....	37
10. Medición de cambios en el Potencial de membrana de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.....	38
11. Medición de ATP en células endoteliales de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.....	38
12. Análisis de la formación de poros en monocapas de células endoteliales de vénulas postcapilares con Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	39
13. Análisis estadísticos.....	40
RESULTADOS.....	41
1. Activación de Hemicanales formados por conexina y canales formados por panexina-1 en la respuesta a PAF.....	41
2. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ activada por PAF.....	54

3. La liberación de ATP contribuye a la señal de Ca^{2+} activada por PAF.....	58
4. Participación del óxido nítrico en la señal de Ca^{2+} activada por PAF.....	61
5. NO induce la S-nitrosilación de conexina 43.....	66
6. Cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad inducida por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares depende de hemicanales de conexina	71
7. La respuesta activada por PAF se asocia con una variación en el potencial de membrana en células endoteliales de vénulas postcapilares.....	73
8. Los canales de Na^+ dependientes de voltaje participan en la señal de Ca^{2+} y en los cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad inducida por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares.....	78
DISCUSIÓN.....	82
CONCLUSIÓN.....	95
MODELO PROPUESTO.....	96
BIBLIOGRAFÍA.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Vénulas post-capilares y arterias de resistencia en la red vascular intacta de mesenterio de rata.....	27
FIGURA 2. Apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en vasos intactos de mesenterio estimulados con PAF.....	42
FIGURA 3. Características morfológicas de los cultivos de células endoteliales provenientes de vénulas post-capilares (CEV) y arterias de resistencia (CEA).....	46
FIGURA 4. Características morfológicas de los arterias de resistencia y vénulas postcapilares y en cultivos de células endoteliales provenientes de vénulas post-capilares (CEV) y arterias de resistencia (CEA).....	47
FIGURA 5. Caracterización funcional de los cultivos de células endoteliales provenientes de arterias de resistencia y vénulas post-capilares.....	49
FIGURA 6. Expresión de conexinas y Panx-1 en la células endoteliales de vénulas.....	51
FIGURA 7. PAF induce la apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV).....	53
FIGURA 8. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV) depende de Ca^{2+} extracelular.....	55
FIGURA 9. La señal de Ca^{2+} activada por PAF en las células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV) depende de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1.....	57
FIGURA 10. Liberación de ATP inducida por PAF células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV).....	59
FIGURA 11. La activación de receptores purinérgicos contribuye al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV).....	60
FIGURA 12. El óxido nítrico (NO) participa en la activación de la señal de Ca^{2+} inducida por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV).....	62
FIGURA 13. Señal de Ca^{2+} inducida por óxido nítrico (NO) en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV).....	63
FIGURA 14. Participación del óxido nítrico y los receptores purinérgicos en la señal de Ca^{2+} activada por PAF en las células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV).....	65
FIGURA 15. PAF aumenta la S-nitrosilación de proteínas en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV).....	67
FIGURA 16. PAF induce un aumento en la asociación especial de eNOS con Cx43 en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV).....	69
FIGURA 17. PAF induce la S-nitrosilación de Cx43 en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV).....	70
FIGURA 18. La formación de poros intercelulares en respuesta a PAF depende de hemicanales formados por conexina 43.....	72
FIGURA 19. PAF induce la oscilación del potencial de membrana en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV).....	75

FIGURA 20. Las oscilaciones en el potencial de membrana inducido por PAF en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV) es independiente de la señalización de ATP.....	76
FIGURA 21. Expresión de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje (Nav) en las células endoteliales de vénulas post-capilares.....	77
FIGURA 22. La señal de Ca ²⁺ activada por PAF depende de la activación del canal Nav1.2.....	79
FIGURA 23. La formación de poros intercelulares en respuesta a PAF depende de canales Nav.....	81
FIGURA 24. Esquema de la respuesta activada por PAF.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica

Akt: Proteína quinasa B

ATP: Adenosin trifosfato

BrEt: Bromuro de etidio

Ca²⁺: Ión calcio

[Ca²⁺]_i: Concentración de Ca²⁺ intracelular libre

Ca_v: Canales de calcio dependientes de voltaje

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico

CEV: Células endoteliales de vénulas post capilares

CEA: Células endoteliales de arteria

cGMP: Guanosin monofosfato cíclico

Cxs: Conexinas

Cx37: Conexina 37

Cx40: Conexina 40

Cx43: Conexina 43

DAG: Diacilglicerol

EDTA: Etilendiamino tetra-acético

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, NOS III

FITC: Fluoresceina Isotiocianato

HAEC: Células endoteliales de aorta humana

HMVEC: Células endoteliales de microvasculatura de pulmón

HPAEC: Células endoteliales de arteria de pulmón

HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IP3: Inositol 1,4,5 tri-fosfato

kDa: Kilo dalton

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MLCK: Quinasa de miosina de cadena ligera

MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico

Na⁺: Sodio

Na_v: canales de sodio dependientes de voltaje

Na_v 1.2: canales de sodio 1.2 dependientes de voltaje

Na_v 1.6: canales de sodio 1.6 dependientes de voltaje

NCX: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

L-NA: N ω -propil-arginina

Orai1: Proteína 1 del canal de calcio activado por liberación de calcio

Panx-1: Panexina 1

PAF: Factor activador de plaquetas

PKC: Proteína quinasa C

PBS: Tampón fosfato salino

PLA: Ensayo de ligación por proximidad (proximity ligation assay)

PLC: Fosfolipasa C

PPADS: Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2,4-disulfónico

PVDF: Polivinilideno difluoruro

P2X7: Receptor purinérgico ionotrópico

P2Y: Receptor purinérgico metabotrópico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS-PAGE: Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SERCA: ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico

SNAP: S-nitroso acetyl penicilamina

SOC: Canales de Ca^{2+} operados por depósitos

STIM1: Molécula de interacción 1 estromal

TRP: canales receptores de potencial transitorio

TRPC: canales receptores de potencial transitorio canónicos

TTBS: Tampón Tris-Tween salino

TTX: Tetrodotoxina

VASP: fosfoproteína estimulada por vasodilatador

VE-cadherina: Caderina endotelial vascular

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VVO: Organelos vesículo-vacuolar

WB: Western blot

ZO-1: Proteína Zona ocludens 1

RESUMEN

Las células endoteliales constituyen una barrera de permeabilidad entre la sangre y el intersticio. Normalmente en las células endoteliales de los capilares ocurre el intercambio de gases y pequeñas moléculas, sin embargo, en la inflamación ocurre una hiperpermeabilidad a macromoléculas principalmente a nivel de células endoteliales de vénulas postcapilares. Agentes inflamatorios como Histamina o PAF producen la hiperpermeabilidad mediante el incremento en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$. El aumento de calcio (Ca^{2+}) se produce por su liberación desde los reservorios intracelulares del retículo a través del aumento de IP_3 , pero esto no explica la mantención de la señal en el tiempo lo que sugiere que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular también participa activamente en este proceso. Dentro de los mecanismos propuestos están los hemicanales formados por conexina y canales de panexina, que podrían participar en la entrada directa de Ca^{2+} o de manera indirecta a través de la liberación de ATP y activación de receptores purinérgicos. Otro componente importante es la producción de óxido nítrico (NO), por la activación de la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS). En ese contexto, se ha estudiado que el incremento de la hiperpermeabilidad por NO, ocurre a partir de la activación de la eNOS, y su subsecuente traslocación al citosol que conduce a la S-nitrosilación de proteínas componentes de las uniones adherentes. Por otro lado, también un mecanismo dependiente de voltaje podría participar en el aumento de Ca^{2+} asociado a la hiperpermeabilidad. Estudios en la red vascular de mejilla de hámster demostraron la participación de canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) en el aumento de la hiperpermeabilidad. Si bien el trabajo no explica la apertura de estos canales Ca_v , podría ser a través de la participación de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v), sin embargo, sólo

se han descrito estos canales en vena safena mediante estudios electrofisiológicos, por lo tanto, se desconoce la participación de los canales Na_v en hiperpermeabilidad. Hasta la fecha aún no se han integrado todos los componentes mencionados en un mecanismo que explique la hiperpermeabilidad en vénulas postcapilares, es así que la hipótesis de esta tesis propone que “el aumento de Ca^{2+} inducido por PAF es mediado por la activación de canales de Na_v y una posterior activación de la eNOS. Esto incrementa la producción de NO, que a través de la S-nitrosilación de hemicanales formados por conexina y/o canales formados por panexina induce su apertura, permitiendo la entrada directa de Ca^{2+} o de manera indirecta a través de la liberación de ATP, lo cual permite la mantención de la respuesta a lo largo del tiempo.” Los objetivos generales son: 1) Evaluar si los hemicanales formados por conexinas y los canales de panexinas participan en el aumento de Ca^{2+} asociado a la hiperpermeabilidad inducida por PAF; 2) Evaluar si la producción de NO contribuye al aumento de Ca^{2+} inducido por PAF a través de la apertura de hemicanales de conexinas y canales de panexinas; 3) Evaluar si los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) están involucrados en el aumento de Ca^{2+} inducido por PAF; 4) Evaluar la participación de hemicanales de conexina, canales de panexina y canales Na_v en la respuesta de hiperpermeabilidad inducida por PAF. La estrategia experimental involucró la realización de cultivo selectivo de células endoteliales provenientes de vénulas postcapilares en mesenterio de rata donde se realizó medición de calcio intracelular, captación de colorante etidio en presencia y ausencia de inhibidores de conexinas, panexina 1, eNOS y canales Na_v . También se midió la liberación de ATP, variación de potencial por electrofisiología en presencia y ausencia de inhibidores de canales Na_v y la formación de poros en monocapa de este cultivo con Microscopía de Fuerza Atómica. También se realizó preparación de la red vascular intacta de mesenterio de rata y se realizó medición de captación de colorante etidio en presencia y ausencia

de inhibidores de conexinas y panexina 1. Los resultados mostraron que PAF induce un incremento en la captación de etidio en vénulas intactas y en cultivos de células endoteliales de vénulas postcapilares, lo cual se asocia a un rápido incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y a la formación de poros. Tanto la captación de etidio como el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por PAF, se bloqueó al tratar con los péptidos inhibidores de conexinas ^{37,43}Gap27 o ⁴³Gap26 y el péptido inhibidor de panexina 1, ¹⁰Panx, sin embargo, el tratamiento con PPADS sólo atenuó parte del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y no afectó la captación de etidio, sugiriendo que es un evento posterior a la apertura de hemicanales formados por conexina o canales formados por panexina. PAF también produjo un incremento en la liberación de ATP, que fue inhibido al tratar con ⁴³Gap26 o ¹⁰Panx y produjo la S-nitrosilación mediada por NO de conexina 43. Consistente con esto, el bloqueo de la producción de NO con LNA produjo una inhibición en la captación de etidio y en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Además, se observó que PAF produce la generación de espigas despolarizantes en el potencial de membrana de células endoteliales de vénulas postcapilares y que el tratamiento con TTX bloquea las señales despolarizantes y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Consistente con lo anterior, el tratamiento con Lamotrigina, un inhibidor de los canales $Na_v1.2$, prácticamente abolió la respuesta de Ca^{2+} inducida por PAF. Finalmente, el tratamiento con ^{37,43}Gap27 o TTX, bloqueó la formación de poros inducida por PAF. Los resultados de esta tesis sugieren que la estimulación de las células endoteliales de vénulas postcapilares con PAF aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la apertura de canales $Na_v1.2$, activación de la enzima eNOS y producción de NO que lleva a la S-nitrosilación de la Cx43 y la apertura de hemicanales formados por esta conexina, y por otro mecanismo, la apertura de canales formados por Panx-1, donde ambos componentes, permitirían la entrada directa de Ca^{2+} y de manera indirecta

mediante la liberación de ATP con la subsecuente activación de receptores purinérgicos, este mecanismo permitiría la mantención de la respuesta de hiperpermeabilidad en el tiempo.

ABSTRACT

Endothelial cells constitute a permeability barrier between blood and tissue interstitium. However, inflammatory agents such as Histamine or PAF, evoke an increase in endothelial cell permeability to macromolecules in post-capillary venules (hyperpermeability), which leads to edema. Hyperpermeability is associated with an increment in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of endothelial cells, which is initiated by calcium (Ca^{2+}) mobilization from the intracellular stores, the development of hyperpermeability along the time depends on Ca^{2+} influx from the extracellular space. However, the mechanisms involved in this process have not been clearly identified. Connexin-based hemichannels and Pannexin-1-formed channels may participate in the response by allowing direct Ca^{2+} influx and by the activation of a purinergic-dependent signaling through ATP release. In addition, Nitric oxide (NO) production, by activation of endothelial isoform nitric oxide synthase (eNOS) is involved in hiperpermeability response too. Hence, it has been studied that NO mediated-hyperpermeability occurs from eNOS activation, and its subsequent translocation to cytosol that leads to NO mediated adherent junctions proteins S-nitrosylation. On the other hand, a voltage dependent mechanism could also participate in Ca^{2+} -dependent increase hyperpermeability. Hamster cheek pouch studies demonstrated voltage-gated calcium channels (Cav) participation in hyperpermeability response. In spite of this work doesn't explain Cav channels opening, it could be through voltage-gated sodium channels (Nav) opening. However, these channels have only been described in electrophysiological studies of saphenous vein, therefore, Nav channels participation in hyperpermeability remains unclear.

Based on this background, it was proposed that “increase of $[Ca^{2+}]_i$ associated to the PAF-induced hyperpermeability is mediated by Nav channels opening and subsequent eNOS activation and NO production, which leads to connexin hemichannels and pannexin channels activation by NO-mediated S-nitrosylation and allowing direct Ca^{2+} influx or by the activation of a purinergic-dependent signaling through ATP release”. The general objectives were: 1) To determine if connexin hemichannels or pannexin channels participates in $[Ca^{2+}]_i$ increase associated to PAF; 2) To evaluate if NO production contribute to $[Ca^{2+}]_i$ increase associated to PAF; 3) To determine if Nav channels opening participates in $[Ca^{2+}]_i$ increase associated to PAF; 4) To evaluate if connexin hemichannels, pannexin channels or Nav channels opening participates in PAF-induced hyperpermeability. These objectives were developed mainly in primary cultures of mesenteric endothelial cells of postcapillary venules in the rat mesentery, where intracellular calcium measurement and ethidium uptake was performed in the presence and absence of connexin, panexin 1, eNOS and Nav channels inhibitors. ATP release, electrophysiology analysis in the presence and absence of Nav channel inhibitors, and monolayer pore formation with Atomic Force Microscopy were also measured these primary cultures. Rat mesenteric vascular beds was also carried out and measurement of uptake of ethidium dye was performed in the presence and absence of connexin and panexin 1 inhibitors. PAF induced an increase in ethidium uptake in intact venules and in EC-V, which was associated with a rapid rise of $[Ca^{2+}]_i$. Both the hemichannel activation and Ca^{2+} signaling were abolished by treatment with connexin blocking peptides ^{37,43}Gap27 or ⁴³Gap26 and by application of the pannexin-1 blocking peptide ¹⁰Panx or the purinergic receptor blocker PPADS. PAF also induced a ⁴³Gap26- and ¹⁰Panx-sensitive ATP release and evoked a NO-mediated S-nitrosylation of Cx43. Consistent with this, NO production inhibition with NG-nitro-L-arginine

blunted the PAF-induced ethidium uptake and Ca^{2+} signaling. Furthermore, it was observed that PAF produces depolarizing spikes generation in membrane potential of endothelial cells of postcapillary venules and TTX treatment blocks depolarizing signals and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. In addition, treatment with Nav1.2 channel inhibitor Lamotrigine abolished the PAF-induced Ca^{2+} response. Finally, ^{37,43}Gap27 or TTX blocked PAF-initiated pore formation.

Finally, these results indicate that Nav1.2 channels opening, activation of the eNOS enzyme and production of NO leads to Cx43 hemichannel activation by NO-mediated S-nitrosylation and subsequent pannexin1 channel opening which are essential for the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ associated to PAF-induced hyperpermeability. These channels may allow direct Ca^{2+} influx or lead to purinergic receptor activation through ATP release.

INTRODUCCIÓN

La función principal del sistema circulatorio es mantener un ambiente adecuado en los tejidos, lo que se traduce en la distribución de sustancias esenciales y la eliminación de subproductos metabólicos. Este sistema también participa en mecanismos homeostáticos como la regulación de la temperatura corporal (Crouch et al., 2017) y el mantenimiento del equilibrio de fluidos (Yesiltepe et al., 2017). El sistema circulatorio está constituido por el corazón, grandes vasos sanguíneos, que permiten la distribución y retorno sanguíneo (Feihl, Francois, Liaudet & Waeber, 2009), y la microcirculación, que es donde ocurre el intercambio de agua, gases como oxígeno, nutrientes y desechos (Feihl, Francois, Liaudet & Waeber, 2009; Secomb & Pries, 2011). La microcirculación involucra vasos sanguíneos de tamaño pequeño que conforman un sistema de arteriolas (diámetro $< \sim 100 \mu\text{m}$) y vénulas interconectadas por una red de capilares, esto puede variar en términos de morfología o regulación fina, dependiendo de las necesidades particulares de cada tejido (Secomb & Pries, 2011). Las arteriolas se encargan de la distribución del flujo sanguíneo y están constituidas por una capa de células endoteliales y una capa de células musculares lisas (Lillo et al., 2012; Segal, 2005), que va discontinuándose progresivamente hasta desaparecer completamente a nivel de los capilares, los cuales a su vez permiten el intercambio funcional entre la sangre y los tejidos. Finalmente en las vénulas, que permiten el retorno sanguíneo, se reorganiza la capa de células musculares lisas a medida que van aumentando su calibre (Aird, 2007a)

1. Hiperpermeabilidad.

En condiciones normales, el intercambio de solutos ocurre en los capilares por difusión de moléculas pequeñas y gases, y en menor medida de proteínas plasmáticas, usualmente menores

de ~60 kDa, mientras que la permeabilidad a grandes moléculas es fuertemente restringida y regulada (Nagy et al., 2006). Este traspaso de grandes moléculas suele iniciarse en procesos inflamatorios donde es principalmente regulado en las vénulas postcapilares, que en condiciones normales, mantienen la integridad de la barrera endotelial mediante la estabilización de las comunicaciones intercelulares compuestas principalmente por uniones adherentes, como la Caderina endotelial vascular (VE-cadherina) (F. R.E. Curry & Adamson, 2013). La estabilización de la barrera es regulado por una pequeña GTPasa llamada Rac-1 (Spindler et al., 2010) cuya señalización se produce por acción directa o indirecta de cAMP (Roger H. Adamson et al., 2010; Baumer et al., 2009; F. R.E. Curry & Adamson, 2013) y por mediadores como la esfingosina 1-fostato (Roger H. Adamson et al., 2010) prostaglandina E2 (Birukova et al., 2007), entre otros.

Sin embargo, la exposición a factores pro-inflamatorios, como por ejemplo: bradicinina, histamina, factor activador de plaquetas (PAF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre otros (R. H. Adamson et al., 2003a; Ashina et al., 2015; Kim et al., 2000) produce un aumento de la permeabilidad a macromoléculas (> 60 kDa) en las vénulas postcapilares, lo cual se denomina Hiperpermeabilidad. Esto se traduce en un traspaso rápido o extravasación de macromoléculas, como albúmina (peso molecular ~ 69 kDa), desde la sangre al intersticio de los tejidos, con el consecuente flujo osmótico de agua. Este proceso, generalmente se evidencia por la formación de verdaderos “huecos o grietas” entre las células endoteliales postvenulares por la apertura transiente de comunicaciones intercelulares como las uniones adherentes, lo que se denomina permeabilidad paracelular (Claesson-Welsh, 2015).

Las uniones adherentes corresponden a una familia de proteínas denominadas cateninas que forman un complejo integrado por la proteína transmembrana específica de las células endoteliales, VE-cadherina y cateninas citoplasmáticas, como p120, β -catenina, plakoglobina y α -catenina, siendo éstas últimas las que mantienen su anclaje al citoesqueleto. La porción extracelular de la VE-cadherina le permite asociarse con la porción extracelular de la VE-cadherina de la célula adyacente y de esta manera mantener la unión entre las células endoteliales (Dejana et al., 1999) Se ha estudiado la participación de VE-cadherina y las otras cateninas en el mecanismo de la respuesta de hiperpermeabilidad (Corada et al., 1999; Gavard & Gutkind, 2006; Konstantoulaki et al., 2003; Marín et al., 2012; Orsenigo et al., 2012). Por otro lado, otras proteínas que forman complejos de uniones intercelulares como las uniones estrechas también participan en la respuesta de hiperpermeabilidad, pero en territorios específicos, como por ejemplo, la barrera hematoencefálica (Jia et al., 2013; Matter & Balda, 2003; Tietz & Engelhardt, 2015). Una hipótesis sobre el mecanismo que lleva al aumento en la permeabilidad paracelular está relacionado a que las uniones adherentes están conectadas a filamentos de actina por las cateninas α , β , γ y p120, y por medio de estas conexiones, las fuerzas retráctiles del citoesqueleto influyen fuertemente en las uniones célula – célula. Se ha estudiado que la retracción de los filamentos de actina puede relacionarse a un mecanismo dependiente de la isoforma endotelial de la quinasa de miosina de cadena ligera (MLCK), y cuya activación puede relacionarse a múltiples eventos de señalización como aumento de calcio (Ca^{2+}) intracelular, activación de la proteína quinasa C (PKC) y vías de señalización relacionadas a óxido nítrico (NO) (Schnittler et al., 2014; Shen, Qiang, Wu, Mack H, Yuan, 2009; Vouret-Craviari et al., 1998). Sin embargo, este mecanismo de hiperpermeabilidad se determinó utilizando el agente inflamatorio trombina en cultivo de células endoteliales de vena de cordón

umbilical (HUVEC) y en la línea inmortalizada EA.hy926, siendo células que no necesariamente representan todo lo que ocurre a nivel fisiológico (Shen et al., 2010; Vouret-Craviari et al., 1998), además, una posible interacción entre la desestabilización de las uniones adherentes y retracción de filamentos de actina, aún no está clara, por lo que, también se sugiere que estos mecanismos actúan de manera paralela (Schnittler et al., 2014; Tirupathi et al., 2006).

Se debe notar que la hiperpermeabilidad también se puede producir por medio del transporte de macromoléculas a través de la membrana luminal hacia la basolateral, lo cual correspondería a un proceso que se conoce como permeabilidad transcelular, el mecanismo más estudiado es el que ocurre por medio de vesículas o vacuolas denominados Organelos vesículo-vacuolar o por su sigla en inglés VVO (Dvorak & Feng, 2001). Se ha estudiado que las VVO consisten en vacuolas fenestradas de caveolas y que se forman rápidamente frente al estímulo del Factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF. Si bien, hay trabajos descriptivos de detección de su estructura en otros modelos, como en endotelio venular de un modelo animal de inflamación alérgica ocular, su visualización es limitada técnicamente ya que sólo se han observado por microscopía electrónica. Además, hay pocos estudios que describen su relevancia funcional siendo la mayoría relacionados a modelos de tumores, como la formación de VVO en la hiperpermeabilidad en Gliomas por VEGF (Lin et al., 2008; Nagy et al., 2006; Vasile et al., 1999).

Cabe mencionar, que la mayoría de los agentes inflamatorios que se han usado en el estudio de la hiperpermeabilidad como VEGF, histamina, bradiginina; y otras moléculas como ionóforos de Ca^{2+} y ATP, no son estímulos específicos para el lado venular de la red vascular, sino que también producen vasodilatación en el lado arterial, lo cual contribuye al aumento de la

hiperpermeabilidad por el incremento en la presión hidrostática (F. E. Curry, 1992). Sin embargo, la vasodilatación arteriolar no es un requisito para que ocurra este proceso, ya que el factor activador de plaquetas (PAF), un lípido polar endógeno, que produce una intensa respuesta de hiperpermeabilidad, es vasoconstrictor a nivel arteriolar, lo que descarta por una parte, el componente de presión hidrostática en su efecto y lo hace un estímulo más selectivo por las células endoteliales postvenulares (Dillon et al., 1988)

El PAF, como su nombre lo indica, fue descubierto mientras se estudiaba la interacción entre plaquetas y leucocitos, (Hanahan, 1986) asimismo, este potente mediador lipídico es sintetizado en variados tipos celulares como neutrófilos, basófilos, plaquetas y células endoteliales (Chao & Olson, 1993; Prescott et al., 2000) y a su vez tiene efectos en células endoteliales, plaquetas, neutrófilos, monocitos y en tejidos como corazón, pulmón, riñón, entre otros. (Chao & Olson, 1993; Shukla, 1992). Las respuestas activadas por PAF son mediadas por su receptor, que posee 7 dominios transmembrana asociados a una proteína G (Chao & Olson, 1993; Hyland et al., 2018; Prescott et al., 2000). Además de sus efectos mencionados anteriormente, también se ha estudiado en mesenterio de ratón que el efecto de extravasación e hiperpermeabilidad de PAF es a través de la señalización por MAPK, y en mesenterio de rata se ha estudiado que PAF produce hiperpermeabilidad por mecanismos relacionadas a cAMP e independiente a fuerzas retráctiles (R. Adamson et al., 2007; R. H. Adamson et al., 2003b; Kim et al., 2000; Yu et al., 2005).

2. La Hiperpermeabilidad depende de calcio.

La hiperpermeabilidad depende de un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en las células endoteliales de las vénulas postcapilares (Glass et al., 2005; He et al.,

1990; Lum et al., 1992). En términos generales, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se inicia por la activación de una vía de transducción dependiente de la fosfolipasa C (PLC), la cual lleva a la producción de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). IP_3 se une a su receptor que está ubicado en el retículo endoplásmico, lo cual da como resultado la liberación de Ca^{2+} desde estos almacenes intracelulares hacia el citoplasma (Kelly et al., 1998; Lum et al., 1992; Tirupathi et al., 2002). Esta vía de señalización se ha descrito evaluando, principalmente, la respuesta a agentes pro-inflamatorios como histamina (Paltauf-Doburzynska et al., 2000), trombina (Sandoval et al., 2001), VEGF (Bates & Curry, 1997; Pocock et al., 2000) ATP (Pocock et al., 2000), PAF (Zhu & He, 2005), en conjunto con el vaciamiento los almacenes intracelulares de Ca^{2+} inhibiendo la SERCA con tapsigargina (Paltauf-Doburzynska et al., 2000; Pocock et al., 2000) y el efecto de inhibidores de PLC (Kim et al., 2000; Y. Yuan et al., 1993a). Aunque ciertamente la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares participa en la respuesta de hiperpermeabilidad, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene en el tiempo durante periodos prolongados de estimulación (Bates & Curry, 1997; He et al., 1990), a su vez, experimentos en células endoteliales de microvasculatura pulmonar que muestran la inhibición de la permeabilidad al remover el Ca^{2+} con tapsigargina, esta inhibición se revierte al agregar Ca^{2+} extracelular lo que sugiere que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ proveniente de los almacenes intracelulares no es suficiente para mantener la respuesta de permeabilidad el Ca^{2+}_i no es suficiente para la disrupción de la barrera (Kelly et al., 1998) lo cual sugiere que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular también participa activamente en este proceso.

Dentro de los primeros mecanismos propuestos está la entrada capacitativa de Ca^{2+} o dicho de otro modo, los denominados Canales de Ca^{2+} operados por depósitos (canales SOC) (Cioffi & Stevens, 2006; Moccia, 2012; Prakriya & Lewis, 2015), y como su nombre indica, son activados

por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Prakriya & Lewis, 2015). La activación de estos canales SOC es altamente dinámica y requiere la interacción directa de dos tipos de proteínas, la STIM1 que se encuentra en la membrana del retículo y actúa como sensor de Ca^{2+} , y la Orai1 que comprende la unidad formadora del canal en la membrana plasmática de la célula endotelial (J. P. Yuan et al., 2009). Los estudios que relacionan los canales SOC con la hiperpermeabilidad están basados principalmente por la inhibición con Tapsigargina de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA) (Cioffi & Stevens, 2006); sin embargo, se ha descrito que la hiperpermeabilidad inducida por Trombina en células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) es independiente de Orai1 (Shinde et al., 2014) y en otros estudios se han utilizado líneas celulares de arteriolas de pulmón (Kelly et al., 1998) lo que no responde fielmente a un modelo de permeabilidad, ya que estas líneas celulares no corresponden a una venular y su función fisiológica es más bien arteriolar. Otro mecanismo propuesto para describir la entrada de Ca^{2+} extracelular corresponde a la familia de canales receptores de potencial transitorio (canales TRP), que son canales permeables a cationes como Ca^{2+} , destacando entre ellos a los TRP canónicos (TRPC) (Fitz Roy E. Curry & Glass, 2006; Gees et al., 2010; Moccia, 2012; Owsianik et al., 2006). En este contexto, se ha descrito que bradicinina y trombina producen un aumento de la permeabilidad en células endoteliales de cerebro mediante un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y esta respuesta es atenuada en presencia LOE908, un inhibidor de TRPC (Brown et al., 2008). Asimismo, en células endoteliales de pulmón de ratones knock out TRPC4^{-/-} se demostró que hay pérdida en la formación de fibras de estrés y retracción de las células al atenuarse la entrada de Ca^{2+} inducida por Trombina (Tiruppathi et al., 2002) y en pulmones aislados y perfundidos se describió que la estimulación con PAF activa

canales TRPC6 para la entrada de Ca^{2+} y subsiguiente aumento de permeabilidad (Samapati et al., 2012)

Además de los mecanismos descritos anteriormente, existe el mediado por ATP, que si bien es conocido como el nucleótido involucrado en el metabolismo energético, también es una potente molécula de señalización (Lohman et al., 2012) que activa un aumento en la permeabilidad y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células endoteliales postvenulares (Pocock et al., 2000). La señalización de ATP para el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ involucra a los receptores purinérgicos, que se dividen en P_1 o de adenosina y P_2 o de ATP, y estos últimos a su vez se subdividen en P_2Y y P_2X . Por una parte, los P_2Y son receptores metabotrópicos asociados a proteína G y gatillan señales relacionadas a IP_3 y aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En células endoteliales arteriales se ha descrito que se expresan los receptores P_2Y_1 , P_2Y_2 y P_2Y_{11} (Burnstock, 2017; L. Wang et al., 2002), pero no se ha descrito la expresión de estos receptores en células endoteliales postvenulares. Si se ha estudiado en células endoteliales de arteria de rata, que al utilizar un agonista específico de receptores P_2 , se produce un aumento en la extravasación de macromoléculas como FITC-dextrano a través del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tanaka et al., 2003). Por otro lado, los P_2X , son receptores ionotrópicos, es decir, son canales iónicos que se abren en respuesta a la unión del ligando, en este caso ATP, y por esta vía pueden producir un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). En células endoteliales arteriales y en HUVEC se ha descrito que se expresan receptores P_2X_4 , pero en células endoteliales postvenulares aún no se ha determinado que receptores P_2X se expresan (Burnstock, 2017; L. Wang et al., 2002). En un estudio realizado en diferentes cultivos de células endoteliales, provenientes de vena umbilical (HUVEC), aorta (HAEC), arteria de pulmón (HPAEC) y microvasculatura de pulmón (HMVEC), se evidenció que los receptores P_2X_4 participan en el aumento de calcio inducido por ATP (K Yamamoto et al., 2000).

