



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**DISFUNCIÓN VASCULAR INDUCIDA POR LA LIBERACIÓN DE CGRP DESDE
LOS NERVIOS SENSORIALES PERIVASCULARES**

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

Por

PABLO SIMÓN GAETE PAUCHARD

DIRECTOR DE LA TESIS: XAVIER FIGUEROA FOESSEL

Enero, 2015



**INFORME DE APROBACIÓN DE LA DEFENSA PRIVADA
DE LA TESIS DOCTORAL TITULADA**

**"Disfunción vascular inducida por la liberación de CGRP desde los
nervios sensoriales perivasculares"**

Presentada por el Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas

PABLO SIMÓN GAETE PAUCHARD

El Comité Evaluador, constituido por los profesores abajo firmantes, ha evaluado como Aprobada (APROBADO, APROBADO CON MODIFICACIONES, REPROBADO) el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral.

Dr. Xavier Figueroa F.
Director de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Rodrigo Iturriaga A.
Coordinador Comité de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Mauricio Boric P.
Miembro Comité de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Mauricio Retamal L.
Miembro Externo Comité de Tesis
Universidad del Desarrollo

Santiago de Chile, 19 de diciembre de 2014

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi novia, Natalia Herrera Romero, a mi madre, Marie Rose Pauchard y a mi amigo Augusto Patricio Cornejo Gac (1982 - 2012).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis con un especial énfasis a Inés Poblete por el excelente apoyo técnico brindado; a mis compañeros Manuel Muñoz, Víctor Lazo, Pía Burboa y Nicolás Ardiles por sus consejos, críticas y ayuda técnica; a Mariela Puebla, por su importante colaboración en la realización de la inmunofluorescencia para CGRP, y a Mauricio Lillo por la constante discusión crítica de los resultados y por su valiosa cooperación en el diseño y realización de experimentos claves de este trabajo. Agradezco también a todas aquellas personas que colaboraron mediante preguntas, consejos y críticas en las diversas ocasiones que me tocó presentar mis resultados de forma pública. Agradezco a Brant Isakson (Cardiovascular Research Center, Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA) por la generosa donación del anticuerpo para P-Panx-1. Finalmente, quisiera agradecer encarecidamente al Dr. Xavier Figueroa por la excelente tutoría de mi tesis doctoral. El Dr. Figueroa colaboró permanentemente en el diseño, supervisión, realización y discusión crítica de los experimentos. Agradezco al Dr. Figueroa no solo por potenciar mi formación como científico, sino por contribuir considerablemente a mi crecimiento personal mediante los innumerables consejos y charlas motivacionales. Finalmente, agradezco a todas las fuentes de

financiamiento (descritas a continuación) que hicieron posible la realización y difusión de esta tesis en importantes congresos nacionales e internacionales.

Fuentes de financiamiento:

Beca de Ayudante Becario VRI (2010 y 1er semestre 2011)

Beca de Instructor Becario VRI (2do semestre 2011)

Beca CONICYT para estudios de Doctorado (2012-2014)

Beca CONICYT de Apoyo de Tesis Doctoral N° 24121388 (2012-2013)

Becas CONICYT de asistencia a eventos cortos (2010, 2011, 2012, 2013)

Beca de residencia VRI (2014)

Fondos de la Dirección de Postgrado para eventos cortos

Proyecto FONDECYT 1100850

Proyecto ANILLOS ACT-71

ÍNDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE MATERIAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xxv
INTRODUCCIÓN	1
1 Señales vasodilatadoras derivadas del endotelio	5
1.1 Óxido nítrico (NO)	5
1.1.1 Estructura y función de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)	5
1.1.2 Regulación de la eNOS	7
1.1.3 Vasodilatación dependiente de NO	10
1.1.4 Importancia del NO en el control del tono vascular	12
1.2 Prostaglandinas	14
1.3 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)	15

2	Rol de las conexinas y panexinas en el control de la función vascular	18
2.1	Estructura y función de canales intercelulares, hemicanales formados por conexinas y canales formados por panexinas	18
2.1.1	<i>Conexinas</i>	18
2.1.2	<i>Panexinas</i>	22
2.2	Distribución de conexinas y panexinas en los vasos sanguíneos.....	24
2.3	Uniones comunicantes en la pared vascular	26
2.4	Canales de panexina y hemicanales formados por conexinas en la vasculatura ..	29
3	Nervios perivasculares.....	32
3.1	Inervación de los vasos sanguíneos	32
3.2	Nervios simpáticos.....	35
3.3	Nervios sensoriales perivasculares	37
3.3.1	<i>Estructura y función de los nervios sensoriales perivasculares</i>	37
3.3.2	<i>Neurotransmisores</i>	39
4	Propuesta de la tesis.....	50
4.1	Hipótesis	51
	OBJETIVOS	52
	MATERIALES Y MÉTODOS	56
1	Animales	56
2	Perfusión de la red arterial mesentérica.....	56
3	Registro de la presión de perfusión.....	57
4	Aislamiento de arterias mesentéricas.....	58
5	Inmunofluorescencia.....	59

6	Cultivo de células endoteliales	60
7	Captación de colorante.....	61
8	Acoplamiento vascular	61
9	Western blot.....	62
10	Detección del NO.....	64
11	Detección del ATP.....	64
12	Detección del superóxido.....	65
13	Detección de Ca ²⁺	66
14	Drogas.....	66
	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	68
1	Activación de las fibras sensoriales perivasculares	68
2	Respuestas vasomotoras	69
3	Medición del superóxido	71
4	Medición del NO	71
5	Expresión de proteínas.....	73
6	Denervación de la red arterial mesentérica.....	74
7	Cambios en la permeabilidad de la membrana	75
8	Medición del ATP.....	79
9	Medición del Ca ²⁺	79
10	Acoplamiento vascular mediante uniones comunicantes	80
11	Análisis estadístico	81
	RESULTADOS	82

1 La activación de las fibras sensoriales perivasculares regula la vasodilatación dependiente del endotelio.....	82
<i>1.1 Alteración de los componentes de la vasodilatación inducida por ACh.</i>	<i>82</i>
<i>1.2 La activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares conduce a un incremento progresivo de la producción de superóxido.</i>	<i>96</i>
<i>1.3 Los nervios sensoriales perivasculares regulan la actividad de la eNOS.....</i>	<i>98</i>
<i>1.4 La inhibición de la eNOS causada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares es mediada por los receptores CGRP-1.....</i>	<i>104</i>
2 Las fibras sensoriales perivasculares regulan la función endotelial mediante la activación de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas.....	107
<i>2.1 Los nervios sensoriales perivasculares controlan la activación de los canales formados por Panx-1.</i>	<i>107</i>
<i>2.2 La apertura de los canales formados por Panx-1 inducida por la activación de los nervios sensoriales perivasculares se produce en el endotelio vascular.</i>	<i>110</i>
<i>2.3 Los canales de Panx-1 juegan un papel clave en la inhibición de la señalización del NO causada por el CGRP.....</i>	<i>114</i>
<i>2.4 La activación del receptor CGRP-1 conduce a un incremento prolongado de la permeabilidad de la membrana endotelial a través de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas.....</i>	<i>122</i>
<i>2.5 Los hemicanales formados por conexinas juegan un papel importante en la inhibición de la señalización del NO causada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares.....</i>	<i>129</i>

2.6	<i>La liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares induce la activación de los canales de Panx-1 a través de la vía PKA-NO.</i>	129
3	Las fibras sensoriales perivasculares regulan la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes.	134
3.1	<i>La liberación de CGRP desde los terminales sensoriales perivasculares inhibe el acoplamiento celular en arterias mesentéricas.</i>	134
3.2	<i>Las fibras sensoriales perivasculares regulan la vasodilatación dependiente de uniones comunicantes.</i>	136
4	La activación transitoria de las fibras sensoriales perivasculares afecta la función vascular por al menos tres horas.	136
4.1	<i>La activación del receptor CGRP-1 y posterior apertura de los canales de Panx-1 regula la expresión de proteínas claves en el control de la función vascular.</i>	136
	DISCUSIÓN	139
1	Desbalance de los componentes vasodilatadores derivados del endotelio	140
2	Mecanismo de inhibición de la vasodilatación dependiente de NO	147
3	Mecanismo de activación de los canales formados por Panx-1	153
4	Incremento prolongado de la permeabilidad de la pared vascular a través de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas	162
5	Regulación de la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes	173
6	Regulación de la función vascular por los nervios sensoriales perivasculares	176
7	Proyecciones	177
	CONCLUSIÓN	183
	BIBLIOGRAFÍA	188

APÉNDICE I212

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Principales señales vasodilatadoras derivadas del endotelio.....	3
FIGURA 2. Estructura de los canales intercelulares, de los hemicanales formados por conexinas y de los canales formados por panexinas.....	19
FIGURA 3. Inervación de los vasos sanguíneos de los tejidos periféricos.....	34
FIGURA 4. Estructura y función de CGRP y su receptor.....	45
FIGURA 5. Cursos temporales representativos de la vasodilatación inducida por ACh.....	83
FIGURA 6. El tratamiento con capsaicina altera los componentes de la respuesta vasodilatadora inducida por ACh.....	84
FIGURA 7. El tratamiento con capsaicina activa un componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas.....	86
FIGURA 8. La inhibición de la producción de NO activa un componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas.....	87
FIGURA 9. La pre-contracción con KCl no afecta la vasodilatación dependiente de NO.....	89
FIGURA 10. El tratamiento con capsaicina inhibe la vasodilatación dependiente de NO.....	90
FIGURA 11. Inicio de la inhibición causada por capsaicina de la vasodilatación dependiente de NO.....	91

FIGURA 12. La inhibición causada por capsaicina de la vasodilatación dependiente de NO ocurre de manera progresiva en el tiempo	93
FIGURA 13. El tratamiento con capsaicina no afecta la acción del NO sobre el músculo liso.....	94
FIGURA 14. Capsaicina no afecta la respuesta vasodilatadora dependiente de NO en la red arterial mesentérica denervada.....	95
FIGURA 15. El tratamiento con capsaicina produce un incremento en la producción de superóxido a lo largo del tiempo.....	97
FIGURA 16. El tratamiento con capsaicina conduce a la inhibición progresiva de la producción de NO.....	99
FIGURA 17. La estimulación con CGRP inhibe la producción de NO en células endoteliales.....	100
FIGURA 18. El tratamiento con capsaicina reduce el nivel de fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177.....	102
FIGURA 19. El tratamiento con CGRP inhibe la señalización de calcio activada por ACh.....	103
FIGURA 20. El receptor CGRP- 1 media la inhibición de la señalización del NO causada por el tratamiento con capsaicina.....	105
FIGURA 21. Capsaicina incrementa la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular a través de la activación de los canales formados por Panx-1	108
FIGURA 22. Capsaicina no incrementa la permeabilidad de membrana en la pared vascular de vasos denervados.....	111

FIGURA 23. CGRP aumenta la permeabilidad de las células de la pared vascular mediante la activación de los canales formados por Panx-1.....	112
FIGURA 24. La captación del colorante amarillo de lucifer inducida por capsaicina o CGRP se restringe al endotelio vascular.....	113
FIGURA 25. CGRP incrementa la permeabilidad de la membrana de células endoteliales mediante la activación de los canales de Panx-1.....	115
FIGURA 26. Los canales de Panx-1 participan en la inhibición del componente vasodilatador dependiente de NO causado por el tratamiento con capsaicina.....	116
FIGURA 27. Los canales formados por Panx-1 juegan un papel clave en la inhibición de la producción de NO causada por el tratamiento con capsaicina.....	118
FIGURA 28. Los canales formados por Panx-1 median la inhibición de la producción de NO inducida por CGRP en células endoteliales.....	119
FIGURA 29. Los canales formados por Panx-1 juegan un papel clave en el control de la fosforilación de eNOS causada por el tratamiento con capsaicina.....	120
FIGURA 30. El bloqueo de los canales de Panx-1 previene la abolición de la señal de calcio activada por ACh.....	121
FIGURA 31. El tratamiento con CGRP y capsaicina produce un incremento prolongado de la permeabilidad de las células de la pared vascular a través de los canales formados por Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas.....	123
FIGURA 32. La estimulación del receptor CGRP-1 conduce a la activación prolongada de los canales de Panx-1 y al reclutamiento de los hemicanales de conexina en la pared vascular..	125
FIGURA 33. El NO induce un incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular.....	127

FIGURA 34. La captación de colorante inducida por el tratamiento con capsaicina o CGRP se restringe principalmente al endotelio vascular.....	128
FIGURA 35. Los hemicanales formados por conexinas participan en la inhibición del componente vasodilatador dependiente de NO causado por el tratamiento con capsaicina...	130
FIGURA 36. La apertura de los canales de Panx-1 inducida por capsaicina depende de la activación del receptor CGRP-1 y la posterior activación de la vía PKA-NO.....	131
FIGURA 37. La apertura de los canales de Panx-1 inducida por CGRP depende de la activación del receptor CGRP-1 y la posterior activación de la vía PKA-NO.....	133
FIGURA 38. El tratamiento con capsaicina o CGRP bloquea el acoplamiento intercelular en la pared vascular.....	135
FIGURA 39. El tratamiento con capsaicina inhibe la vasodilatación dependiente del endotelio mediada por uniones comunicantes.....	137
FIGURA 40. El bloqueo de la producción o de la señalización del NO sugiere que la inhibición de la producción de NO activa un componente vasodilatador compensatorio.....	145
FIGURA 41. El tratamiento con capsaicina conduce a la desensibilización de las fibras sensoriales perivasculares.....	151
FIGURA 42. El CGRP ₈₋₃₇ inhibe de manera concentración-dependiente la captación de etidio inducida por capsaicina.....	155
FIGURA 43. La concentración de CGRP ₈₋₃₇ usada en esta tesis inhibe parcialmente la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina.....	157
FIGURA 44. El CGRP ₈₋₃₇ no inhibe los canales de Panx-1 ni los hemicanales formados por conexinas.....	159

FIGURA 45. La activación de los canales de Panx-1 inducida por capsaicina no es mediada por los receptores purinérgicos.....	166
FIGURA 46. La estimulación de las células endoteliales con CGRP no está asociada a la liberación de ATP.....	167
FIGURA 47. El tratamiento con capsaicina regula la fosforilación de la Panx-1.....	169
FIGURA 48. La estimulación con ACh no conduce a la activación prolongada de los canales de Panx-1 o de los hemicanales formados por conexinas.....	171
FIGURA 49. Efecto de la activación de los nervios sensoriales perivasculares sobre la función endotelial.....	185
FIGURA 50. Resumen de los mecanismos implicados en la disfunción endotelial causada por CGRP.....	186

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Distribución de conexinas y panexinas en la pared vascular.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

11,12,15-THETA: Ácido 11,12,15-trihidroieicosatrienoico
12-S-HETE: Ácido 12-(S)-hidroieicosatetraenoico
AC: Adenilato ciclasa
ACh: Acetilcolina
AMPK: Proteína kinasa activada por AMP
ARG: Ganglio aórtico renal
ATP: adenosina 5'-trifosfato
BH₄: Tetrahidrobiopterina
BK_{Ca}: Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BSA: Albúmina de suero bovino
CaMKII: Ca²⁺-calmodulina kinasa II
cAMP: Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
Caps: Capsaicina
CE: Célula endotelial
cGMP: Guanosín monofosfato cíclico
CGRP: Péptido relacionado al gen de la calcitonina
CML: Célula muscular lisa
CO: Monóxido de carbono
COX: Ciclo-oxigenasa
CRLR: Receptor tipo receptor de la calcitonina
Cx: Conexina
DRG: Ganglio de la raíz dorsal
ECGF: Factor de crecimiento de la célula endotelial
EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF: Factor relajante derivado del endotelio
EETs: Ácidos epoxieicosatrienoicos
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
FAD: Flavín adenina dinucleótido
FMN: Flavín mononucleótido
GA: Ácido glicerretínico
H₂S: Sulfuro de hidrógeno
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HMEC: Células endoteliales microvasculares humanas

HO: Hemo-oxigenasa
 IK_{Ca}: Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
 IL: Interleukina
 Indo: Indometacina
 IP3: Inositol-tri-fosfato
 IP3-R: Receptor de inositol tri-fosfato
 K_{ATP}: Canales de potasio sensibles a ATP
 K_{ir}: Canales de potasio de rectificación de entrada
 K_p: Constante de partición
 L-NA: N^o-nitro-L-arginina
 LEI: Lámina elástica interna
 LPS: Lipopolisacárido
 LOX: Lipoxigenasa
 MAP: Presión arterial media
 MCG: Ganglio cervical medio
 MLC: Cadena liviana de miosina
 MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino) propanesulfónico
 NA: Noradrenalina
 NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NGF: Factor de crecimiento nervioso
 NKA: Neurokinina A
 NKB: Neurokinina B
 NK1: Receptor de neurokinina 1
 NO: Óxido nítrico
 NOS: Óxido nítrico sintasa
 NPY: Neuropeptido Y
 NT: Neurotransmisor
 O₂⁻: Superóxido
 ODQ: 1H-(1,2,4)oxadiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-ona
 Panx: Panexina
 PE: Fenilefrina
 PG: Prostaglandina
 PGI₂: Prostaciclina
 PI3K: Fosfatidil-3-kinasa
 PKA: Proteína kinasa A
 PKC: Proteína kinasa C
 PKG: Proteína kinasa G
 PLA: Fosfolipasa A
 PLC: Fosfolipasa C
 PPADS: Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2,4-disulfónico
 PP1: Proteína fosfatasa 1
 PP2A: Proteína fosfatasa 2A
 PP2B: Calcineurina
 Prob: Probenecid
 PVG: Ganglio de la cadena paravertebral
 RAMP: Proteínas que modifican la actividad del receptor

RCP: Proteína componente del receptor de CGRP
RyR: Receptor de rianodina
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas
SK_{Ca}: Canales de potasio activados por calcio de conductancia pequeña
SNAP: S-nitroso acetil penicilamina
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
SP: Substancia P
TA₂: Tromboxano A₂
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TRPV1: Canal potencial del receptor transitorio de vaniloide tipo 1
TTX: Tetrodotoxina
UA: Unidades arbitrarias
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VIP: Péptido intestinal vasoactivo
VR1: Proteína del receptor vaniloide

RESUMEN

La regulación de la presión arterial y de la distribución del flujo sanguíneo depende del control del grado de contracción del músculo liso (i.e. tono vasomotor) que recubre las arterias de resistencia. Además del músculo liso, la pared de estos vasos está compuesta por una capa de células endoteliales, las cuales controlan el tono vasomotor mediante la liberación de agentes vasodilatadores, principalmente, el óxido nítrico (NO) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Las células de la pared vascular están conectadas entre sí por canales intercelulares formados por conexinas, los cuales transmiten el NO y el EDHF a las células musculares lisas adyacentes y permiten la coordinación de la función vascular. Las conexinas también forman hemicanales, los cuales conectan el compartimiento intracelular con el espacio extracelular. La panexina-1 (Panz-1) forma canales estructuralmente similares a los hemicanales formados por las conexinas. Interesantemente, la activación de ambos, los hemicanales formados por las conexinas o los canales de Panx-1, ha sido ampliamente asociada a procesos inflamatorios y a disfunción celular. Las arterias de resistencia están inervadas por fibras sensoriales sensibles a capsaicina que liberan el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) durante condiciones inflamatorias. Notablemente la inflamación conduce a la reducción de la vasodilatación dependiente del NO y del EDHF; no obstante, los mecanismos que median este fenómeno se desconocen. Basado en estos antecedentes, la

hipótesis de este trabajo es que el CGRP induce la activación de los canales de Panx-1 en el endotelio vascular, lo cual conduce a la pérdida de la señalización del NO y a la inhibición del acoplamiento intercelular mediado por uniones comunicantes. Los objetivos generales son: 1) determinar si la liberación de CGRP desde los terminales sensoriales perivasculares regula la vasodilatación dependiente de NO en las arterias de resistencia; 2) determinar si los canales de panexinas y/o los hemicanales formados por conexinas participan en la disfunción endotelial inducida por CGRP; 3) dilucidar el mecanismo de activación de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas inducido por CGRP; 4) analizar si la activación de los nervios sensoriales perivasculares regula la comunicación intercelular en las arterias de resistencia. Para abordar estos objetivos, se utilizó la red arterial mesentérica de rata, aislada y perfundida. En esta preparación, se indujo la liberación de CGRP desde los nervios sensoriales perivasculares mediante la perfusión de capsaicina ($1 \mu\text{M}$), durante 20 min. Antes y/o después de este tratamiento, se evaluó la vasodilatación inducida por acetilcolina (ACh, $0,01 - 10 \mu\text{M}$), un vasodilatador dependiente del endotelio; se determinó la producción de NO; se cuantificó la expresión de proteínas mediante Western blot; y se analizó, mediante captación de etidio o amarillo de lucifer, los cambios en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los constituidos por panexinas o los hemicanales formados por conexinas. Finalmente, se analizó la comunicación intercelular mediante un ensayo de acoplamiento a colorante. El tratamiento con capsaicina no afectó la magnitud de la respuesta vasodilatadora inducida por ACh. No obstante, en los mesenterios estimulados con capsaicina, la vasodilatación dependiente de NO fue inhibida de manera progresiva a lo largo del tiempo, mientras que una respuesta vasodilatadora sensible a indometacina compensó la pérdida del componente de NO. Además, el tratamiento con capsaicina incrementó la producción de

superóxido, redujo los niveles basales de la fosforilación de la eNOS en serina 1177 (P-eNOS^{Ser1177}) e inhibió la producción de NO inducida por ACh. El bloqueo del receptor CGRP-1 con CGRP₈₋₃₇ previno la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO y la reducción de los niveles de P-eNOS^{Ser1177}. La estimulación con capsaicina o CGRP indujo un aumento en la captación de etidio en las arterias mesentéricas, lo cual no fue prevenido por lantano (inhibidor de hemicanales de conexinas) ni PPADS (antagonista de receptores purinérgicos P2), pero sí por probenecid (inhibidor de los canales de Panx-1), CGRP₈₋₃₇, KT-5720 (inhibidor de la PKA) y L-NA (bloqueador de la producción de NO). Una hora después de la estimulación con capsaicina o CGRP, se detectó una captación similar de etidio la cual fue prevenida cuando la estimulación se hizo en presencia de CGRP₈₋₃₇ o probenecid. La captación de etidio observada 1 h después del tratamiento con capsaicina fue inhibida parcialmente por ambos, probenecid o lantano. La captación del colorante amarillo de lucifer inducida por capsaicina o CGRP se detectó principalmente en células orientadas de forma paralela con respecto al eje longitudinal del vaso. El bloqueo de los canales de Panx-1 con probenecid o ¹⁰panx, previno la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO, la reducción de los niveles de P-eNOS^{Ser1177} y la inhibición de la producción de NO causada por capsaicina. Además, el tratamiento con capsaicina o CGRP inhibió la difusión del etidio mediada por uniones comunicantes en la pared vascular. Los resultados de este trabajo sugieren que la activación de los nervios sensoriales perivasculares conduce a la liberación de CGRP desde los terminales sensoriales y a la activación de los receptores CGRP-1. La activación de los receptores CGRP-1 conlleva a la activación prolongada de los canales de Panx-1 en el endotelio vascular mediante la vía PKA-NO. La apertura de los canales de Panx-1 conduce a la inhibición de la producción del NO. Adicionalmente, la activación de los

nervios sensoriales perivasculares sensibles a capsaicina, a través de la liberación de CGRP, también conduce a la inhibición del acoplamiento intercelular a través de uniones comunicantes. Estos resultados apuntan a los nervios sensoriales perivasculares, el receptor de CGRP-1 y los canales de Panx-1 como potenciales blancos terapéuticos en estados patológicos que conlleven a la activación de las fibras sensoriales y a disfunción endotelial como por ejemplo, la inflamación.

ABSTRACT

Regulation of blood pressure and blood flow distribution depends on controlling the degree of smooth muscle contraction (i.e. vasomotor tone) in resistance arteries. In addition to smooth muscle cells, the vessel wall is composed of a layer of endothelial cells, which control the vasomotor tone by releasing vasodilator agents, mainly, nitric oxide (NO) and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). The cells of the vascular wall are connected by intercellular channels (i.e. gap junctions) formed by connexins, which transmit NO and EDHF to neighboring smooth muscle cells and allow coordination of vascular function. Connexins also form hemichannels, which connect the intracellular compartment with the extracellular space. Pannexin-1 (Panx-1) form channels structurally related to connexin-formed hemichannels. Interestingly, activation of both, connexin-formed hemichannels or Panx-1 channels has been widely associated with inflammatory processes and cellular dysfunction. Resistance arteries are innervated by capsaicin-sensitive sensory nerves that release calcitonin gene-related peptide (CGRP) during inflammatory conditions. Notably, inflammation leads to a reduced NO- and EDHF-dependent vasodilation; however, the mechanisms that mediate this phenomenon are still unknown. Based on this background, the hypothesis of this study is that CGRP induces the activation of Panx-1 channels in the vascular endothelium, which leads to the loss of NO signaling and the inhibition of gap junction-

mediated intercellular coupling. The objectives are: 1) to determine whether the release of CGRP from perivascular sensory terminals regulates NO-dependent vasodilation in resistance arteries; 2) to determine whether pannexin channels and/or connexin-formed hemichannels are involved in endothelial dysfunction induced by CGRP; 3) to elucidate the mechanism of activation of pannexin channels and/or connexin-formed hemichannels induced by CGRP; 4) to analyze whether activation of perivascular sensory nerves regulates intercellular communication in resistance arteries. To address these objectives, the rat mesenteric arterial bed, isolated and perfused was used. In this preparation, the activation of perivascular sensory nerves was induced by perfusion of capsaicin (1 μ M) for 20 min. Before and/or after this treatment, vasodilation induced by acetylcholine (ACh, 0.01 – 10 μ M), an endothelium-dependent vasodilator, was evaluated; NO production was determined; protein expression was quantified by Western blot; and the changes in membrane permeability through channels such as those formed by pannexins or connexin-formed hemichannels was analyzed by ethidium or lucifer yellow uptake. Finally, the intercellular communication through a dye coupling assay was analyzed. Capsaicin treatment did not affect the magnitude of the ACh-induced vasodilator response. However, in mesenteries stimulated with capsaicin NO-dependent vasodilation was gradually inhibited along the time, while a vasodilator component sensitive to indomethacin compensated the loss of NO. Furthermore, treatment with capsaicin increased superoxide production, decreased the level of phosphorylation of eNOS at serine 1177 (P-eNOS^{Ser1177}) and inhibited NO production induced by ACh. Blockade of CGRP-1 receptors with CGRP₈₋₃₇ prevented both, the inhibition of NO-dependent vasodilation and the reduction of P-eNOS^{Ser1177} levels. Stimulation with capsaicin or CGRP induced an increase in the ethidium uptake in mesenteric arteries, which was not prevented by lanthanum (connexin-

formed hemichannel inhibitor) or PPADS (P2 purinergic receptor antagonist), but by probenecid (Panz-1 channel inhibitor), CGRP₈₋₃₇, KT-5720 (PKA inhibitor) and L-NA (NO production blocker). One hour after stimulation with capsaicin or CGRP, a similar ethidium uptake was detected, which was prevented when stimulation was done in presence of CGRP₈₋₃₇ or probenecid. The ethidium uptake observed 1 hour after capsaicin treatment was partially inhibited by both, probenecid or lanthanum. Lucifer yellow uptake induced by capsaicin or CGRP was detected mainly in those cells oriented parallel to the longitudinal axis of the vessel. Blockade of Panx-1 channels with probenecid or ¹⁰panx prevented the inhibition of NO-dependent vasodilation, the reduced levels of P-eNOS^{Ser1177} and the inhibition of NO production caused by capsaicin. In addition, treatment with capsaicin or CGRP inhibited the gap junction-mediated ethidium diffusion in the vessel wall. The results of this work suggest that activation of perivascular sensory nerves leads to the release of CGRP from sensory terminals and the activation of CGRP-1 receptors. The activation of CGRP-1 receptors leads to the prolonged activation of Panx-1 channels in the vascular endothelium by a PKA/NO-dependent pathway. Panx-1 channel opening leads to inhibition of the NO production. In addition, activation of perivascular capsaicin-sensitive sensory nerves, through the release of CGRP, also leads to the inhibition of gap junction-mediated intercellular coupling. These results apoint to the perivascular sensory nerves, the CGRP-1 receptor and Panx-1 channels as potential therapeutic targets in disease states involving activation of sensory fibers and endothelial dysfunction such as, inflammation.

INTRODUCCIÓN

El sistema cardiovascular, en términos generales, está compuesto por dos estructuras: el corazón, y los vasos sanguíneos. El corazón bombea la sangre y los vasos sanguíneos la distribuyen a todos los tejidos del cuerpo, los cuales requieren de un suministro continuo de nutrientes y O₂ y de la remoción de sus desechos metabólicos. Los vasos sanguíneos forman una extensa red vascular, la cual se encarga de transportar la sangre desde el corazón hacia los tejidos y llevarla de vuelta desde los tejidos hasta el corazón. La red vascular está compuesta por arterias, capilares y venas. Las arterias llevan la sangre hacia los tejidos; los capilares permiten el intercambio de solutos (nutrientes, gases y productos de desecho celular) con los tejidos, y las venas, conducen la sangre de vuelta al corazón. Contrario a lo que se pensaba hace varios años atrás, los vasos sanguíneos no son tubos rígidos limitados únicamente a la conducción de la sangre en una forma pre-determinada, sino que son estructuras complejas y dinámicas, que cumplen muchas funciones, tales como la regulación de la distribución de la sangre hacia los tejidos, capacitancia (almacenaje de sangre a alta y baja presión), control de la permeabilidad post-capilar, etc. La distribución del flujo sanguíneo depende de la resistencia al flujo de la sangre, la cual, a su vez, radica en las arteriolas y arterias de pequeño calibre (< 300 μm de diámetro interno). Los cambios del diámetro interno de estos vasos, conocidos como arterias de resistencia, determinan el flujo sanguíneo de acuerdo a las necesidades

metabólicas del tejido, donde una vasodilatación (disminución de la resistencia al flujo) conlleva a un aumento del flujo y una vasoconstricción (aumento de la resistencia al flujo) a una disminución del flujo. De esta manera, las arterias de resistencia también controlan la resistencia vascular periférica total y, junto con el corazón, que regula el flujo sanguíneo por medio de cambios en el gasto cardíaco, son elementos claves en el control de la presión arterial (Lillo *et al.*, 2012).

La pared de las arterias está formada principalmente por una capa de células endoteliales que reviste el lumen del vaso y por una o más capas de células musculares lisas. En el caso de los vasos de resistencia, las arteriolas presentan una sola capa de células musculares lisas y las arterias de resistencia (de mayor diámetro interno) pueden presentar hasta 3 capas de células musculares lisas. Las células endoteliales producen agentes vasoactivos que controlan y regulan el grado de contracción del músculo liso vascular (i.e. tono vasomotor). Estos agentes incluyen señales o sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que actúan de forma paracrina sobre las células musculares lisas adyacentes. Los principales agentes vasoconstrictores sintetizados en el endotelio son la endotelina, la angiotensina II, y los prostanoides tromboxano A_2 (TA_2) y prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Los principales agentes vasodilatadores de origen endotelial son: el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y las prostaclinas (Figura 1). Es importante destacar que en condiciones normales las señales vasodilatadoras derivadas del endotelio predominan por sobre las vasoconstrictoras.

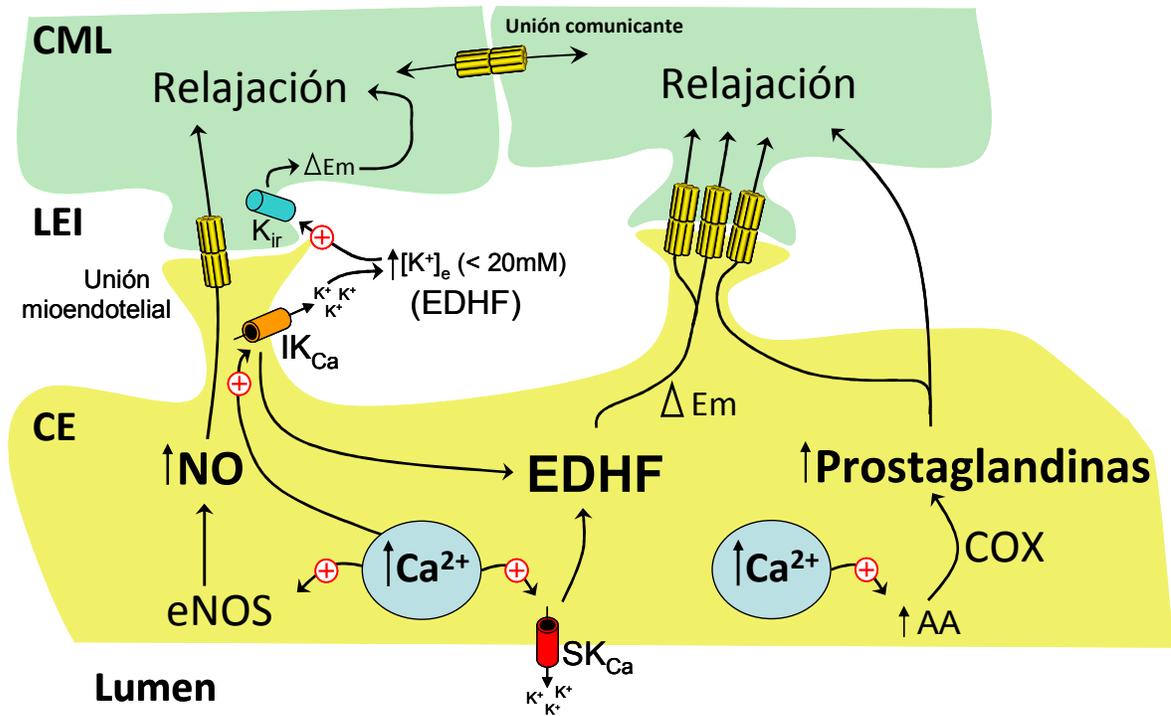


FIGURA 1. Principales señales vasodilatadoras derivadas del endotelio. Ante un estímulo determinado, el endotelio vascular produce agentes vasodilatadores que actúan sobre el músculo liso adyacente induciendo su relajación. Las principales señales vasodilatadoras derivadas del endotelio son el óxido nítrico (NO) el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y las prostaglandinas. Si bien la producción de todos estos agentes depende de incrementos en la concentración del Ca^{2+} intracelular, cada una de las señales es regulada finamente por diversos factores y los incrementos del Ca^{2+} intracelular inducidos por distintos agonistas (tales como, bradicinina, acetilcolina, entre otros) no necesariamente conducen a la activación de todos los agentes vasodilatadores. Abreviaciones: CML: Célula muscular lisa; LEI: Lámina elástica interna; CE: Célula endotelial; SK_{Ca} : Canales de potasio activados por Ca^{2+} de conductancia pequeña; IK_{Ca} : Canales de potasio activados por Ca^{2+} de conductancia intermedia; K_{ir} : Canales de potasio de rectificación de entrada; eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial; COX: Ciclo-oxigenasa.