Actualmente, se encuentran muchos estudios que relacionan la participación de hemicanales formados por conexinas (Cxs) y canales formados por panexinas (Panxs) en la comunicación celular y particularmente en dinámicas de Ca^{2+} (De Bock et al., 2011; Gödecke et al., 2012; Kaneko et al., 2015; Parthasarathi et al., 2006; Pinheiro et al., 2013). La apertura de estos canales se podría estimular por un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la entrada directa de Ca^{2+} por el canal y a través de la señalización de Ca^{2+} mediada por la liberación de ATP (Xavier F. Figueroa & Duling, 2009; Saez et al., 2003; Sáez et al., 2005). Las conexinas son una familia de proteínas transmembrana que participan en la formación de uniones en hendidura, más conocidas como gap junctions, las cuales comunican el citoplasma de dos células adyacentes. Seis conexinas oligomerizan para formar una estructura hexamérica con un poro central, denominado hemicanal o conaxon. Los hemicanales pueden permanecer como canal propiamente tal o conectarse con otro hemicanal de una célula adyacente para conformar la unión en hendidura o gap junction (Xavier F. Figueroa & Duling, 2009; Saez et al., 2003). En mamíferos, se han descrito al menos 20 isoformas de conexinas, denominadas de acuerdo a su tamaño aproximado (en kDa) (Willecke et al., 2002), en el endotelio arterial se expresan mayormente las isoformas Cx37, Cx40 y Cx43 (Johnstone et al., 2009). Por otro lado, las panexinas son proteínas transmembrana con una estructura similar a las conexinas, pero con poca homología. Las panexinas también oligomerizan para formar canales similares a los hemicanales formados por conexinas, pero, al parecer, no forman gap junctions. Se han descrito 3 isoformas de panexinas (Panx1, Panx2 y Panx3), pero la que se expresa más consistentemente en el endotelio arterial es Panx1 (Barbe et al., 2006; Bond & Naus, 2014). Es importante notar que si bien se ha caracterizado la expresión de las Cx37, Cx40 y Cx43 en células endoteliales de vena cava (Craneal, torácica y abdominal) en ratas (Inai & Shibata, 2009), no se ha caracterizado la

expresión de conexinas y panexinas en las células endoteliales postvenulares. Los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por panexinas, no son sólo simples poros de comunicación de orden pasivo, sino más bien pueden cumplir funciones específicas y se ha descrito que permiten el paso de moléculas de señalización como cAMP, IP₃, ATP y óxido nítrico (NO) y iones como Ca²⁺, entre otros (Xavier F. Figueroa & Duling, 2009; Johnstone et al., 2009); por ejemplo, se ha descrito que hemicanales formados por conexinas participan en el aumento de la [Ca²⁺]_i en células endoteliales de cerebro de rata al ser estimuladas con el agente inflamatorio Bradicinina, algo similar se estudió en células endoteliales de microvasculatura cerebral, donde se determinó que tanto canales de panexina como hemicanales de conexina 43 podrían participar en las dinámicas de Ca²⁺ que llevan a un aumento de la permeabilidad en la barrera hematoencefálica (De Bock et al., 2011; Kaneko et al., 2015). Además, los canales formados por conexinas o panexinas pueden participar en el aumento de [Ca²⁺]_i a través de la liberación de ATP; por ejemplo, se ha descrito que, en fibroblastos, bradicinina induce liberación de ATP vía activación de hemicanales de conexinas y canales de panexinas promoviendo un aumento de la [Ca²⁺]_i por la activación del receptor P2Y₁₂ (Pinheiro et al., 2013). Asimismo, se ha estudiado en miocitos y en células endoteliales de la barrera hematoencefálica de cerdo que la localización de las gap junctions compuestas por Cx43 dependen de la interacción con la Zona ocludens 1 (ZO-1), una proteína de las uniones estrechas (Palatinus et al., 2011), lo cual sugiere que la colocalización de Cx43 con ZO-1, claudina 5 y ocludina, se relaciona a que las gap junction podrían contribuir con las tight junction en la estabilización de la barrera endotelial (Nagasawa et al., 2006). Dentro del contexto de inflamación, se ha descrito que tanto conexinas como panexinas participan en la adhesión de

leucocitos al endotelio (Veliz et al., 2008) y la posterior migración de estos leucocitos (Lohman et al., 2015a).

3. Óxido Nítrico en Hiperpermeabilidad.

Se describió que la respuesta de hiperpermeabilidad inducida por agentes proinflamatorios depende de un aumento de NO (Hatakeyama et al., 2006). El NO es una molécula de señalización versátil y de vida media corta (menos de 4 segundos), que es sintetizada a partir del aminoácido L-arginina por la isoforma endotelial de la enzima Óxido Nítrico Sintasa (eNOS) (Qian & Fulton, 2013; Vallance & Chan, 2001). Agentes proinflamatorios como PAF, Histamina y VEGF incrementan la respuesta de hiperpermeabilidad y la producción de NO contribuye en ello, a través de la activación de eNOS probablemente por la unión al complejo calmodulina-Ca²⁺, fosforilación o vía de señalización relacionada a PKC o Akt (Durán et al., 2010; Qian & Fulton, 2013; Xiao et al., 2011), activación de Guanilato ciclasa y el subsecuente aumento de la producción de cGMP (Jeon et al., 2001; Lal et al., 2001; Y. Yuan et al., 1993b). Sin embargo, NO también puede realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas, proceso denominado S-nitrosilación (Iwakiri et al., 2006). En ese contexto, también, se ha propuesto otro mecanismo por el cual NO incrementa la hiperpermeabilidad, y es a partir de la activación de la eNOS, y su subsecuente traslocación al citosol (Durán et al., 2010; F. Sánchez et al., 2008; F. A. Sánchez et al., 2011), para que el NO producido modifique por S-nitrosilación proteínas componentes de las uniones adherentes (Marín et al., 2012). Por otro lado, cabe mencionar que se ha descrito que NO también podría causar un incremento en la [Ca²⁺]_i en las células endoteliales de porcino (Berkels et al., 2000). Este resultado apoya la idea que el NO participa en la respuesta de hiperpermeabilidad, pero adicionalmente sugiere que junto con

afectar la permeabilidad a través de una modificación post-traducciona de proteínas de unión adherente (Marín et al., 2012), también podría activar una vía de señalización que contribuye al aumento de Ca^{2+}_i . En concordancia con esto, se ha descrito que el NO activa hemicanales formados por conexinas, 37, 40 o 43 (Lillo et al., 2012), lo cual al menos en el caso de la Cx43 se asocia con la S-nitrosilación de esta proteína (Retamal et al., 2006), también se ha descrito la asociación de Cx37 con eNOS en una línea de células endoteliales de ratón (Pfenniger et al., 2010). Adicionalmente, se demostró que junto con activar a los hemicanales de conexina, el NO, preferencialmente, atraviesa la membrana plasmática a través de estos canales o difunde de una célula a otra, vía gap junctions (Xavier F. Figueroa et al., 2013). Por otro lado, también se ha descrito que el NO podría S-nitrosilar canales de Panx-1 en células endoteliales de aorta, pero la consecuencia funcional de este proceso aún es controversial (Lin et al., 2008; Lohman et al., 2012). Además, cabe mencionar que aún no se ha evaluado la posible expresión, regulación y función de conexinas en vénulas postcapilares. En esta tesis se propone que un aumento inicial de la $[Ca^{2+}]_i$ lleva a un aumento en la producción de NO que, a su vez, induce la apertura de hemicanales de conexinas y/o canales de panexinas a través de la S-nitrosilación de estas proteínas. La activación de los hemicanales de conexinas y canales de panexinas contribuiría al incremento de $[Ca^{2+}]_i$ ya sea permitiendo la entrada directa de Ca^{2+} , o a través de la liberación de ATP. Sin embargo, la propuesta mencionada anteriormente, no parece ser la única respuesta al mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular.

4. Mecanismo dependiente de voltaje en Hiperpermeabilidad.

En un estudio en que se midió hiperpermeabilidad en mejilla de hámster se encontró que Nifedipina, un inhibidor de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v), atenuó la

hiperpermeabilidad inducida por PAF, lo que sugiere que un mecanismo dependiente de voltaje podría participar en el aumento de Ca^{2+} asociado a la hiperpermeabilidad (Oshiro et al., 1995). La presencia de un mecanismo dependiente de voltaje en las células endoteliales no es insólito. Ya en los primeros estudios de mecanismos de permeabilidad en vénulas aisladas y capilares de rana se proponía que la despolarización de las células endoteliales podría inducir la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y subsecuente entrada de Ca^{2+} extracelular (He & Curry, 1991; R. S. Zhang & Huxley, 1992). Más recientemente, se mostró que la estimulación eléctrica de arteriolas de cremaster de ratón provoca una activación secuencial de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) y canales Ca_v , que resulta en un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y, subsecuentemente, vasodilatación (X. F. Figueroa et al., 2007). La activación de canales Na_v podría ayudar a explicar el mecanismo de activación de los Ca_v en el trabajo de Oshiro. Si bien se había descrito la presencia de Na_v en células endoteliales de arterias pulmonares y HUVEC (Gordienko & Tsukahara, 1994), no existe evidencia de su expresión en vénulas post-capilares. Consistente con la presencia de Na_v en venas, en células endoteliales de vena safena se caracterizó por medio de estudios electrofisiológicos la expresión de canales Na_v , demostrando que eran funcionales (Gosling et al., 1998). Estos antecedentes sugieren que un mecanismo dependiente de voltaje puede contribuir a la entrada de Ca^{2+} extracelular a las células endoteliales. Sin embargo, no se ha descrito la participación de los canales Na_v en hiperpermeabilidad.

Los canales Na_v están constituidos por una subunidad alfa que forma el canal y entre una a cuatro subunidades beta (β_1 , β_2 , β_3 y β_4) que son regulatorias. Por otra parte, las subunidades β_1 y β_3 están asociadas a la subunidad α en forma no covalente, mientras que la subunidad β_2 y β_4 forman puentes disulfuro con la subunidad α (Clare et al., 2000; Vacher et al., 2008).

Existen 10 genes de subunidades α que codifican las proteínas, $\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$, y una atípica Na_x de los canales de Na_v , que se expresan en diferentes tejidos excitables (Namadurai et al., 2015; Verkhatsky & Steinhäuser, 2000). Los $\text{Na}_v1.1$, 1.2, 1.3 y 1.6 son los principales canales de Na^+ expresados en el sistema nervioso central. Por otra parte los canales Na_v 1.7, 1.8 y 1.9 se expresan en el sistema nervioso periférico. En los tejidos musculares también hay una expresión diferenciada de canales de Na^+ . En el músculo esquelético, el $\text{Na}_v1.4$ es el único canal detectado hasta el momento, mientras que en el tejido cardiaco se expresa el $\text{Na}_v1.5$, específicamente entre las células musculares cardiacas en los discos intercalares (Vacher et al., 2008). Hasta la fecha no se conoce una función específica del décimo canal de Na^+ conocido como Na_x , el cual se expresa tanto en el hipotálamo como en los astrocitos.

Si bien la propuesta de esta tesis no involucra dilucidar el mecanismo de activación de los canales Na_v , estos canales se podrían activar por medio de la apertura de los canales TRP inducida por los agentes pro-inflamatorios en vénulas, lo cual despolarizaría la membrana, llevando el potencial de membrana al umbral de activación de los canales Na_v (Vincent & A.J. Duncton, 2011).

En su conjunto, los antecedentes descritos sugieren que los canales Na_v podrían participar en la respuesta de hiperpermeabilidad que se produce en las células endoteliales de vénulas postcapilares, por lo que la propuesta podría representar un nuevo mecanismo involucrado en hiperpermeabilidad.

HIPÓTESIS

“La señal de Ca^{2+} asociada a la respuesta de hiperpermeabilidad inducida por PAF se inicia por un aumento en la producción de NO mediado por la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v), lo cual contribuye a la apertura de hemicanales de conexina y/o canales de panexina a través de la S-nitrosilación de estos canales, activando, de esta manera, la entrada directa de Ca^{2+} o de manera indirecta a través de la liberación de ATP.”

OBJETIVOS

- 1. Evaluar si los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por panexinas participan en el aumento de Ca^{2+} asociado a la hiperpermeabilidad inducida por PAF.**
 - a. Determinar la expresión de hemicanales de conexina y canales de panexina en células endoteliales venulares.
 - b. Determinar si hemicanales de conexinas y canales de panexinas participan en el aumento de Ca^{2+}_i inducido por PAF en células endoteliales venulares.
 - c. Determinar si hemicanales de conexina y canales de panexinas participan en el aumento de Ca^{2+}_i inducido por PAF en células endoteliales venulares a través de la liberación de ATP .

- 2. Evaluar si la producción de NO contribuye al aumento de Ca^{2+} inducido por PAF a través de la apertura de hemicanales formados por conexinas y canales formados por panexinas.**
 - a. Determinar si el NO contribuye al aumento del Ca^{2+}_i inducido por PAF en células endoteliales venulares.
 - b. Determinar si el NO gatilla la apertura inducida por PAF de hemicanales de conexinas y canales de panexinas en células endoteliales venulares.
 - c. Determinar si el NO gatilla la apertura inducida por PAF de hemicanales de conexinas y canales de panexina en células endoteliales venulares a través de la S-nitrosilación de estas proteínas (Cxs: 37, 40 o 43 y Panx-1).

3. Evaluar si los canales de Na⁺ dependientes de voltaje (Na_v) están involucrados en el aumento de Ca²⁺ inducido por PAF.

- a. Determinar la expresión de los canales Na_v en células endoteliales venulares.
- b. Evaluar si PAF activa una despolarización del potencial de membrana dependiente de la activación de canales Na_v en células endoteliales venulares.
- c. Determinar si los canales Na_v participan en el aumento de Ca²⁺ inducido por PAF en células endoteliales venulares.

4. Evaluar la participación de hemicanales de conexina, canales de panexina y canales Na_v en los cambios estructurales asociados a la respuesta de hiperpermeabilidad inducida por PAF.

- a. Determinar si la apertura de los hemicanales de conexina y canales de panexina participan en los cambios estructurales asociados a la respuesta de hiperpermeabilidad inducida por PAF.
- b. Determinar si la activación de los canales Na_v participa en los cambios estructurales asociados a la respuesta de hiperpermeabilidad inducida por PAF.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales.

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley adultas de 200-230g de peso, criadas y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas tuvieron acceso a agua y alimento ad libitum. Los animales se utilizaron para la preparación de la red vascular mesentérica intacta (Método 3.2), cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares (Método 3.3), extractos para western blot (Método 3.4) y cortes para inmunofluorescencia (Método 3.5). Todos los protocolos experimentales se aprobaron por la comisión de bioética de la universidad y están de acuerdo con los estándares internacionales para el uso de animales de laboratorio.

2. Preparación de la red vascular mesentérica intacta de rata.

Las ratas se anestesiaron con ketamina (clorhidrato de ketamina 111,56mg/ml, Ilium) y Xilacina (clorhidrato de xilacina 23,3mg/ml, Centrovvet) en proporción 90 y 10 mg/kg, respectivamente. Se expuso la arteria mesentérica superior por medio de una incisión en la línea media de la pared abdominal, la cual se canuló con un tubo de polietileno P-50 (Intramedic, USA) y se perfundió a un flujo constante de 0,8 mL/min con una solución estéril de tampón Tyrode-Bicarbonato (composición (mM): NaCl 118; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 23,8 y glucosa 11,1) calentada a 37°C y burbujeada continuamente con una mezcla de 5% CO₂ / 95% O₂, para obtener un pH 7,35 - 7,45. Una vez canulada la arteria mesentérica superior, se aisló la parte del mesenterio conectado a la porción del tubo digestivo correspondiente al duodeno y primer tercio del ileon. Las ratas se sacrificaron rápidamente por exsanguinación, mediante el corte de la aorta abdominal. El lumen de la porción de tubo digestivo aislado junto a la red

mesentérica se limpió mediante la perfusión de tampón Tyrode-Bicarbonato. La red vascular aislada intacta junto al tubo digestivo se colocó en una cámara de perfusión, donde se dejó estabilizar por un período de 30 minutos antes de comenzar los experimentos. Para los experimentos, los vasos sanguíneos se identificaron en campo claro. Por lo general, las arterias de resistencia y vénulas post-capilares se encuentran pareadas (Figura 1B), las arterias mantienen su forma tubular característica por el grosor de su pared, esto se observa en las imágenes por inmunohistoquímica y en las de mesenterio intacto, ambos ubicados a la izquierda en la figura 1A y 1B respectivamente, y se diferencian de las vénulas porque éstas últimas tienen una pared más delgada y se encuentran colapsadas, lo que las hace ver más translúcidas o brillante a luz clara (Imágenes de inmunohistoquímica y de mesenterio intacto ubicadas a la derecha en la figura 1A y 1B respectivamente).

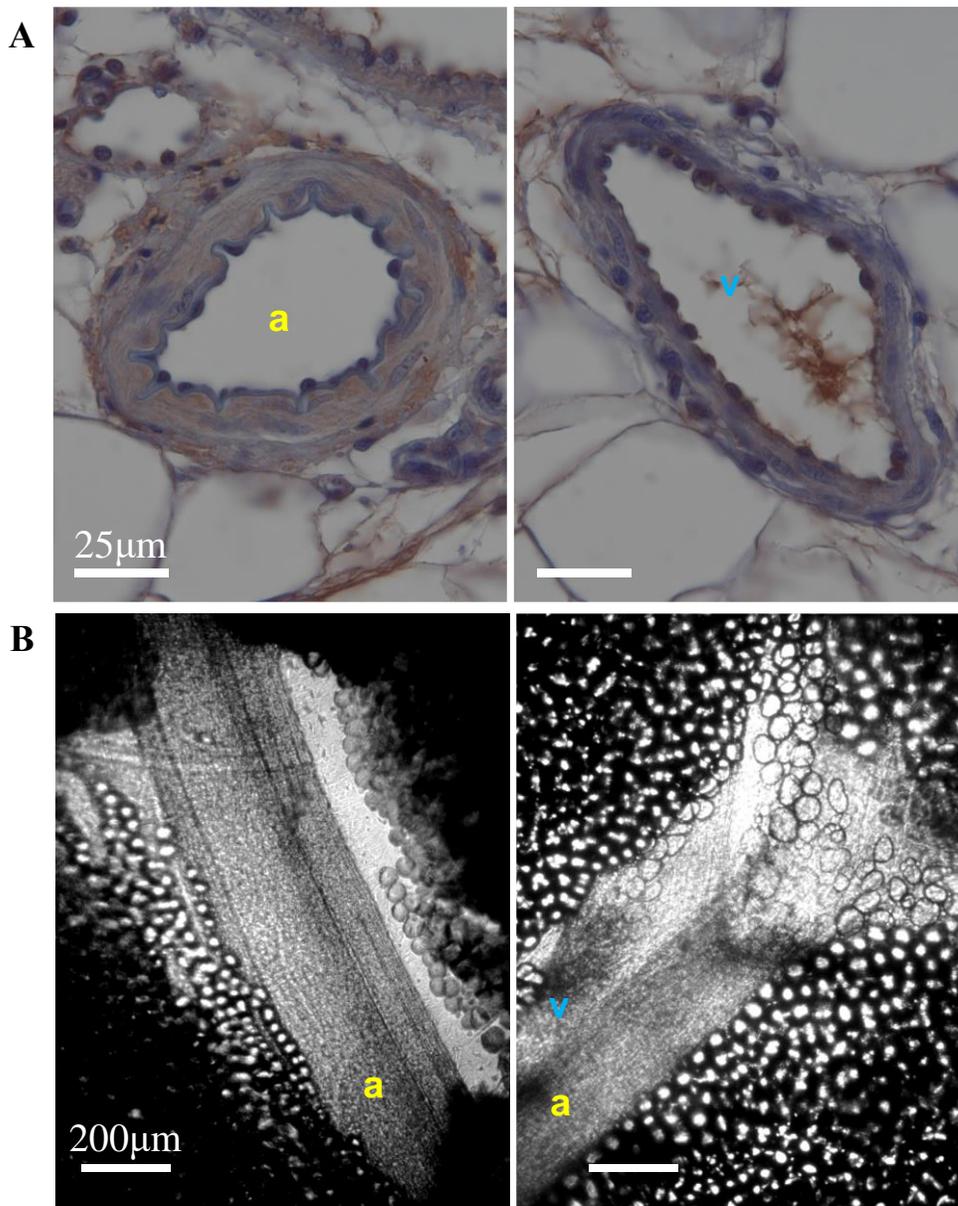


Figura 1. Vénulas post-capilares y arterias de resistencia en la red vascular intacta de mesenterio de rata. **A** Imágenes de arteria de resistencia (a) a la izquierda y vénula post-capilar (v) a la derecha por inmunohistoquímica para eNOS, que muestra la estructura de las paredes de ambos vasos. **B.** Imágenes representativas obtenidas en campo claro donde se observa una arteria de resistencia (a) y en imagen de la derecha se observa la disposición de los vasos sanguíneos y una apreciación de las diferencias entre arteria de resistencia (a) y vénula postcapilar (v)

3. Cultivo de células endoteliales de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.

Los mesenterios se aislaron como lo descrito en el procedimiento anterior (punto 3.2) y la red vascular se separó del tubo digestivo durante la perfusión continua con una solución estéril de tampón Tyrode con antibióticos (Anfotericina y Streptomina), ajustada a pH = 7,4 y mantenida a temperatura ambiente (22°). La red vascular se fijó mediante alfileres a una superficie de Sylgard® en el fondo de una placa petri y se removió el tejido adiposo para identificar las arteriolas y vénulas, los cuales se aislaron y mantuvieron por separado en una solución tampón Tyrode-antibiótico. Los segmentos aislados se colocaron en tubos eppendorf estériles con 1mL de Tyrode-antibiótico + BSA 0,1% + colagenasa I (2mg), se lavaron y se sembraron en placas de 30mm (Thermo scientific Biolite, código 130181) o en covers de 12mm (Heyn, código 0111520) con medio M199 (Gibco, código 31100-035) suplementado con suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS: Endothelial cell growth supplement from bovine pituitary, BioReagent, Sigma código E0760-15MG), antibióticos, antifúngicos (Penicilina/Estreptomina/Fungizona, Gibco, código 15240) y 20% suero fetal bovino). Las células se cultivaron por 4 días a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂-95% aire con una humedad relativa cercana al 100%, para que alcancen un 70% de confluencia.

4. Electroforesis y Western blot.

Para la determinación de los niveles de proteínas, se prepararon en buffer de lisis (composición PBS /triton X-100/cocktail inhibidores de proteasas Sigma Aldrich, P8340-1ML) los extractos de vénulas postcapilares aisladas y cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares. Las vénulas postcapilares se homogenizaron mecánicamente en frío. Posteriormente, los homogenizados se centrifugaron a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Se

rescataron los sobrenadantes y se cuantificó el contenido de proteínas totales a través del método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bradford BioRad (Bio-Rad Laboratories, código 500-0006). Luego, se mezclaron las muestras con buffer Laemmli 4X (composición en mM: Tris base 10; EDTA 1; y dodecil sulfato de sodio (SDS) 2,5%; β -mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol una punta de espátula, glicerol 40%) y se incubaron por 5 minutos en un baño de agua hirviendo, para denaturar las proteínas. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización para western blot. Para la separación de proteínas por electroforesis se cargaron entre 60 a 80 μg de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE entre 10 y 12%), utilizando el marcador estándar de peso molecular Dual color (Bio-Rad, código 1610374). Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF, Thermo Scientific, código 88518), las cuales se bloquearon con leche descremada 5% en PBS por 1 hora a Temperatura ambiente y, posteriormente, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-Cx37 (Monoclonal generado en ratón, Alpha Diagnostic, código CX37A11-A), anti-Cx40 (Policlonal, generado en conejo, Chemicon, código AB1726), anti-Cx43 (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction LaboratoriesTM, código 610062), anti-Panx-1 (Policlonal generado en conejo, Sigma-Aldrich, código AV42783-50UG), anti-eNOS (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction LaboratoriesTM, código 610298), anti-Nav1.2 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-002), anti-Nav1.5 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-005) y anti-Nav1.6 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-009) con el potenciador de señal HIKARI solución A (Nacalai Tesque, código 02270-81). Las membranas se sometieron a 6 lavados de 10 minutos cada uno con buffer Tris-Tween salino pH 7,5 (TTBS, composición: Tris base 20 mM; Tween-20 0,3%; NaCl 138 mM), y luego se

incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific, código 32460) o con el anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific, código 32430), preparado con el potenciador de señal HIKARI solución A y solución B (Nacalai Tesque, código 02270-81) y se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno con buffer Tris-Tween salino pH 7,5, para posteriormente detectar las proteínas con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher, código 34095).

5. Inmunofluorescencia.

Para la inmunofluorescencia en tejido, ratas machos Sprague Dawley 230-250 g de peso, se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 90 y 10 mg/kg, respectivamente) y se perfundió por el ventrículo izquierdo con 200 mL de PBS a 37°C, para luego continuar la perfusión con 200 mL de solución Bouin (composición: ácido pícrico saturado, formaldehído al 37% y ácido acético glacial 100%, en relación 15:5:1). Se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida del perfusado. A continuación, se aisló el mesenterio y se dejó por 24 horas en solución de fijación Bouin a temperatura ambiente. Posteriormente, se inició un protocolo de inclusión, poniendo el tejido en una solución de alcohol 60%, alcohol 80%, alcohol I 95% y alcohol II 95% por 30 minutos cada vez a temperatura ambiente; alcohol I 100%, alcohol II 100%, xilol I, xilol II por 1 hora cada vez a temperatura ambiente. Continuando con un protocolo de inclusión, poniendo el tejido en xilol II por 15 minutos en estufa a 60°C, luego el tejido se traspasó a un recipiente con Paraplast Plus® I (Leica Microsystems, código 39602004) por 1 hora a 60°C, Paraplast II a temperatura ambiente por 24 horas. Luego, el tejido se deja a 60°C hasta disolución del Paraplast II, para posteriormente traspasarlo a Paraplast III por 3 horas a 60°C, y armar el taco con Paraplast fresco, el cual se dejó solidificar a temperatura

ambiente por 24 horas. El taco con el tejido se colocó en la prensa del micrótopo, y se obtuvieron cortes de 7 y 10 μm , como se estimó apropiado, los cuales se colocaron en un baño termoregulado a 45°C y se recogieron en portaobjetos silanizados, para luego secarlos por 24 horas a 37°C. Los cortes obtenidos se sometieron a un protocolo de hidratación en una solución de xilol I, xilol II, alcohol I 100%, y alcohol II 100%, por 10 minutos cada vez en agitación suave dentro de una cubeta Hellendhal; luego alcohol 95%, alcohol 80%, alcohol 60% por 5 minutos cada vez. Posteriormente, los cortes se bloquean con una solución de albúmina de suero de bovino (BSA) al 3% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave, luego se incubó con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-Cx37 (Monoclonal generado en ratón, Alpha Diagnostic, código CX37A11-A), anti-Cx40 (Policlonal, generado en conejo, Chemicon, código AB1726), anti-Cx43 (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction LaboratoriesTM, código 610062), anti-Panx-1 (Policlonal generado en conejo, Sigma-Aldrich, código AV42783-50UG), anti-eNOS (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction LaboratoriesTM, código 610298), anti-Nav1.2 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-002), anti-Nav1.5 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-005) y anti-Nav1.6 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-009) por 12 horas a 4°C en una cámara húmeda. Se remueve el anticuerpo primario mediante tres lavados de 5 minutos cada uno con buffer de inmunohistoquímica pH 7,6 (IHQ, composición en mM: Na₂HPO₄ 11; KH₂PO₄ 3,5; NaCl 121; Tris base 41; NaN₃ 3,1). Posteriormente, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario ALEXA Fluor® 568 de cabra anti-IgG de conejo (Invitrogen Molecular Probes, código A11011) o el anti-IgG de ratón (Invitrogen Molecular Probes, código A11004), por 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con buffer de inmunohistoquímica y se agregó 30 μL de medio de montaje

para fluorescencia Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, código 17984-25).. Las muestras se analizan con microscopio Olympus BX41, acoplado a una cámara ProgRes C5 cool Jenoptik y el programa ProgRes Capture Pro 2.7.7 Jenoptik.