La contribución de las señales vasodilatadoras en el control del tono vasomotor depende del estímulo, del territorio vascular, de la especie y de la condición fisiológica o patológica del tejido (Feletou y Vanhoutte, 2009). Así, por ejemplo, en las arterias de conducción (e.g. aorta) el NO juega un papel crucial en el control del tono vasomotor en desmedro del EDHF y de las prostaglandinas que cumplen un papel insignificante (Chen *et al.*, 1988; Shimokawa *et al.*, 1996; Brandes *et al.*, 2000; Csanyi *et al.*, 2007). La importancia del EDHF aumenta a medida que disminuye el calibre de las arterias (Shimokawa *et al.*, 1996; Feletou y Vanhoutte, 2009), sugiriendo que el EDHF tiene un papel esencial en la microcirculación y, consecuentemente, en el control de la resistencia periférica y de la distribución del flujo sanguíneo. Consistente con esta hipótesis, se ha demostrado que en la mayoría de las arterias de resistencia el bloqueo de la síntesis del NO solo atenúa la respuesta vasodilatadora inducida por vasodilatadores dependientes del endotelio tales como bradicinina y acetilcolina (ACh) (Gaete *et al.*, 2012). En base a la observación que algunas prostaglandinas tienen propiedades vasodilatadoras, se ha propuesto que las prostaglandinas también controlan el tono vasomotor. Sin embargo, esta idea solo ha sido confirmada en determinadas condiciones y en solo algunos territorios vasculares (Forstermann *et al.*, 1986); por lo tanto, se piensa que la contribución de las prostaglandinas en el control fisiológico del tono vasomotor, en condiciones normales, es despreciable con respecto al NO y al EDHF (Forstermann *et al.*, 1986; Feletou y Vanhoutte, 2009).

1 Señales vasodilatadoras derivadas del endotelio

1.1 Óxido nítrico (NO)

1.1.1 Estructura y función de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, reacción que es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de NOS; la NOS-1 o nNOS (isoforma neuronal), la NOS-2 o iNOS (isoforma inducible) y la NOS-3 o eNOS (isoforma endotelial) (Wu, 2002). En los vasos sanguíneos, bajo condiciones fisiológicas, el NO es sintetizado principalmente por la eNOS (Figura 1). La eNOS es una proteína que se expresa de manera constitutiva en los vasos sanguíneos. En las arterias de resistencia, la eNOS está localizada principalmente en microdominios especializados de las células endoteliales conocidos como caveolas. Sin embargo, su distribución dentro de la célula puede variar de acuerdo a las condiciones fisiológicas o patológicas que afecten su actividad (Prabhakar *et al.*, 1998; Oess *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2013a).

Estructuralmente, la eNOS está compuesta por un dímero, cada uno formado por un dominio oxigenasa (N-terminal) y un dominio reductasa (C-terminal) (Mount *et al.*, 2007). Ambos dominios están separados por un sitio de unión al complejo Ca^{2+} -calmodulina, el cual, está obstaculizado físicamente por un elemento autoinhibitorio (correspondiente a una región de la cola C-terminal de la eNOS) durante el estado inactivo de la enzima. La producción de NO

depende de la oxidación del sustrato L-arginina, lo cual es catalizado por el dominio oxigenasa de la eNOS. Este proceso depende de un flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa de la enzima. El flujo de electrones se transmite por distintos cofactores que deben estar acoplados a la eNOS. Estos cofactores son NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), FAD (Flavín adenina dinucleótido), FMN (Flavín mononucleótido), BH₄ (Tetrahidrobiopterina), y un grupo hemo (Fleming y Busse, 2003). El dominio reductasa del extremo C-terminal posee el sitio de unión para NADPH, el cual dona los electrones necesarios para generar el NO.

La activación de la eNOS depende, principalmente, de la disociación de la enzima de la proteína caveolina-1 (que ancla la enzima a las caveolas) y de la unión de la enzima con el complejo Ca²⁺-calmodulina. Ambos procesos dependen de un incremento en la concentración del calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) (Wu, 2002). Es importante notar que la biodisponibilidad del complejo Ca²⁺-calmodulina depende directamente de la [Ca²⁺]_i, pero el desplazamiento del elemento autoinhibitorio necesario para la interacción del complejo Ca²⁺-calmodulina con la eNOS requiere de otros mecanismos que, como se verá más adelante, pueden o no depender del Ca²⁺ intracelular (Wu, 2002). En consecuencia, se piensa que el Ca²⁺ por sí solo es incapaz de activar la eNOS y requiere de otras vías de señalización para lograrlo (Fleming y Busse, 2003).

1.1.2 Regulación de la eNOS

La actividad de la eNOS es regulada por diversos mecanismos, los cuales controlan el acceso del complejo Ca^{2+} -calmodulina a su sitio de unión, el acoplamiento del dímero, el flujo de electrones, etc. La eNOS forma un complejo multiproteico, mediante la interacción con otras enzimas y proteínas andamio. Se sabe que la interacción de la eNOS con estas proteínas regula su función. Así, la eNOS interactúa por ejemplo con kinasas, fosfatasa, receptores acoplados a proteína G y otras proteínas estructurales o de andamio como dinamina, caveolina-1 y la proteína hsp90, que modifica alostéricamente la enzima favoreciendo su activación (Fleming y Busse, 2003).

Si bien se han descrito numerosas vías de señalización que controlan la actividad de la eNOS, el principal mecanismo de regulación es mediante la fosforilación de residuos específicos de la enzima (Wu, 2002; Fleming y Busse, 2003). En este contexto, se ha descrito que modificaciones en el estado de fosforilación de la serina 114, la treonina 495, la serina 615, la serina 633 y la serina 1177 controlan la actividad de la eNOS (Mount *et al.*, 2007). La fosforilación de la eNOS en los residuos serina 1177 o serina 633 favorece la actividad de la enzima (Dimmeler *et al.*, 1999; Michell *et al.*, 2002). En contraste, la fosforilación de la eNOS en el residuo treonina 495 se asocia con una reducción en la activación de la enzima (Fleming *et al.*, 2001). El efecto de la fosforilación de los residuos serina 114 y serina 615 sobre la actividad de la eNOS es controversial (Mount *et al.*, 2007). También se ha propuesto que la actividad de la eNOS es modulada por la fosforilación en el residuo tirosina 657, la cual se asocia con una potente inhibición de la enzima (Fisslthaler *et al.*, 2008).

Aunque la eNOS presenta múltiples sitios de fosforilación, la mayor parte de los estudios han concluido que la regulación de la actividad de la eNOS depende principalmente de la fosforilación de dos sitios específicos: la serina 1177 y la treonina 495 (Fleming y Busse, 2003). Si bien aún no se tiene claro como la fosforilación de estos sitios regula la activación e inhibición de la enzima, se han propuesto algunas hipótesis de acuerdo a la localización de los residuos en la enzima. En este contexto, el sitio serina 1177 se localiza en el dominio reductasa de la enzima. Así, se piensa que la fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177 conduce a la activación de la eNOS favoreciendo el acoplamiento del dímero, lo cual crea sitios de alta afinidad para L-arginina y BH₄, y facilita el flujo de electrones hacia el dominio oxigenasa de la enzima (Panda *et al.*, 2002; Mount *et al.*, 2007). Una segunda hipótesis plantea que la fosforilación de la enzima en serina 1177 controla la unión de la enzima con el complejo Ca²⁺-calmodulina mediante la regulación del elemento autoinhibitorio (Mount *et al.*, 2007). Por su parte, la treonina 495 se localiza en el sitio de unión de la eNOS con el complejo Ca²⁺-calmodulina, por lo cual, se piensa que la fosforilación de este residuo conduce a la inhibición de la enzima mediante el impedimento (disminución de la afinidad) de la unión del complejo Ca²⁺-calmodulina con la enzima.

Si bien el mecanismo por el cual la fosforilación modula la actividad de la eNOS aún es foco de investigación, se piensa que el estado de fosforilación de la eNOS controla, principalmente, la sensibilidad de la enzima por el Ca²⁺ (Dimmeler *et al.*, 1999). De esta manera, el control de la eNOS mediante la desfosforilación de la serina 1177 o la fosforilación de la treonina 495 permite que la enzima se mantenga inactiva pese a incrementos sustanciales de la [Ca²⁺]_i. Por otro lado, el control mediante la fosforilación de la eNOS en la serina 1177 puede, incluso,

activar la enzima con niveles basales del Ca^{2+} , sin la necesidad de que exista un alza en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La fosforilación y desfosforilación de la eNOS en los distintos residuos es mediada por distintas proteínas kinasas y fosfatasas. Así, la fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177 puede ser catalizada por la proteína kinasa A (PKA), la proteína kinasa activada por AMP (AMPK), la proteína kinasa G (PKG), la Ca^{2+} -calmodulina kinasa II (CaMKII), la vía fosfatidil-3-kinasa (PI3K)-Akt, la proteína kinasa C (PKC)- α y la PKC- δ (vía Akt) (Fleming y Busse, 2003; Partovian *et al.*, 2005; Mount *et al.*, 2007; Sud *et al.*, 2008). En contraste, la fosforilación de la eNOS en el residuo inactivador treonina 495, es catalizada por al menos, la PKC β -II (Chiasson *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la desfosforilación en ambos residuos es mediada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Sin embargo, hay evidencia que muestra que la proteína fosfatasa 1 (PP1) y calcineurina (PP2B) desfosforila la treonina 495 y no la serina 1177 (Fleming y Busse, 2003; Mount *et al.*, 2007).

La activación de las diferentes kinasas y fosfatasas depende del estímulo. En este contexto, numerosos agentes que estimulan la producción de NO mediante cambios en la fosforilación de la eNOS lo hacen mediante la activación de kinasas diferentes. Por ejemplo, bradicinina estimula la producción de NO mediante la fosforilación de la serina 1177 vía Akt o CaMKII y la desfosforilación de la treonina 495 por la PP1 (Harris *et al.*, 2001; Fleming y Busse, 2003). En contraste, la tensión de roce ejercida por el flujo de la sangre sobre la superficie luminal del endotelio estimula la producción de NO mediante la fosforilación de la serina 1177, mediante la activación de la PKA y la Akt, sin modificar aparentemente el estado de fosforilación de la

treonina 495 (Boo *et al.*, 2002). Notablemente, no todos los agonistas que inducen la producción de NO modifican la fosforilación de la eNOS (e.g. acetilcolina (ACh)).

La quelación del Ca^{2+} previene la activación de la eNOS inducida por el shear stress o por vasodilatadores dependientes del endotelio (Dimmeler *et al.*, 1999; Gaete *et al.*, 2012), lo cual sugiere que el Ca^{2+} es requisito indispensable para la activación de la enzima. De esta manera, la fosforilación de los residuos que favorecen la activación de la enzima o la desfosforilación de los residuos que la inhiben son incapaces, por si solos, de inducir la activación de la enzima. En consecuencia, además de la fosforilación de la eNOS, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ constituye un paso crucial para la activación de la enzima.

1.1.3 Vasodilatación dependiente de NO

La idea de que el endotelio cumple un rol esencial en el control del tono vasomotor fue propuesta por primera vez en 1980 por Furchgott y Zawadzki (Furchgott y Zawadzki, 1980). En dicho trabajo, Furchgott demostró que ACh induce la relajación del músculo liso mediante la producción por el endotelio de una substancia a la cual se le denominó EDRF (factor relajante derivado del endotelio). Siete años más tarde, los grupos de Ignarro y Moncada de forma independiente confirmaron que la naturaleza química del EDRF era NO (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). A partir de entonces, miles de estudios han sido publicados demostrando la relevancia de este compuesto en la función vascular.

El NO es un gas de bajo peso molecular soluble en agua (30 Da, $K_p = 4.4$) (Moller *et al.*, 2005). Por lo tanto, se piensa que el NO, desde el lugar donde es sintetizado, difunde en todos sentidos (de forma homogénea) pudiendo actuar de forma autocrina o paracrina. En este último caso, el NO generado en la célula endotelial puede actuar, por ejemplo, en células musculares lisas adyacentes. En la célula muscular lisa, el NO activa la guanilato ciclasa soluble, lo que conduce a una elevación de la concentración de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). El cGMP incrementa la actividad de la PKG, lo cual induce la relajación del músculo liso y la consiguiente vasodilatación. Se ha descrito que la relajación del músculo liso mediada por PKG puede involucrar al menos tres mecanismos diferentes: reducción de la $[Ca^{2+}]_i$, desensibilización al Ca^{2+} y regulación de los filamentos delgados (Lincoln *et al.*, 2001). Además, dependiendo del territorio vascular, la vasodilatación inducida por NO puede ocurrir por una vía independiente y/o dependiente de la hiperpolarización del músculo liso (Murphy y Brayden, 1995; Yuan *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Mistry y Garland, 1998). Con respecto al primer caso, la activación de la PKG puede conllevar a una reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a 1) la reducción de la activación de los canales de calcio tipo L localizados en la membrana del músculo liso, 2) al incremento de la activación de bombas de calcio que secuestran el calcio del sarcoplasma, o bien, 3) a una reducción en la activación del receptor de inositol tri-fosfato (IP3-R) (Lincoln *et al.*, 2001). El NO, a través de la PKG, también puede reducir la sensibilidad de la maquinaria contráctil del músculo liso mediante la activación de la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MLC), la cual desfosforila la MLC e impide la contracción del músculo (Lincoln *et al.*, 2001). Además, el NO puede afectar la maquinaria contráctil del músculo liso mediante la fosforilación de proteínas (e.g. la proteína Hsp20) que se unen a los filamentos delgados, lo cual conduce a la inhibición de la contracción del músculo (Lincoln *et*

al., 2001; Fleming y Busse, 2003). En lo que respecta al mecanismo de vasodilatación dependiente de la hiperpolarización del músculo liso, la activación de la PKG inducida por el NO puede conducir a la activación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) o a los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BK_{Ca}) (Murphy y Brayden, 1995; Mistry y Garland, 1998). La activación de los canales BK_{Ca} puede explicarse por la regulación del estado de fosforilación del canal mediante PKG o fosfatasa activadas por PKG, y por incrementos focalizados del Ca^{2+} en sitios adyacentes a los canales BK_{Ca} . Estos aumentos locales de los niveles de Ca^{2+} pueden explicarse por la fosforilación, vía PKG, de los canales de calcio del retículo sarcoplásmico, del IP3-R o del receptor de rianodina (RyR) (Lincoln *et al.*, 2001). La activación de los canales de K^+ conduce a la hiperpolarización del músculo liso, lo cual disminuye la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (principalmente los canales de Ca^{2+} tipo L). Este mecanismo reduce la $[Ca^{2+}]_i$ y conlleva a la relajación del músculo liso.

1.1.4 Importancia del NO en el control del tono vascular

Se ha descrito que diversos estímulos inducen la producción de NO en arterias. Estos estímulos incluyen bradicinina, ACh, histamina, insulina, estrógeno, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ATP, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), trombina, shear stress y la pulsatilidad de la sangre, entre otros. En las arterias de resistencia, el NO sintetizado regula minuto a minuto el grado de contracción del músculo liso vascular. Consistente con esta propuesta, se ha descrito que la inhibición aguda de la producción del NO en arterias de resistencia aumenta considerablemente la respuesta vasoconstrictora inducida por agonistas

α 1-adrenérgicos (e.g. noradrenalina o fenilefrina) o la producida por la despolarización directa del músculo liso (e.g. soluciones altas en K^+) (Moncada *et al.*, 1991; Gaete *et al.*, 2012). Estos antecedentes sugieren que el NO basal y/o el generado por la vasoconstricción, constituyen un freno fisiológico de la contracción del músculo liso. Más aún, la tensión de roce (i.e. el *shear stress*) induce una respuesta vasodilatadora que depende principalmente de la producción del NO (Paniagua *et al.*, 2001). La tensión de roce constituye el principal estímulo *in vivo* de las células endoteliales de las arterias de resistencia, lo cual da luces de la gran importancia que tiene el NO en el control tónico del tono vascular en este tipo de arterias. Consistente con esta idea, la inhibición crónica de la eNOS conduce a un incremento significativo de la presión arterial (Baylis *et al.*, 1992; Dananberg *et al.*, 1993; Bank *et al.*, 1994). Más aún, la abolición del gen que transcribe para la eNOS produce hipertensión (Huang *et al.*, 1995; Steudel *et al.*, 1997; Scotland *et al.*, 2005). Todos estos antecedentes indican que el NO tiene un papel esencial en el control del tono vasomotor en la microcirculación.

La disfunción endotelial es un término que ha sido empleado para hacer referencia a un empeoramiento de la señalización que media la vasodilatación dependiente del endotelio (Verma y Anderson, 2002). Es tal la relevancia del NO en la función vascular que, actualmente se piensa que una característica inequívoca de la disfunción endotelial (típicamente observada en enfermedades o estados patológicos como hipertensión, diabetes e inflamación, entre otras), es una disminución en la biodisponibilidad del NO (Rudic y Sessa, 1999; Verma y Anderson, 2002; Clapp *et al.*, 2004).

1.2 Prostaglandinas

Las prostaglandinas son eicosanoides sintetizados por la enzima ciclo-oxigenasa (COX) a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX, la COX-1 (isoforma constitutiva) y la COX-2 (isoforma inducible). La síntesis de las prostaglandinas depende de una cascada de señalización iniciada por la activación de la fosfolipasa A2 (PLA₂), mediante un mecanismo dependiente (PLA_{2α}) e independiente (PLA_{2β/γ}) de Ca²⁺ (Figura 1). La activación de la PLA₂ conlleva a la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana, el cual es el sustrato de las COXs. El metabolito producido por las COXs a partir del ácido araquidónico es la prostaglandina G₂ (PGG₂). La PGG₂, mediante la activación de la enzima prostaglandina H (PGH) sintasa, se transforma en PGH₂. Finalmente la PGH₂ es transformada en otros metabolitos mediante la activación de diferentes enzimas (prostaglandina sintasas). De este modo, a partir de la PGH₂ se sintetiza la prostaglandina I₂ (PGI₂) por la prostaciclina sintasa, la prostaglandina E₂ (PGE₂), por la PGE₂ sintasa, la prostaglandina D₂ (PGD₂) por la PGD₂ sintasa y la PGF_{2α} por la PGF_{2α} sintasa (Lillo *et al.*, 2012). La PGH₂ también es utilizada por TA₂ sintasa para sintetizar el TA₂ (Lillo *et al.*, 2012).

En la pared vascular, la COX se expresa en células endoteliales y células musculares lisas. Notablemente, se ha descrito que diferentes prostaglandinas tienen propiedades vasoactivas, pero tales observaciones se limitan solo a ciertos territorios vasculares. La PGF_{2α} y el TA₂ producen vasoconstricción, mientras que la PGI₂, la PGE₂ y la PGD₂ inducen vasodilatación. No obstante, el principal metabolito vasodilatador derivado del ácido araquidónico en las células endoteliales es la PGI₂ o también llamada prostaciclina (Feletou y Vanhoutte, 2009;

Lillo *et al.*, 2012). Las prostaciclinas actúan sobre receptores específicos para la PGI₂ localizados en las células musculares. La activación de estos receptores conduce a la hiperpolarización del músculo liso mediante la activación de diferentes poblaciones de canales de K⁺. Las prostaciclinas tienen un rol despreciable en la respuesta vasodilatadora inducida por agentes neurohumorales tales como ACh o bradicinina (Forstermann *et al.*, 1986). Sin embargo, se ha observado que su producción es importante en la respuesta vasodilatadora inducida por el flujo (i.e. tensión de roce) (Feletou y Vanhoutte, 2009).

1.3 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

El término EDHF es un acrónimo que hace referencia a cualquier sustancia o señal sintetizada, liberada o derivada del endotelio que produzca la hiperpolarización y relajación del músculo liso. Aunque la naturaleza química del EDHF ha sido bastante estudiada, su identidad no ha sido definitivamente dilucidada. Sin embargo, se han propuesto numerosos candidatos para EDHF, entre ellos, los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), sintetizados por la citocromo P450 2C, el ácido 12-(S)-hidroxieicosatetraenoico (12-S-HETE), sintetizado por la 12-LOX (lipoxigenasa), el ácido 11,12,15-trihidroxieicosatrienoico (11,12,15-THETA), sintetizado por la 15-LOX-I, el H₂O₂, sintetizado principalmente a partir del superóxido (O₂⁻) por la superóxido dismutasa (SOD), el monóxido de carbono (CO), sintetizado principalmente a partir de la degradación de grupos hemo mediante la hemo oxigenasa (HO-1 y HO-2), el sulfuro de hidrógeno (H₂S), sintetizado principalmente por la enzima cistationa-γ-liasa, el péptido natriurético tipo C, iones K⁺, etc. (Feletou y Vanhoutte, 2009). En estricto rigor, el NO

también puede ser considerado un EDHF debido a que en el músculo liso de algunos territorios vasculares regula la actividad de ciertos canales de K^+ como los BK_{Ca} , por lo cual induce la hiperpolarización del músculo liso. Ya que las prostaciclina (PGI₂) también actúan mediante la hiperpolarización del músculo liso, también son sustancias que pueden ser consideradas como un EDHF.

Si bien la naturaleza química del EDHF es foco de un gran debate en la actualidad, la mayor parte de la evidencia apunta a que la hiperpolarización del músculo liso en respuesta a agonistas vasodilatadores dependientes del endotelio no depende de la producción o liberación de mediadores como los mencionados en el párrafo anterior (Goto *et al.*, 2002; Ungvari *et al.*, 2002; Dora *et al.*, 2003). En este contexto, se piensa que el EDHF corresponde principalmente a la transmisión de una corriente eléctrica hiperpolarizante desde el endotelio al músculo liso (Goto *et al.*, 2002). Este fenómeno depende directamente de un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en el endotelio vascular (Ungvari *et al.*, 2002), lo cual activa canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) de conductancia pequeña (SK_{Ca}) e intermedia (IK_{Ca}), que están localizados preferencialmente en el endotelio vascular (Eichler *et al.*, 2003) (Figura 1). La activación de los SK_{Ca} y de los IK_{Ca} genera una corriente de K^+ que hiperpolariza el potencial de membrana de la célula endotelial (Crane *et al.*, 2003; Eichler *et al.*, 2003). Se piensa que esta hiperpolarización se propaga al músculo liso adyacente principalmente a través de los canales intercelulares, conocidos como uniones comunicantes o gap junctions, que conectan los citoplasmas de ambas células (Goto *et al.*, 2002; Ungvari *et al.*, 2002; Dora *et al.*, 2003; Figueroa y Duling, 2009) (Figura 1). La hiperpolarización transmitida al músculo liso reduce la $[Ca^{2+}]_i$ en este tipo celular mediante la disminución de la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+}

sensibles a voltaje tipo L, lo cual conlleva a la relajación del músculo liso y a la vasodilatación.

La hiperpolarización generada en el endotelio no solo se podría transmitir mediante este mecanismo (Edwards *et al.*, 1998; Feletou y Vanhoutte, 2009). En este contexto, Edwards *et al.* (1998) demostraron en arterias hepáticas y mesentéricas que la activación de los canales $I_{K_{Ca}}$ y $S_{K_{Ca}}$ inducida por ACh (la cual conlleva a la hiperpolarización del endotelio), genera un incremento local en la concentración extracelular de iones K^+ (< 20 mM) (Figura 1). El K^+ extracelular induce la activación de los canales de K^+ de rectificación de entrada (K_{ir}) dispuestos en el músculo liso, lo cual contribuye a la hiperpolarización del músculo liso y a la vasodilatación de las arterias (Edwards *et al.*, 1998) (Figura 1). En consecuencia, el acoplamiento eléctrico mediado por uniones comunicantes no siempre explica todo el EDHF. Aún así, se piensa que la comunicación mediante uniones comunicantes constituye uno de los principales mecanismos implicados en la transmisión de la hiperpolarización desde el endotelio al músculo liso.

2 Rol de las conexinas y panexinas en el control de la función vascular

2.1 Estructura y función de canales intercelulares, hemicanales formados por conexinas y canales formados por panexinas

2.1.1 Conexinas

Las conexinas (Cx) son proteínas con cuatro segmentos transmembrana que se unen entre sí para formar canales funcionales en la membrana plasmática (Willecke *et al.*, 2002) (Figura 2). En mamíferos, se han descrito al menos 20 isoformas de conexinas, denominadas de acuerdo a su tamaño aproximado (en KDa) (Willecke *et al.*, 2002). Como se describirá con mayor detalle más adelante, en los vasos sanguíneos solo se ha descrito la expresión de la Cx32, la Cx37, la Cx40, la Cx43 y la Cx45.

La unión de seis conexinas en el retículo endoplasmático forma un conexón o hemicanal. El conexón se transloca a la membrana plasmática en vesículas donde permite la comunicación directa del interior de la célula con el medio extracelular (Figura 2). La unión de dos hemicanales (provenientes de células contiguas) forma un canal intercelular conocido también como unión comunicante, unión en hendidura o gap junction (Willecke *et al.*, 2002) (Figura 2).

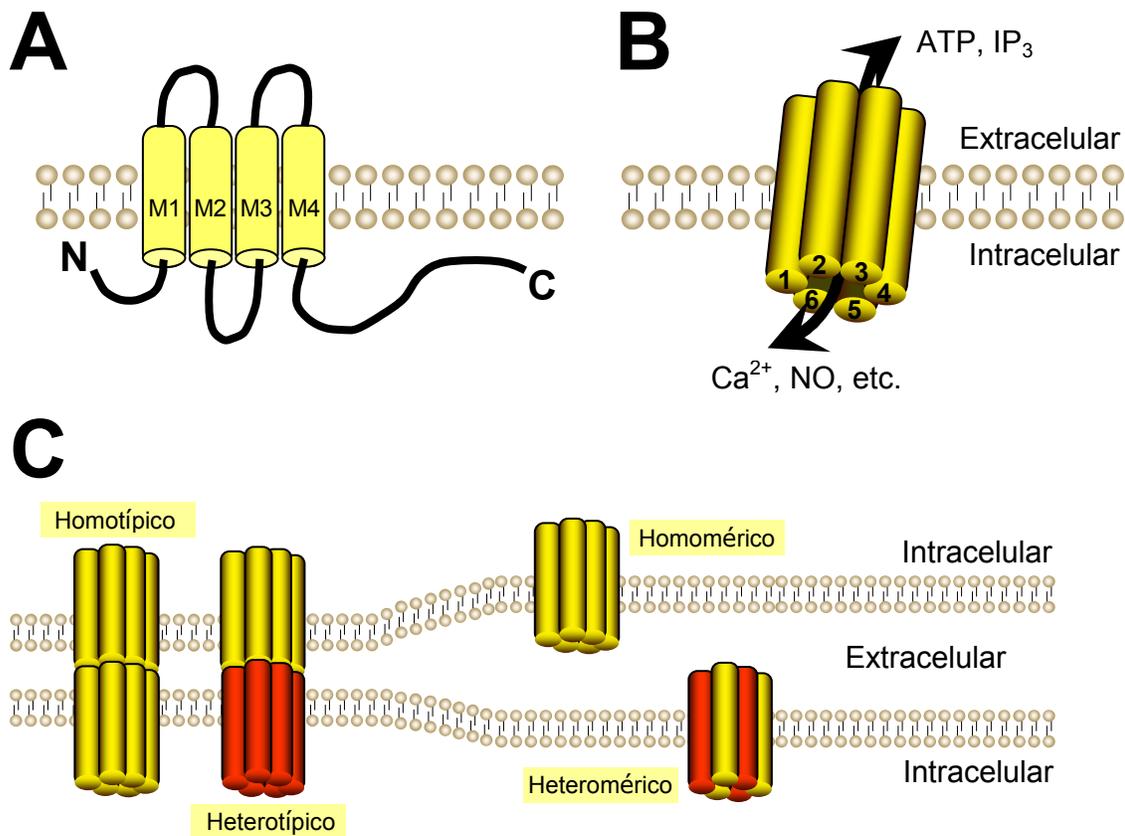


FIGURA 2. Estructura de los canales intercelulares, de los hemicanales formados por conexinas y de los canales formados por panexinas. Las conexinas y panexinas son proteínas de familias diferentes y como tal, poseen muy poca homología en su secuencia aminoacídica. Sin embargo, ambas proteínas comparten una similar topología y función. **A)** La topología de las conexinas y panexinas muestra que ambas tienen cuatro segmentos transmembrana, dos loop extracelulares, un loop intracelular, una cola amino(N)-terminal intracelular y una cola carboxi(C)-terminal generalmente extensa en el lado intracelular. **B)** La unión de 6 subunidades de conexinas forma un conexón. La unión de 6 panexinas (particularmente Panx-1) forma un panexón. Un hemicanal corresponde a un conexón situado en la membrana plasmática. Un canal de panexina corresponde a un panexón que se transloca a la membrana plasmática. La unión de 6 subunidades de conexinas o de panexinas forma un poro acuoso que permite el intercambio de corriente, iones y moléculas de bajo peso molecular (<1 KDa). Los hemicanales de conexina y los canales de panexina comunican el compartimiento intracelular con el espacio extracelular. **C)** La unión de dos hemicanales (formados por conexinas) provenientes de células adyacentes forma un canal intercelular, el cual comunica directamente el citoplasma de ambas células. El canal puede ser homotípico si está formado por hemicanales idénticos, o heterotípico si está formado por hemicanales diferentes. Así mismo, El hemicanal puede ser homomérico si está constituido por seis subunidades idénticas o heteromérico si está compuesto por dos o más subunidades distintas.

Se piensa que la cantidad de hemicanales desapareados es bastante menor con respecto a los hemicanales apareados (i.e. hemicanales que forman canales intercelulares). No obstante, esta observación podría variar considerablemente de acuerdo a la condición fisiológica/patológica y el tipo celular estudiado. Cada hemicanal y unión comunicante contiene un poro acuoso de gran tamaño (10 – 15 Å de diámetro), el cual permite el paso de corriente, iones (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , etc.) y un gran número de moléculas pequeñas tales como, ATP, NAD^+ , IP_3 , NO, entre otros (Saez *et al.*, 2003; Harris, 2007; Figueroa y Duling, 2009).

Las células normalmente expresan más de un tipo de conexina. Como consecuencia, los hemicanales pueden estar conformados por una misma isoforma de conexina o por isoformas diferentes, generando hemicanales homoméricos o heteroméricos, respectivamente (Willecke *et al.*, 2002) (Figura 2). En este contexto, un estudio de la oligomerización de las diferentes isoformas de conexinas expresadas en la vasculatura reveló que la Cx43 puede formar hemicanales heteroméricos junto con la Cx37, la Cx40 o la Cx45 (Brink *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2002). En contraste, no está claro si la Cx37 forma hemicanales heteroméricos con la Cx40. Estos antecedentes sugieren que las conexinas podrían formar hemicanales heteroméricos en la pared vascular, con características distintas a los hemicanales homoméricos.

Cada canal intercelular puede estar compuesto por dos hemicanales idénticos o distintos entre sí (Figura 2). Los canales formados por dos hemicanales idénticos se denominan canales homotípicos, mientras que los canales compuestos por hemicanales diferentes se llaman canales heterotípicos (Willecke *et al.*, 2002). Con respecto a las conexinas expresadas en la

vasculatura, estudios en células transfectadas indican que los hemicanales formados por la Cx32 solo forman canales intercelulares con otros hemicanales de Cx32 y no con hemicanales de Cx37, Cx40, Cx43 ni Cx45 (White *et al.*, 1995). En contraste, los hemicanales de Cx37 pueden formar canales intercelulares con hemicanales formados por la Cx37, la Cx40, la Cx43 o la Cx45 (White *et al.*, 1995). A su vez, los hemicanales formados por la Cx40 pueden formar canales intercelulares con hemicanales de Cx40 y en menor medida con hemicanales compuestos por la Cx37 o la Cx45 (White *et al.*, 1995). Los hemicanales de Cx43 pueden formar canales intercelulares con hemicanales de Cx37, Cx43 y en menor magnitud con hemicanales de Cx45 (White *et al.*, 1995). El acoplamiento entre hemicanales formados por la Cx40 y la Cx43 aún es controversial (White *et al.*, 1995; Haubrich *et al.*, 1996; Valiunas *et al.*, 2000). Finalmente, los hemicanales de Cx45 pueden formar canales intercelulares con los hemicanales formados por la Cx45 y en menor magnitud con hemicanales de Cx37, Cx40 o Cx43 (Elfgang *et al.*, 1995).