Para la inmunofluorescencia de células, se utilizaron cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares, crecidos en cubreobjetos de 12 mm hasta una confluencia de aproximadamente 80%. Las células se fijaron por 30 minutos en Paraformaldehído 4% preparado en PBS y se permeabilizaron por 30 minutos a temperatura ambiente usando un Tampón PBS con Tritón X-100 al 0,1% . Luego, se bloqueó por 30 minutos con albúmina de suero bovino al 3% en PBS y se incubó con alguno de los anticuerpos primarios: anti-Cx37 (Monoclonal generado en ratón, Alpha Diagnostic, código CX37A11-A), anti-Cx40 (Policlonal, generado en conejo, Chemicon, código AB1726), anti-Cx43 (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction LaboratoriesTM, código 610062), anti-Panx-1 (Policlonal generado en conejo, Sigma-Aldrich, código AV42783-50UG), anti-eNOS (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction LaboratoriesTM, código 610298), anti-eNOS (Policlonal generado en conejo, BD Transduction Laboratories TM, código 610298), anti-S-Nitroso-Cystein (SON-Cys, policlonal generado en conejo, Sigma-Aldrich, código N5411), anti-Na_v1.2 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-002), anti-Na_v1.5 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-005) y anti-Na_v1.6 (Policlonal generado en conejo, Alomone Labs, código ASC-009) a 4°C por toda la noche. Se removió el anticuerpo primario como fue descrito para los cortes de tejido y se incubó el anticuerpo secundario ALEXA Fluor® 568 de cabra anti-IgG de conejo (Invitrogen Molecular Probes, código A11011) o anti-IgG de ratón (Invitrogen Molecular Probes, código A11004) por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar el anticuerpo secundario, se tiñeron los núcleos con DAPI (4',6-diamino-2-

fenilindol Sigma Aldrich, código D9542-1MG) y se utilizó como medio de montaje, Dako® (Dako Fluorescent Mounting Medium, código S3023). Las muestras se visualizaron usando un microscopio Olympus BX41 acoplado a una cámara ProgRes C5 cool Jenoptik, y el programa ProgRes Capture Pro 2.7.7 Jenoptik. Todas las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

6. Proximity Ligation Assay (PLA)

Para los ensayos de ligación por proximidad, se utilizaron cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares crecidas en cubreobjetos de 12 mm hasta una confluencia de aproximadamente 80%. Las células se fijaron por 30 minutos en Paraformaldehído 4% preparado en PBS y se permeabilizaron por 30 minutos a temperatura ambiente con Tampón PBS con Tritón X-100 al 0,1%. Luego, se bloquearon las muestras por 30 minutos a 37°C con la solución incluida en el kit Duolink® In Situ Detection Reagents Orange (Sigma-Aldrich, código DUO92007-100RXN), se incubaron por toda la noche a 4°C con alguno de los siguientes anticuerpos primarios anti-Cx43 (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction Laboratories™, código 610062), anti-Panx-1 (Policlonal generado en conejo, Sigma-Aldrich, código AV42783-50UG), anti-eNOS (Monoclonal generado en ratón, BD Transduction Laboratories™, código 610298), anti-eNOS (Policlonal generado en conejo, BD Transduction Laboratories™, código 610298), anti-S-Nitroso-Cystein (SON-Cys, policlonal generado en conejo, Sigma-Aldrich, código N5411) que se acuerdo a su origen se incubaron en el Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS, (Sigma-Aldrich, código DUO92001-100RXN) o el Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS (Sigma-Aldrich, código DUO92005-100RXN) diluido en la solución “Antibody Diluent” del kit Duolink®. Posterior a la

incubación, los cubreobjetos con las células se lavaron 4 veces por 5 minutos con el Tampón de lavado A del kit Duolink® (Duolink® Wash Buffer A Sigma-Aldrich, código 82046). Posteriormente, se procede a la incubación de los anticuerpos secundarios con los reactivos provistos en el kit de reacción Duolink® In Situ Detection Reagents Orange (Sigma-Aldrich, código DUO92007-100RXN), y se realizaron lavados consecutivos con el Tampón de lavado A del kit Duolink® (Duolink® Wash Buffer A Sigma-Aldrich, código 82046) y tampón de lavado B Duolink® Wash Buffer B (Sigma-Aldrich, código 82048), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. La tinción de núcleos y montaje se realizaron siguiendo las mismas instrucciones del punto 3.5. Las muestras se analizaron usando un microscopio confocal Nikon eclipse Ti, acoplado al programa NIS Elements nd2 (Nikon).

7. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales de vénulas postcapilares mesentéricas de rata.

Los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular se analizaron en cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares utilizando el indicador de Ca^{2+} libre Fluo-4-AM (Life Technologies, código F23917). Las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm y crecieron hasta alcanzar una confluencia aproximada de 80%, se lavaron con un tampón Tyrode-MOPS (composición (mM): NaCl 118; KCl 5,4; $CaCl_2$ 2,5; $MgSO_4$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; glucosa 11,1; MOPS 5). Luego, se incubaron con Fluo-4AM $10\mu M$ por 1 hora en oscuridad a $36^\circ C$ para cargar el indicador Fluo-4 (longitud de onda de excitación: 470-490 nm; longitud de onda de emisión; 515 nm), se lavaron las células 3 veces con la solución tampón y se dejaron estabilizar a $36^\circ C$ por aproximadamente 15 minutos. Los cambios en la señal fluorescente se analizaron en tiempo real cada 3s. Se registraron 30 s en condiciones basales y luego 2 min durante la estimulación.

Las células endoteliales de vénulas postcapilares se estimularon con PAF (10 nM) (Platelet Activating Factor o PAF, β -Acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine Sigma código P7568-1MG) o SNAP (300 nM) (S-Nitroso-N-Acetil-D, L-Penicilamina o SNAP, Calbioquem, código 487910) en condiciones control o en presencia de los péptidos bloqueadores ^{37,43}Gap27 (200 μ M) (GenScript, código U7432DG260-1), ⁴³Gap26 (200 μ M) (GeneScript, código U7432DG260-3), ¹⁰Panx (60 μ M) (GenScript, código U4928CD070-1) o con los inhibidores farmacológicos PPADS (100 μ M) (Tocris, código 0605), N^G-nitro-L-arginina o L-NA (100 μ M) (Sigma, código N5501-5G), TTX (1 μ M) (Affix Scientific, código AF3015), 1,4 anhidro TTX (1,5 μ M) (Alomone Labs, código T-560), Lamotrigina (300 μ M) (Alomone Labs, código L205). La señal fluorescente se analizó usando un microscopio (Olympus, BX50BI, Tokio, Japón), acoplado a una cámara Retiga (intensificada 1394, Qimaging) y el programa IPLab 3.7 (Scanalytics, Inc). Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

8. Actividad de hemicanales en vénulas postcapilares intactas de la red vascular de mesenterio de rata.

La actividad de hemicanales se detectó a través del ensayo de captación de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Código E8751-5G) a través de la perfusión del colorante en los vasos intactos. La membrana celular es impermeable al etidio y sólo puede ingresar a la célula si se abre una vía transmembrana como la apertura de hemicanales formados por Cxs o canales formados por panexinas. Una vez que ingresa el colorante a la célula se intercala en el DNA y emite fluorescencia (longitud de onda de excitación: 530-550 nm; longitud de onda emisión: 590 nm),

la cual, por tanto, es proporcional a la actividad de los hemicanales de conexinas y canales de panexinas.

En la preparación de mesenterio intacto, se perfundió el buffer Tyrode-bicarbonato con 5 μM de bromuro de etidio (BrEt) en presencia de PAF (10 nM) (β -Acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine Sigma, código P7568-1MG) o ATP (10 μM) (Adenosine 5'-Triphosphate lisodium salt hydrate Sigma, código A2383-1G) por 10 minutos en condiciones control O después de la aplicación previa por 5 minutos de $^{43}\text{Gap}26$ (200 μM) (GeneScript, código U7432DG260-3) o $^{10}\text{Panx}$ (60 μM) (GenScript, código U4928CD070-1). La actividad basal de los hemicanales formados por Cxs y los canales formados por Panxs se evalúa mediante la perfusión de BrEt 5 μM por 10 minutos solo. Posteriormente, se remueve el exceso de BrEt mediante la perfusión de la solución tampón Tyrode- bicarbonato por 15 minutos y se registra la señal fluorescente del etidio en vénulas y arterias utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus, BX50BI, Tokio, Japón) y una cámara Retiga (intensificada 1394, Qimaging) acoplada al programa IPLab 3.7 (Scanalytics, Inc), en campo claro para identificar los vasos y la señal fluorescente de EtBr para evaluar el grado de captación del colorante. Las imágenes son analizadas con el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

9. Actividad de hemicanales en células endoteliales de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.

Los ensayos de captación de bromuro de etidio se realizaron en cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares crecidas en cubreobjetos de 12 mm a una confluencia aproximada del 80%, a través de un protocolo experimental similar al descrito en el punto anterior (3.8).

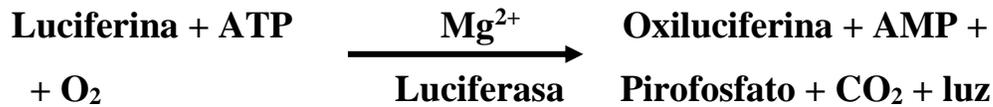
Las células se lavaron con buffer Tyrode MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid) con glucosa (composición en mM: NaCl 118; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; MOPS 10; glucosa 11), ajustado a pH 7,4. Las células se incubaron por 10 a 15 minutos con BrEt 5 μ M a 36°C se estimulan con PAF 10 nM (Platelet Activating Factor o PAF, β -Acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine Sigma código P7568-1MG) en condiciones control o en presencia de los péptidos bloqueadores ^{37,43}Gap27 (200 μ M) (GenScript, código U7432DG260-1), ⁴³Gap26 (200 μ M) (GeneScript, código U7432DG260-3), ¹⁰Panx (60 μ M) (GenScript, código U4928CD070-1) o con los inhibidores farmacológicos PPADS (100 μ M) (Tocris, código 0605), N^G-nitro-L-arginina o L-NA (100 μ M) (Sigma, código N5501-5G). El cambio de la señal fluorescente de EtBr se analizó en tiempo real cada 30 s. Se registraron 2 min basales y 6 min durante la estimulación. Finalmente, las células se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia (Olympus, BX50BI, Tokio, Japón) y una cámara Retiga (intensificada 1394, Qimaging), acoplada al programa IPLab 3.7 (Scanalytics, Inc). Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

10. Medición de cambios en el Potencial de membrana de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.

Para evaluar el efecto de PAF sobre el potencial de membrana de las células endoteliales de vena y el rol de los canales Na_v , se empaló una célula con un microelectrodo de vidrio lleno con KCl 3 M (resistencia de la micropipeta: 20-50 Ω) y conectado a un amplificador. La preparación se conectó a tierra con un electrodo de referencia colocado en el efluente de la solución. El microelectrodo se posicionó sobre la célula en un ángulo de 45-60° y se avanzó cuidadosamente usando un micromanipulador electrónico (Burleigh TS-5000-I50, NY) para empalar una célula. Se usó el siguiente criterio para determinar un empalamiento exitoso: una rápida desviación negativa del potencial, un potencial de membrana estable por al menos 30 s y una desviación positiva del potencial al sacar la micropipeta. Las células se estimularon con PAF (10nM) (β -Acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine Sigma código P7568-1MG) o ATP (10 μ M) (Adenosine 5'-Triphosphate lisodium salt hydrate Sigma, código A2383-1G) en condiciones control o en presencia de TTX (1 μ M) (Affix Scientific, código AF3015) o PPADS (100 μ M) (Tocris, código 0605).

11. Medición de ATP en células endoteliales de vénulas postcapilares de mesenterio de rata.

La liberación de ATP se evaluó a través de su detección en el medio de los cultivos primarios de las células endoteliales de vénulas post-capilares por medio del ensayo de bioluminiscencia luciferina-luciferasa usando el kit de medición de ATP (Life Technologies, código A22066), que se basa en la siguiente reacción:



donde la emisión de bioluminiscencia es proporcional a la concentración de ATP. La reacción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, la señal luminiscente se detectó con un luminómetro Turner TD-20e y la concentración de ATP se calculó interpolando las mediciones en una curva de calibrado con concentraciones entre 0,01 y 10 nM de ATP a temperatura ambiente. Previo a la medición, las células endoteliales de vénulas postcapilares se estimularon con PAF 10 nM (β -Acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine Sigma código P7568-1MG) en condiciones control o en presencia de los bloqueadores $^{43}\text{Gap26}$ (200 μM) (GeneScript, código U7432DG260-3) y $^{10}\text{Panx}$ (60 μM) (GenScript, código U4928CD070-1).

12. Análisis de la formación de poros en monocapas de células endoteliales de vénulas postcapilares con Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La formación de poros involucra un cambio en la dimensión o acortamiento, y, por lo tanto, en la altura celular (z). Por lo tanto, se realizó un mapeo de la altura celular a través de AFM en cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares crecidas en cubreobjetos de 12 mm hasta una confluencia aproximada de 80%. Las células endoteliales se lavaron con un tampón y luego se colocaron en una cámara para su análisis por AFM. Las células se mantuvieron en tampón Tyrode-MOPS a 20°C, se realizó un primer escaneo por AFM y luego se estimuló con PAF 10nM (β -Acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine Sigma código P7568-1MG) en condiciones control o en presencia de los bloqueadores $^{37,43}\text{Gap27}$ 200 μM (GenScript, código U7432DG260-1) o TTX 1 μM (Affix Scientific, código AF3015). Posterior a eso, se realizaron al menos 8 escaneos más que se traducen en 8 imágenes. Las imágenes de AFM se

tomaron con las células sumergidas en tampón a temperatura ambiente utilizando un Bruker-AXS FastScan Dimension AFM instrument. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Nanoscope analysis 1.5.

13. Análisis estadísticos

Los resultados se presentaron como la media \pm error estándar. Las comparaciones entre dos grupos experimentales se realizaron mediante el test de t-student (pareado o no pareado). Las comparaciones múltiples entre grupos se analizan mediante ANOVA de una o dos vías y la prueba post hoc Bonferroni. Las diferencias se consideran significativas con un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizan utilizando el programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

1. Activación de Hemicanales formados por conexina y canales formados por panexina-1 en la respuesta a PAF.

Como primera aproximación se estudió la apertura de hemicanales formados por conexina y canales formados por panexina mediante la medición de la captación de etidio por las células de la pared de los vasos en una preparación ex vivo de mesenterio intacto. En la figura 2A se muestra la señal fluorescente de etidio en vénulas y arteriolas en condiciones control y después de la estimulación con PAF o ATP. Se puede apreciar que tanto la estimulación por 15 minutos con PAF 10nM o ATP 10 μ M provocaron un aumento en la captación de etidio (Figura 2A y 2B); sin embargo, la respuesta a la estimulación con PAF se observó solamente en vénulas postcapilares de la red mesentérica, lo que confirma que PAF es un estímulo específico para las células endoteliales venulares. La incubación por 15 minutos con el péptido inhibidor específico de la Cx43, el ⁴³Gap26 (200 μ M), o de la Panx-1, el ¹⁰Panx (60 μ M), bloqueó la captación de colorante estimulada por PAF. La cuantificación del aumento inducido por PAF en la señal fluorescente de etidio se presenta en la Figura 2C. Estos resultados indican que la estimulación con PAF induce la apertura de hemicanales formados por conexina 43 y canales formados por panexina 1 en vénulas intactas de la red vascular mesentérica.

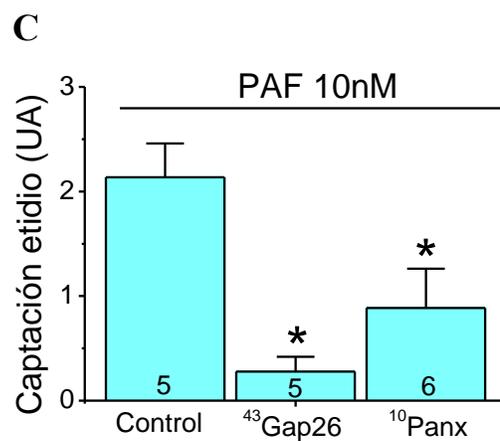
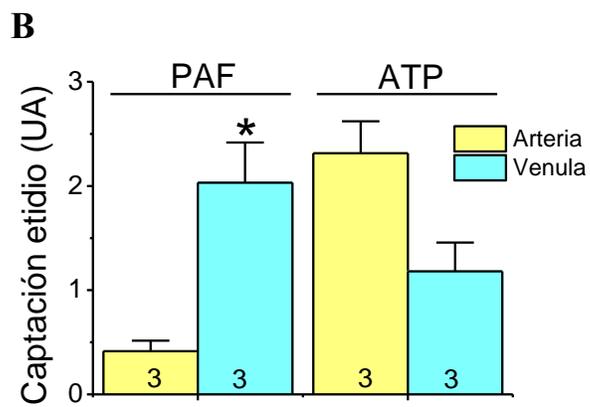
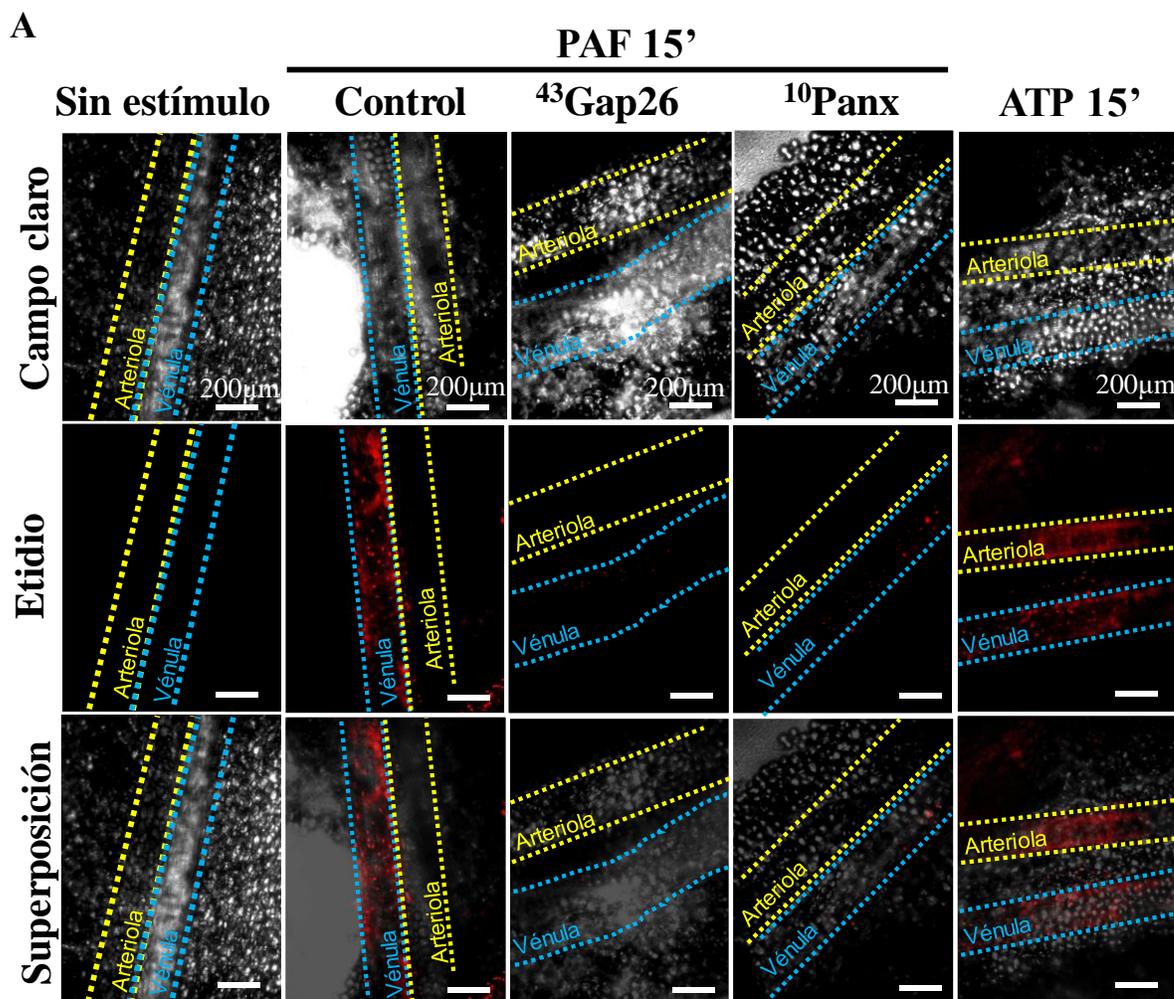


Figura 2. Apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en vasos intactos de mesenterio estimulados con PAF. A, Imágenes representativas de la captación de etidio observada antes y después de la estimulación con PAF o ATP. También se muestra el efecto del tratamiento con el péptido inhibidor de Cx43, ⁴³Gap26 o el péptido bloqueador de Panx-1, ¹⁰Panx. B, Cuantificación de la captación de etidio inducida por PAF o ATP en vénulas y arteriolas aisladas. C, Cuantificación de la captación de etidio observada en vénulas aisladas en respuesta a la estimulación con PAF en condiciones control y en presencia de los inhibidores ⁴³Gap26 o ¹⁰Panx. Los cambios en la señal fluorescente de etidio se expresan en unidades arbitrarias (UA). *, P < 0,05 vs control

Con el fin de estudiar directamente la respuesta activada por PAF en el endotelio de las vénulas postcapilares sin interferencia de otros tipos celulares, se desarrolló una técnica para realizar cultivos de células endoteliales venulares de la microvasculatura mesentérica. De esta manera, se logró obtener cultivos primarios específicos de células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV) y de células endoteliales de arterias de resistencia (CEA) de mesenterio de rata. En la figura 3A se muestran imágenes representativas de campo claro de la monocapa de cultivos primarios de CEA y CEV, donde se puede distinguir que las CEA presentan una morfología más alargada que las CEV, esto se confirma al medir la distancia referente a la longitud y ancho tanto de las CEV y CEA, como se muestra en el gráfico de la figura 3B.

Por otro lado, los resultados de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para eNOS demuestran que esta proteína se expresa en ambos vasos sanguíneos y confirma sus diferencias morfológicas (figura 4A y 4B), en particular, en la figura 4B, la inmunofluorescencia de eNOS en rojo muestra que la pared de las arterias de resistencia es más gruesa y la autofluorescencia en verde de la lámina elástica interna muestra que se encuentra más desarrollada. En cambio, al observar la inmunofluorescencia de eNOS en rojo muestra que la pared de las vénulas postcapilares es más delgada y la autofluorescencia en verde de la lámina elástica interna muestra que es más difusa y al parecer discontinua. El análisis de inmunofluorescencia en la figura 4E, muestra la expresión de eNOS y caveolina 1 en ambos cultivos demostrando que mantienen sus características morfológicas.

La expresión de Cav 1 es más periférica en CEA que en CEV, sugiriendo que en CEA estas proteínas se encuentran principalmente en la membrana plasmática. Por el contrario, en CEV la eNOS se observa mayormente formando una estructura semilunar asociada al núcleo, lo cual

sugiere que predomina la expresión en Golgi de la eNOS en estas células. Además, consistente con la respuesta observada en la red mesentérica intacta, la estimulación con ATP indujo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en CEA como en CEV (Figura 5A), mientras que sólo las CEA respondieron a ACh (Figura 5B) y sólo las CEV a PAF (Figura 5C), lo cual es consistente con la diferenciación funcional del endotelio arterial y venular, validando el uso de las CEV en el estudio de los mecanismos involucrados en la respuesta de las vénulas postcapilares a PAF.

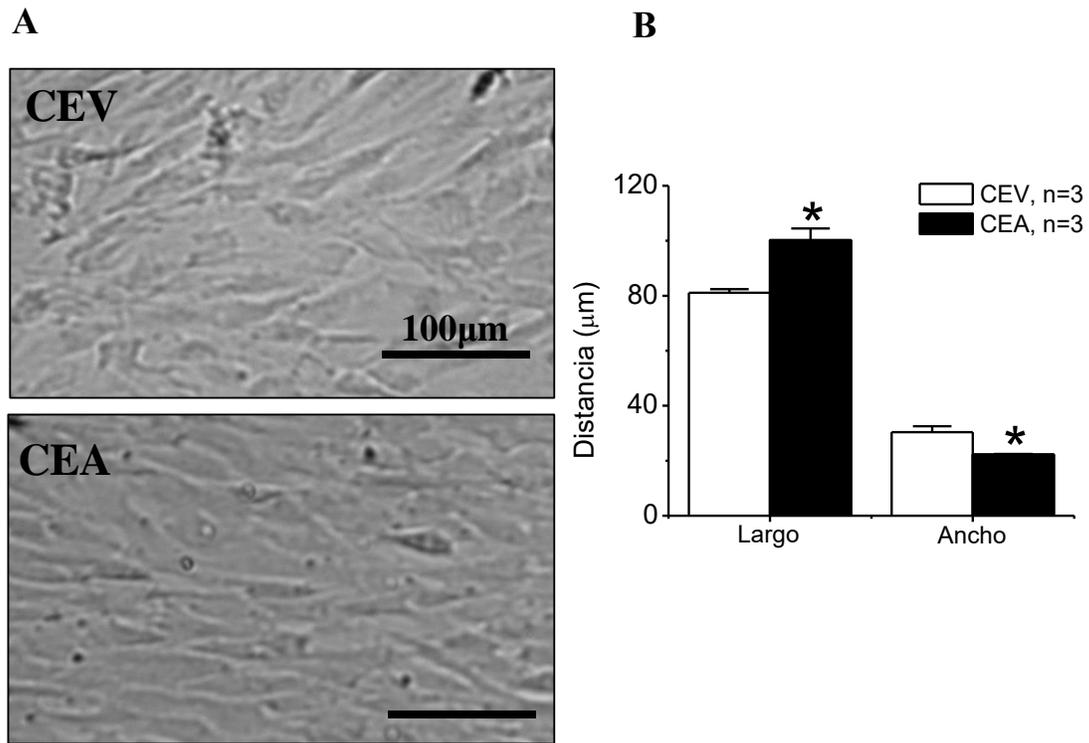


Figura 3. Características morfológicas de los cultivos de células endoteliales provenientes de vénulas post-capilares (CEV) y arterias de resistencia (CEA). A, Imágenes en campo claro de las CEV y de las CEA B, Análisis de la longitud y ancho de las CEV y las CEA. *, $P < 0,05$ CEV vs CEA

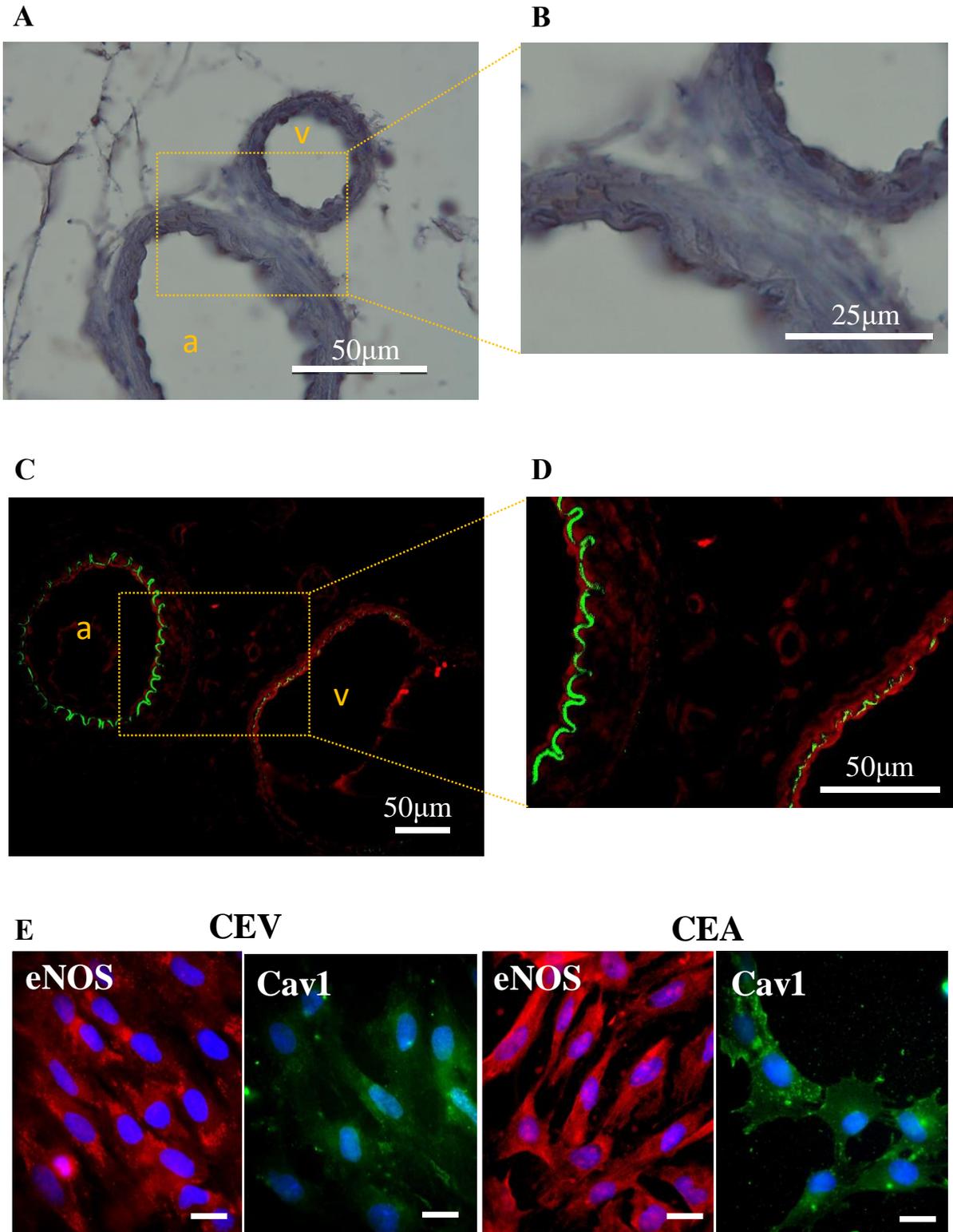


Figura 4. Características morfológicas de los arterias de resistencia y vénulas postcapilares y en cultivos de células endoteliales provenientes de vénulas post-capilares (CEV) y arterias de resistencia (CEA). A, Inmunohistoquímica para eNOS en cortes de mesenterio que muestran una arteria de resistencia (a) y en una vénula post-capilar. **B,** Imagen ampliada de A que muestra más detalle de la diferencia de ambos vasos sanguíneos. **C,** Inmunofluorescencia para eNOS en cortes de mesenterio que muestran una arteria de resistencia (a) y una vénula post-capilar. **D,** Imagen ampliada de C que muestra más detalle de la diferencia de ambos vasos sanguíneos. **E,** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de la distribución celular de eNOS y Caveolina 1 (Cav1) en CEV y CEA.