Se ha descrito que la selectividad a distintas moléculas, la permeabilidad y la conductancia de los hemicanales y de los canales intercelulares varían de acuerdo a las isoformas que los conforman. Más aún, la esperada formación *in vivo* de canales heterotípicos y de hemicanales heteroméricos con propiedades diferentes genera un notable incremento en la variabilidad funcional de canales intercelulares y hemicanales. Estas observaciones han sugerido que los hemicanales y canales intercelulares no son simples canales de baja resistencia sino que regulan finamente el paso de moléculas pequeñas (Stauffer, 1995; Saez *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2006).

Debido a que el poro de los hemicanales es permeable a un gran número de moléculas, se piensa que los hemicanales despareados están mayoritariamente cerrados para prevenir un colapso de las gradientes iónicas o el vaciamiento de moléculas importantes para la homeostasis celular como el ATP o el IP₃ (Saez *et al.*, 2005). Consistente con esto, reciente evidencia apunta a que la activación de los hemicanales en la pared vascular es baja en condiciones basales (Lillo, 2011; Gaete *et al.*, 2014). Más aún, las estrategias experimentales para activar los hemicanales y estudiar sus propiedades incluyen principalmente estímulos no fisiológicos, como por ejemplo mediante la aplicación de voltajes positivos o la disminución drástica de la concentración extracelular de cationes divalentes (principalmente calcio) (Saez *et al.*, 2005). Sin embargo, un gran número de trabajos recientes ha reportado que la activación de los hemicanales en la membrana celular puede ser lograda por estímulos observables en eventos patológicos o de estrés celular como por ejemplo, isquemia, inhibición metabólica, incremento en la biodisponibilidad de mediadores pro-inflamatorios, disminución del pH, etc. Estos antecedentes han sugerido que la activación de los hemicanales formados por conexinas podría asociarse a disfunción celular si su probabilidad de apertura incrementara de manera considerable y prolongada a lo largo del tiempo.

2.1.2 Panexinas

En los mamíferos, además de las conexinas, también se expresan las panexinas (Panx), específicamente 3 isoformas: Panx-1, Panx-2 y Panx-3. Las panexinas son proteínas homólogas a las inexas, que son las proteínas responsables de la formación de uniones comunicantes en invertebrados (Panchin, 2005). Las panexinas son una familia de proteínas

que no está relacionada con las conexinas (Panchin, 2005). En este sentido, la secuencia de aminoácidos de conexinas y panexinas es completamente diferente (~16% de homología); no obstante, se ha observado que la topología y función de ambas proteínas es muy similar (Panchin, 2005) (Figura 2). Al igual que las conexinas, las panexinas poseen cuatro segmentos transmembrana y en el caso de la Panx-1, la unión de seis subunidades forma un panexón (Panchin, 2005) (Figura 2). En contraste, al parecer, la Panx-2 requiere 8 subunidades para formar el canal (Ambrosi *et al.*, 2010). Se desconoce el número de subunidades que requiere la Panx-3 para formar un panexón. La oligomerización de las subunidades de panexina permite la formación de un poro acuoso en el centro del complejo, similar a los conexones aunque de un mayor diámetro ($> 15 \text{ \AA}$). La translocación de los panexones a la membrana forma canales funcionales, con propiedades de permeabilidad que se han propuesto ser bastante similares a las conexinas (Figura 2). En este contexto, se piensa que los canales de Panx-1 son permeables a moléculas pequeñas como ATP, y a iones como Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- , entre otros. Es importante destacar que si bien se ha descrito que las panexinas pueden formar uniones comunicantes *in vitro* (Bruzzone *et al.*, 2003), a la fecha no se ha podido establecer si estas proteínas pueden formar canales intercelulares en condiciones *in vivo*. En consecuencia, la formación de canales intercelulares por panexinas es controversial.

2.2 Distribución de conexinas y panexinas en los vasos sanguíneos

Como se mencionó anteriormente, en los vasos sanguíneos se ha descrito la expresión de la Cx32, la Cx37, la Cx40, la Cx43 y la Cx45. Todas estas conexinas se expresan en la vasculatura periférica, pero a diferencia de las demás, la Cx 45 se encuentra principalmente en los vasos sanguíneos del cerebro (Tabla 1). Si bien, la distribución de estas conexinas varía dependiendo de la especie, del tejido, del tipo celular y del calibre del vaso estudiado, se piensa que el músculo liso vascular expresa principalmente la Cx40 y la Cx43, siendo esta última la isoforma predominante en este tipo celular (Gustafsson *et al.*, 2003; Figueroa y Duling, 2009). Por otra parte, el endotelio vascular expresa la Cx37, la Cx40 y la Cx43 (Tabla 1), pero la Cx37 y la Cx40 son las principales Cxs de las células endoteliales. Recientemente, se describió la presencia de la Cx32 en cultivos de diferentes células endoteliales humanas y en células endoteliales de vena cava inferior de ratón (Okamoto *et al.*, 2009). Más aún, estudios de inmunocitoquímica (datos no publicados) y Western blot (Gaete *et al.*, 2014) en nuestro laboratorio han confirmado la expresión de la Cx32 en la vasculatura mesentérica de rata. Aún queda por confirmar si la Cx 32 se expresa en arterias.

Proteína	Vaso sanguíneo	CE	CML	Especie	Referencia
Cx32	Vena cava inferior	+	—	Ratón	Okamoto <i>et al.</i> , 2009
	Aorta	+	—	Rata	van Kempen y Jongsma, 1999; Severs <i>et al.</i> , 2001; Gabriels <i>et al.</i> , 1998; Rummery <i>et al.</i> , 2002
Cx37	Arteria coronaria	+	+	Rata	van Kempen y Jongsma, 1999
	Arteria caudal	+	+/-	Rata	Hill <i>et al.</i> , 2002; Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arterias (200-300µm) y arteriolas (<50µm) mesentéricas	+	—	Rata	Gustafsson <i>et al.</i> , 2003
	Arteria basilar	+	+/-	Rata	Hill <i>et al.</i> , 2002; Haddock <i>et al.</i> , 2006
	Aorta	+	—	Ratón	Kwak <i>et al.</i> , 2002; Kruger <i>et al.</i> , 2002
	Arteriolas del músculo cremáster	+	—	Ratón	Figueroa y Duling, 2008
	Vasos de la piel, testículo, intestino y pulmón	+	—	Ratón	Simon y McWhorter, 2002
	Arteriolas de la mejilla, arterias del músculo retractor	+	+/-	Hámster	Sandow <i>et al.</i> , 2003
	Arteria coronaria	+	—	Cerdo	van Kempen y Jongsma, 1999
	Arteria cerebral media	+	—	Conejo	Ujiie <i>et al.</i> , 2003
Cx40	Aorta	+	—	Rata	Bruzzzone <i>et al.</i> , 1993; van Kempen y Jongsma, 1999; Severs <i>et al.</i> , 2001; Gabriels <i>et al.</i> , 1998; Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arteria coronaria	+	+	Rata	van Kempen y Jongsma, 1999
	Arteria caudal	+	—	Rata	Hill <i>et al.</i> , 2002; Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arterias (200-300µm) y arteriolas (<50µm) mesentéricas	+	—	Rata	Gustafsson <i>et al.</i> , 2003
	Arteria basilar	+	+/-	Rata	Li y Simard, 1999; Hill <i>et al.</i> , 2002; Haddock <i>et al.</i> , 2006
	Arteriola pial	+	+/-	Rata	Little y Duling, 1995
	Aorta	+	—	Ratón	Kwak <i>et al.</i> , 2002; Kruger <i>et al.</i> , 2002; Isakson <i>et al.</i> , 2006
	Arteriolas del músculo cremáster	+	—	Ratón	Figueroa <i>et al.</i> , 2003; Figueroa y Duling, 2008
	Vasos de la piel, testículo, intestino y pulmón	+	—	Ratón	Simon y McWhorter, 2002
	Arteriolas de la mejilla, arterias del músculo retractor	+	—	Hámster	Sandow <i>et al.</i> , 2003
	Aorta y arteria coronaria	+	+	Cerdo	van Kempen y Jongsma, 1999
	Aorta y arteria coronaria	+	+	Vaca	van Kempen y Jongsma, 1999
Arteria cerebral media	+	+/-	Conejo	Ujiie <i>et al.</i> , 2003	
Cx43	Aorta	+	+	Rata	Bruzzzone <i>et al.</i> , 1993; van Kempen y Jongsma, 1999; Severs <i>et al.</i> , 2001; Gabriels <i>et al.</i> , 1998; Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arteria coronaria	—	+	Rata	van Kempen y Jongsma, 1999
	Arteria caudal	+	—	Rata	Hill <i>et al.</i> , 2002; Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arterias (200-300µm) y arteriolas (<50µm) mesentéricas	+	—	Rata	Gustafsson <i>et al.</i> , 2003
	Arteria basilar	+	+	Rata	Li y Simard, 1999; Hill <i>et al.</i> , 2002; Haddock <i>et al.</i> , 2006
	Arteriola pial	+	+/-	Rata	Little y Duling, 1995
	Aorta	+/-	+	Ratón	Kwak <i>et al.</i> , 2002; Kruger <i>et al.</i> , 2002; Isakson <i>et al.</i> , 2006
	Arteriolas de la mejilla, arterias del músculo retractor	+	—	Hámster	Sandow <i>et al.</i> , 2003
	Aorta y arteria coronaria	+	+	Cerdo	van Kempen y Jongsma, 1999
	Aorta	—	+	Vaca	van Kempen y Jongsma, 1999
	Arteria mamaria interna	—	+	Humano	Severs <i>et al.</i> , 2001
	Vasos del telencéfalo	+	—	Humano	Virgintino <i>et al.</i> , 2001
Arteria cerebral media	+/-	+	Conejo	Ujiie <i>et al.</i> , 2003	
Cx45	Aorta	—	+/-	Rata	Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arteria caudal	—	+/-	Rata	Rummery <i>et al.</i> , 2002
	Arteria cerebral posterior y basilar	—	+	Rata	Li y Simard, 2001
Panx-1	Arteria cerebral media	—	+	Rata	Burns <i>et al.</i> , 2012
	Aorta, arteria carótida, arteria femoral	+	—	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
	Arteria renal	+	+/-	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
	Arteria intrapulmonar, coronaria, abdominal	+	+	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
	Arteriolas del músculo espinotrapecio y cremáster	+	+	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
	Arteria toracodorsal	+	+	Ratón	Billaud <i>et al.</i> , 2011; Lohman <i>et al.</i> , 2012
Panx-2	Arteria cerebral media	+	+	Rata	Burns <i>et al.</i> , 2012
	Arteria intrapulmonar	+/-	+	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
Panx-3	Arteria intrapulmonar	+	+/-	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
	Arterias coronarias pequeñas (< 100 µm)	+	+	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012
	Arteriolas de la corteza renal	+	+/-	Ratón	Lohman <i>et al.</i> , 2012

TABLA 1. Distribución de conexinas y panexinas en la pared vascular. CE: Células endoteliales; CML: Células del músculo liso. Adaptado de Gaete *et al.* (2014). Las referencias de esta tabla están disponibles en el manuscrito adjunto (ver apéndice I).

Con respecto a las panexinas, solo unos pocos trabajos han explorado la expresión y distribución de estas proteínas en la vasculatura. Así, se ha observado que al igual que las conexinas, su expresión y distribución depende de la especie y del territorio vascular (Tabla 1). No obstante, la principal isoforma expresada en los vasos sanguíneos es la Panx-1. En arterias de gran calibre (e.g. arterias de conducción) Panx-1 se encuentra principalmente en las células endoteliales (Lohman *et al.*, 2012a). Sin embargo, a medida que el diámetro del vaso va disminuyendo, la Panx-1, además de expresarse en el endotelio, también se expresa con consistencia en el músculo liso vascular (Lohman *et al.*, 2012a). Notablemente, la expresión de Panx-1 observada en arterias cerebrales solo ha podido ser detectada en células musculares y no en células endoteliales (Tabla 1). En consecuencia, es importante notar que en las arterias de resistencia periféricas, Panx-1 se distribuye con consistencia en las células musculares lisas y en las células endoteliales (Tabla 1).

2.3 Uniones comunicantes en la pared vascular

Las arterias de resistencia, a diferencia de las arterias de conducción (e.g. la aorta), presentan un número reducido de capas de células musculares lisas lo cual sugiere que, en estas arterias, existe una íntima relación entre el endotelio y el músculo liso. Esta hipótesis ha sido apoyada por estudios de microscopía, electrofisiología y de acoplamiento a colorante, las cuales han demostrado que las células endoteliales están conectadas con las células musculares lisas mediante canales intercelulares formados por conexinas (Goto *et al.*, 2002; Ungvari *et al.*, 2002; Dora *et al.*, 2003). Si bien existe una separación física entre ambas células por la lámina elástica interna, la célula endotelial y la célula muscular se contactan mediante la proyección

física de la membrana endotelial, la cual atraviesa la lámina elástica interna generando numerosos puntos de contacto con la célula muscular (Dora *et al.*, 2003) (Figura 1). Estos puntos de contacto se conocen como uniones mioendoteliales y en la mayoría de ellos es posible encontrar canales generalmente agrupados en placas (i.e. uniones comunicantes) que conectan los citoplasmas del endotelio y del músculo liso adyacente. Notablemente, el bloqueo farmacológico de las uniones comunicantes con diversos antagonistas tales como el ácido palmitoleico, el ácido 18- α - o 18- β glicirretínico (α/β -GA), la carbenoxolona (la forma hidrosoluble del GA) y los péptidos miméticos dirigidos a sitios específicos de la Cx37, la Cx40 y la Cx43, inhiben la vasodilatación y la transmisión de la corriente hiperpolarizante generada en el endotelio en respuesta a vasodilatadores dependientes del endotelio tales como ACh (Goto *et al.*, 2002; Griffith *et al.*, 2002; Ungvari *et al.*, 2002; Dora *et al.*, 2003; Sokoya *et al.*, 2006). Estos antecedentes sugieren fuertemente que las uniones comunicantes constituyen la vía de transmisión del EDHF (Figura 1). Consistente con esto, la densidad de las uniones mioendoteliales (y de uniones comunicantes) incrementa a medida que disminuye el calibre de la arteria, lo cual es consistente con la observación que las respuestas vasodilatadoras dependientes del EDHF son más relevantes a medida que el calibre arterial se reduce (Shimokawa *et al.*, 1996; Feletou y Vanhoutte, 2009). Además de mediar las respuestas dependientes del EDHF, los canales intercelulares formados por conexinas cumplen un rol crítico en la transmisión del NO desde el endotelio al músculo liso y la consiguiente vasodilatación dependiente de NO (Figuroa *et al.*, 2013b). Todos estos antecedentes indican que las uniones comunicantes mioendoteliales son mediadores esenciales en el control del tono vasomotor ejercido por el endotelio en las arterias de resistencia.

Además de las uniones comunicantes mioendoteliales en las arterias también es posible distinguir la formación de estas uniones entre células endoteliales adyacentes y entre las células musculares contiguas (Figuroa y Duling, 2009). Estos antecedentes han sugerido a lo largo de los últimos años que existe un acoplamiento funcional en la pared vascular potencialmente relevante para la sincronización de las respuestas vasculares en la microcirculación (Figuroa *et al.*, 2006; Figuroa y Duling, 2009). De esta manera, se piensa que los mecanismos por los cuales las uniones comunicantes participan en la regulación del tono vasomotor no solo involucran la transmisión de señales vasodilatadoras (i.e. EDHF y NO) desde el endotelio al músculo liso (conducción radial), sino que también participan en la propagación de señales vasomotoras a lo largo de la pared del vaso (i.e. conducción longitudinal) (Figuroa *et al.*, 2007; Figuroa y Duling, 2008; Figuroa y Duling, 2009). Consistente con esta hipótesis, se ha observado que la aplicación de ACh restringida a un segmento corto de una arteriola (50 μm), no solo induce una respuesta vasodilatadora en el sitio estimulado directamente por la ACh (sitio local), sino también en sitios distantes (i.e. hasta 2000 μm del sitio de estimulación) (Doyle y Duling, 1997; Figuroa *et al.*, 2007), lo cual indica que la respuesta vasodilatadora se propaga a lo largo del vaso. Notablemente, la conducción y propagación de las respuestas vasomotoras es muy rápida. Sorprendentemente, ambas, la respuesta vasodilatadora local y la conducida (e.g. a 2000 μm del sitio local), se observan prácticamente al mismo tiempo, sin un retraso detectable (Figuroa y Duling, 2008). La conducción de esta respuesta vasodilatadora es sensible al daño del endotelio, y es insensible al bloqueo de la conducción eléctrica a través de los nervios perivasculares con tetrodotoxina (TTX), sugiriendo que la conducción de la vasodilatación depende de una señal eléctrica que se propaga a través de las uniones comunicantes que conectan las células

endoteliales de la pared vascular (Figuroa *et al.*, 2007). Consistente con esta idea, la eliminación de la expresión de la Cx40 produjo una drástica reducción de la conducción longitudinal de las señales vasomotoras (Figuroa *et al.*, 2003). Todos estos antecedentes indican que las uniones comunicantes son esenciales para la transmisión longitudinal de las señales vasomotoras en la pared de arterias de resistencia.