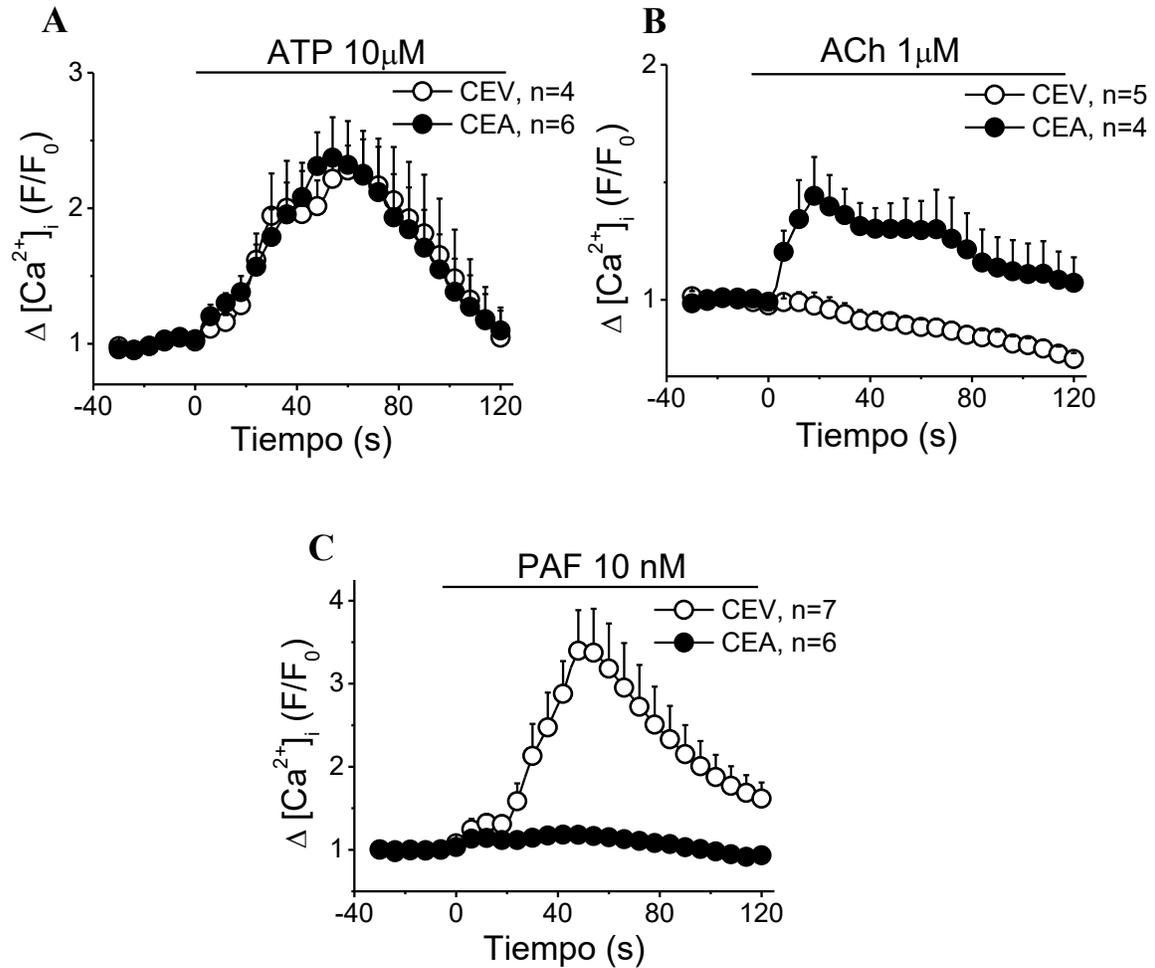


Figura 5. Caracterización funcional de los cultivos de células endoteliales provenientes de arterias de resistencia y vénulas post-capilares. Curso temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ observados en CEV y CEA en respuesta a la estimulación con ATP 10 μ M (A), ACh 1 μ M (B) o PAF 10 nM (C).

Luego de la estandarización del cultivo de las CEV, se evaluó la expresión de las conexinas típicamente descritas en el endotelio vascular (i.e. Cxs: 37, 40 y 43) y panexina 1 tanto en vénulas aisladas como en células endoteliales de vénulas postcapilares ambas provenientes de mesenterio de rata. Se detectó la expresión de Cx 37, Cx40, Cx43 y Panx 1 tanto en las vénulas aisladas como en CEV mediante Western blot (Figura 6A). Por otro lado, el análisis por inmunofluorescencia mostró que tanto las Cxs 37, 40 y 43 y Panx1 se expresan en el endotelio de las vénulas aisladas (Figuras 6B) y, en particular, la expresión de las conexinas en CEV presentó una señal puntilínea en las zonas de aposición celular (Figura 6C). Estos resultados confirman que la Cx37, la Cx40, la Cx43 y la panexina 1 se expresan en las células endoteliales de vénulas postcapilares.

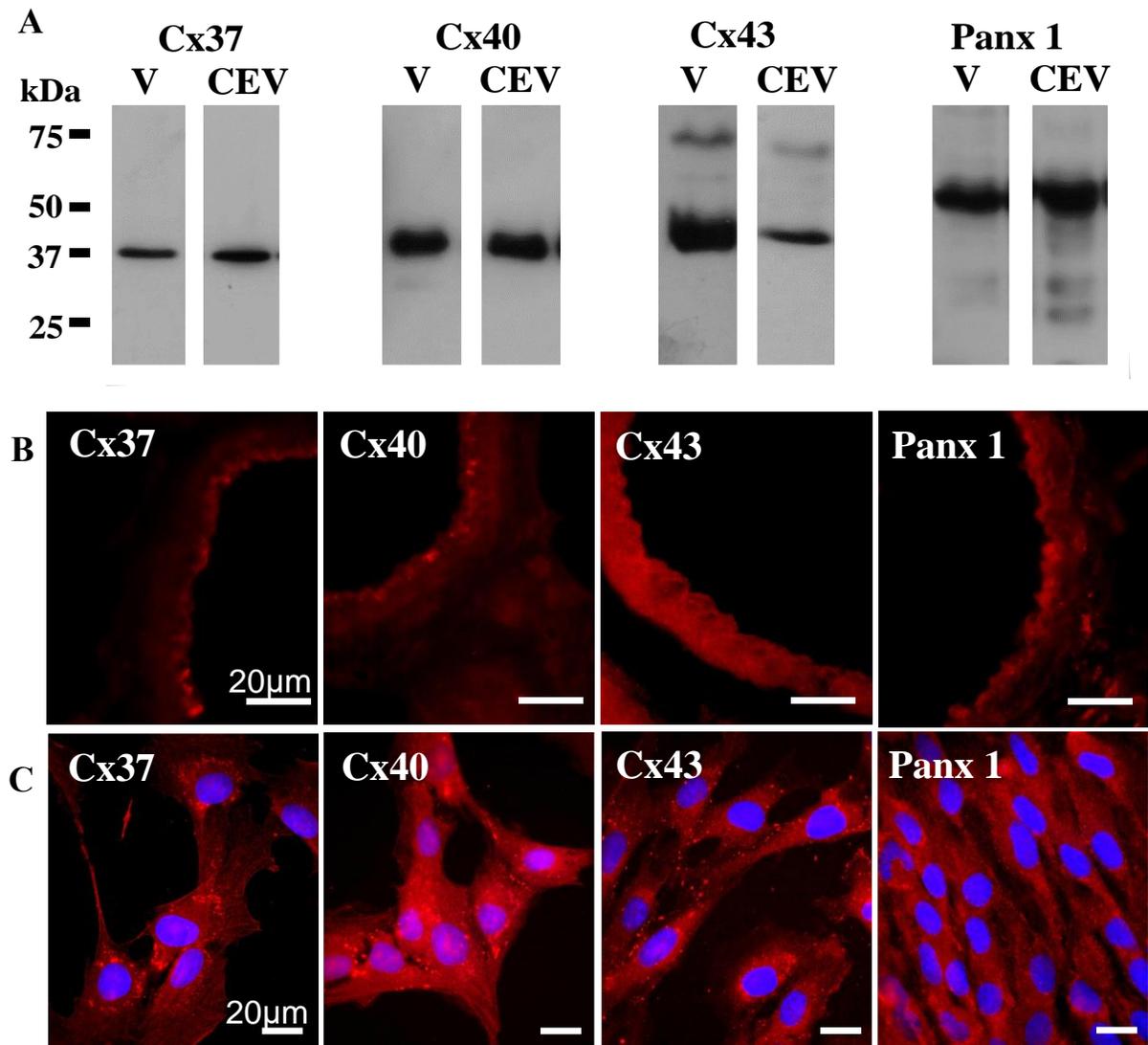


Figura 6. Expresión de conexas y Panx-1 en la células endoteliales de vénulas. A, Inmunoblots representativos de la expresión de la Cx37, Cx40, Cx43 y Panx-1 en vénulas intactas (V) y cultivos primarios de células endoteliales de vénulas post capilares (CEV). **B and C,** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Cx37, Cx40, Cx43 y Panx-1 en vénulas intactas (B) y en CEV (C).

Consistente con la apertura de hemicanales de conexinas y canales de panexinas observada en vénulas intactas (Figura 2), la estimulación con PAF 10 nM también aumentó la captación de etidio a lo largo del tiempo en CEV (Figura 7A y 7B). El tratamiento con los péptidos bloqueadores de las conexinas 37 y 43, ^{37,43}Gap27, y de Panx-1, ¹⁰Panx, inhibió casi por completo la captación de etidio, confirmando que la captación del colorante se produjo por medio de la apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 (Figura 7A y 7B).

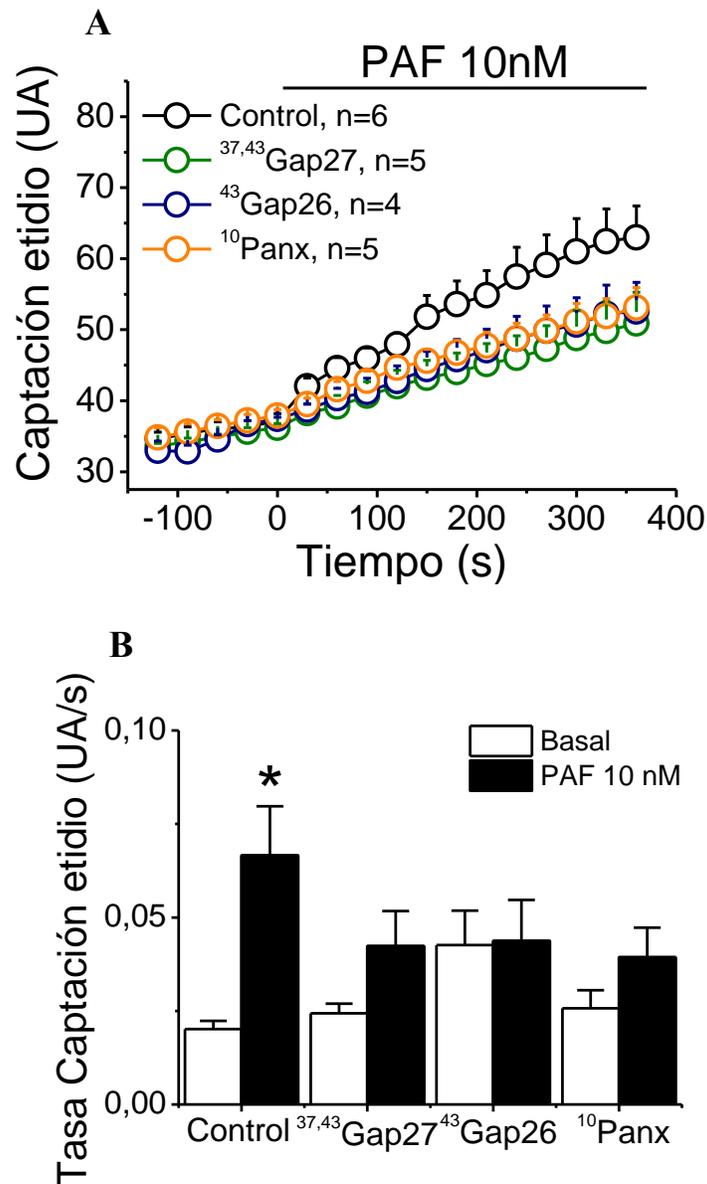


Figura 7. PAF induce la apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV). **A**, Curso temporal del aumento en la captación de etidio inducida por PAF en las CEV en condiciones control y en presencia de los péptidos inhibidores de conexinas, ^{37,43}Gap27 o ⁴³Gap26 o el péptido bloqueador de Panx-1, ¹⁰Panx. Los cambios en la señal fluorescente de etidio se expresan en unidades arbitrarias (UA). **B**, Análisis del aumento en la tasa de captación de etidio inducida por PAF en condiciones control y después del tratamiento con ^{37,43}Gap27, ⁴³Gap26 o ¹⁰Panx. En B *, P < 0,05 vs basal.

2. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ activada por PAF.

Los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1 son permeables a Ca^{2+} . Por lo tanto, se analizó la participación de estos canales en la señal de Ca^{2+} que media la respuesta pro-inflamatoria activada por PAF. La estimulación con PAF produjo un aumento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$, en donde se puede observar un primer incremento rápido que alcanzó un máximo durante los primeros 10 segundos de la respuesta y que después de estabilizarse por unos pocos segundos fue seguido por un segundo aumento de mayor magnitud que llegó a su máximo a los ~50 s, resultando en un incremento muy reproducible (Figura 8A). Este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ dependió principalmente de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, ya que la remoción del Ca^{2+} de la solución del baño (Ca^{2+} -free) produjo una muy fuerte reducción en ambas fases de la respuesta inducida por la estimulación con PAF (Figuras 8B y 8C). Estos resultados confirman que además de la participación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares hay una importante contribución de Ca^{2+} extracelular en la respuesta activada por PAF.

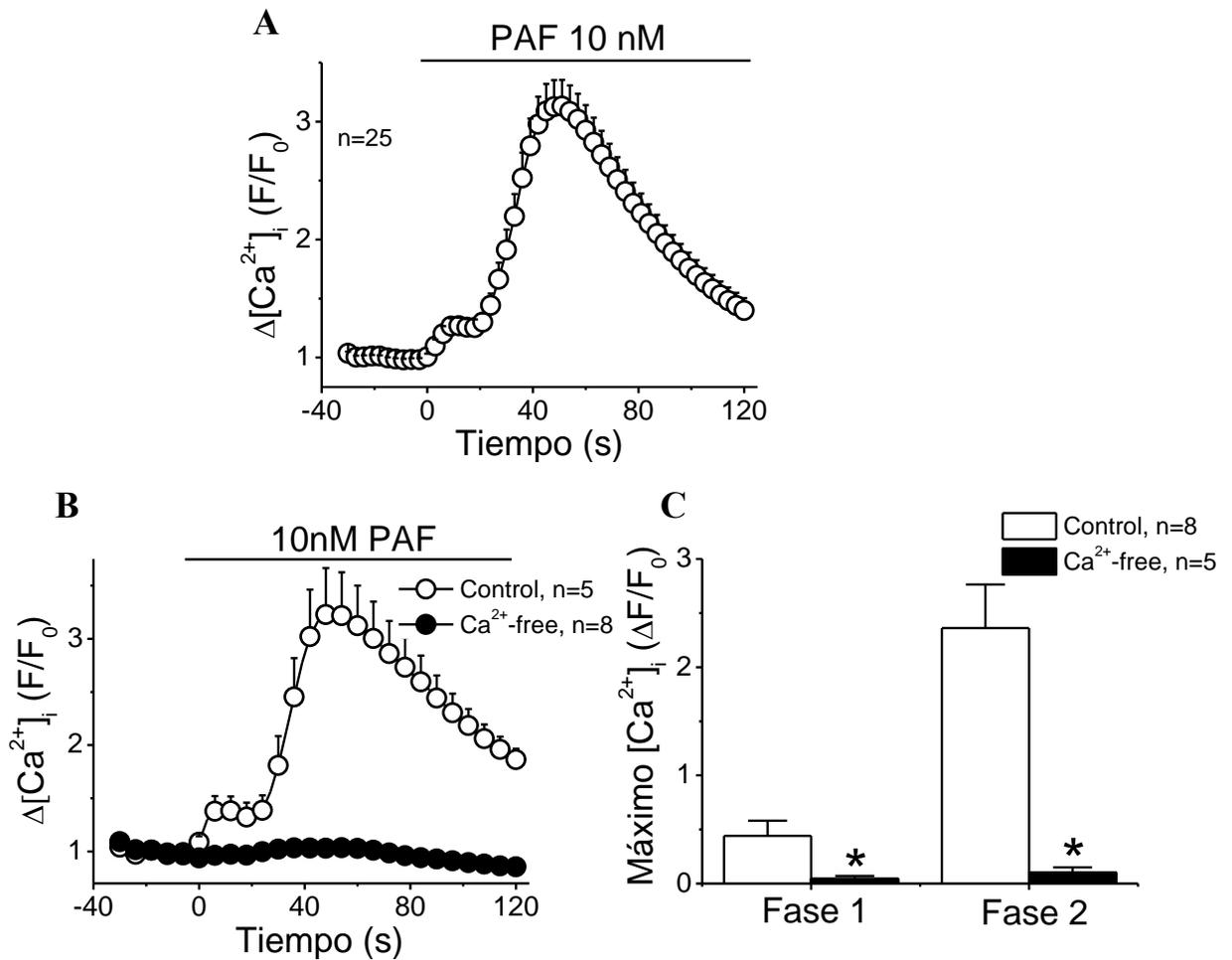


Figura 8. El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV) depende de Ca^{2+} extracelular. **A.** Análisis del curso temporal de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por PAF en las CEV. En este análisis se agruparon todos los controles de las distintas series experimentales, lo cual demuestra la alta reproducibilidad de la respuesta. Notar que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presenta dos fases. **B,** Curso temporal del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PAF en condiciones control y después de remover el Ca^{2+} de la solución extracelular (Ca^{2+} -free). **C,** Análisis del incremento máximo de la señal de Ca^{2+} en cada una de las fases observadas en respuesta a la estimulación con PAF. * $P < 0,05$ vs control.

Consistente con la participación de los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por Panx-1 en la respuesta activada por PAF, el bloqueo de estos canales inhibió la señal de Ca^{2+} inducida por PAF. El tratamiento con el péptido ^{37,43}Gap27 o el péptido ⁴³Gap26 inhibió ambas fases del aumento de Ca^{2+} intracelular (Figura 9A y 9B), mientras la incubación previa con el péptido ¹⁰Panx bloqueó completamente la primera fase de la respuesta, pero sólo redujo la segunda fase del aumento de Ca^{2+} en aproximadamente un 75% (Figura 9C y 9D).

El análisis del aumento máximo de Ca^{2+} muestra que tanto los péptidos bloqueadores de conexinas como panexinas inhiben significativamente ambas fases del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PAF (Figura 9A y 9C), esto sugiere que los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1 podrían proveer una vía directa para la entrada de Ca^{2+} en respuesta a PAF.

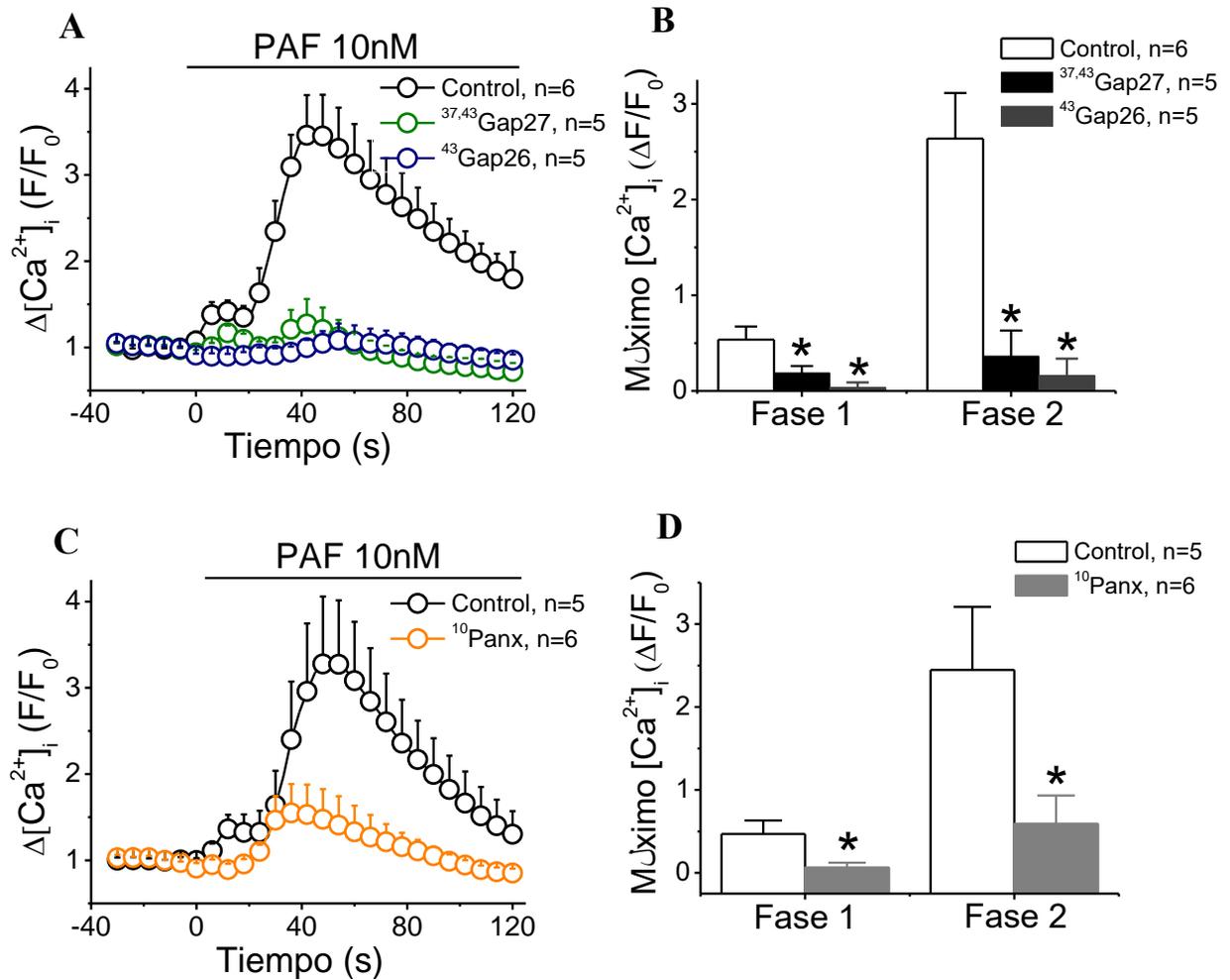


Figura 9. La señal de Ca^{2+} activada por PAF en las células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV) depende de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1. **A, C,** Curso temporal del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ observado en las CEV en respuesta a PAF en condiciones control y después del tratamiento con los péptidos inhibidores de conexinas, ^{37,43}Gap27 o ⁴³Gap26 (**A**) o el péptido bloqueador de Panx-1, ¹⁰Panx (**C**). **B, D,** Análisis del incremento máximo de la señal de Ca^{2+} en las dos fases de la respuesta inducida por PAF en ausencia (Control) y en presencia de ^{37,43}Gap27, ⁴³Gap26 (**B**) o ¹⁰Panx (**D**). *, $P < 0,05$ vs control.

3. La liberación de ATP contribuye a la señal de Ca^{2+} activada por PAF.

La apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 podría permitir la liberación de ATP y, por lo tanto, con el fin de estudiar la contribución de una vía purinérgica en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activado por PAF, se evaluó en primera instancia si la respuesta a PAF se asocia con la liberación de ATP. Los resultados muestran que la estimulación con PAF produce un aumento en la liberación de ATP, la cual se inhibe casi por completo en presencia de $^{43}\text{Gap26}$ o $^{10}\text{Panx}$ (Figura 10). Además, se determinó si la liberación de ATP contribuye al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de la activación de receptores purinérgicos y, consistente con esta noción, el tratamiento con PPADS, un bloqueador de receptores purinérgicos, inhibió el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activado por PAF (Figura 11A). Sin embargo, esta inhibición se restringió a sólo una fase de la respuesta, ya que en presencia de PPADS se observó un incremento en la fase 1 de la señal de Ca^{2+} y un bloqueo casi completo de la fase 2 (Figura 11B). Consecuentemente, se evaluó si la activación de receptores purinérgicos se relaciona con la apertura de los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por panexinas. Los resultados muestran que al medir la captación de colorante en CEV estimuladas por PAF, el tratamiento con PPADS no disminuyó la captación de etidio (Figura 11C) y esto se confirmó al analizar la tasa de captación (Figura 11D). Esto sugiere que ATP participa como una vía indirecta de aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de la liberación de ATP por hemicanales de conexina o canales de panexina y luego la activación de receptores purinérgicos.

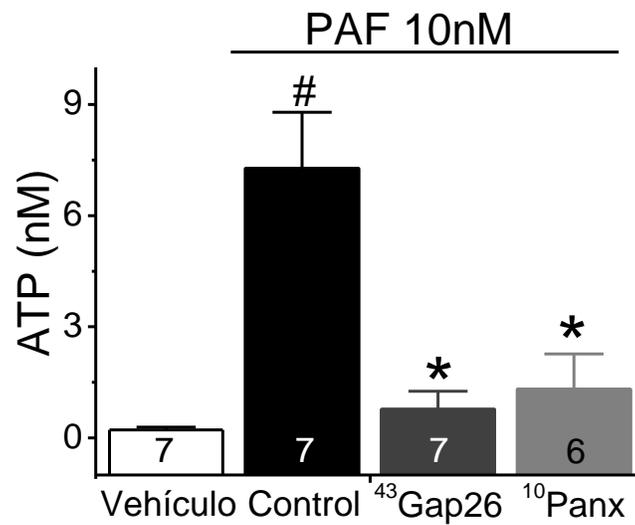


Figura 10. Liberación de ATP inducida por PAF células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV). Aumento en la concentración extracelular de ATP observado en respuesta a la estimulación de las CEV con PAF en condiciones control y en presencia de los péptidos inhibidores ⁴³Gap26 o ¹⁰Panx. # P < 0,05 vs el vehículo ; * P < 0,05 vs el control.

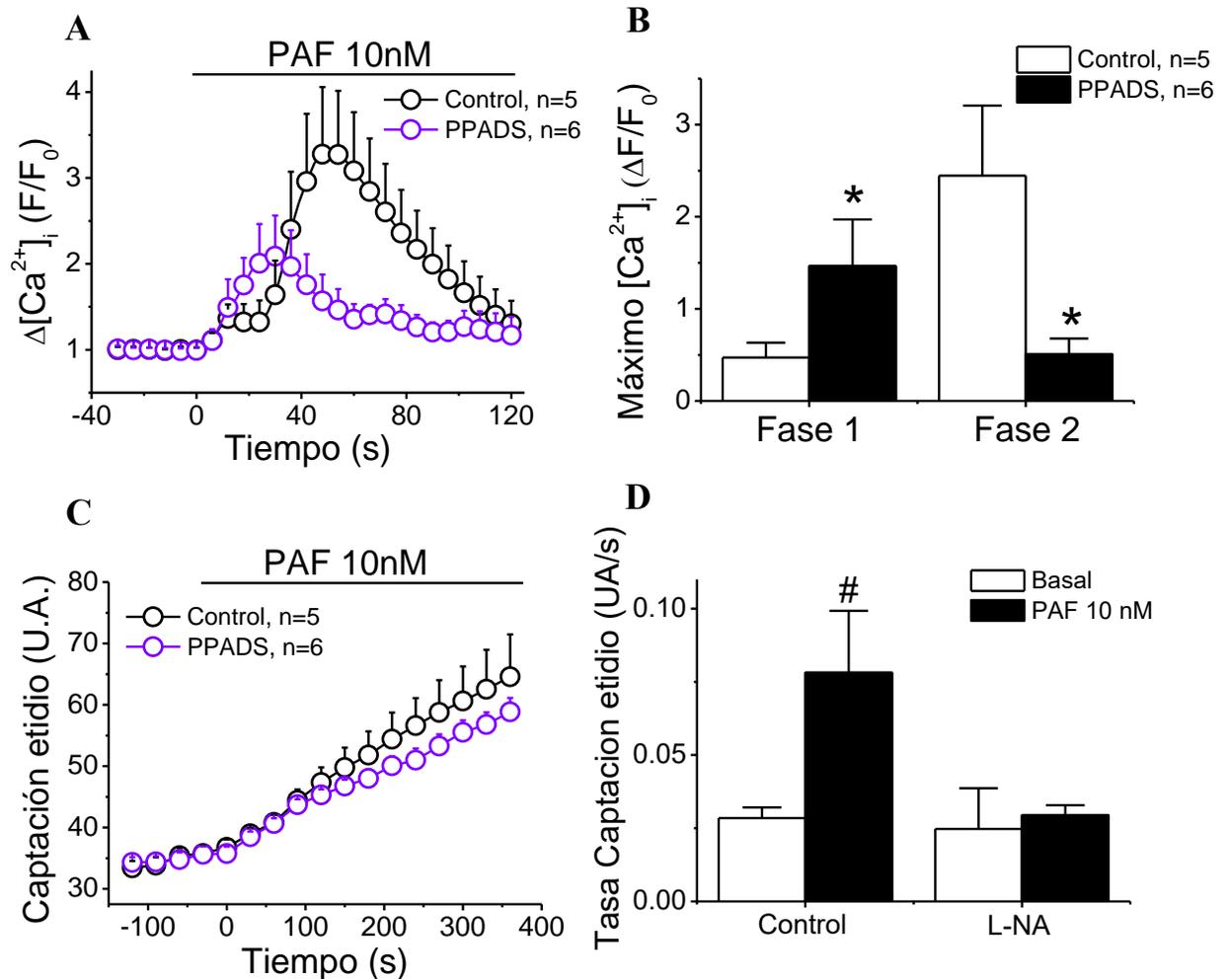


Figura 11. La activación de receptores purinérgicos contribuye al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV). A, Curso temporal de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observados en las CEV en respuesta a PAF en condiciones control y en presencia del bloqueador de receptores purinérgicos PPADS. **B,** Análisis del incremento máximo de la señal de Ca^{2+} en las dos fases de la respuesta inducida por PAF en ausencia (Control) y en presencia de PPADS. *, $P < 0,05$ vs control. **C,** Curso temporal del aumento en la captación de etidio inducida por PAF en condiciones control y después del tratamiento con PPADS. Los cambios en la señal fluorescente de etidio se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). **D,** Análisis del aumento en la tasa de captación de etidio inducida por PAF en condiciones control y en presencia de PPADS. *, $P < 0,05$ vs Control; #, $P < 0,05$ vs Basal

4. Participación del óxido nítrico en la señal de Ca^{2+} activada por PAF.

Como la actividad de los hemicanales de Cx43 y los canales de Panx-1 podría ser regulada por NO, se realizó la medición de Ca^{2+} intracelular en presencia del inhibidor farmacológico L-NA, lo cual provocó una disminución en el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulado por PAF (Figura 12A) y al analizar los máximos de Ca^{2+} el bloqueo es significativo en ambas fases (Figura 12B).

Para confirmar que el NO contribuye al aumento de Ca^{2+} a través de la regulación de la actividad de los hemicanales de Cx43 y canales de Panx-1, se analizó la captación de colorante en CEV, en donde se observó que el tratamiento con L-NA atenuó el aumento de la captación de etidio inducida por PAF (figura 12C y 12D). Estos resultados sugieren que el componente del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de NO podría estar mediado por la apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1.

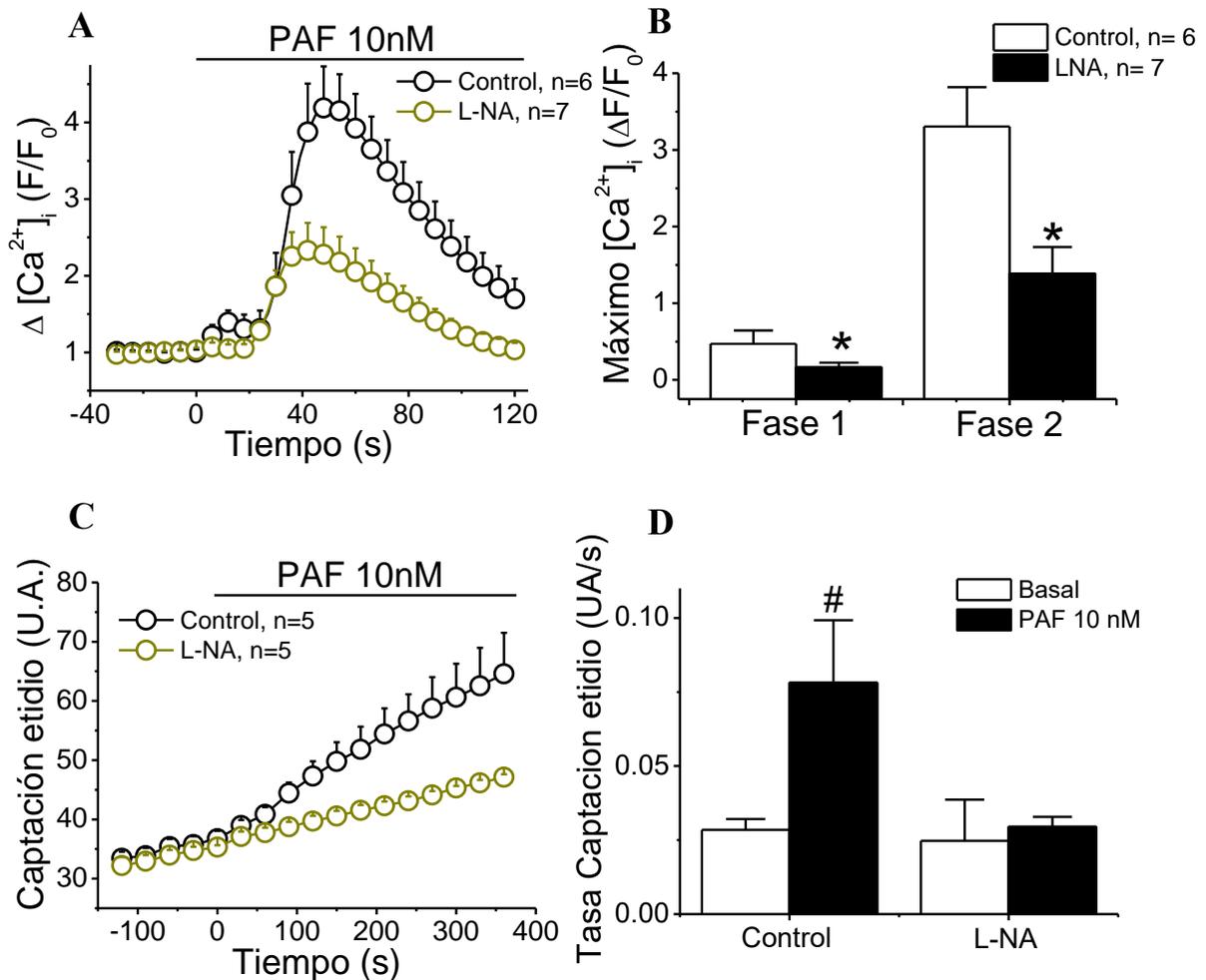


Figura 12. El óxido nítrico (NO) participa en la activación de la señal de Ca^{2+} inducida por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV). **A**, Curso temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por PAF en las CEV en condiciones control y después del bloqueo de la producción de NO con L-NA 100 μ M. **B**, Análisis del incremento máximo de la señal de Ca^{2+} en las dos fases de la respuesta inducida por PAF en ausencia (Control) y en presencia de L-NA. **C**, Curso temporal del aumento en la captación de etidio inducido por PAF en las CEV en ausencia (Control) y presencia de L-NA. Los cambios en la señal fluorescente de etidio se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). **D**, Análisis del aumento en la tasa de captación de etidio inducida por PAF en condiciones control y en presencia de L-NA. *, $P < 0,05$ vs Control; #, $P < 0,05$ vs Basal

Consistente con la participación de Cx43 y Panx-1 en el componente dependiente de NO del incremento de Ca^{2+} inducido por PAF, en la figura 13, la estimulación con el donador de NO SNAP indujo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que fue completamente bloqueado por los péptidos inhibidores $^{43}\text{Gap26}$ y $^{10}\text{Panx}$.

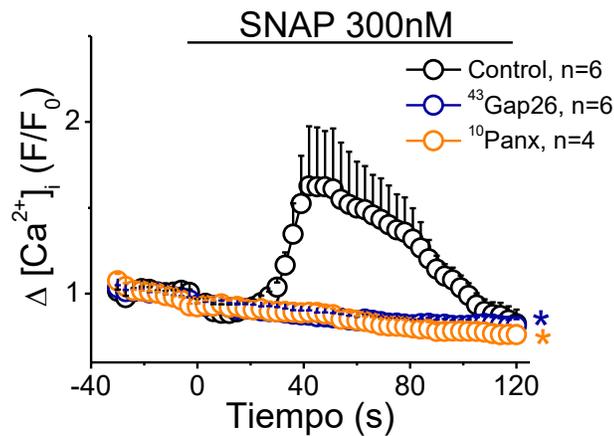


Figura 13. Señal de Ca^{2+} inducida por óxido nítrico (NO) en células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV). Curso temporal de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observados en respuesta a la estimulación con el donador de NO SNAP en condiciones control y en presencia del péptido inhibidor de hemicanales formados por Cx43, el $^{43}\text{Gap26}$, o el péptido bloqueador de canales formados por Panx-1, el $^{10}\text{Panx}$. *, $P < 0,05$ vs Curva Control.

Para relacionar la vía directa de entrada de Ca^{2+} , posiblemente a través de NO, con la vía indirecta de entrada de Ca^{2+} , a través de la liberación de ATP, se midió la captación de colorante estimulada por PAF en presencia de L-NA más el péptido $^{43}\text{Gap}26$ y L-NA más ^{10}Pax . Ambos resultados mostraron que hay una disminución de la captación de colorante levemente más pronunciada al tratamiento de L-NA por sí solo (Figura 14A y 14B). Al medir el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por PAF incubados previamente con L-NA más PPADS muestran que hay una inhibición casi completa de la respuesta de Ca^{2+} en ambas fases. Estos resultados sugieren que ambas vías de entrada de Ca^{2+} son secuenciales y actúan a través de hemicanales formados por Cx43 y Pax-1.

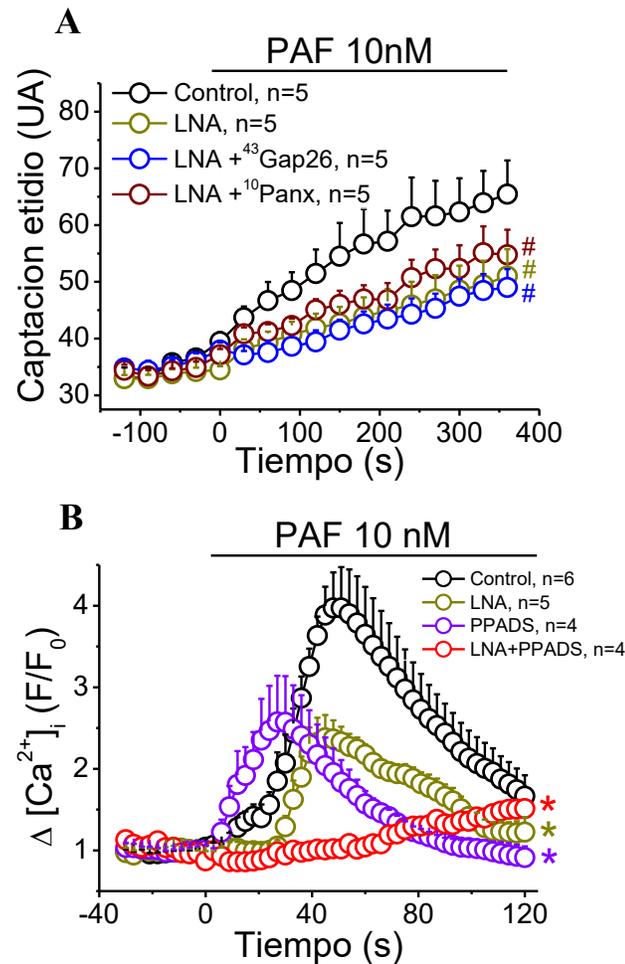


Figura 14. Participación del óxido nítrico y los receptores purinérgicos en la señal de Ca^{2+} activada por PAF en las células endoteliales de vénulas postcapilares (CEV). **A.** Curso temporal del aumento en la captación de etidio inducido por PAF en las CEV en condiciones control y después del tratamiento con L-NA sola o en combinación con ⁴³Gap26 o ¹⁰Panx. Los cambios en la señal fluorescente de etidio se expresan en unidades arbitrarias (UA). **B.** Curso temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ observados en las CEV en respuesta a PAF 10 nM en ausencia (Control) o presencia de LNA, PPADS o L-NA junto con PPADS. #, $P < 0,05$ vs Curva Control sin basal; *, $P < 0,05$ vs Curva Control.

5. NO induce la S-nitrosilación de conexina 43.

Luego se estudió si la producción de NO contribuye a la activación de hemicanales de conexina o canales de panexina a través de la S-nitrosilación de conexinas y/o panexinas. Como una primera aproximación experimental, se evaluó por inmunofluorescencia el cambio global en los niveles de S-nitrosilación de proteínas en células endoteliales de vénulas post-capilares luego de la estimulación con PAF por 1 minuto. Los resultados en la figura 15 muestran que efectivamente ocurre un notorio aumento de la señal de proteínas nitrosiladas al estimular con PAF, el cual fue inhibido por el tratamiento con L-NA, confirmando la contribución del NO a esta modificación.

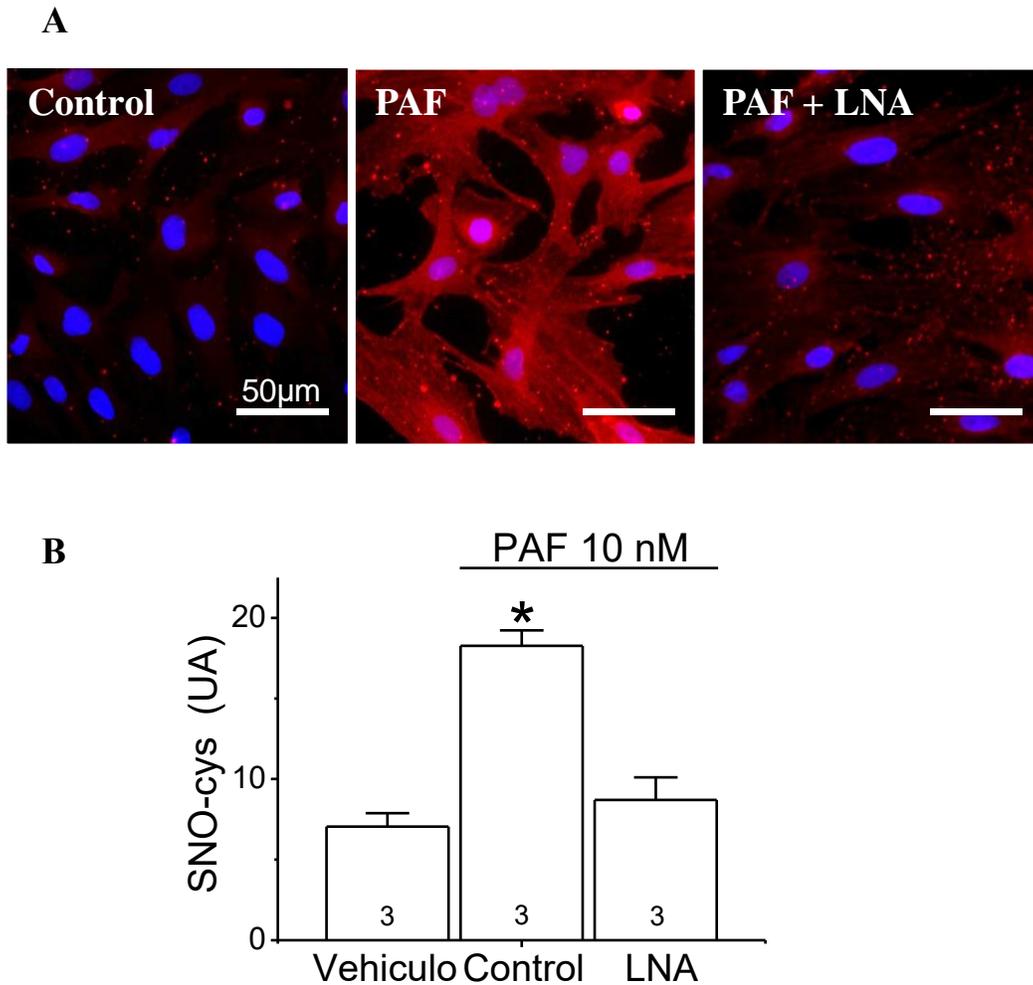


Figura 15. PAF aumenta la S-nitrosilación de proteínas en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV). **A**, Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de la S-nitrosilación de proteínas observada en CEV en respuesta a la estimulación con PAF en condiciones control (sin estímulo) y después del tratamiento por 45 minutos con L-NA. Además, también se muestra el efecto del vehículo del PAF. **B**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los experimentos mostrados en A. Los cambios en la señal fluorescente se expresan en unidades arbitrarias (A.U.). *, $P < 0,05$ vs vehículo

Consecuente con el resultado anterior, se estudió la relación espacial de la eNOS con la conexina 43 y panexina 1, ya que la modificación por S-nitrosilación se produce cerca de la fuente de producción de NO, donde su concentración es mayor. Para ello, la técnica de Proximity ligation assay (PLA) permite detectar si dos proteínas se encuentran a una distancia igual o menor a 20nm, por lo cual, si se usan los anticuerpos apropiados, también permite reconocer modificaciones postraduccionales. Los resultados de la figura 16 muestran que la estimulación con PAF produce un aumento de la señal de PLA para conexina 43 con eNOS, pero, no para panexina 1 con eNOS, sugiriendo que la respuesta activada por PAF lleva a que se genere una asociación espacial entre Cx43 y eNOS que podría favorecer la activación de la Cx43 por S-nitrosilación. Por lo tanto, se evaluó directamente la S-nitrosilación de la Cx43 por medio de la técnica de PLA. Consistente con los resultados anteriores, PAF produjo un incremento en los niveles de S-nitrosilación de Cx43 (Figura 17). Estos resultados son compatibles con la propuesta que un aumento inicial de NO gatillado por PAF activa la entrada de Ca^{2+} través de la apertura inducida por S-nitrosilación de hemicanales formados por Cx43.

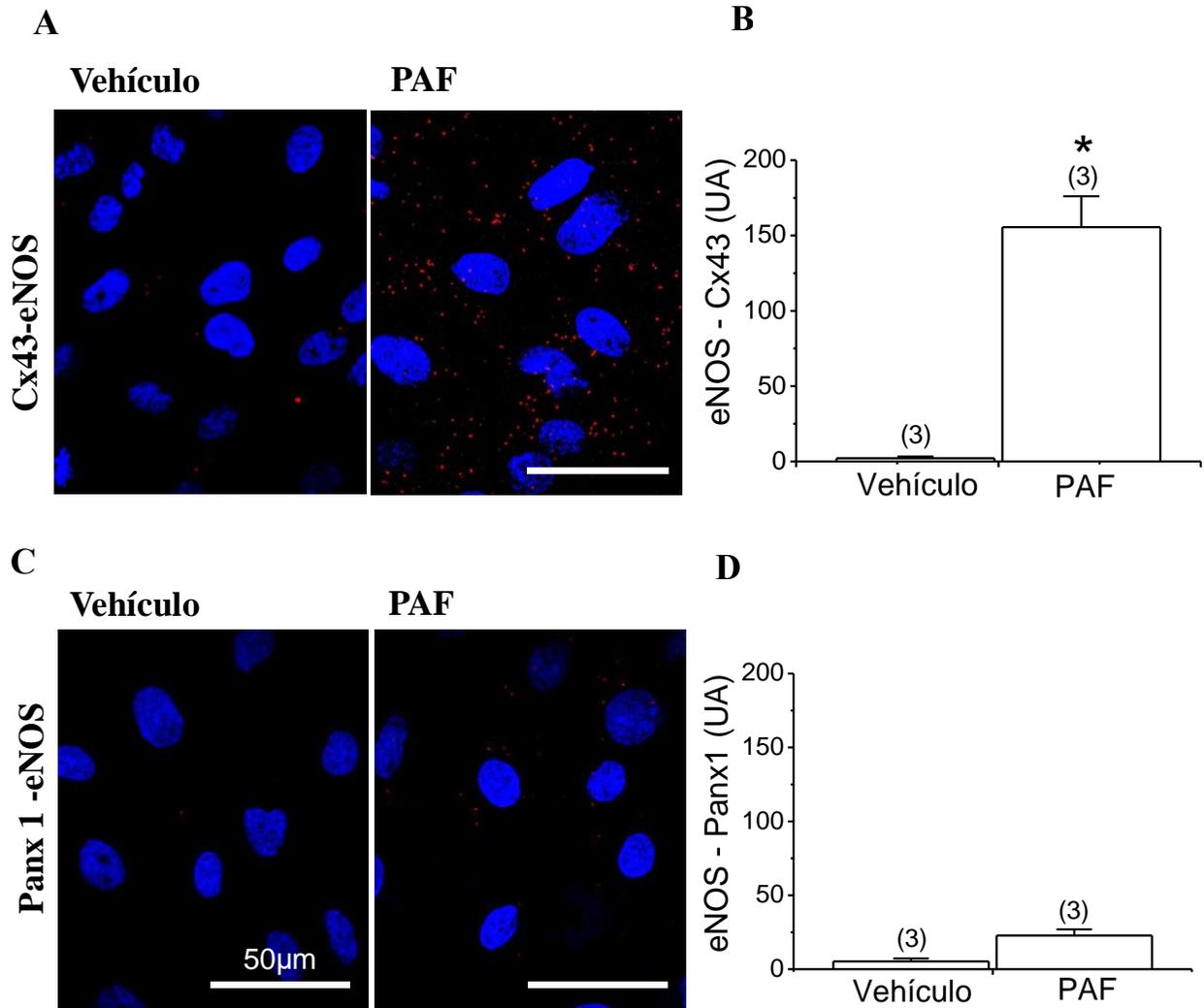


Figura 16. PAF induce un aumento en la asociación especial de eNOS con Cx43 en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV). A y C, Imágenes representativas del análisis por el Ensayo de Ligación por Proximidad de la asociación espacial de eNOS con Cx43 (A) o Panx-1 (C) en CEV después de la estimulación con PAF por 1 min o con su vehículo. La señal fluorescente roja indica que las proteínas analizadas se encuentran a una proximidad menor de 20 nm. **B y D,** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los experimentos mostrados en A y C. Los cambios en la señal fluorescente se expresan en unidades arbitrarias (AU). Los números entre paréntesis indican el valor de n. *, $P < 0,05$ vs vehículo

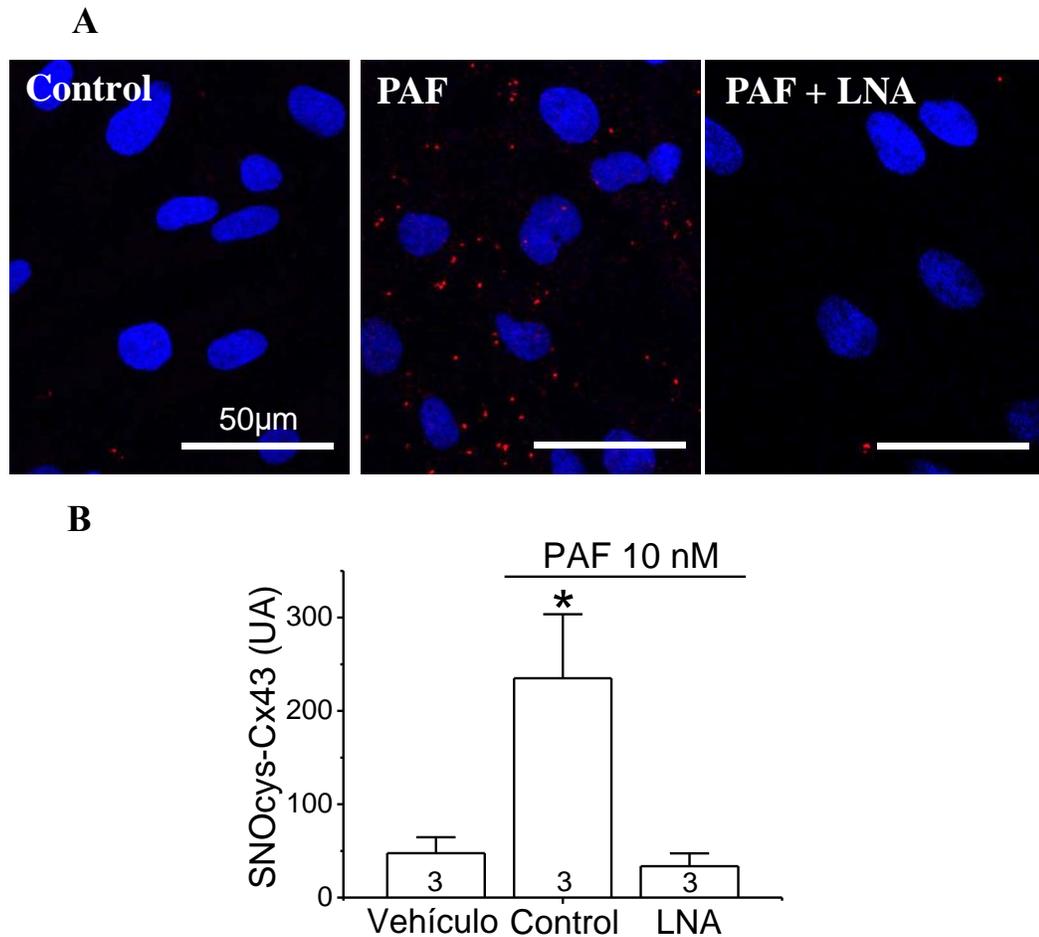


Figura 17. PAF induce la S-nitrosilación de Cx43 en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV). **A**, Imágenes representativas del análisis por el Ensayo de Ligación por Proximidad de la S-nitrosilación de Cx43 observada en las CEV en respuesta a la estimulación con PAF por 1 min en condiciones control y en presencia L-NA, un inhibidor de la producción de NO. También se muestra el efecto de la aplicación del vehículo del PAF. Los cambios en la señal fluorescente se expresan en unidades arbitrarias (AU). **B**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los experimentos mostrados en A. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $P < 0,05$ vs vehículo

6. Cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad inducida por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares depende de hemicanales de conexina.

En base a los resultados anteriormente expuestos, se estudió si los hemicanales formados por Cx43 podrían participar en los cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad inducida por PAF. Para ello, se estudió la formación de poros o espacios (“gaps”) intercelulares en los sitios de unión de células endoteliales de vénulas post-capilares a través de un análisis morfológico por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). En los resultados (Figura 18) se muestran imágenes representativas del barrido y medición de la altura de dos células adyacentes antes y después de la estimulación con PAF. Como esperado, se observó que PAF indujo la formación de espacios intercelulares, consistentes con los cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad. Además, el tratamiento con ^{37, 43}Gap27 bloqueó la formación de estos espacios, confirmando la participación de los hemicanales formados por Cx43 en este proceso.

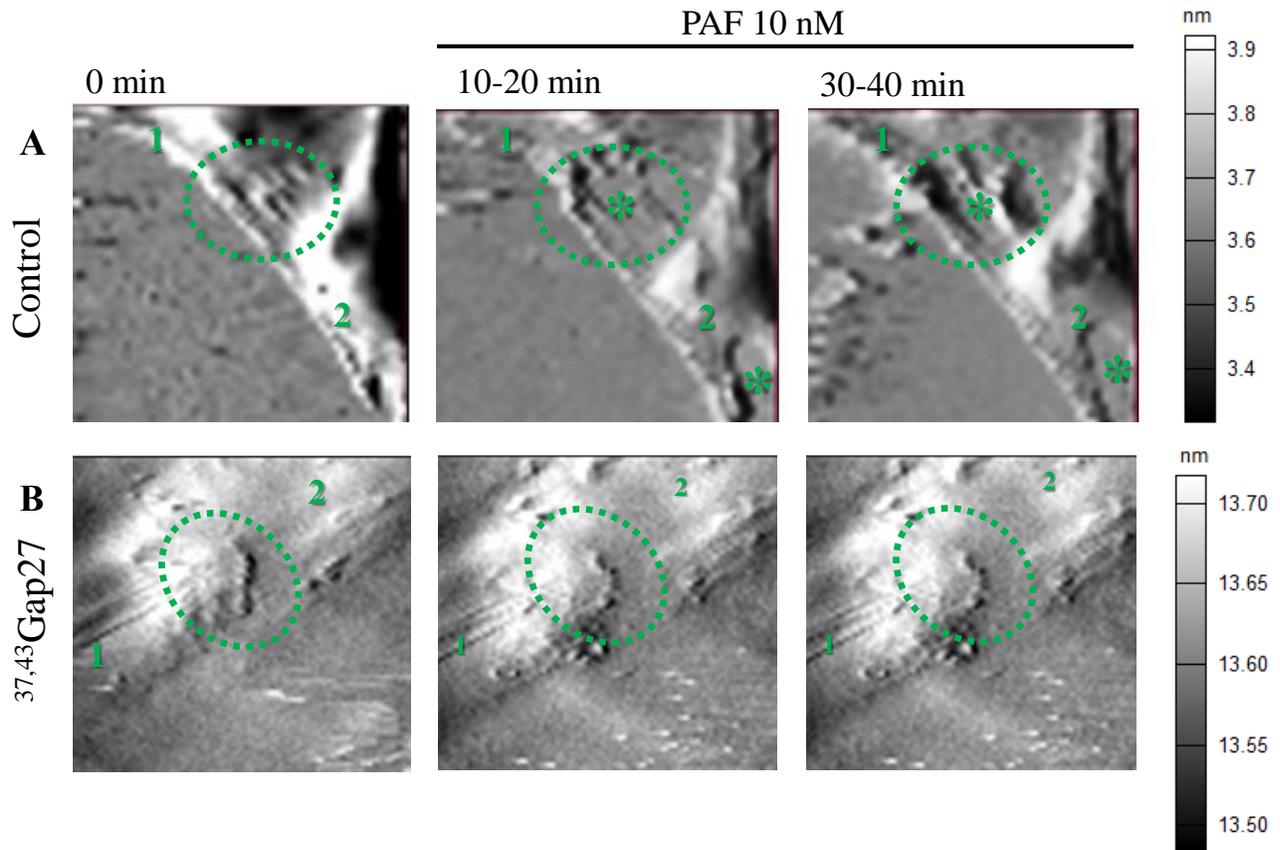


Figura 18. La formación de poros intercelulares en respuesta a PAF depende de hemicanales formados por conexina 43. Imágenes representativas del análisis por Microscopía de Fuerza Atómica de los cambios morfológicos inducidos por PAF en las células endoteliales de vénulas post-capilares en condiciones control (A) y en presencia del péptido ^{37,43}Gap27 (B). * indica la región en que se formaron poros internedoteliales en respuesta a PAF. Los círculos con línea punteada delimitan el área de aposición celular. En A y B se muestran dos células identificadas como 1 y 2. La escala a la derecha de las imágenes representa la altura de las células.