La relevancia fisiológica de las uniones comunicantes en el sistema cardiovascular queda de manifiesto en estudios con ratones KO de la Cx40 o de la Cx43 específicamente en el endotelio. Notablemente, estos ratones sufren hipertensión e hipotensión respectivamente, indicando que las uniones comunicantes son esenciales en la regulación del tono vasomotor y en la coordinación minuto a minuto y a largo plazo de la función microvascular (Liao *et al.*, 2001; de Wit *et al.*, 2003; Figuroa *et al.*, 2006).

2.4 Canales de panexina y hemicanales formados por conexinas en la vasculatura

Si bien la expresión de las panexinas y las conexinas ha sido confirmada en la vasculatura, no existe ninguna evidencia directa que demuestre la formación de canales de panexina y de hemicanales formados por conexina en la membrana de las células que componen la pared vascular. Más aún, se desconoce si existen canales de panexina y hemicanales formados por conexina funcionales en la pared vascular. Sin embargo, la formación de canales intercelulares entre las células de la pared vascular hace presagiar que al menos deben existir hemicanales formados por conexina en la membrana celular de las células endoteliales y de las células musculares *in vivo*. En consecuencia, el rol de los hemicanales formados por conexinas y de

los canales de panexinas en la función vascular aún no ha sido caracterizado. No obstante, algunos estudios, mediante técnicas farmacológicas han dado algunas luces que ambos podrían tener un rol significativo en el control de la función vascular.

El primer estudio que entregó evidencia para un rol de los hemicanales formados por conexinas en la vasculatura fue realizado por Marion Faigle y colaboradores usando un cultivo de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) (Faigle *et al.*, 2008). En este estudio mostraron que la liberación de ATP en condiciones basales es sensible a los inhibidores de la Cx43, α -GA y el péptido mimético $^{43}\text{GAP27}$. Estos resultados permitieron a Faigle proponer que la liberación de ATP en las células endoteliales es mediada por hemicanales formados por Cx43 (Faigle *et al.*, 2008).

Posteriormente, Billaud y colaboradores mostraron el 2011 que el bloqueo farmacológico de los canales formados por Panx-1 disminuye la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina, un agonista del receptor adrenérgico α -1, y no la producida por la despolarización del músculo liso mediante un aumento de la concentración de K^+ extracelular (Billaud *et al.*, 2011). Los resultados de dicho trabajo sugieren que los canales formados por Panx-1 localizados en el músculo liso tienen un papel crucial en la señalización celular dependiente del receptor adrenérgico α -1. Así, los canales de Panx-1 probablemente participan en el control fisiológico del tono vasomotor mediando la vasocontracción inducida por la activación del sistema simpático.

En otro trabajo, Figueroa y colaboradores mostraron que la transmisión del NO a través de la membrana celular requiere de hemicanales formados por conexinas (Figueroa *et al.*, 2013b). En ese trabajo se demostró que los hemicanales formados por todas las conexinas presentes en la vasculatura periférica (i.e. Cx32, Cx37, Cx40 y Cx43) son permeables a NO. Consistente con esto, la inhibición de los hemicanales de conexina con β -GA previno la difusión del NO desde el lado extracelular al citoplasma de las células endoteliales en aorta de rata, lo cual sugiere que los hemicanales formados por las conexinas presentes en las células endoteliales de aorta son esenciales para la transmisión del NO a través de la membrana plasmática (Figueroa *et al.*, 2013b). En dicho trabajo también se demostró en células HeLa transfectadas que el NO induce la apertura de los hemicanales de Cx37, Cx40 y Cx43, pero no de Cx32. Los resultados del trabajo de Figueroa y colaboradores sugieren que en la pared vascular los hemicanales formados por conexinas contribuyen a dirigir hacia blancos celulares específicos la señalización paracrina del NO.

Finalmente, un trabajo publicado recientemente con los primeros avances de esta tesis mostró mediante la técnica de captación de etidio, que la perfusión del neuropéptido CGRP (péptido relacionado al gen de la calcitonina) en arterias mesentéricas induce un notable incremento en la activación de los canales de Panx-1 localizados en la pared vascular (Gaete *et al.*, 2014). Más aún, el CGRP indujo un incremento en la tasa de captación del colorante en células endoteliales aisladas de la red vascular mesentérica, lo cual fue prevenido completamente con un bloqueador de Panx-1 (Gaete *et al.*, 2014). Notablemente, la activación de los canales de Panx-1 en las arterias mesentéricas se asoció al control de la expresión de proteínas importantes para la función vascular tales como la eNOS (Gaete *et al.*, 2014). En

consecuencia, ese trabajo, además de proponer que el endotelio vascular contiene canales funcionales de Panx-1, sugiere también que la activación de los canales de Panx-1 en las arterias mesentéricas cumple un rol importante en la regulación a largo plazo de la función vascular (Gaete *et al.*, 2014).

Debido a los escasos reportes con respecto a los canales de panexina y los hemicanales formados por conexinas en la vasculatura, su participación en el control y regulación de la función vascular en condiciones fisiológicas y patológicas aún debe investigarse. En este contexto, el estudio de los canales de panexina y de los hemicanales formados por conexinas en la vasculatura es un campo totalmente novedoso y que necesitamos explorar para entender de una mejor manera el control de la función y disfunción vascular.

3 Nervios perivasculares

3.1 Inervación de los vasos sanguíneos

La idea que los vasos sanguíneos se encuentran en contacto directo con fibras nerviosas fue sugerida hace más de cien años y numerosos estudios han confirmado a lo largo del tiempo que los vasos sanguíneos, efectivamente, se encuentran extensamente inervados por fibras del sistema autónomo (Cowen y Burnstock, 1980; Ruocco *et al.*, 2002; Guyenet, 2006; Hobara *et al.*, 2006; Kawasaki *et al.*, 2009). Estas fibras nerviosas que rodean los vasos sanguíneos reciben el nombre de nervios o fibras perivasculares. La inervación perivascular puede estar

compuesta por nervios provenientes del sistema simpático, del sistema sensorial y/o del sistema parasimpático. Sin embargo, se ha demostrado que la inervación parasimpática en la vasculatura es muy escasa y únicamente se puede encontrar en los vasos de unos pocos tejidos como la piel, el cerebro y el tejido eréctil, entre otros (Kaji *et al.*, 1988; Ruocco *et al.*, 2002; Hamel, 2006). De este modo, en la circulación periférica, la red de nervios perivasculares incluye principalmente fibras de nervios simpáticos y fibras sensoriales (Figura 3).

Las fibras nerviosas perivasculares se distribuyen en la vasculatura a través de la adventicia (i.e. la capa más externa de los vasos sanguíneos). En este contexto, las fibras forman un alambrado que se interna en la adventicia en el borde de las células musculares lisas (Gulbenkian *et al.*, 1993). De esta manera, las fibras perivasculares se encuentran en estrecho contacto con la pared vascular (Burnstock, 1980; Bleys *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2009).

Las fibras nerviosas perivasculares poseen numerosas varicosidades, las cuales albergan decenas o cientos de vesículas cargadas de neurotransmisores (normalmente se co-almacenan varios neurotransmisores) (Burnstock, 1980; Cowen y Burnstock, 1980; Luff *et al.*, 2000) (Figura 3). Con un estímulo apropiado, los neurotransmisores pueden ser liberados desde los terminales nerviosos perivasculares, lo que les permite actuar sobre receptores específicos localizados en las células del músculo liso y/o del endotelio vascular (Figura 3). Cabe destacar, que la localización y expresión de estos receptores (en el endotelio y/o en el músculo liso) difiere de acuerdo al territorio vascular.

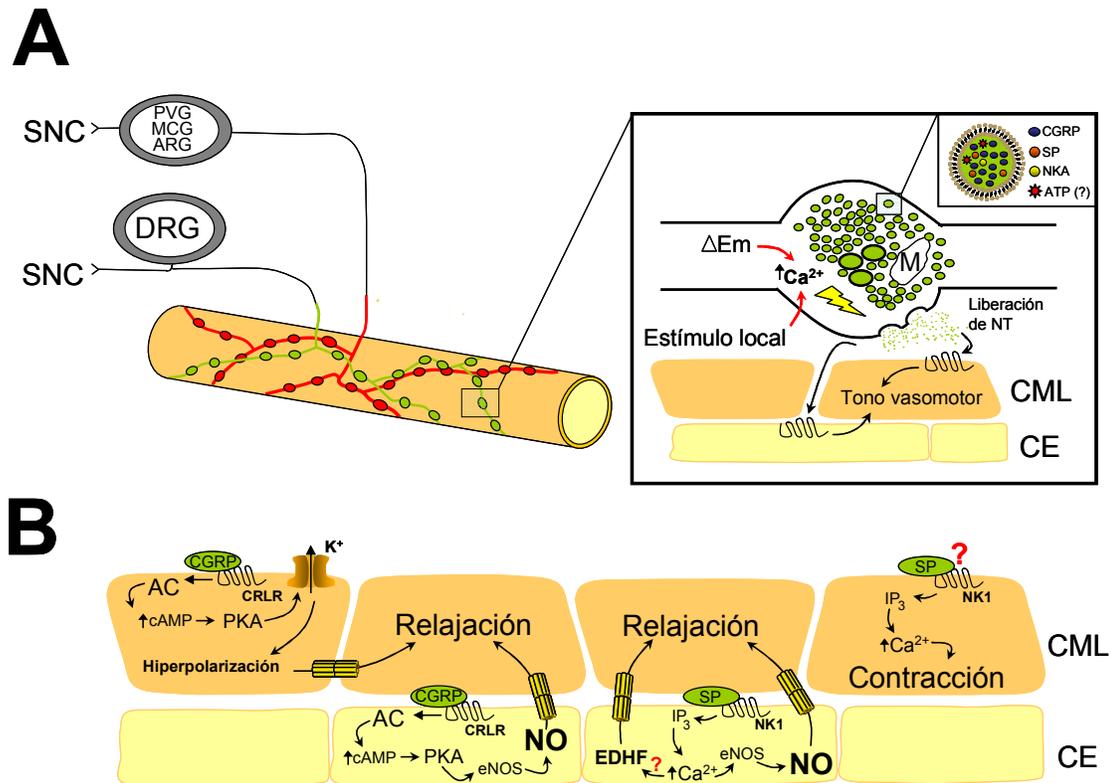


FIGURA 3. *Inervación de los vasos sanguíneos de los tejidos periféricos.* **A)** Las arterias de resistencia periféricas están rodeadas fundamentalmente por fibras nerviosas del sistema simpático (rojo) y del sistema sensorial (verde). Las fibras nerviosas corresponden a axones que nacen en somas localizados en ganglios nerviosos. Las fibras perivasculares contienen varicosidades, las cuales contienen decenas o cientos de vesículas cargadas con neurotransmisores. La estimulación de ambos, los nervios simpáticos o los nervios sensoriales, conlleva a la liberación de neurotransmisores desde los terminales nerviosos periféricos (e.g. sobre la pared vascular). Los neurotransmisores almacenados son vasoactivos por lo cual, se piensa que la actividad de los nervios perivasculares participa en el control del tono vasomotor. **B)** La activación de los nervios sensoriales perivasculares conduce, principalmente, a la liberación de CGRP y sustancia P, los cuales producen vasodilatación en la mayoría de los territorios vasculares mediante distintos mecanismos que dependen de la localización de los receptores en las células del músculo liso o en las células del endotelio vascular. Signos de interrogación indican evidencia controversial. CML: Células del músculo liso; CE: Células endoteliales; SNC: Sistema nervioso central; DRG: Ganglio de la raíz dorsal; PVG: Ganglio de la cadena paravertebral; MCG: Ganglio cervical medio; ARG: Ganglio aórtico renal; M: Mitocondria; NT: Neurotransmisor; CGRP: Péptido relacionado al gen de la calcitonina; SP: Sustancia P; NKA: Neurokinina A; CRLR: Receptor tipo receptor de la calcitonina; AC: Adenilato ciclasa; PKA: Proteína quinasa A; eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial; NO: Óxido nítrico; SP: Sustancia P; NK1: Receptor de neurokinina 1; IP₃: Inositol tri-fosfato; EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.

La mayoría de los neurotransmisores almacenados en los terminales nerviosos son sustancias vasoactivas; por lo tanto, se piensa que las fibras perivasculares tienen un papel importante en el control del tono vasomotor. En este contexto, los nervios simpáticos han sido muy estudiados y existe un consenso en que la actividad de estos nervios contribuye a la mantención del tono vasomotor (Mulvany y Aalkjaer, 1990). En contraste, la contribución de las fibras sensoriales al control del tono vasomotor es bastante controversial (Smillie y Brain, 2011).

3.2 *Nervios simpáticos*

Los nervios perivasculares del sistema simpático inervan profusamente la vasculatura y en arterias de resistencia ejercen preferencialmente un tono vasoconstrictor. En su gran mayoría, corresponden a fibras barosensibles, es decir, que responden a los cambios detectados por barorreceptores arteriales (Guyenet, 2006). Un aumento en la presión sanguínea activa los barorreceptores, lo cual inhibe la actividad de las fibras del sistema simpático y por lo tanto el tono vasoconstrictor que es ejercido por el mismo (Guyenet, 2006). Así, la acción vasoconstrictora mediada por las fibras perivasculares del simpático tiene un rol vital en el control cotidiano (y también a largo plazo) del tono vascular.

Los neurotransmisores difieren de acuerdo a la especie y el vaso estudiado, pero, en la mayoría de los casos, la noradrenalina (NA) es el principal neurotransmisor de los terminales perivasculares del sistema simpático (Tsuru *et al.*, 2002). Otros neurotransmisores importantes

en estas fibras son el neuropéptido Y (NPY) y el ATP, que a menudo son co-transmisores (i.e. co-almacenados y co-liberados) de la NA (Tsuru *et al.*, 2002).

La NA puede activar señales vasodilatadoras o vasoconstrictoras dependiendo del tipo de receptor que estimule. De este modo, la NA genera vasoconstricción cuando actúa sobre receptores alfa adrenérgicos (α_1 y α_2) en el músculo liso y vasodilatación cuando actúa sobre receptores beta adrenérgicos (β_2) en el músculo liso y receptores α_2 , β_1 , β_2 y β_3 en el endotelio. La unión de la NA con receptores α_1 (acoplados a la proteína G_q) induce la activación de la fosfolipasa C (PLC) y el incremento del IP_3 , lo cual moviliza el calcio desde almacenes intracelulares y activa la entrada de calcio extracelular por canales dependientes e independientes de voltaje (Piascik y Perez, 2001). Por otra parte, la unión de la NA con los receptores α_2 (acoplados a la proteína G_i), disminuyen la concentración intracelular de cAMP y conllevan a la contracción del músculo liso (Bylund, 1992). Finalmente, la activación de los receptores β adrenérgicos 1, 2 y 3 (acoplados a la proteína G_s) conduce a un aumento del cAMP intracelular y a la relajación del músculo liso vascular.

Como se mencionó anteriormente, la actividad del simpático ejerce un tono principalmente vasoconstrictor. No obstante, la NA genera vasodilatación en unos pocos territorios vasculares. Estas observaciones han llevado a pensar que los receptores tipo alfa predominan con respecto a los beta en la musculatura lisa. Consistente con esta hipótesis, la hipertensión ha sido asociada muchas veces a un incremento de la actividad del sistema simpático (Mark, 1996). Más aún, la “desactivación” del simpático (e.g. farmacológica o quirúrgicamente) conduce a la prevención o atenuación del cuadro hipertensivo en diversos modelos de

hipertensión (tales como hipertensión espontánea (SHR), hipertensión renovascular, etc.), indicando que el sistema simpático participa en la mantención de la patología mediante el aumento de la actividad vasoconstrictora (Judy *et al.*, 1976).

3.3 Nervios sensoriales perivasculares

3.3.1 Estructura y función de los nervios sensoriales perivasculares

Las neuronas sensoriales que inervan los vasos sanguíneos de los tejidos periféricos son neuronas pseudounipolares que tienen su soma en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) del nervio espinal. En las neuronas sensoriales que inervan la cabeza, el soma se encuentra en el ganglio trigeminal. En ambos ganglios ocurre la síntesis de proteínas y procesamiento del mRNA, incluidos todos los neurotransmisores peptídicos (Deng y Li, 2005). Del cuerpo celular del DRG nacen dos axones, uno que viaja centralmente hasta el asta dorsal en la médula espinal donde contacta una interneurona, y otro axón que se ramifica e inerva prácticamente todos los tejidos periféricos, incluidos los vasos sanguíneos (Figura 3).