7. La respuesta activada por PAF se asocia con una variación en el potencial de membrana en células endoteliales de vénulas postcapilares.

Se ha observado que la respuesta inducida por PAF es sensible al bloqueo de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Oshiro et al., 1995) lo cual sugiere que un mecanismo dependiente de voltaje podría estar involucrado en la señalización iniciada por PAF. Por lo tanto, se analizó la participación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) en la respuesta a PAF. El resultado de la figura 19A y 19B muestra, en primer lugar, que el potencial en reposo de las células endoteliales es de aproximadamente -40 mV, y que la estimulación con PAF gatilla la generación de espigas despolarizantes en el potencial de membrana. El tratamiento con el inhibidor de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v), TTX ($1 \mu\text{M}$), bloqueó completamente la generación de estas “espigas”, confirmando la participación de canales Na_v en la respuesta. Además, la concentración utilizada de TTX sugiere que los canales involucrados pertenecerían a las isoformas de canales Na_v sensibles a TTX. En este contexto, se ha detectado previamente que en las células endoteliales arteriolares se expresan los canales $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.9$ (Figuroa, 2007) y que en las células HUVEC los canales $\text{Na}_v1.5$ y $\text{Na}_v1.7$ (Andrikopoulos, 2010), por lo que mediante la técnica inmunofluorescencia se evaluó la expresión de estas proteínas en las células endoteliales de vénulas postcapilares. Los resultados confirman la expresión de los canales $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.6$ en el endotelio de las vénulas postcapilares y en los cultivos de células endoteliales de vénulas postcapilares (Figura 21A y 21B). Por otro lado, en la figura 20A se observa que la estimulación con ATP no provoca las espigas despolarizantes y la adición de PAF gatilla la variación de potencial a pesar de la presencia de ATP. Junto con esto, el tratamiento con PPADS no interfiere en la variación de potencial generada por PAF (Figura 18B), lo que confirma que la posible participación de ATP y activación de receptores

purinérgicos en el proceso de hiperpermeabilidad son posteriores a la apertura de canales de Na_v .

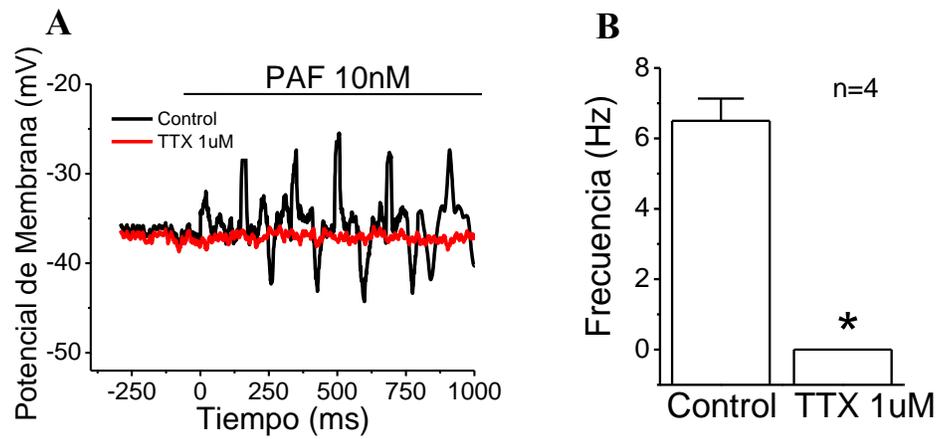


Figura 19. PAF induce la oscilación del potencial de membrana en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV). **A**, Registro representativo de las variaciones en el potencial de membrana de las CEV en respuesta a la estimulación con PAF en condiciones control o en presencia de tetrodotoxina (TTX). **B**, Análisis de la frecuencia de los picos de despolarización inducidos por PAF en ausencia (Control) o presencia de TTX. *, $P < 0,05$ vs Control

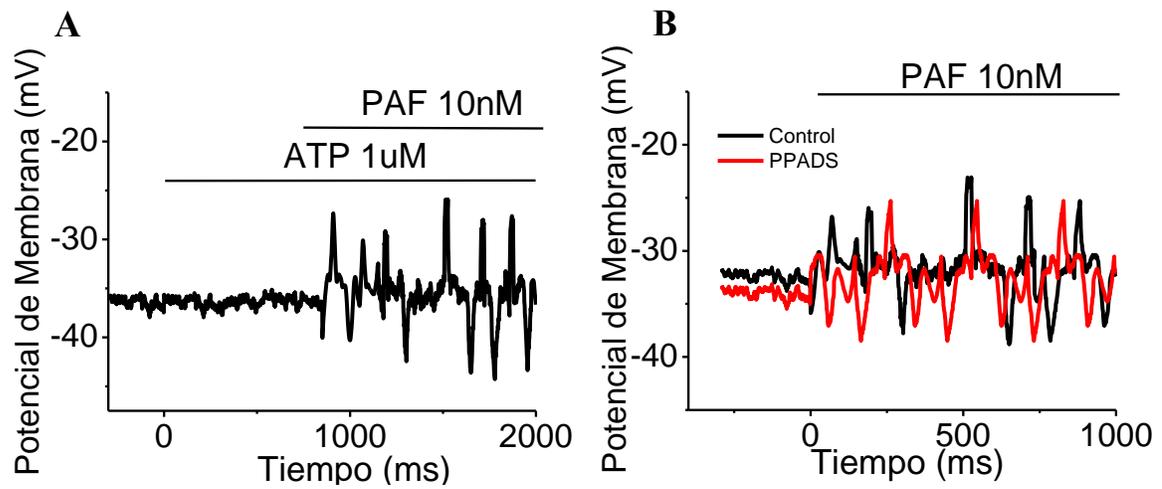


Figura 20. Las oscilaciones en el potencial de membrana inducido por PAF en células endoteliales de vénulas post-capilares (CEV) es independiente de la señalización de ATP. A, Registro representativo del potencial de membrana de las CEV en respuesta a ATP solo y subsecuentemente a ATP junto con PAF. **B,** Registro representativo de las variaciones en el potencial de membrana de las CEV inducidas por PAF en presencia de PPADS.

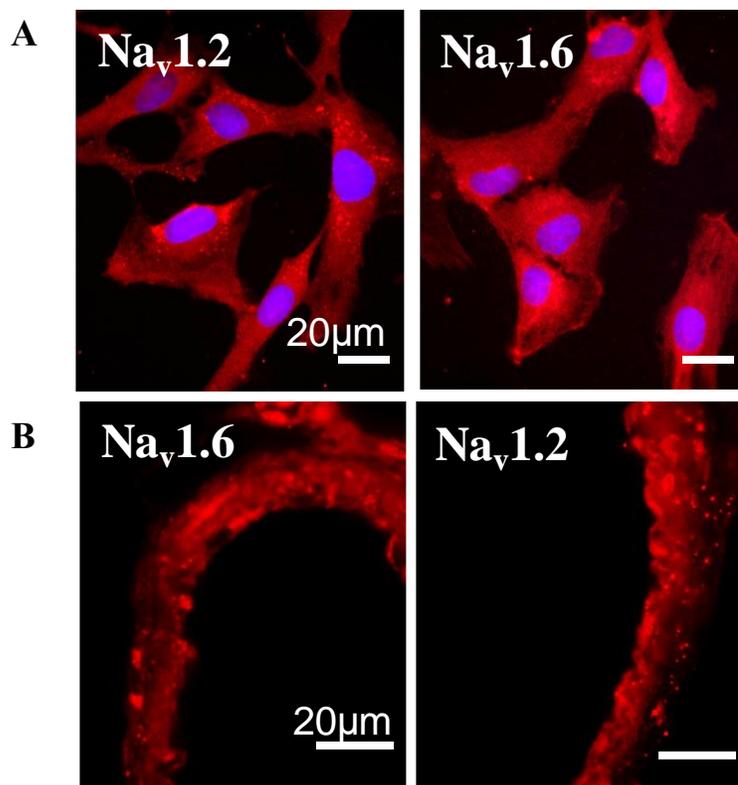


Figura 21. Expresión de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) en las células endoteliales de vénulas post-capilares. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión en cultivos primarios de células endoteliales de vénulas post-capilares (A) y en vénulas mesentéricas intactas (B) de las isoformas de los canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$.

8. Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje participan en la señal de Ca²⁺ y en los cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad inducida por PAF en células endoteliales de vénulas postcapilares.

Para confirmar la participación de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje sensibles a TTX en la respuesta inducida por PAF, se analizaron los cambios en la [Ca²⁺]_i. El tratamiento con TTX 1μM inhibió el aumento en la [Ca²⁺]_i activado por PAF (Figura 22A y 22B), confirmando la participación de estos canales en la respuesta.

Con el fin de identificar la isoforma de canal Na_v involucrada, se evaluó el efecto de bloqueadores específicos de los canales Na_v1.2 o Na_v1.6 sobre el aumento de la [Ca²⁺]_i. El bloqueo de los canales Na_v1.6 con 4,9 anhidro TTX no afectó la señal de Ca²⁺ iniciada por PAF (Figura 22C y 22D), pero, notablemente, el tratamiento con Lamotrigina, un inhibidor de los canales Na_v1.2, prácticamente abolió la respuesta. Este resultado se evidencia claramente tanto en el curso temporal (Figura 22C) como en el análisis del aumento máximo de la respuesta (Figura 22D), lo cual sugiere que los canales Na_v1.2 participan en la señal de Ca²⁺ asociada a la respuesta de hiperpermeabilidad iniciada por PAF.

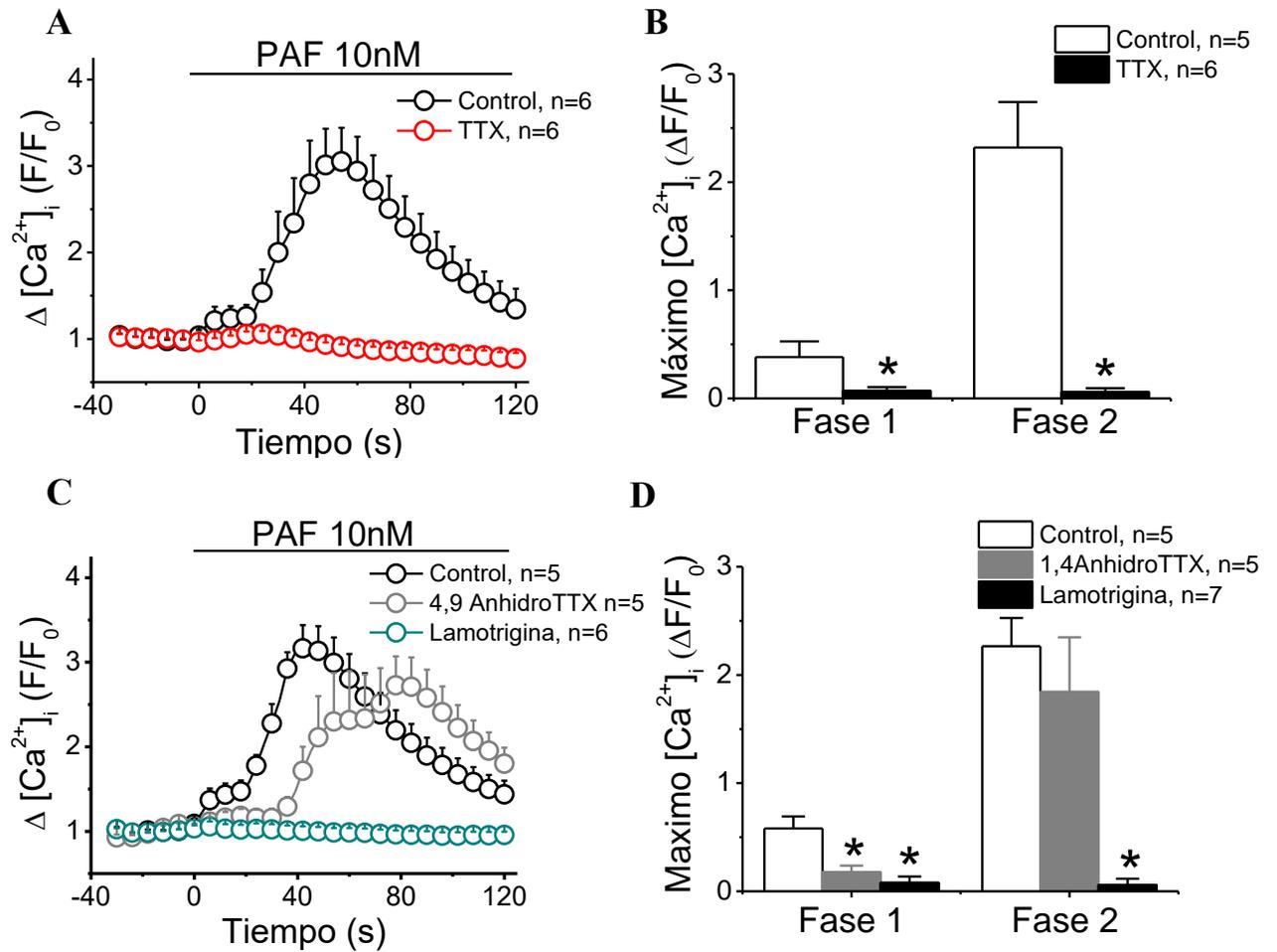


Figura 22. La señal de Ca^{2+} activada por PAF depende de la activación del canal $Na_v1.2$. **A y C**, Curso temporal del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PAF en condiciones control y en presencia de TTX (**A**), 1,4-anhidro-TTX (**C**), un inhibidor f de los canales $Na_v1.6$, y de lamotrigina (**C**), un bloqueador de los canales $Na_v1.2$. **B y D**, Análisis del incremento máximo de la señal de Ca^{2+} en las dos fases de la respuesta inducida por PAF en ausencia (Control) y en presencia de TTX (**B**), 4,9-anhidro-TTX (**D**) y Lamotrigina (**D**). *, $P < 0,05$ vs control.

Finalmente, se analizó por AFM si los canales de Na⁺ dependientes de voltaje participan en los cambios estructurales asociados a la hiperpermeabilidad inducida por PAF (Figura 23). Las imágenes representativas del barrido y medición de la altura de dos células adyacentes muestran una clara formación de espacios intercelulares en respuesta a la estimulación con PAF, lo cual fue inhibido por el tratamiento con TTX 1μM (Figura 23B). En presencia de TTX se observó más bien la aparición de fibras de estrés que impiden la “ruptura” de la unión intercelular, confirmando la participación de los canales Nav en los cambios estructurales asociados a la respuesta de hiperpermeabilidad por PAF.

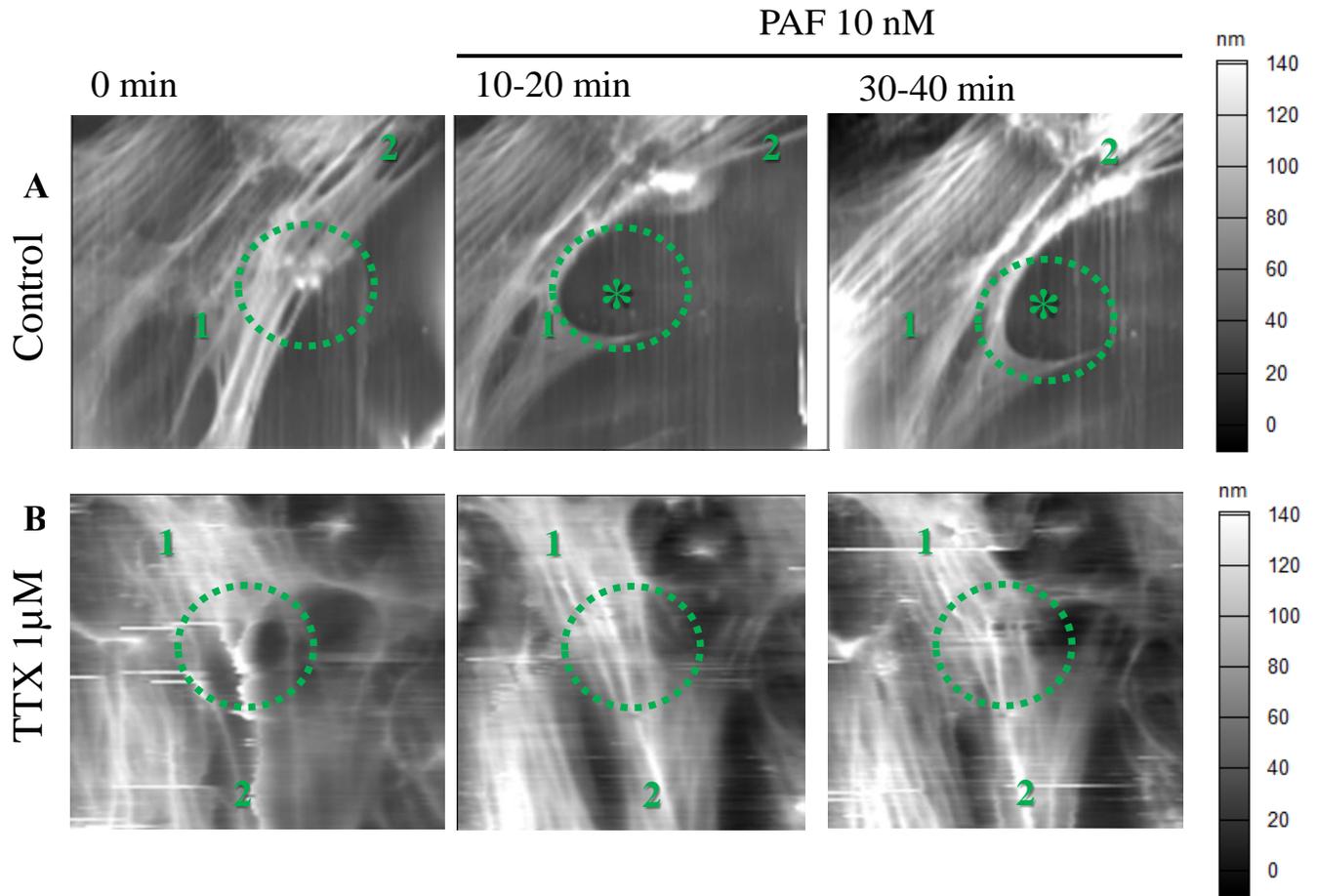


Figura 23. La formación de poros intercelulares en respuesta a PAF depende de canales Na_v . Imágenes representativas del análisis por Microscopía de Fuerza Atómica de los cambios morfológicos inducidos por PAF en los cultivos primarios de células endoteliales de vénulas post-capilares en condiciones control (**A**) y en presencia de TTX 1 μM (**B**). * indica la región en que se formaron poros internodoteliales en respuesta a PAF. Los círculos con línea punteada delimitan el área de aposición celular. En A y B se muestran dos células identificadas como 1 y 2. La escala a la derecha de las imágenes representa la altura de las células.

DISCUSIÓN

La visión del endotelio como una barrera estable que permite el intercambio selectivo de nutrientes, agua y proteínas plasmáticas contrasta con su papel ampliamente conocido en el proceso inflamatorio (Fitz Roy E. Curry & Adamson, 2010; Levick & Michel, 2010). A pesar de que se ha estudiado la hiperpermeabilidad desde la segunda mitad del siglo XX, aún sigue en discusión el mecanismo por el cual se produce. Variados grupos de estudio han llegado al consenso que la hiperpermeabilidad es un fenómeno complejo, y que puede ser explicada desde vías paracelulares como la formación de gaps o “espacios” producidos por la retracción del citoesqueleto a través de la interacción actina-miosina o por la desestabilización de las uniones adherentes entre las células endoteliales, por vías transcelulares, a través de organelos vesiculo-vacuolares (VVO), por alteración del glicocálix, un componente de la barrera endotelial, y también por la interacción con otras células, como la liberación de agentes proinflamatorios, trampas extracelulares o NETs y ROS por los neutrófilos o por la participación de células adyacentes como los pericitos (R. H. Adamson et al., 2003a; Alphonsus & Rodseth, 2014; Armulik et al., 2010; Harding et al., 2019; Jamieson et al., 2019; Ma et al., 2019; Rigor et al., 2013; Van Hinsbergh & Van Nieuw Amerongen, 2002; Villaseñor et al., 2017). A pesar de las diversas opciones, un elemento central de señalización de la hiperpermeabilidad es el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, producida por agentes inflamatorios, y si bien la vía de IP3 es la que se encuentra más estudiada, aún sigue en discusión la o las vías que permitan la entrada directa de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Bates & Curry, 1997; Brailoiu, Eugen, Shinsky, Megan, Yan, Guang, Abood, Mary E., Brailoiu, 2017; Brailoiu et al., 2018; Chetham et al., 1999; F. E. Curry, 1992; He et al., 1990; Kugelmann et al., 2018; Pocock et al., 2000; Samapati et al., 2012; Sarker et al.,

1998; Suresh et al., 2015; Tauseef et al., 2016; Thakore & Earley, 2019; Townsley, 2018; Wu et al., 2005; Zhou et al., 2016; Zou et al., 2015).

Dentro del contexto de la hiperpermeabilidad se ha descrito la posible interacción de los canales intercelulares formados por conexinas, las gap junctions, con las uniones estrechas (Nagasawa et al., 2006; J. Zhang et al., 2018) y uniones adherentes (Kandasamy et al., 2015; Liu et al., 2015). Asimismo, también se ha estudiado la participación de los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por panexinas en la migración de leucocitos (Lohman et al., 2015b; Veliz et al., 2008; Vliagoftis et al., 2014) y, además, en la señalización de Ca^{2+} observada en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y pulmones (De Bock et al., 2011; Kaneko et al., 2015). Sin embargo, estos territorios son más bien particulares y no representan necesariamente lo que ocurre a nivel periférico.

El aumento de la captación de colorante en la red vascular intacta de mesenterio estimulada con PAF muestra que la respuesta activada por PAF involucra un incremento asociado a la permeabilidad de la membrana plasmática como el producido por los hemicanales formados por conexina y canales formados por panexina, y el tratamiento con los péptidos inhibidores $^{37,43}\text{Gap27}$, $^{43}\text{Ga26}$ y $^{10}\text{Panx}$ confirmó la participación de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en este proceso (Figura 2). Cabe destacar que la captación de colorante estimulada por PAF se observó exclusivamente en las vénulas postcapilares. En relación con lo anterior, al evaluar la captación de colorante inducida por ATP, que es un agonista ampliamente estudiado en ambos territorios vasculares, arterias y vénulas, se observó que efectivamente tanto en arterias como en vénulas postcapilares se activan hemicanales de conexina y panexina (Figura 2). Los resultados indican que hay una respuesta heterogénea entre

el endotelio arterial versus el endotelio de las vénulas postcapilares, pero, como la pared de los vasos está compuesta de diversos tipos celulares, para poder estudiar en forma específica la señalización de Ca^{2+} en el endotelio de las vénulas postcapilares, se desarrolló una técnica para obtener cultivos primarios de células endoteliales que pertenezcan exclusivamente a este territorio vascular, y, además, a este mismo tejido, es decir, el mesenterio de rata. La obtención del cultivo primario fue exitosa y además se logró obtener cultivos de células endoteliales de arterias de resistencia, por lo que se realizó una comparación general para caracterizar estos cultivos primarios. En primer lugar, se encontró que las células endoteliales de vénulas postcapilares muestran una menor longitud que las células endoteliales de arterias y no es un hecho aislado (Figura 3A y 3B), ya que es consistente con lo observado en el estudio comparativo de la distribución y localización de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en arteriolas y vénulas aisladas de cremáster de ratón, al detectar la expresión de ICAM-1 en la superficie del endotelio de ambos vasos sanguíneos, se observó que la longitud de las células endoteliales de las arteriolas era relativamente mayor a las células endoteliales de vénulas (Sumagin, Ronen, Sarelius, 2006). Del mismo modo, al evaluar la expresión de eNOS y caveolina 1 en estos cultivos primarios, la aparente diferencia en la distribución de ambas proteínas puede relacionarse a sus funciones diferenciales (Figura 4E). En efecto, se ha descrito en cultivos de células endoteliales de vénulas y arteriolas de mesenterio de rata, que tanto la expresión como actividad de eNOS es mayor en el endotelio venular (Wagner et al., 2001), también se ha investigado la interacción de eNOS y Cav-1 ya que ambas se pueden ubicar espacialmente en caveolas, se ha descrito que la internalización de eNOS por caveolas, e interacción con Cav-1, regula la hiperpermeabilidad estimulada por PAF, además, en células endoteliales de aorta de bovino, se estudió que insulina regula la localización de eNOS y Cav-1

en la membrana y por tanto la producción de NO (Chen et al., 2018; F. Sánchez et al., 2008; H. Wang et al., 2009).

También se evaluó la respuesta funcional de los cultivos primarios midiendo calcio intracelular. ATP produjo un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en CEV como en CEA (Figura 5A), lo cual se relaciona a sus múltiples efectos que tiene en arterias y venas (He & Curry, 1993; Lohman et al., 2012; Mcknight & Curry, 2002; Kimiko Yamamoto et al., 2018). Por su parte, acetilcolina, es un conocido vasodilatador dependiente de endotelio (Xavier F. Figueroa et al., 2002; Manicam et al., 2016; Tallini et al., 2007), por lo tanto, se esperaba que provocara el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre las células endoteliales de arterias solamente (Figura 5B), y ya sabemos que PAF sólo tiene un efecto sobre las vénulas postcapilares (R. H. Adamson et al., 2003a; Brailoiu et al., 2018; Samapati et al., 2012), de acuerdo a lo observado en los resultados de esta tesis (Figura 5C). Por lo tanto, los resultados obtenidos confirman la pureza de los cultivos de células endoteliales de arterias y vénulas postcapilares. Asimismo, se destaca que los resultados corroboran la respuesta observada en vasos intactos y demuestran que los cultivos primarios de células endoteliales de vénulas mesentéricas son un buen modelo experimental para estudiar la respuesta activada por PAF. Las células endoteliales son versátiles y se han realizado variadas revisiones con respecto a su heterogeneidad (Aird, 2007a, 2007b; McCarron et al., 2017, 2019; Page et al., 1992); sin embargo, poca es la importancia que se ha brindado cuando se estudian las respuestas específicas de los vasos sanguíneos dentro de su contexto fisiológico. En consecuencia, al establecer un procedimiento para el desarrollo de cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares permite realizar estudios más fehacientes con respecto a la respuesta de Ca^{2+} e hiperpermeabilidad y, por lo tanto, todos los resultados posteriores de esta tesis se obtuvieron usando este modelo experimental.

Se analizó la expresión de conexinas y panexina en el cultivo de células endoteliales de vénulas postcapilares y se determinó que, al igual que las vénulas intactas del mesenterio, expresan las conexinas 37, 40 y 43 y panexina 1 (Figura 6). En la literatura, hay antecedentes que indican que las células endoteliales arteriolares expresan conexinas 37, 40 y 43 y panexina 1 (Johnstone et al., 2009), pero, en el lado venular, sólo se ha estudiado la expresión de estas conexinas en células endoteliales de la vena cava (Chang et al., 2010), en las válvulas de venas en ratón (Munger et al., 2016) y en células endoteliales de grandes venas, como la vena cava en su sección abdominal y torácica (Inai & Shibata, 2009). Con respecto a panexina 1, hay menos registros de su expresión en venas, pero se ha estudiado su participación en HUVEC y en células endoteliales de vena safena de ratones (Lohman et al., 2015a) y también en la barrera hematoencefálica (Kaneko et al., 2015). Los resultados observados en esta tesis demuestran que tanto las conexinas 37, 40 y 43 como panexina 1 se expresan en células endoteliales de vénulas postcapilares de un territorio vascular periférico como el mesenterio y además confirma que las células endoteliales no varían su perfil de expresión al ser aisladas del mesenterio, lo que realza la utilidad de los cultivos primarios de células endoteliales de vénulas postcapilares como modelo experimental.

A continuación, se evaluó la activación de los hemicanales de conexina y canales de panexina en las células endoteliales de vénulas postcapilares en respuesta a PAF, lo cual se confirmó usando los péptidos inhibidores ^{37,43}Gap27, ⁴³Ga26 y ¹⁰Panx, de acuerdo a lo observado previamente en el mesenterio aislado (Figura 7). La utilización de péptidos inhibidores de conexinas son una herramienta muy eficaz, ya que son secuencias que presentan afinidad específica por regiones cercanas al poro de cada isoforma en particular (Li et al., 2015; N. Wang et al., 2012). Sin embargo, el tiempo de tratamiento es clave, ya que períodos largos de

incubación, más de 1 hora, llevan al bloqueo de los canales gap junction además de los hemicanales, mientras que tiempos cortos, como 15 minutos, permiten la inhibición de sólo los hemicanales (De Bock et al., 2011; Li et al., 2015; N. Wang et al., 2012). Por otro lado, el péptido $^{10}\text{Panx}$ está ampliamente estudiado como un inhibidor de Panx-1 (Boucher et al., 2018; Murali et al., 2017; Pinheiro et al., 2013; Timóteo et al., 2014).

Como siguiente paso, se estudió los mecanismos involucrados en la respuesta de Ca^{2+} inducida por PAF. Los resultados mostraron que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por PAF presenta dos componentes o fases, la cual, en una primera interpretación, puede sugerir que el primer componente, de menor amplitud, proviene de la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares. Sin embargo, la remoción del Ca^{2+} de la solución extracelular inhibió casi por completo el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que destaca la participación en la respuesta de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Figura 8).

Consistente con la captación de colorante inducida por PAF, la incubación por 15 minutos de los péptidos inhibidores $^{37,43}\text{Gap27}$ y $^{43}\text{Ga26}$ inhibió ambas fases de la señal de Ca^{2+} , confirmando que la participación de los hemicanales formados por Cx43 en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activada por PAF en las células endoteliales de vénulas postcapilares. Notablemente, un resultado similar se observó con la aplicación de $^{10}\text{Panx}$ (Figura 9). En la literatura se ha descrito la participación de hemicanales de conexina 43 en la señal de Ca^{2+} en la barrera hematoencefálica y en pulmones (De Bock et al., 2011; Parthasarathi et al., 2006), donde se propusieron mecanismos relacionados a la entrada directa de Ca^{2+} . Por otro lado, el aumento de la entrada de Ca^{2+} también puede ser inducida por un mecanismo indirecto, relacionado a la liberación de ATP y subsecuente activación de receptores purinérgicos. En relación con lo

anterior, se ha estudiado la participación de canales formados por Panx-1 en la liberación de ATP en oocitos, algo similar se estudió en HUVEC, ya que, al ser estimuladas con Trombina había liberación de ATP por canales formados por Panx-1 y también en células endoteliales de vénulas postcapilares de ratones en el contexto de la migración transendotelial leucocitaria (Bao et al., 2004; Gödecke et al., 2012; Lohman et al., 2015a). En lo que respecta a los hemicanales formados por conexinas, en células endoteliales de córnea, se observó que un leve aumento de Ca^{2+} intracelular activa la apertura de hemicanales formados por Cx43 y posterior liberación de ATP, promoviendo más entrada de Ca^{2+} por la activación de receptores purinérgicos (Gomes et al., 2005), algo similar se observó previamente en astrocitos (Stout et al., 2002).

En línea con lo anterior, en esta tesis se evaluó la liberación de ATP y activación de receptores purinérgicos. Consistente con la participación de una vía purinérgica en la respuesta, se encontró que la estimulación con PAF produce la liberación de ATP en las células endoteliales de vénulas postcapilares a través de la apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 (Figura 10). Además, la inhibición de los receptores purinérgicos metabotrópicos y ionotrópicos con PPADS (100uM) bloqueó la segunda fase del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, indicando que esta fase depende de la activación de los receptores purinérgicos (Figura 11A y 11B). Por otro lado, el tratamiento con PPADS no afectó la captación de colorante iniciada por PAF (Figura 11C y 11D), lo cual confirma que la liberación de ATP a través de la apertura de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx1 ocurre antes de la activación de receptores purinérgicos. En suma, el aumento de Ca^{2+} mediado por PAF consta de una primera fase que depende de la entrada directa de Ca^{2+} a través de los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1 y una segunda fase que depende de la liberación de ATP a

través de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 y posterior activación de receptores purinérgicos.

En relación a lo anterior, la producción de NO por la eNOS participa en el aumento de permeabilidad de la barrera endotelial (Hatakeyama et al., 2006; Ramírez et al., 1995). Además, se encontró que, en células endoteliales de microvasculatura de cerebro, el aumento de la hiperpermeabilidad inducido por PAF se asocia con la formación de NO (Brailoiu et al., 2018). Junto con esto, también se ha propuesto que el NO podría llevar a un aumento de hiperpermeabilidad a través de la S-nitrosilación y consecuente activación, de proteínas relacionadas a las uniones intercelulares como p120 y β -catenina (Marín et al., 2012), VE-caderina (Guequén et al., 2016) y proteínas focales como la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) (Zamorano et al., 2017).

En el contexto de esta tesis, es interesante notar que el NO también puede llevar a la activación de hemicanales formados por Cx43 a través de la S-nitrosilación de esta Cx. Por lo tanto, como primera aproximación, se estudió la contribución de NO en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales de vénulas postcapilares estimuladas por PAF. Los resultados de esta tesis demuestran que la inhibición de la eNOS con L-NA bloquea ambos componentes del aumento de la señal de Ca^{2+} estimulada por PAF (Figura 12A y 12B). Por otro lado, los resultados de captación de colorante demuestran que la contribución de NO en la señal de Ca^{2+} depende de la activación de hemicanales formados por conexinas y canales formados por panexina (Figura 12C y 12D), como se evidencia al aplicar L-NA junto con el péptido $^{43}Gap26$ o $^{10}Panx$ (Figura 14A). Coherente con lo anterior, al utilizar SNAP en concentraciones dentro del rango fisiológico (300nM) (Figura 13), se demuestra que NO genera un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en

células endoteliales de vena, lo cual es consistente con lo observado en células endoteliales de aorta de porcino (Berkels et al., 2000). Además, estos resultados confirman que el NO contribuye en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la activación de hemicanales formados por conexina y canales formados por panexina, probablemente en la primera fase del aumento de Ca^{2+} estimulado por PAF, la cual correspondería por tanto a la entrada directa de Ca^{2+} a través de estos canales. Como fue mencionado anteriormente, un posible mecanismo de activación que relacione NO y los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx1 podría ser la S-nitrosilación. Dentro de este contexto, se ha descrito que NO induce la S-nitrosilación de conexinas y panexinas. Por una parte, se ha demostrado que la S-nitrosilación de Cx43 ocurre en astrocitos (Retamal et al., 2006), en gap junctions formadas por Cx43 que median la comunicación endotelio-células musculares lisas (Straub, Adam C., Billaud, Marie, Johnstone, Scott R., Best, Angela K., Yemen, Sean, Dwyer, Scott T., Looft-Wilson, Robin, Lysiak, Jeffery J., Gaston, Ben, Lisa, Palmer, Isakson, 2011), y en el preconditionamiento isquémico que produce un aumento en la S-nitrosilación de hemicanales de Cx43 en el sarcolema mitocondrial (Sun et al., 2015). Por otra parte, el efecto de la S-nitrosilación en canales formados por panexina es controversial. Si bien hay estudios que demuestran que la mutación de cisteínas (C282W y C346S) en canales formados por panexina 1 transfectados en oocitos y en células N2A generan un canal constitutivamente abierto (Bunse et al., 2010; Prochnow et al., 2009), también se ha mostrado que la S-nitrosilación de panexina 1 en células HEK293T y en células endoteliales de aorta de ratón, inhibe tanto la corriente como la liberación de ATP (Lohman et al., 2012).

Los resultados de esta tesis demuestran que la estimulación de células endoteliales de vénulas postcapilares con PAF produce un aumento en la S-nitrosilación de proteínas (Figura 15). Asimismo, los resultados que muestran la cercanía entre eNOS y Cx43, pero no entre eNOS y

Panx 1, nos sugiere que, a diferencia de Panx1, la Cx43 se encuentra en una ubicación preferencial para ser activada por S-nitrosilación (Figura 16). Esto se confirmó al evaluar directamente la S-nitrosilación de Cx43 por PLA (Figura 17), demostrando que el aumento de NO inducido por PAF produce la S-nitrosilación de hemicanales formados por Cx43 y, por lo tanto, podría ser el mecanismo que explica la primera fase de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Si bien, estos resultados no permiten confirmar la S-nitrosilación de Panx1, no se descarta la presencia de otra modificación, como la fosforilación, que produzca la apertura de canales formados por Panx1.

En concordancia a lo anterior, en la segunda fase del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ podría estar implicado la liberación de ATP a través de hemicanales formados por conexinas o canales formados por panexina 1 y posterior activación de receptores purinérgicos (Arkhipov & Pavlov, 2019; Wellmann et al., 2018). Al estudiar el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de L-NA y PPADS (Figura 14B), los resultados muestran una inhibición casi por completo de la respuesta, lo que confirma que hay una fase dependiente de NO, la cual permitiría una entrada directa de Ca^{2+} a través de S-nitrosilación de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 y otra fase dependiente de la activación de una vía purinérgica por la liberación de ATP mediada por la activación de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1, produciendo el segundo componente de la señalización de Ca^{2+} .

La participación de un mecanismo dependiente de voltaje en las células endoteliales ha sido poco documentada, y los resultados de esta tesis demuestran que canales Na_v están involucrados en la respuesta asociada a la hiperpermeabilidad de las células endoteliales de vénulas

postcapilares. La aplicación de PAF produjo una oscilación del potencial de membrana de las células endoteliales de vénulas postcapilares, la cual puede ser atribuida a la activación de canales Na_v , por la sensibilidad de esta respuesta a TTX (Figura 19). En concordancia con esto, se confirmó la expresión de los canales sensibles a TTX $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.6$ en cultivos de células endoteliales de vénulas postcapilares y vénulas postcapilares intactas de mesenterio de rata (Figura 21). Al parecer, la activación de estos canales es un evento inicial de la respuesta inducida por PAF, ya que este efecto de PAF no fue reproducido por ATP y ni ATP o PPADS alteraron la acción de PAF sobre el potencial de membrana de las células endoteliales de vénulas postcapilares (Figura 20). Estos resultados apoyan lo descrito por Gosling, que demuestran la expresión de canales Nav resistentes a TTX en vena safena y son consistentes con la variación del potencial de membrana descrita en células endoteliales de microvasculatura de cerebro al ser estimuladas con PAF (Brailoiu et al., 2018).

Consistente con la participación de canales Na_v en la respuesta asociada a la hiperpermeabilidad, el tratamiento con TTX inhibió ambas fases del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activado por PAF en las células endoteliales de vénulas postcapilares (Figura 22A y 22B). Asimismo, el bloqueo de los canales $\text{Na}_v1.2$ con lamotrigina, pero no de los canales $\text{Na}_v1.6$ con 4,9 anhidrotetrodotoxina, previno el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado en respuesta a PAF (Figura 22C y 22D), lo cual indica que esta isoforma de los canales Nav es la responsable de gatillar la señalización asociada a la hiperpermeabilidad iniciada por PAF.

La participación de canales Nav en la respuesta asociada a la hiperpermeabilidad es consistente con la presencia de un mecanismo dependiente de voltaje como el descrito por Oshiro, et al, 1995, quienes propusieron que canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje están involucrados en la

Hiperpermeabilidad inducida por PAF en mejilla de hámster. Además, un mecanismo similar se describió también en células endoteliales de microvasculatura cerebral, donde el tratamiento con nifedipina, un bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo L, inhibió el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado en respuesta a la estimulación con PAF (Brailoiu et al., 2018). En este contexto, los canales Na_v se podrían acoplar a la activación de canales Ca_v a través de un mecanismo similar al propuesto por (X. F. Figueroa et al., 2007) para la vasodilatación inducida por la estimulación eléctrica de arteriolas de la microcirculación del músculo cremaster de ratón. Sin embargo, una corriente de entrada de Na^+ también podría llevar a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de la activación del modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), como se describió que ocurre en la astrogliosis (Pappalardo, Laura W., Samad, Omar A., Black, Joel A., Waxman, 2014), en esclerosis múltiple (Alrashdi et al., 2019) y en la vasodilatación inducida por ACh de arterias de resistencia mesentéricas (Lillo et al., 2018). En el contexto de hiperpermeabilidad, el incremento de la permeabilidad a Dextrano-FITC observado en una monocapa de células HUVEC en respuesta a trombina disminuyó notoriamente en presencia de SEA0400, un inhibidor específico del modo reverso del NCX, indicando que la entrada de Ca^{2+} mediada por la activación del modo reverso de este intercambiador contribuye a la respuesta de hiperpermeabilidad (Andrikopoulos et al., 2015). En conjunto, estos resultados indican que los canales $\text{Na}_v1.2$ están involucrados en el inicio de la respuesta activada por PAF y que el acoplamiento de estos canales con el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría ser un interesante campo de estudio para futuras investigaciones.

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales de vénulas postcapilares produce la respuesta de Hiperpermeabilidad a través del desensamblaje de las uniones adherentes y rearrreglos en el citoesqueleto (Sandoval et al., 2001). Por lo tanto, era importante evaluar si la activación de los hemicanales formados por Cx43 y canales de Na^+ dependientes de voltaje en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, se asocia con la respuesta de hiperpermeabilidad iniciada por PAF. Para ello, se estudió la formación de poros o espacios (“gaps”) intercelulares en los sitios de unión de las células endoteliales de vénulas post-capilares a través de un análisis morfológico por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Las imágenes de barrido y altura de dos células adyacentes confirmaron que efectivamente PAF aumenta la formación de poros, y, como esperado, el tratamiento con $^{37,43}Gap27$ o TTX previnieron esta respuesta (Figuras 18 y 23).

Por mucho tiempo, se ha estudiado la formación de poros entre células endoteliales como el mecanismo de transporte paracelular responsable del aumento de la permeabilidad a fluidos y macromoléculas (Jiang et al., 2008; Kugelman et al., 2018; Rippe & Haraldsson, 1994), los resultados obtenidos a través del análisis con AFM permiten dar una primera aproximación a un estudio más detallado de las propiedades viscoelásticas de la región inter-endotelial y como cambia esa estructura frente a agentes proinflamatorios, además del análisis del tamaño del poro y la morfología del mismo (Chiou et al., 2013).

CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis sugieren fuertemente que la estimulación de las células endoteliales de vénulas postcapilares con PAF aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la apertura de canales $Na_v1.2$, los cuales, posiblemente, se acoplan a la activación del modo reverso del NCX o canales Ca_v , permitiendo una primera entrada de Ca^{2+} que activa la enzima eNOS. La producción de NO resultante podría llevar a la S-nitrosilación de la Cx43 y la apertura de hemicanales formados por esta conexina, y por otro mecanismo, la apertura de canales formados por Panx-1, donde ambos podrían contribuir a la respuesta, por un lado, permitiendo la entrada directa de Ca^{2+} a través de estos canales y, por otro lado, indirectamente mediante la liberación de ATP con la subsecuente activación de receptores purinérgicos, lo cual podría ser muy relevante para la mantención de la respuesta asociada a la hiperpermeabilidad en el tiempo (Figura 24).

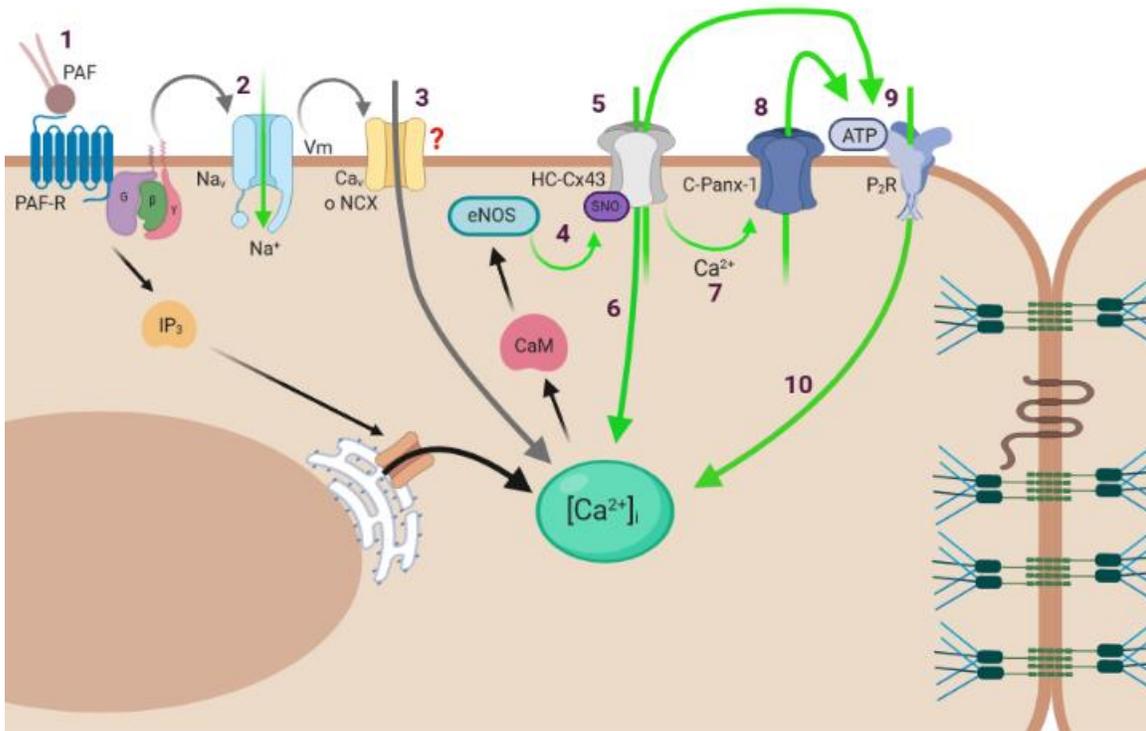


Figura 24. Modelo del mecanismo de entrada de Ca^{2+} . la estimulación de las células endoteliales de vénulas postcapilares por PAF (1), aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, a través de la apertura de canales Na_v 1.2 (2), los cuales, posiblemente activan la vía inversa del NCX o canales Ca_v (3), permitiendo una primera entrada de Ca^{2+} que activa la enzima eNOS, provocando la s-nitrosilación (4) y apertura de algunos hemicanales formados por Cx43 (5), permitiendo una entrada directa de Ca^{2+} y la liberación de ATP (9). La entrada directa de Ca^{2+} induce la apertura de canales formados por Panx-1 (7), permite la liberación de ATP (8), para la subsecuente activación de receptores purinérgicos (9) y entrada Ca^{2+} (10), todo con el fin de mantener la respuesta de hiperpermeabilidad (Leyenda: PAF-R: receptor de PAF; HC-Cx43: Hemicanales formados por Cx43; C-Panx1: canales formados por Panx-1; P₂R: receptor purinérgico tipo 2).

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, R. H., Zeng, M., Adamson, G. N., Lenz, J. F., & Curry, F. E. (2003a). PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(1), H406–H417. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00021.2003>
- Adamson, R. H., Zeng, M., Adamson, G. N., Lenz, J. F., & Curry, F. E. (2003b). PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285(1 54-1), 406–417. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00021.2003>
- Adamson, R., Ly, J., Sarai, R., Lenz, J., Altangerel, A., Drenckhahn, D., & Curry, F. (2007). Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 294(3), H1188–H1196. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00937.2007>
- Adamson, Roger H., Sarai, R. K., Altangerel, A., Thirkill, T. L., Clark, J. F., & Curry, F. R. E. (2010). Sphingosine-1-phosphate modulation of basal permeability and acute inflammatory responses in rat venular microvessels. *Cardiovascular Research*, 88(2), 344–351. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq184>
- Aird, W. C. (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research*, 100(2), 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>
- Aird, W. C. (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation Research*, 100(2), 174–190. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae>
- Alphonsus, C. S., & Rodseth, R. N. (2014). The endothelial glycocalyx: A review of the vascular barrier. *Anaesthesia*, 69(7), 777–784. <https://doi.org/10.1111/anae.12661>
- Alrashdi, B., Dawod, B., Schampel, A., Tacke, S., Kuerten, S., Marshall, J. S., & Côté, P. D. (2019). Nav1.6 promotes inflammation and neuronal degeneration in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1622-1>
- Andrikopoulos, P., Kieswich, J., Harwood, S. M., Baba, A., Matsuda, T., Barbeau, O., Jones, K., Eccles, S. A., & Yaqoob, M. M. (2015). Endothelial angiogenesis and barrier function in response to thrombin require Ca²⁺ influx through the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18412–18428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628156>
- Arkipov, S. N., & Pavlov, T. S. (2019). ATP release into ADPKD cysts via pannexin-1/P2X7 channels decreases ENaC activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(1), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.177>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L.,

- Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, *468*(7323), 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Ashina, K., Tsubosaka, Y., Nakamura, T., Omori, K., Kobayashi, K., Hori, M., Ozaki, H., & Murata, T. (2015). Histamine induces vascular hyperpermeability by increasing blood flow and endothelial barrier disruption in vivo. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132367>
- Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Letters*, *572*(1–3), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.009>
- Barbe, M. T., Monyer, H., & Bruzzone, R. (2006). Cell-Cell Communication Beyond Connexins: The Pannexin Channels. *Physiology*, *21*(2), 103–114. <https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2005>
- Bates, D. O., & Curry, F. E. (1997). Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca (2+)-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *273*(2), H687–H694.
- Baumer, Y., Spindler, V., Werthmann, R. C., B??nemann, M., & Waschke, J. (2009). Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *Journal of Cellular Physiology*, *220*(3), 716–726. <https://doi.org/10.1002/jcp.21819>
- Berkels, R., Suerhoff, S., Roesen, R., & Klaus, W. (2000). Nitric oxide causes a cGMP-independent intracellular calcium rise in porcine endothelial cells - A paradox? *Microvascular Research*, *59*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1006/mvre.1999.2191>
- Birukova, A., Zagranichnaya, T., Fu, P., Alekseeva, E., Chen, W., Jacobson, J., & Birukov, K. (2007). Prostaglandins PGE2 and PGI2 promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Experimental Cell Research*, *313*(11), 2504–2520. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.159.Primary>
- Bond, S. R., & Naus, C. C. (2014). The pannexins: Past and present. *Frontiers in Physiology*, *5*, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00058>
- Boucher, J., Simonneau, C., Denet, G., Clarhaut, J., Balandre, A. C., Mesnil, M., Cronier, L., & Monvoisin, A. (2018). Pannexin-1 in human lymphatic endothelial cells regulates lymphangiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19061558>
- Brailoiu, Eugen, Shinsky, Megan, Yan, Guang, Abood, Mary E., Brailoiu, C. G. (2017). Mechanisms of modulation of brain microvascular endothelial cells function by thrombin. *Brain Research*, *1657*, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.011>
- Brailoiu, E., Barlow, C. L., Ramirez, S. H., Abood, M. E., & Brailoiu, G. C. (2018). Effects of Platelet-Activating Factor on Brain Microvascular Endothelial Cells. *Neuroscience*, *377*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.039>

- Brown, R. C., Wu, L., Hicks, K., & Neil, R. G. O. (2008). Regulation of Blood-Brain Barrier Permeability by Transient Receptor Potential C and Transient Receptor Potential V Channel Activation. *Microcirculation*, *15*(4), 359–371. <https://doi.org/10.1080/10739680701762656>.REGULATION
- Bunse, S., Schmidt, M., Prochnow, N., Zoidl, G., & Dermietzel, R. (2010). Intracellular cysteine 346 is essentially involved in regulating Panx1 channel activity. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(49), 38444–38452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.101014>
- Burnstock, G. (2017). Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, *120*(1), 207–228. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>
- Chang, C. J., Wu, L. S., Hsu, L. A., Chang, G. J., Chen, C. F., Yeh, H. I., & Ko, Y. S. (2010). Differential endothelial gap junction expression in venous vessels exposed to different hemodynamics. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *58*(12), 1083–1092. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956425>
- Chao, W., & Olson, M. (1993). Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. Journal*, *292*, 617–629.
- Chen, Z., Oliveira, S. D. S., Zimnicka, A. M., Jiang, Y., Sharma, T., Chen, S., Lazarov, O., Bonini, M. G., Haus, J. M., & Minshall, R. D. (2018). Reciprocal regulation of eNOS and caveolin-1 functions in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, *29*(10), 1190–1202. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0049>
- Chetham, P. M., Babál, P., Bridges, J. P., Moore, T. M., & Stevens, T. (1999). Segmental regulation of pulmonary vascular permeability by store-operated Ca²⁺ entry. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *276*(1 20-1), 41–50. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.1.141>
- Chiou, Y. W., Lin, H. K., Tang, M. J., Lin, H. H., & Yeh, M. L. (2013). The Influence of Physical and Physiological Cues on Atomic Force Microscopy-Based Cell Stiffness Assessment. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077384>
- Cioffi, D. L., & Stevens, T. (2006). Regulation of endothelial cell barrier function by store-operated calcium entry. *Microcirculation*, *13*(8), 709–723. <https://doi.org/10.1080/10739680600930354>
- Claesson-Welsh, L. (2015). Vascular permeability - The essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *120*(3), 135–143. <https://doi.org/10.3109/03009734.2015.1064501>
- Clare, J., Tate, S., Nobbs, M., & Romanos, M. (2000). Voltage-Gated Sodium Channels as Therapeutic Targets. *Molecular Pharmacology*, *5*(11), 506–520. <https://doi.org/10.1002/3527602038.ch14>
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M. G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., McDonald, D. M., Ward, P. A., & Dejana, E. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(17), 9815–9820. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9815>

- Crouch, A. C., Manders, A. B., Cao, A. A., Scheven, U. M., & Greve, J. M. (2017). Cross-sectional area of the murine aorta linearly increases with increasing core body temperature. *International Journal of Hyperthermia*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1396364>
- Curry, F. E. (1992). Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *The FASEB Journal*, 6, 2456–2466.
- Curry, F. R.E., & Adamson, R. H. (2013). Tonic regulation of vascular permeability. *Acta Physiologica*, 207(4), 628–649. <https://doi.org/10.1111/apha.12076>
- Curry, Fitz Roy E., & Adamson, R. H. (2010). Vascular permeability modulation at the cell, microvessel, or whole organ level: Towards closing gaps in our knowledge. *Cardiovascular Research*, 87(2), 218–229. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq115>
- Curry, Fitz Roy E., & Glass, C. A. (2006). TRP channels and the regulation of vascular permeability: New insights from the lung microvasculature. *Circulation Research*, 99(9), 915–917. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000249618.51440.c6>
- De Bock, M., Culot, M., Wang, N., Bol, M., Decrock, E., De Vuyst, E., Da Costa, A., Dauwe, I., Vinken, M., Simon, A. M., Rogiers, V., De Ley, G., Evans, W. H., Bultynck, G., Dupont, G., Cecchelli, R., & Leybaert, L. (2011). Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(9), 1942–1957. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.86>
- Dejana, E., Bazzoni, G., & Lampugnani, M. G. (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: Only an intercellular glue? *Experimental Cell Research*, 252(1), 13–19. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4601>
- Dillon, P. K., Ritter, A. B., & Duran, W. N. (1988). Vasoconstrictor effects of platelet-activating factor in the hamster cheek pouch microcirculation: Dose-related relations and pathways of action. *Circulation Research*, 62(4), 722–731. <https://doi.org/10.1161/01.RES.62.4.722>
- Durán, W. N., Breslin, J. W., & Sánchez, F. A. (2010). The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovascular Research*, 87(2), 254–261. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq139>
- Dvorak, A. M., & Feng, D. (2001). The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): A new endothelial cell permeability organelle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49(4), 419–431. <https://doi.org/10.1177/002215540104900401>
- Feihl, Francois, Liaudet, L., & Waeber, B. (2009). The Macrocirculation and Microcirculation of Hypertension. *Curr Hypertense Rep*, 11(3), 182–189. <https://doi.org/10.1007/s11906-009-0033-6>
- Figuroa, X. F., Chen, C.-C., Campbell, K. P., Damon, D. N., Day, K. H., Ramos, S., & Duling, B. R. (2007). Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1371–

H1383. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01368.2006>

- Figueroa, Xavier F., & Duling, B. R. (2009). Gap Junctions in the Control of Vascular Function. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(2), 251–266. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2117>
- Figueroa, Xavier F., González, D. R., Martínez, A. D., Durán, W. N., & Boric, M. P. (2002). ACh-induced endothelial NO synthase translocation, NO release and vasodilation in the hamster microcirculation in vivo. *Journal of Physiology*, *544*(3), 883–896. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.021972>
- Figueroa, Xavier F., Lillo, M. A., Gaete, P. S., Riquelme, M. A., & Sáez, J. C. (2013). Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. *Neuropharmacology*, *75*, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.022>
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF Controls endothelial-cell permeability promoting β -arrestin-dependent Endocytosis VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, *8*(11), 1223–1234. <https://doi.org/10.1038/ncb1486>
- Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(10), 1–31. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003962>
- Glass, C. A., Pockock, T. M., Curry, F. E., & Bates, D. O. (2005). Cytosolic Ca²⁺ concentration and rate of increase of the cytosolic Ca²⁺ concentration in the regulation of vascular permeability in Rana in vivo. *Journal of Physiology*, *564*(3), 817–827. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.083220>
- Gödecke, S., Roderigo, C., Rose, C. R., Rauch, B. H., Gödecke, A., & Schrader, J. (2012). Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *302*(6), C915–C923. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2010>
- Gomes, P., Srinivas, S. P., Verecke, J., & Himpens, B. (2005). ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(1), 104–113. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0846>
- Gordienko, D., & Tsukahara, H. (1994). Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na⁺ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar arter and human umbilical vein. *European Journal of Physiology*, *428*, 91–93.
- Gosling, M., Harley, S. L., Turner, R. J., Carey, N., & Powell, J. T. (1998). Human saphenous vein endothelial cells express a tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium current. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(33), 21084–21090. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21084>
- Guequén, A., Carrasco, R., Zamorano, P., Rebolledo, L., Burboa, P., Sarmiento, J., Boric, M. P., Korayem, A., Durán, W. N., & Sánchez, F. A. (2016). S-nitrosylation regulates VE-cadherin phosphorylation and internalization in microvascular permeability. *American*

- Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 310(8), H1039–H1044.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00063.2016>
- Hanahan, D. (1986). Platelet Activating Factor : a Biologically active Phosphoglyceride. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 483–509.
- Harding, I. C., Mitra, R., Mensah, S. A., Nersesyan, A., Bal, N. N., & Ebong, E. E. (2019). Endothelial barrier reinforcement relies on flow-regulated glycocalyx, a potential therapeutic target. *Biorheology*, 56(2–3), 131–149. <https://doi.org/10.3233/BIR-180205>
- Hatakeyama, T., Pappas, P. J., Hobson, R. W., Boric, M. P., Sessa, W. C., & Durán, W. N. (2006). Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hyperpermeability in vivo. *Journal of Physiology*, 574(1), 275–281.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108175>
- He, P., & Curry, F. E. (1991). Depolarization modulates endothelial cell calcium influx and microvessel permeability. *Am. J. Physiol.*, 261, H1246–54.
- He, P., & Curry, F. E. (1993). Differential actions of cAMP on endothelial [Ca²⁺]_i and permeability in microvessels exposed to ATP. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 265(3 34–3), 1019–1023.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.3.h1019>
- He, P., Pagakis, S. N., & Curry, F. E. (1990). Measurement of Cytoplasmic Calcium in Single Microvessels with Increased Permeability. *American Journal of Physiology*, 258(5), H1366–H1374.
- Hyland, I. K., O’Toole, R. F., Smith, J. A., & Bissember, A. C. (2018). Progress in the Development of Platelet-Activating Factor Receptor (PAFr) Antagonists and Applications in the Treatment of Inflammatory Diseases. *ChemMedChem*, 13(18), 1873–1884. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800401>
- Inai, T., & Shibata, Y. (2009). Heterogeneous expression of endothelial connexin (Cx) 37, Cx40, and Cx43 in rat large veins. *Anatomical Science International*, 84(3), 237–245.
<https://doi.org/10.1007/s12565-009-0029-y>
- Iwakiri, Y., Satoh, A., Chatterjee, S., Toomre, D. K., Chalouni, C. M., Fulton, D., Groszmann, R. J., Shah, V. H., & Sessa, W. C. (2006). Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19777–19782.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605907103>
- Jamieson, J. J., Linville, R. M., Ding, Y. Y., Gerecht, S., & Searson, P. C. (2019). Role of iPSC-derived pericytes on barrier function of iPSC-derived brain microvascular endothelial cells in 2D and 3D. *Fluids and Barriers of the CNS*, 16(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12987-019-0136-7>
- Jeon, S. Y., Kim, E. A., Ma, Y. W., Kim, J. P., Jung, T. G., & Hwang, E. G. (2001). Nitric oxide mediates platelet activating factor-induced microvascular leakage in rat airways. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 110(1), 83–86.