Los nervios perivasculares sensoriales se subdividen de acuerdo a su tamaño, presencia de mielina y velocidad de conducción (Katzung *et al.*, 2013). En este contexto, las arterias de resistencia se encuentran inervadas por fibras A δ (nervios sensoriales mielínicos de capa delgada, principalmente no-nociceptivos) y por fibras C (nervios sensoriales amielínicos, de menor diámetro y velocidad de conducción que las fibras A δ , nociceptivos en su mayoría)

(Katzung *et al.*, 2013). Todas estas fibras tienen una actividad aferente (los potenciales de acción se transmiten de manera retrógrada hacia el sistema nervioso central) y una actividad eferente (los impulsos nerviosos viajan de manera antidrómica a lo largo del axón). Así, los nervios sensoriales perivasculares tienen una función sensorial y motora a la vez (Holzer y Maggi, 1998). Es importante notar que la estimulación de los nervios en los terminales periféricos no necesariamente alcanza el umbral necesario para generar un potencial de acción que se transmita hacia el sistema nervioso central. Sin embargo, la misma estimulación que no genera la transmisión aferente de la señal puede perfectamente activar la liberación de neurotransmisores en el sitio local de la estimulación por lo que pueden tener una función preferencialmente efectora (Katzung *et al.*, 2013).

Se piensa que las fibras sensoriales perivasculares contactan físicamente los vasos en la unión de la adventicia y la media. Si bien están más distantes de la pared vascular en comparación con las fibras del sistema simpático (Edvinsson *et al.*, 1989; Luff *et al.*, 2000), en algunos casos las fibras sensoriales se internan entre las células musculares lisas vasculares (Lever *et al.*, 1965; Holzer, 1988). Estos antecedentes sugieren que existe una íntima asociación anatómica entre las células que componen la pared vascular y los terminales nerviosos, lo cual podría tener gran relevancia a nivel funcional. Consistente con esta hipótesis, se ha mostrado que al igual que las fibras del simpático, las fibras sensoriales perivasculares controlan el tono vasomotor a través de la liberación de neurotransmisores sobre la pared del vaso (Brain *et al.*, 1985; Uddman *et al.*, 1986; Kawasaki *et al.*, 1988; Han *et al.*, 1990b; Brain *et al.*, 1993; Kohlmann *et al.*, 1997; Zygmunt *et al.*, 1999; Scotland *et al.*, 2004; Legros *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 2009). En contraste con los nervios perivasculares del sistema simpático, la

activación de las fibras sensoriales conduce a la relajación del músculo liso vascular, contribuyendo a mantener un tono vasodilatador (Legros *et al.*, 2007). Actualmente, la mayoría de los trabajos se ha restringido al estudio de la respuesta vasodilatadora inducida por la activación de los nervios sensoriales o bien, a la vasodilatación inducida por la aplicación exógena de sus neurotransmisores. Así, el conocimiento científico ligado a la función de las fibras sensoriales perivasculares en las arterias de resistencia se ha limitado principalmente a la acción inmediata de los neurotransmisores y no al impacto que estos pueden tener sobre la señalización vascular. De esta manera, a diferencia de los nervios simpáticos, la participación de las fibras sensoriales en el control de la función vascular no ha sido explorada minuciosamente. En consecuencia se desconoce si la acción de los neurotransmisores derivados de los terminales sensoriales afecta la función endotelial (i.e. la vasodilatación dependiente del endotelio) y si regulan la comunicación y sincronización de las células de la pared vascular (i.e. acoplamiento intercelular).

3.3.2 *Neurotransmisores*

La liberación de neurotransmisores desde las fibras sensoriales puede ser modulada por diversos estímulos locales: angiotensina II (Kawasaki *et al.*, 1999), histamina (Sun *et al.*, 2011), endotelina-1 (Wang y Wang, 2004), bradicinina (Geppetti, 1993), hormonas sexuales (Gangula *et al.*, 2009), prostaglandinas (Wang *et al.*, 1996), el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Malcangio *et al.*, 1997), estrés mecánico, lactato, opioides, NO (Wang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2008), glucocorticoides, agonistas adrenérgicos (e.g. NA) (Watson *et al.*, 2002), NPY (Kawasaki *et al.*, 1999), cannabinoides (Zygmunt *et al.*, 1999; Ralevic y Kendall, 2001;

Duncan *et al.*, 2004; Wilkinson *et al.*, 2007), nicotina (Kawasaki *et al.*, 2009), pH bajo (Kawasaki *et al.*, 2009), estímulos pro-inflamatorios como endotoxinas (e.g. lipopolisacáridos (LPS)) (Arden *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), estímulos que activen la PKA o la PKC (Supowit *et al.*, 1995), o que gatillen un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en el terminal sensorial, entre otros.

Se sabe que la gran mayoría de las fibras sensoriales perivasculares tienen en común la expresión de un canal catiónico no selectivo, conocido como potencial de receptor transitorio de vaniloide tipo 1 (TRPV1). El TRPV1 es un canal compuesto por un tetrámero de la proteína del receptor vaniloide (VR1). El canal es permeable a Na^+ y Ca^{2+} con una razón de selectividad 1:3 (Venkatachalam y Montell, 2007). El TRPV1 se expresa con consistencia en los terminales de las fibras C pero solo en algunas fibras $A\delta$ (Szallasi *et al.*, 2007); aunque se ha reportado que las fibras $A\delta$ incrementan la expresión del TRPV1 en condiciones inflamatorias (Szallasi *et al.*, 2007). Es importante destacar que la vasodilatación inducida por la activación de las fibras sensoriales perivasculares depende completamente de las fibras que expresan el canal TRPV-1 (Kakuyama *et al.*, 1998). Con respecto a las células de la vasculatura, no existe evidencia que demuestre la expresión del canal TRPV1 en células musculares lisas. En contraste, existen algunos trabajos que sugieren la presencia del canal TRPV1 en células endoteliales (Poblete *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010); sin embargo, esta propuesta aún es controversial. En resumen, la mayor parte de la evidencia indica consistentemente que, en la pared vascular, el canal TRPV1 se expresa exclusivamente en los terminales de las aferencias sensoriales. Como el TRPV1 es un canal permeable a Ca^{2+} , se piensa que la activación del TRPV1 en los terminales sensoriales perivasculares induce un

incremento local en la $[Ca^{2+}]_i$, lo cual conlleva a la fusión de las vesículas que contienen los neurotransmisores con la membrana del terminal nervioso gatillando la exocitosis y liberación de los neurotransmisores sobre la pared vascular. El TRPV1 es un canal termosensible que se activa a temperaturas superiores a 43°C (Venkatachalam y Montell, 2007). El canal también es activado por iones hidrógeno ($pH < 7,2$), capsaicina (el compuesto picante del ají), endocannabinoides (e.g. anandamida), etanol, citocinas proinflamatorias, entre otros (Venkatachalam y Montell, 2007; Kawasaki *et al.*, 2009). La acción de la capsaicina sobre la activación del canal TRPV1 ha sido ampliamente estudiada. En este contexto, se sabe que la capsaicina activa con gran especificidad el canal TRPV-1 (Szallasi *et al.*, 2007). Por lo tanto, el uso de capsaicina como agonista del TRPV1 es considerado una excelente herramienta para inducir la activación de las fibras sensoriales perivasculares, con la consecuente liberación de neurotransmisores en el sitio de activación.

A la fecha se ha propuesto la presencia de numerosos neurotransmisores en las fibras sensoriales perivasculares, entre ellos, el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P, el ATP, la neurokinina A (NKA), el NO, entre otros (Itoh *et al.*, 1995). A pesar de esta gran diversidad, numerosos estudios han mostrado que la SP y fundamentalmente el CGRP son los principales neurotransmisores almacenados y liberados desde la mayoría de las fibras sensoriales perivasculares de la microcirculación periférica.

3.3.2.1 Substancia P

La substancia P es un péptido de 11 aminoácidos (1.3 kDa) que pertenece al grupo de las taquikininas junto a la NKA y la NKB (neurokinina A y B, respectivamente). Es el miembro principal de las taquikininas, y como tal, es el vasodilatador más potente de este grupo. A menudo está co-localizada con el CGRP en los terminales sensoriales (Gibbins *et al.*, 1985; Gulbenkian *et al.*, 1986; Uddman *et al.*, 1986; Merighi *et al.*, 1988), por lo que se dice que es el neurotransmisor secundario de estas fibras. La substancia P actúa sobre los receptores NK1, NK2 y NK3, todos acoplados a la proteína G_s (que activan la vía de la PLC-IP₃). En las arterias de resistencia predomina el receptor NK1, altamente específico para substancia P, y localizado principalmente en las células endoteliales (Maggi, 1995) (Figura 3). La acción de la substancia P en las arterias de resistencia de la microcirculación periférica se ha asociado principalmente a una vasodilatación dependiente del endotelio mediada por la producción de NO, aunque en algunos casos también puede estar ligada a mecanismos hiperpolarizantes independientes de NO (e.g. EDHF) (Busse *et al.*, 2002) (Figura 3). En venas se ha observado que la substancia P puede inducir vasoconstricción; sin embargo, la principal función atribuida a la substancia P en el lado venoso es el control de la extravasación del plasma en vénulas post-capilares durante eventos inflamatorios (inflamación neurogénica).

Scotland *et al* (2004) describieron que la liberación de substancia P desde las fibras sensoriales perivasculares es importante para la generación del tono miogénico en arterias mesentéricas de rata. En este trabajo se propuso que la substancia P actúa sobre los receptores NK1 localizados en el músculo liso donde genera contracción (Scotland *et al.*, 2004) (Figura 3). Si bien en este

trabajo no evaluaron la expresión del receptor NK1 en el músculo, este trabajo sugiere, que el efecto vasoconstrictor o vasodilatador dependería de un balance de la acción de la sustancia P en el músculo y en el endotelio. De este modo, la sustancia P puede tener un efecto dual en el control del tono vascular dependiendo de los receptores que alcance después de su liberación desde los terminales nerviosos.

El rol fisiológico de la sustancia P en el control del tono vasomotor es incierto. No obstante algunos experimentos dan luces de que el papel de la sustancia P en el control del tono vascular es mínimo. En este contexto, la infusión intravenosa del antagonista no peptídico del receptor NK1 (el CP 96,345) no afectó la frecuencia cardíaca ni la presión arterial media (MAP) de ratas en condiciones control (Kohlmann *et al.*, 1997). Si bien el bloqueo del receptor de sustancia P tampoco afectó estas 2 variables en ratas con hipertensión 2K1C (2 riñones, 1 clip) y SHR, sí condujo a un incremento en la presión arterial media (MAP) en las ratas hipertensas DOCA + sal, nefrectomía 5/6 + sal y 1K1C (1 riñón, 1 clip), sin cambios en la frecuencia cardíaca (Kohlmann *et al.*, 1997). Similares resultados obtuvo el grupo de Dipette usando otro antagonista de los receptores NK1, el Span-II. La aplicación intravenosa de Span-II generó un incremento en la MAP de ratas con nefrectomía 5/6 y DOCA-sal (Katki *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2002). Esto último sugiere que la sustancia P participa en el control del tono vasomotor en algunos modelos de hipertensión.

3.3.2.2 Péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP)

El CGRP es un péptido de 37 aminoácidos (3.8 kDa) que fue identificado preliminarmente por Rosenfeld en 1981 (Rosenfeld *et al.*, 1981). Se sintetiza a partir del procesamiento alternativo del RNA mensajero transcrito del gen de la calcitonina (Amara *et al.*, 1982). Notablemente, el CGRP es el principal producto del gen de la calcitonina (Girgis *et al.*, 1985). En 1985, el mismo grupo de Rosenfeld descubrió un péptido homólogo al CGRP, el β -CGRP, el cual proviene de un gen distinto al gen de la calcitonina, localizado en el mismo cromosoma (Amara *et al.*, 1985). En ratas, el β -CGRP se diferencia en solo dos aminoácidos con el péptido descubierto en 1981 (renombrado como α -CGRP) (Amara *et al.*, 1985) (Figura 4). En consecuencia, el CGRP tiene 2 isoformas, α -CGRP y β -CGRP, también llamadas CGRP 1 y CGRP 2 en humanos, que a diferencia de la rata, difieren en 3 aminoácidos (Figura 4).

Debido a su alta homología, ambas isoformas tienen similar afinidad por los receptores de CGRP (Mulderry *et al.*, 1988). Consistente con esto, ambas isoformas de CGRP inducen una potente vasodilatación (Brain *et al.*, 1985; Brain *et al.*, 1986) en un amplio rango de territorios vasculares (Bell y McDermott, 1996). Estos antecedentes sugieren que α -CGRP y β -CGRP actúan sobre los mismos receptores, aunque el desarrollo de nuevos antagonistas de los receptores de CGRP ha sugerido que ambas isoformas podrían tener algunas diferencias en su acción biológica (Wu *et al.*, 2002).

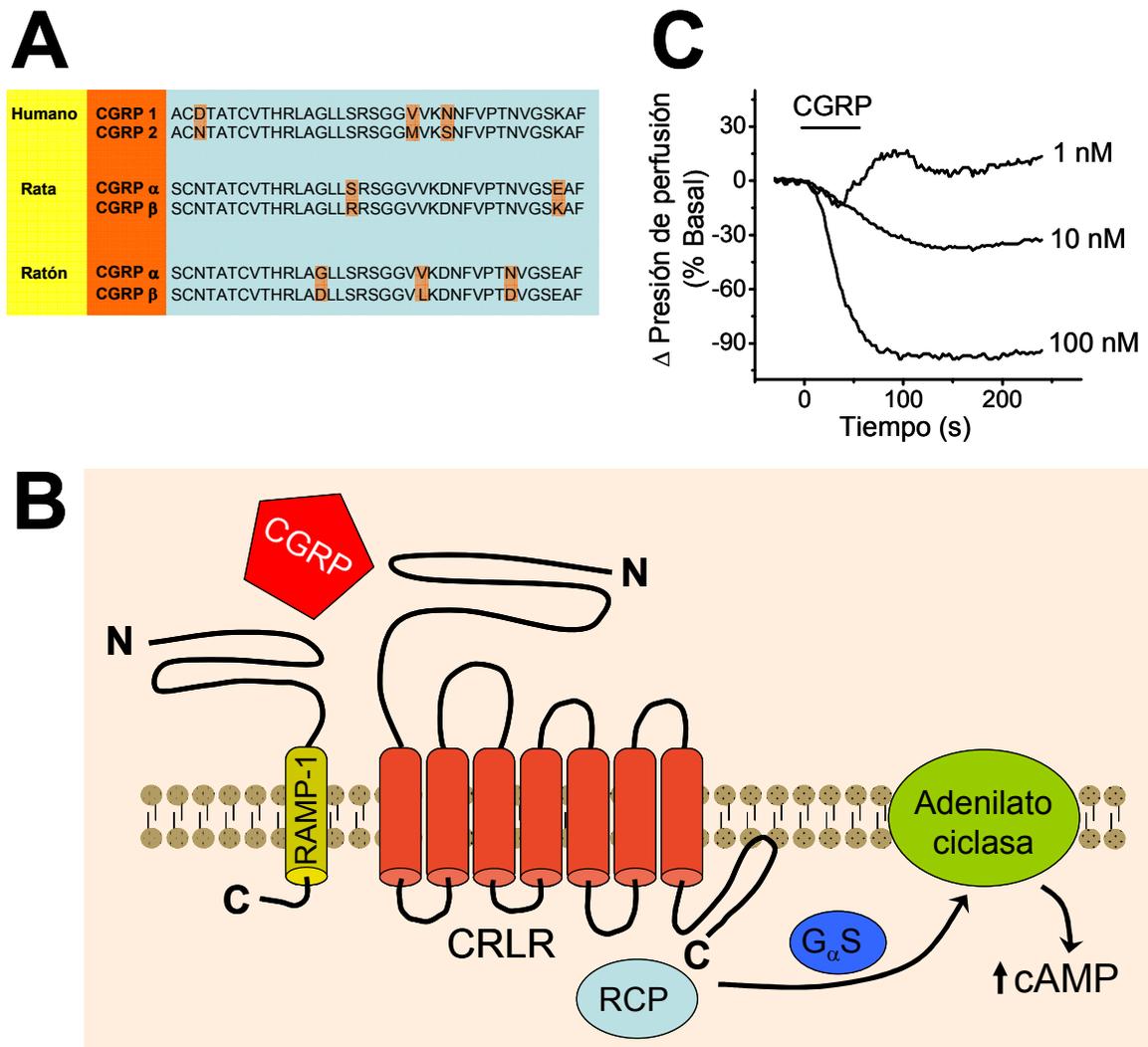


FIGURA 4. Estructura y función de CGRP y su receptor. **A)** Secuencia de la estructura primaria de α -CGRP (CGRP I en humanos) y β -CGRP (CGRP II en humanos). Notar que ambas isoformas solo difieren en tres aminoácidos (ver casilleros naranjos). La comparación de la secuencia de aminoácidos de CGRP de humanos y roedores revela un alto nivel de conservación en mamíferos. **(B)** Esquema del receptor de CGRP. El receptor está compuesto por una proteína de siete segmentos transmembrana (CRLR) acoplada a la proteína RAMP-1 y a RCP. La unión de CGRP con su receptor conlleva principalmente a la activación de una proteína G_s que activa la adenilato ciclasa. La activación de la adenilato ciclasa inducida por CGRP conduce a la producción del segundo mensajero, cAMP. **(C)** La aplicación de CGRP induce una potente vasodilatación en los vasos de resistencia. La respuesta vasodilatadora inducida por distintas concentraciones de CGRP fue evaluada en la red arterial mesentérica de rata pre-contraída con fenilefrina (60 μ M). Las secuencias mostradas en A fueron obtenidas en la base de datos <http://www.uniprot.org>. aa: Aminoácidos; CGRP: Péptido relacionado al gen de la calcitonina; RAMP-1: Proteína que modifica la actividad del receptor 1; CRLR: Receptor tipo receptor de la calcitonina; RCP: Proteína componente del receptor de CGRP.