<https://doi.org/10.1093/rpd/ncw357>

- Jia, W., Lu, R., Martin, T. A., & Jiang, W. G. (2013). The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 779–785. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1875>
- Jiang, Y., Wen, K., Zhou, X., Schwegler-Berry, D., Castranova, V., & He, P. (2008). Three-dimensional localization and quantification of PAF-induced gap formation in intact venular microvessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 295(2), 898–907. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00309.2008>
- Johnstone, S., Isakson, B., & Locke, D. (2009). Biological and Biophysical Properties of Vascular Connexin Channels. *Int Rev Cell Mol Biol*, 278, 69–118. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(09\)78002-5](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)78002-5). BIOLOGICAL
- Kaczmarek-Hájek, K., Lörinczi, É., Hausmann, R., & Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors-recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signalling*, 8(3), 375–417. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9314-7>
- Kandasamy, K., Escue, R., Manna, J., Adebiyi, A., & Parthasarathi, K. (2015). Changes in endothelial connexin 43 expression inversely correlate with microvessel permeability and VE-cadherin expression in endotoxin-challenged lungs. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(6), L584–L592. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00211.2014>
- Kaneko, Y., Tachikawa, M., Akaogi, R., Fujimoto, K., Ishibashi, M., Uchida, Y., Couraud, P.-O., Ohtsuki, S., Hosoya, K. -i., & Terasaki, T. (2015). Contribution of Pannexin 1 and Connexin 43 Hemichannels to Extracellular Calcium-Dependent Transport Dynamics in Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(1), 192–200. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.220210>
- Kelly, J. J., Moore, T. M., Babal, P., Diwan, A. H., Stevens, T., & Thompson, W. J. (1998). Pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cells: differential regulation of Ca²⁺ and permeability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(5), L810–L819. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.5.L810>
- Kim, D. D., Ramírez, M. M., & Durán, W. N. (2000). Platelet-activating factor modulates microvascular dynamics through phospholipase C in the hamster cheek pouch. *Microvascular Research*, 59(1), 7–13. <https://doi.org/10.1006/mvre.1999.2195>
- Konstantoulaki, M., Kouklis, P., & Malik, A. B. (2003). Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and β -catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(2), L434–L442. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00075.2003>
- Kugelmann, D., Rotkopf, L. T., Radeva, M. Y., Garcia-Ponce, A., Walter, E., & Waschke, J. (2018). Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca²⁺-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31408-3>

- Lal, B. K., Varma, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W., & Durán, W. N. (2001). VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvascular Research*, *62*(3), 252–262. <https://doi.org/10.1006/mvre.2001.2338>
- Levick, J. R., & Michel, C. C. (2010). Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovascular Research*, *87*(2), 198–210. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq062>
- Li, X., Zhao, H., Tan, X., Kostrzewa, R. M., Du, G., Chen, Y., Zhu, J., Miao, Z., Yu, H., Kong, J., & Xu, X. (2015). Inhibition of connexin43 improves functional recovery after ischemic brain injury in neonatal rats. *Glia*, *63*(9), 1553–1567. <https://doi.org/10.1002/glia.22826>
- Lillo, M. A., Gaete, P. S., Puebla, M., Ardiles, N. M., Poblete, I., Becerra, A., Simon, F., & Figueroa, X. F. (2018). Critical contribution of Na⁺-Ca²⁺ exchanger to the Ca²⁺-mediated vasodilation activated in endothelial cells of resistance arteries. *FASEB Journal*, *32*(4), 2137–2147. <https://doi.org/10.1096/fj.201700365RR>
- Lillo, M. A., Pérez, F. R., Puebla, M., Gaete, P. S., & Figueroa, X. F. (2012). Control and Coordination of Vasomotor Tone in the Microcirculation. In *The Cardiovascular System-Physiology, diagnostics and clinical implications* (pp. 65–94).
- Lin, Z. X., Yang, L. J., Huang, Q., Lin, J. H., Ren, J., Chen, Z. Bin, Zhou, L. Y., Zhang, P. F., & Fu, J. (2008). Inhibition of tumor-induced edema by antisense VEGF is mediated by suppressive vesiculo-vacuolar organelles (VVO) formation. *Cancer Science*, *99*(12), 2540–2546. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00974.x>
- Liu, X., Sun, W., Zhao, Y., Chen, B., Wu, W., Bao, L., & Qi, R. (2015). Ginkgolide B Inhibits JAM-A, Cx43, and VE-Cadherin Expression and Reduces Monocyte Transmigration in Oxidized LDL-Stimulated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/907926>
- Lohman, A. W., Leskov, I. L., Butcher, J. T., Johnstone, S. R., Stokes, T. A., Begandt, D., Delalio, L. J., Best, A. K., Penuela, S., Leitinger, N., Ravichandran, K. S., Stokes, K. Y., & Isakson, B. E. (2015a). Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nature Communications*, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8965>
- Lohman, A. W., Leskov, I. L., Butcher, J. T., Johnstone, S. R., Stokes, T. A., Begandt, D., Delalio, L. J., Best, A. K., Penuela, S., Leitinger, N., Ravichandran, K. S., Stokes, K. Y., & Isakson, B. E. (2015b). Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nature Communications*, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8965>
- Lohman, A. W., Weaver, J. L., Billaud, M., Sandilos, J. K., Griffiths, R., Straub, A. C., Penuela, S., Leitinger, N., Laird, D. W., Bayliss, D. A., & Isakson, B. E. (2012). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 39602–39612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397976>
- Lum, H., Aschner, J. L., Phillips, P. G., Fletcher, P. W., & Malik, a B. (1992). Time course of

- thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca²⁺ and inositol polyphosphates. *The American Journal of Physiology*, 263(2 Pt 1), L219–L225.
- Ma, Y., Yang, X., Chatterjee, V., Meegan, J. E., Beard, R. S., & Yuan, S. Y. (2019). Role of neutrophil extracellular traps and vesicles in regulating vascular endothelial permeability. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01037>
- Manicam, C., Staubitz, J., Brochhausen, C., Grus, F. H., Pfeiffer, N., & Gericke, A. (2016). The Gatekeepers in the Mouse Ophthalmic Artery: Endothelium-Dependent Mechanisms of Cholinergic Vasodilation. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep20322>
- Marín, N., Zamorano, P., Carrasco, R., Mujica, P., González, F., Quezada, C., Meininger, C., Boric, M., Durán, W., & Sánchez, F. (2012). S-nitrosation of β -catenin and p120 catenin: a novel regulatory mechanism in endothelial hyperpermeability. *Circulation Research*, 111(5), 553–563. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2011.01.002>.The
- Matter, K., & Balda, M. S. (2003). Holey barrier: Claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *Journal of Cell Biology*, 161(3), 459–460. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304039>
- McCarron, J. G., Lee, M. D., & Wilson, C. (2017). The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(4), 322–338. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.008>
- McCarron, J. G., Wilson, C., Heathcote, H. R., Zhang, X., Buckley, C., & Lee, M. D. (2019). Heterogeneity and emergent behaviour in the vascular endothelium. *Current Opinion in Pharmacology*, 45, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.008>
- Mcknight, T. R., & Curry, D. F. R. E. (2002). Mechanisms of heterogeneous endothelial cytoplasmic calcium increases in venular microvessels. *Microcirculation*, 9(6), 537–550. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800166>
- Moccia, F. (2012). Update on vascular endothelial Ca²⁺ signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(7), 127. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i7.127>
- Munger, S. J., Geng, X., Srinivasan, R. S., Witte, M. H., Paul, D. L., & Simon, A. M. (2016). Segregated Foxc2, NFATc1 and Connexin expression at normal developing venous valves, and Connexin-specific differences in the valve phenotypes of Cx37, Cx43, and Cx47 knockout mice. *Developmental Biology*, 412(2), 173–190. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.033>
- Murali, S., Zhang, M., & Nurse, C. A. (2017). Evidence that 5-HT stimulates intracellular Ca²⁺ signalling and activates pannexin-1 currents in type II cells of the rat carotid body. *Journal of Physiology*, 595(13), 4261–4277. <https://doi.org/10.1113/JP273473>
- Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T., & Sawada, N. (2006). Possible Involvement of Gap Junctions in the Barrier Function of Tight Junctions of Brain and Lung Endothelial Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 208, 123–132.

<https://doi.org/10.1002/JCP>

- Nagy, J. A., Feng, D., Vasile, E., Wong, W. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2006). Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Laboratory Investigation*, *86*(8), 767–780. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700436>
- Namadurai, S., Yereddi, N. R., Cusdin, F. S., Huang, C. L. H., Chirgadze, D. Y., & Jackson, A. P. (2015). A new look at sodium channel Beta subunits. *Open Biology*, *5*(1), 140192. <https://doi.org/10.1098/rsob.140192>
- Orsenigo, F., Giampietro, C., Ferrari, A., Corada, M., Galaup, A., Sigismund, S., Ristagno, G., Maddaluno, L., Koh, G. Y., Franco, D., Kurtcuoglu, V., Poulidakos, D., Baluk, P., McDonald, D., Grazia Lampugnani, M., & Dejana, E. (2012). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature Communications*, *3*, 1208–1215. <https://doi.org/10.1038/ncomms2199>
- Oshiro, H., Kobayashi, I., Kim, D., Takenaka, H., Hobson, R. W., & Durán, W. N. (1995). L-Type calcium channel blockers modulate the microvascular hyperpermeability induced by platelet-activating factor in vivo. *Journal of Vascular Surgery*, *22*(6), 732–741. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(95\)70064-1](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(95)70064-1)
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., & Nilius, B. (2006). Permeation and Selectivity of TRP Channels. In *Annu. Rev. Physiol.* (Vol. 68). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
- Page, C., Rose, M., Yacoub, M., & Pigott, R. (1992). Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *American Journal of Pathology*, *141*(3), 673–683. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3736-6_51
- Palatinus, J. A., Quinn, M. P. O., Barker, R. J., Harris, B. S., Gourdie, R. G., & Jourdan, J. (2011). ZO-1 determines adherens and gap junction localization at intercalated disks ZO-1 determines adherens and gap junction localization at intercalated disks. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, *300*(2), H583–H594. <https://doi.org/ajpheart.00999.2010> [pii]r10.1152/ajpheart.00999.2010
- Paltauf-Doburzynska, J., Frieden, M., Spitaler, M., & Graier, W. F. (2000). Histamine-induced Ca²⁺ oscillations in a human endothelial cell line depend on transmembrane ion flux, ryanodine receptors and endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Physiology*, *524*(3), 701–713. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00701.x>
- Pappalardo, Laura W., Samad, Omar A., Black, Joel A., Waxman, S. G. (2014). Voltage-gated sodium channel Nav 1.5 contributes to astrogliosis in in an in vitro model of glial injury via reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Bone*, *62*(7), 1162–1175. <https://doi.org/10.1002/glia.22671>
- Parthasarathi, K., Ichimura, H., Monma, E., Lindert, J., Quadri, S., Issekutz, A., & Bhattacharya, J. (2006). Connexin 43 mediates spread os Ca²⁺-dependent proinflammatory responses in lung capillaries. *J. Clin. Invest.*, *116*, 2193–2200. <https://doi.org/10.1172/JCI26605.surface>

- Pfenniger, A., Derouette, J., Verma, V., Lin, X., Foglia, B., Roth, I., Satta, N., Dunoyer-geindre, S., Sorgen, P., Kwak, B. R., & Delmar, M. (2010). Gap junction Protein 37 Interacts With Endothelial Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *30*(4), 827–834. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200816>.Gap
- Pinheiro, A. R., Paramos-De-Carvalho, D., Certal, M., Costa, C., Magalhães-Cardoso, M. T., Ferreirinha, F., Costa, M. A., & Correia-De-Sá, P. (2013). Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y₁₂ receptors activation. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-70>
- Pocock, T. M., Williams, B., Curry, F. E., & Bates, D. O. (2000). VEGF and ATP act by different mechanisms to increase microvascular permeability and endothelial [Ca²⁺]_i. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *279*(4 48-4), 1625–1634. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.h1625>
- Prakriya, M., & Lewis, R. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, *95*, 1383–1436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00301-7>
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. a, Stafforini, D. M., & McIntyre, T. M. (2000). Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators. *Ann. Rev. Biochem.*, *69*, 419–445.
- Prochnow, N., Hoffmann, S., Dermietzel, R., & Zoidl, G. (2009). Replacement of a single cysteine in the fourth transmembrane region of zebrafish pannexin1 alters hemichannel gating behavior. *Experimental Brain Research*, *199*(3–4), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1957-4>
- Qian, J., & Fulton, D. (2013). Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthases in vascular endothelium. *Frontiers in Physiology*, *4*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00347>
- Ramírez, M. M., Quardt, S. M., Kim, D., Oshiro, H., Minnicozzi, M., & Durán, W. N. (1995). Platelet activating factor modulates microvascular permeability through nitric oxide synthesis. In *Microvascular Research* (Vol. 50, Issue 2, pp. 223–234). <https://doi.org/10.1006/mvre.1995.1055>
- Retamal, M. A., Cortes, C. J., Reuss, L., Bennett, M. V. L., & Saez, J. C. (2006). S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: Induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(12), 4475–4480. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511118103>
- Rigor, R. R., Shen, Q., Pivetti, C. D., Wu, M. H., & Yuan, S. Y. (2013). Myosin light chain kinase signaling in endothelial barrier dysfunction. *Medicinal Research Reviews*, *33*(5), 911–933. <https://doi.org/10.1002/med.21270>
- Rippe, B., & Haraldsson, B. (1994). Transport of macromolecules across microvascular walls: The two-pore theory. *Physiological Reviews*, *74*(1), 163–219. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.163>
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martínez, A. D., & Beyer, E. C. (2003). Plasma

- Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiological Reviews*, 83(4), 1359–1400. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2003>
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., & Bennett, M. V. L. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1711(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.01.014>. Connexin-based
- Samapati, R., Yang, Y., Yin, J., Stoerger, C., Arenz, C., Dietrich, A., Gudermann, T., Adam, D., Wu, S., Freichel, M., Flockerzi, V., Uhlig, S., & Kuebler, W. M. (2012). Lung endothelial Ca²⁺ and permeability response to platelet-activating factor is mediated by acid sphingomyelinase and transient receptor potential classical 6. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(2), 160–170. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0717OC>
- Sánchez, F. A., Rana, R., González, F. G., Iwahashi, T., Durán, R. G., Fulton, D. J., Beuve, A. V., Kim, D. D., & Durán, W. N. (2011). Functional significance of cytosolic endothelial nitric-oxide synthase (eNOS): Regulation of hyperpermeability. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30409–30414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234294>
- Sánchez, F., Kim, D., Durán, R. G., Meininger, C., & Durán, W. N. (2008). Internalization of eNOS via caveolae regulates PAF-induced inflammatory hyperpermeability to macromolecules. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(4), H1642-8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00629.2008>
- Sandoval, R., Malik, A. B., Naqvi, T., Mehta, D., & Tirupathi, C. (2001). Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280, 239–247.
- Sarker, M. H., Easton, A. S., & Fraser, P. A. (1998). Regulation of cerebral microvascular permeability by histamine in the anaesthetized rat. *Journal of Physiology*, 507(3), 909–918. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.909bs.x>
- Schnittler, H., Taha, M., Schnittler, M. O., Taha, A. A., Lindemann, N., & Seebach, J. (2014). Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: The Ying and Yang between stabilization and motion. *Cell and Tissue Research*, 355(3), 529–543. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1856-2>
- Secomb, T. W., & Pries, A. R. (2011). The microcirculation: Physiology at the mesoscale. *Journal of Physiology*, 589(5), 1047–1052. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201541>
- Segal, S. S. (2005). Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*, 12(1), 33–45. <https://doi.org/10.1080/10739680590895028>
- Shen, Qiang, Wu, Mack H, Yuan, S. Y. (2009). Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability. *Cell Health Cytoskeleton*, 2009(1), 43–50.
- Shen, Q., Rigor, R. R., Pivetti, C. D., Wu, M. H., & Yuan, S. Y. (2010). Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovascular Research*, 87(2), 272–280. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq144>

- Shinde, A., Motiani, R., Zhang, X., Abdullaev, I., Adam, A., González-Cobos, J., Zhang, W., Matrougui, K., Vincent, P., & Trebak, M. (2014). STIM1 Controls Endothelial Barrier Function Independently of Orail and Ca²⁺ Entry. *Sci Signal*, 6(267), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The
- Shukla, S. D. (1992). Platelet-Activating factor receptor and signal transduction mechanisms. *FASEB Journal*, 6(6), 2296–2301.
- Spindler, V., Schlegel, N., & Waschke, J. (2010). Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovascular Research*, 87(2), 243–253. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq086>
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G., & Charles, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10482–10488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109902200>
- Straub, Adam C., Billaud, Marie, Johnstone, Scott R., Best, Angela K., Yemen, Sean, Dwyer, Scott T., Looft-Wilson, Robin, Lysiak, Jeffery J., Gaston, Ben, Lisa, Palmer, Isakson, B. E. (2011). Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(2), 399–407. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.215939>
- Sumagin, Ronen, Sarelius, I. H. (2006). TNF- α ACTIVATION OF ARTERIOLES AND VENULES ALTERS THE DISTRIBUTION AND LEVELS OF ICAM-1 AND AFFECTS LEUKOCYTE-ENDOTHELIAL CELL INTERACTIONS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(5), H2116–H2125. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00248.2006>
- Sun, J., Nguyen, T., Aponte, A. M., Menazza, S., Kohr, M. J., Roth, D. M., Patel, H. H., Murphy, E., & Steenbergen, C. (2015). Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria. *Cardiovascular Research*, 106(2), 227–236. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv044>
- Suresh, K., Servinsky, L., Reyes, J., Baksh, S., Udem, C., Caterina, M., Pearse, D. B., & Shimoda, L. A. (2015). Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells involves TRPV4. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(12), L1467–L1477. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00275.2015>
- Tallini, Y. N., Brekke, J. F., Shui, B., Doran, R., Hwang, S. M., Nakai, J., Salama, G., Segal, S. S., & Kotlikoff, M. I. (2007). Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: Measurements in Cx40BAC-GCaMP2 transgenic mice. *Circulation Research*, 101(12), 1300–1309. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.149484>
- Tanaka, N., Kawasaki, K., Nejime, N., Kubota, Y., Takahashi, K., Hashimoto, M., Kunitomo, M., & Shinozuka, K. (2003). P2Y receptor-mediated enhancement of permeation requires CA²⁺ signalling in vascular endothelial cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(9), 649–652. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03893.x>
- Tauseef, M., Farazuddin, M., Sukriti, S., Rajput, C., Meyer, J. O., Ramasamy, S. K., & Mehta, D. (2016). Transient receptor potential channel 1 maintains adherens junction plasticity

- by suppressing sphingosine kinase 1 expression to induce endothelial hyperpermeability. *FASEB Journal*, 30(1), 102–110. <https://doi.org/10.1096/fj.15-275891>
- Thakore, P., & Earley, S. (2019). Transient receptor potential channels and endothelial cell calcium signaling. *Comprehensive Physiology*, 9(3), 1249–1277. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180034>
- Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4), 493–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>
- Timóteo, M. A., Carneiro, I., Silva, I., Noronha-Matos, J. B., Ferreira, F., Silva-Ramos, M., & Correia-De-Sá, P. (2014). ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y6 receptors. *Biochemical Pharmacology*, 87(2), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.007>
- Tiruppathi, C., Ahmed, G. U., Vogel, S. M., & Malik, A. B. (2006). Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation*, 13(8), 693–708. <https://doi.org/10.1080/10739680600930347>
- Tiruppathi, C., Minshall, R. D., Paria, B. C., Vogel, S. M., & Malik, A. B. (2002). Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*, 39(4–5), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(03\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00007-7)
- Townsley, M. I. (2018). Permeability and calcium signaling in lung endothelium: Unpack the box.... *Pulmonary Circulation*, 8(1). <https://doi.org/10.1177/2045893217738218>
- Vacher, H., Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2008). Localization and Targeting of Voltage-Dependent Ion Channels in Mammalian Central Neurons. *Physiological Reviews*, 88(4), 1407–1447. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2008>
- Vallance, P., & Chan, N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: Clinical relevance. *Heart*, 85(3), 342–350. <https://doi.org/10.1136/heart.85.3.342>
- Van Hinsbergh, V. W. M., & Van Nieuw Amerongen, G. P. (2002). Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *Journal of Anatomy*, 200(6), 549–560. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00060.x>
- Vasile, E., Qu-Hong, Dvorak, H. F., & Dvorak, A. M. (1999). Caveolae and vesiculo-vacuolar organelles in bovine capillary endothelial cells cultured with VPF/VEGF on floating matrigel-collagen gels. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47(2), 159–167. <https://doi.org/10.1177/002215549904700205>
- Veliz, L. P., Gonzalez, F. G., Duling, B. R., Saez, J. C., & Boric, M. P. (2008). Functional role of gap junctions in cytokine-induced leukocyte adhesion to endothelium in vivo. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 295(3), H1056–H1066. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00266.2008>
- Verkhratsky, A., & Steinhäuser, C. (2000). Voltage-Dependent Ion Channels in Glial Cells. *Brain Research Reviews*, 380, 380–412.

- Villaseñor, R., Kuennecke, B., Ozmen, L., Ammann, M., Kugler, C., Grüninger, F., Loetscher, H., Freskgård, P. O., & Collin, L. (2017). Region-specific permeability of the blood–brain barrier upon pericyte loss. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(12), 3683–3694. <https://doi.org/10.1177/0271678X17697340>
- Vincent, F., & A.J. Duncton, M. (2011). TRPV4 Agonists and Antagonists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(17), 2216–2226. <https://doi.org/10.2174/156802611796904861>
- Vliagoftis, H., Ebeling, C., Ilarraza, R., Mahmudi-Azer, S., Abel, M., Adamko, D., Befus, A. D., & Moqbel, R. (2014). Connexin 43 expression on peripheral blood eosinophils: Role of gap junctions in transendothelial migration. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/803257>
- Vouret-Craviari, V., Boquet, P., Pouyssegur, J., van Obberghen-schilling, E., & Obberghen-schilling, E. Van. (1998). Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Molecular Biology of the Cell*, 9(September), 2639–2653. <https://doi.org/10.1091/MBC.9.9.2639>
- Wagner, L., Hoey, J. G., Erdely, A., Boegehold, M. A., & Baylis, C. (2001). The nitric oxide pathway is amplified in venular vs arteriolar cultured rat mesenteric endothelial cells. *Microvascular Research*, 62(3), 401–409. <https://doi.org/10.1006/mvre.2001.2359>
- Wang, H., Wang, A. X., Liu, Z., Chai, W., & Barrett, E. J. (2009). The trafficking/interaction of eNOS and caveolin-1 induced by insulin modulates endothelial nitric oxide production. *Molecular Endocrinology*, 23(10), 1613–1623. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0115>
- Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgårdh-Nilsson, A., Andersson, M., Borna, C., Gudbjartsson, T., Jern, S., & Erlinge, D. (2002). P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40(6), 841–853. <https://doi.org/10.1097/00005344-200212000-00005>
- Wang, N., De Bock, M., Antoons, G., Gadicherla, A. K., Bol, M., Decrock, E., Evans, W. H., Sipido, K. R., Bukauskas, F. F., & Leybaert, L. (2012). Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca²⁺ elevation. *Basic Research in Cardiology*, 107(6), 17. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0304-2>
- Wellmann, M., Álvarez-Ferradas, C., Maturana, C. J., Sáez, J. C., & Bonansco, C. (2018). Astroglial Ca²⁺-dependent hyperexcitability requires p2y 1 purinergic receptors and pannexin-1 channel activation in a chronic model of epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00446>
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., & Goran. (2002). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biological Chemistry*, 383(5), 725–737.
- Wu, S., Cioffi, E. A., Alvarez, D., Sayner, S. L., Chen, H., Cioffi, D. L., King, J., Creighton, J. R., Townsley, M., Goodman, S. R., & Stevens, T. (2005). Essential role of a Ca²⁺-selective, store-operated current (ISOC) in endothelial cell permeability determinants of the vascular leak site. *Circulation Research*, 96(8), 856–863.

<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000163632.67282.1f>

- Xiao, Z., Wang, T., Qin, H., Huang, C., Feng, Y., & Xia, Y. (2011). Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release modulates endothelial nitric-oxide synthase via Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2-mediated serine 635 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 20100–20108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220236>
- Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., Qi, Z., Sokabe, M., & Ando, J. (2000). P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 279(1), H285–H292. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.1.H285>
- Yamamoto, Kimiko, Imamura, H., & Ando, J. (2018). Shear stress augments mitochondrial atp generation that triggers atp release and ca²⁺ signaling in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 315(5), H1477–H1485. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00204.2018>
- Yesiltepe, A., Dizdar, O. S., Gorkem, H., Dondurmaci, E., Ozkan, E., Koc, A., Baktir, A. O., & Gunal, A. I. (2017). Maintenance of negative fluid balance can improve endothelial and cardiac functions in primary hypertensive patients. *Clinical and Experimental Hypertension*, 39(6), 579–586. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1291663>
- Yu, P., Hatakeyama, T., Aramoto, H., Miyata, T., Shigematsu, H., Nagawa, H., Hobson, R. W., & Durán, W. N. (2005). Mitogen-activated protein kinases regulate platelet-activating factor-induced hyperpermeability. *Microcirculation*, 12(8), 637–643. <https://doi.org/10.1080/10739680500301706>
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y., Paul, F., & Muallem, S. (2009). *Orai channels*. 11(3), 337–343. <https://doi.org/10.1038/ncb1842.SOAR>
- Yuan, Y., Granger, J., Defily, D. V, Chilian, M., & Zawieja, C. (1993a). Histamine increases venular permeability a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade. *The American Physiological Society*, 264, H1734-9.
- Yuan, Y., Granger, J., Defily, D. V, Chilian, M., & Zawieja, C. (1993b). *Histamine increases venular permeability a phospholipase via cyclase cascade*.
- Zamorano, P., Marín, N., Córdova, F., Aguilar, A., Meininger, C., Boric, M. P., Golenhofen, N., Contreras, J. E., Sarmiento, J., Durán, W. N., & Sánchez, F. A. (2017). S-nitrosylation of VASP at cysteine 64 mediates the inflammation-stimulated increase in microvascular permeability. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 313(1), H66–H71. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00135.2017>
- Zhang, J., Yang, G., Zhu, Y., Peng, X., Li, T., & Liu, L. (2018). Relationship of Cx43 regulation of vascular permeability to osteopontin-tight junction protein pathway after sepsis in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 314(1), R1–R11. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00443.2016>
- Zhang, R. S., & Huxley, V. H. (1992). Control of capillary hydraulic conductivity via membrane potential-dependent changes in Ca²⁺ influx. *The American Journal of*

Physiology, 262(1 Pt 2), H144-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733304>

- Zhou, C., Townsley, M. I., Alexeyev, M., Voelkel, N. F., & Stevens, T. (2016). Endothelial hyperpermeability in severe pulmonary arterial hypertension: Role of store-operated calcium entry. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(3), L560–L569. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00057.2016>
- Zhu, L., & He, P. (2005). Platelet-activating factor increases endothelial [Ca²⁺]_i and NO production in individually perfused intact microvessels. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288(6), H2869-77. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01080.2004>
- Zou, M., Dong, H., Meng, X., Cai, C., Li, C., Cai, S., & Xue, Y. (2015). Store-operated Ca²⁺ entry plays a role in HMGB1-induced vascular endothelial cell hyperpermeability. *PLoS ONE*, 10(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123432>