En el sistema nervioso periférico, α -CGRP es la isoforma predominante en las neuronas del DRG (Gibson *et al.*, 1988; Mulderry *et al.*, 1988) y consistente con esto, a diferencia de β -CGRP, α -CGRP está altamente expresado en las fibras perivasculares sensoriales (Lu *et al.*, 1999). Las fibras sensoriales que expresan α -CGRP (a partir de ahora mencionado como CGRP), también expresan el canal TRPV1 (Horie *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Kawasaki *et al.*, 2009). Más aún, el vaciamiento selectivo de los neurotransmisores de los terminales sensoriales que expresan el TRPV1 elimina la vasodilatación inducida por la estimulación eléctrica de las fibras perivasculares sensoriales (Kakuyama *et al.*, 1998; Legros *et al.*, 2007). En consecuencia, es importante destacar que la gran mayoría de las fibras sensoriales sensibles a capsaicina contienen CGRP (Carr *et al.*, 1990).

Además de inducir la relajación del músculo liso vascular, el CGRP tiene un efecto cronotrópico e inotrópico positivo en el corazón, es decir, aumenta la frecuencia y la contracción cardíaca, respectivamente. Estas observaciones han sugerido que el CGRP es un neurotransmisor importante para el control del tono vasomotor, la distribución sanguínea y la regulación de la presión arterial. Sin embargo, como se discutirá más adelante, esta hipótesis es bastante controversial.

Los receptores del CGRP se encuentran ampliamente distribuidos en la vasculatura. De acuerdo a la afinidad del antagonista CGRP₈₋₃₇ (i.e. CGRP sin los primeros 7 aminoácidos del extremo N-terminal), se han descrito 2 tipos de receptores: CGRP-1 (altamente sensibles a CGRP₈₋₃₇) y CGRP-2 (insensibles a CGRP₈₋₃₇) (Dennis *et al.*, 1990; Quirion *et al.*, 1992;

Juaneda *et al.*, 2000). El receptor CGRP-1 es el principal mediador de los efectos cardiovasculares de CGRP (Smillie y Brain, 2011).

El receptor de CGRP es un complejo multiproteico formado por al menos tres componentes: 1) el receptor tipo receptor de la calcitonina (CRLR), 2) la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMP) y la proteína componente del receptor de CGRP (RCP) (Figura 4). El CRLR es una proteína de 7 segmentos transmembrana acoplada a proteína G que posee el sitio de unión al CGRP. El CRLR está acoplado a la proteína RAMP, principalmente a la proteína RAMP-1 (1 dominio transmembrana) (Smillie y Brain, 2011) que permite la localización del receptor en la membrana, su reciclaje, y su afinidad con el ligando (McLatchie *et al.*, 1998; Parameswaran y Spielman, 2006). El CRLR interactúa con la proteína RCP, lo cual permite acoplar a CRLR con la vía de transducción activada por CGRP (Evans *et al.*, 2000).

En la vasculatura, los receptores del CGRP están distribuidos de manera heterogénea. De esta manera, la vasodilatación inducida por CGRP puede involucrar mecanismos dependientes y/o independientes del endotelio, según si el receptor se localiza en el endotelio, el músculo liso, o en ambos tipos celulares (Brain y Grant, 2004) (Figura 3). En la red arterial mesentérica, por ejemplo, la acción del CGRP depende de la activación de receptores en el músculo liso y en el endotelio (Legros *et al.*, 2007).

Se piensa que el receptor de CGRP está acoplado, principalmente, a una proteína G del tipo G_s . De este modo, la activación del receptor de CGRP está asociada fundamentalmente a la activación de la adenilato ciclasa (AC) (Legros *et al.*, 2007) (Figura 4). La activación de la

AC, incrementa la producción de adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) lo cual activa la PKA. Cuando el receptor del CGRP se localiza en el endotelio vascular, CGRP genera una vasodilatación mediada principalmente por la activación de la PKA, lo cual gatilla la producción de NO (Figura 3) (Gray y Marshall, 1992; Yoshimoto *et al.*, 1998; Legros *et al.*, 2007). La estimulación con CGRP también ha sido asociada a la producción de prostacilclinas en células endoteliales, por lo que la respuesta vasodilatadora inducida por CGRP podría ser potenciada por prostaglandinas (Crossman *et al.*, 1987). Cuando el receptor del CGRP se localiza en las células del músculo liso, la PKA fosforila canales de K^+ sensibles a ATP (canales K_{ATP}) y/o canales de K^+ activados por calcio de alta conductancia (canales BK_{Ca}) incrementando la probabilidad de apertura de los canales y generando una hiperpolarización del músculo liso vascular que conlleva a la vasodilatación (Nelson *et al.*, 1990; Quayle *et al.*, 1994; Miyoshi y Nakaya, 1995; Wellman *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que el CGRP es el principal neurotransmisor de los nervios sensoriales perivasculares, debido a que CGRP es el principal agente vasodilatador derivado de estas fibras. En este contexto, los bloqueadores de los receptores de CGRP tienen un potente efecto inhibitorio sobre la vasodilatación inducida por la activación de estas fibras sensoriales (usando capsaicina o excitando las fibras eléctricamente) (Kawasaki *et al.*, 1988; Han *et al.*, 1990b; Brain *et al.*, 1993; Legros *et al.*, 2007). Más aún, la respuesta vasodilatadora inducida por CGRP es aproximadamente 10 a 100 veces más potente que la sustancia P y la NKA (Smillie y Brain, 2011), lo cual destaca el protagonismo del CGRP en el control del tono vasomotor en desmedro de la sustancia P. Si bien solo algunas células del DRG y del trigémino son inmunoreactivas a CGRP (aproximadamente el 30-40%) (Supowit *et al.*, 1995), estudios

muestran que la mayoría de las fibras sensoriales perivasculares son inmunoreactivas a CGRP (Uddman *et al.*, 1986; Tsai *et al.*, 1988). Esto indica que la extensa mayoría de los vasos sanguíneos de la microcirculación periférica son inervados por fibras CGRP-érgicas.

El papel del CGRP en el control tónico de la función cardiovascular es controversial. Sin embargo, la eliminación específica del péptido α -CGRP o la inyección intravenosa de antagonistas selectivos para los receptores de CGRP sugiere que, al menos en condiciones basales, el CGRP no participa en el control del tono vasomotor ni en la regulación de la función cardiovascular (Lu *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2002). Consistente con esta hipótesis, la liberación tónica de CGRP es apenas detectable, indicando que la actividad basal de las fibras sensoriales es baja. En contraste, incrementos en los niveles plasmáticos de CGRP han sido detectados durante diversos estados o condiciones patológicas tales como isquemia, migraña, hipertensión, obesidad, sepsis y otros estados inflamatorios (Franco-Cereceda *et al.*, 1989; Zelissen *et al.*, 1991; Edvinsson *et al.*, 1992; Masuda *et al.*, 1992; Arden *et al.*, 1994; Arnalich *et al.*, 1995; Ashina *et al.*, 2000; Juhasz *et al.*, 2003). Notablemente, todas estas patologías están asociadas a disfunción cardiovascular (Clapp *et al.*, 2004; Kurth *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2008); no obstante, se desconoce si la disfunción vascular es mediada por la acción del CGRP. En 1987, Crossman *et al.*, mostraron que el tratamiento de células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) con CGRP potenció la producción de prostaciclina inducida por bradicinina, un vasodilatador dependiente del endotelio (Crossman *et al.*, 1987). Más tarde, en 1999, Lu y Fiscus, mostraron que la incubación de anillos aórticos con CGRP durante 1 hora condujo a la inhibición de la contracción inducida por fenilefrina, un agonista α -1 adrenérgico (Lu y Fiscus, 1999). Estos resultados sugieren que el CGRP regula la función

endotelial y más aún, que el CGRP afecta la función del músculo liso vascular y puede tener un papel importante en la disfunción vascular observada en estados fisiopatológicos como la inflamación. Es importante destacar que, hasta el momento, ningún trabajo ha evaluado si el CGRP regula la función endotelial en arterias de resistencia.

4 Propuesta de la tesis

Numerosos trabajos han demostrado que la activación de las fibras sensoriales perivasculares induce una potente vasodilatación causada por la liberación de CGRP desde los terminales nerviosos periféricos. Sin embargo, se desconoce si el CGRP regula la función vascular a largo plazo. Las células endoteliales son un componente importante para el control de la función vascular y controlan segundo a segundo el tono vasomotor mediante la producción de señales vasodilatadoras tales como el NO y el EDHF. Además, la comunicación intercelular entre las células que componen la pared vascular es esencial para la sincronización y coordinación de las señales vasomotoras. Notablemente, la reducción de la vasodilatación dependiente del endotelio y la inhibición en la comunicación intercelular son características comunes en enfermedades cardiovasculares asociadas a eventos inflamatorios como hipertensión y diabetes. La inflamación ha sido asociada a un incremento en la excitación de CGRP de los nervios perivasculares y a la reducción de la biodisponibilidad de los componentes vasodilatadores derivados del endotelio. Además, la inflamación está asociada a un incremento de la activación de los canales de panexina y de los hemicanales formados por conexinas, los cuales podrían afectar dramáticamente la función celular si su probabilidad de apertura incrementara de manera prolongada en el tiempo. Sorprendentemente, el CGRP

controla la expresión de la eNOS mediante la activación de canales de Panx-1 en arterias de resistencia, lo cual sugiere que éste péptido podría regular la señalización del NO en estados patológicos. Basado en estos antecedentes, se propone la siguiente hipótesis:

4.1 Hipótesis

El CGRP liberado desde los nervios sensoriales perivasculares induce la activación prolongada de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas en la pared vascular, lo cual conlleva a disfunción vascular mediante la inhibición de la señalización del NO y la pérdida del acoplamiento intercelular.

OBJETIVOS

1.- Determinar si la liberación de CGRP desde los terminales sensoriales perivasculares regula la vasodilatación dependiente de NO en las arterias de resistencia.

- a) Evaluar si la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares regula la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio.
- b) Determinar si la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares inhibe la señalización del NO.
- c) Analizar si la inhibición de la señalización del NO inducida por la activación de los nervios sensoriales es mediada por el CGRP.

2.- Determinar si los canales de panexinas y/o los hemicanales formados por conexinas participan en la disfunción endotelial inducida por CGRP.

- a) Determinar si la activación de los nervios sensoriales perivasculares controla la apertura de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas en la pared vascular.
- b) Analizar si la activación de los nervios sensoriales perivasculares activa los canales de panexinas y/o los hemicanales formados por conexinas en el endotelio vascular.
- c) Evaluar si la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO causada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares es mediada por la activación de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas.
- d) Evaluar la reversibilidad de la activación de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas inducida por la activación de los nervios sensoriales perivasculares.

3.- Dilucidar el mecanismo de activación de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas inducido por CGRP.

- a) Evaluar si los nervios sensoriales perivasculares controlan la activación de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas mediante la liberación de CGRP.
- b) Determinar si el CGRP controla la apertura de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas mediante la vía clásica del neurotransmisor, cAMP-PKA.
- c) Evaluar si el CGRP controla la apertura de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas a través de la liberación de ATP, de la producción de NO y la activación de la PKG.
- d) Determinar el mecanismo de señalización que conlleva a la activación prolongada de los canales de panexinas y/o de los hemicanales formados por conexinas.

4.- Analizar si la activación de los nervios sensoriales perivasculares regula la comunicación intercelular en las arterias de resistencia.

- a) Evaluar si el CGRP inhibe el acoplamiento vía uniones comunicantes entre las células de la pared vascular.

- b) Evaluar si la activación de los nervios perivasculares sensoriales regula la conducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de uniones comunicantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Animales

En esta tesis se utilizaron ratas macho *Sprague dawley* de 230 – 250 g de peso. Las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 90 y 10 mg/Kg, respectivamente). Todos los animales fueron obtenidos en el vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile, que cuenta con facilidades para la mantención y supervisión veterinaria constante de los animales. Todos los protocolos experimentales se diseñaron de acuerdo a las normas establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Pontificia Universidad Católica de Chile y la American Physiological Society.

2 Perfusión de la red arterial mesentérica

Por medio de una incisión en la línea media de la pared abdominal se expuso la arteria mesentérica superior de ratas previamente anestesiadas. La arteria fue canulada con un tubo de polietileno P-50 (Intramedic, USA) y perfundida a un flujo constante de 2 mL/min con una

solución tampón bicarbonato Tyrode (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. Una vez canuladas, las ratas fueron sacrificadas por exsanguinación, mediante el corte de la aorta abdominal. Los mesenterios perfundidos fueron aislados de la pared del tubo digestivo y se colocaron en una cámara (placa tipo petri), donde se dejaron estabilizar por al menos 20 min antes de comenzar los experimentos. La solución de perfusión se burbujeó continuamente con una mezcla de 5% CO₂ / 95% O₂, para obtener un pH = 7,35 – 7,45. Todas las drogas aplicadas en esta preparación se disolvieron en la solución de perfusión.

3 Registro de la presión de perfusión

La presión de perfusión de la red arterial mesentérica es un índice de la resistencia que generan las arterias que componen el mesenterio. De esta manera, el tono vasomotor de las arterias de resistencia de la red arterial mesentérica fue evaluado mediante el análisis, a tiempo real, de los cambios en la presión de perfusión. Adicionalmente, la resistencia periférica total (R_T) fue calculada con la fórmula:

$$P = Q \times R_T$$

Donde, P = Presión de perfusión y Q = Flujo (2 mL/min).

Los cambios en la presión de perfusión se registraron por medio de un transductor de presión (Statham modelo P23AC, Hato Rey, Puerto Rico) conectado a la entrada de la arteria mesentérica superior. La señal eléctrica transmitida por el transductor fue amplificada con un amplificador PM-1000 (DataQ Instruments, USA). La señal amplificada (analógica) se convirtió a una señal digital mediante una interfaz DataQ DI158U (DataQ Instruments, USA), conectada a un computador. Los registros fueron adquiridos con el software DataQ 3.17 (DataQ Instruments, USA), el cual permitió visualizar la presión de perfusión a tiempo real.

4 Aislamiento de arterias mesentéricas

Se aisló la red arterial mesentérica como se describió previamente en el punto 2. Una vez finalizado el protocolo experimental, el mesenterio se sacó del sistema de perfusión y se colocó en una placa petri con una solución Tyrode-MOPS (composición (mM): NaCl 118; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; glucosa 11,1; MOPS 18), ajustada a pH = 7,4 y mantenida a temperatura ambiente (22°C). El mesenterio se fijó a una superficie de silicona Silgard[®] 184 (Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) en el fondo de la placa con alfileres pequeños. Luego, se removió cuidadosamente el tejido adiposo de las arterias mesentéricas de segundo orden (120-180 μm de diámetro interno) seleccionadas. Finalmente, se aislaron segmentos de arteriolas de ~0,5 a 0,8 cm y se trasladaron a una cámara nueva con la solución Tyrode-MOPS descrita anteriormente.

5 Inmunofluorescencia

La red arterial mesentérica fue perfundida durante 5 min con solución Bouin (composición: ácido pícrico saturado, formaldehído al 37% y ácido acético glacial (100%) en razón 15:5:1) a un flujo de 0,5 mL/min. Luego, el mesenterio se separó del páncreas, se retiró del sistema de perfusión y se dejó en un tubo vial inmerso en solución Bouin durante 24 h a temperatura ambiente (22°C). Posteriormente, con unos alfileres se fijó el tejido en una placa con Silgard[®] y se aisló una arteria mesentérica de segundo orden de acuerdo a lo descrito en el punto 4. Una vez removido el tejido adiposo, los vasos fueron almacenados nuevamente en solución Bouin para su uso posterior. Para remover el Bouin, los vasos se lavaron a temperatura ambiente con una solución salina PBS (composición (mM): NaCl 136,9; KCl 2,68; NaH₂PO₄ 10,44 y KH₂PO₄ 1,76), con un pH = 7,4. Luego, los vasos se incubaron con BSA (3%) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó el anticuerpo primario anti-CGRP a 4°C durante toda la noche (~12 h). El anticuerpo secundario Alexa Fluor[®] 568 se incubó 1 h a temperatura ambiente. El vaso fue posteriormente colocado en un portaobjeto con micropocillo. Se agregó medio de montaje Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, Cat. # 17984-25, Hatfield, PA, USA). Finalmente, el vaso se visualizó en un microscopio Olympus BX41, con una cámara ProgRes C5 cool (Jenoptik) conectada a un computador. Las fotos se sacaron usando el programa ProgRes Capture Pro 2.7.7 (Jenoptik). El anticuerpo primario anti-CGRP fue obtenido de Thermo Scientific (Cat. # PA5-19755, Rockford, IL, USA). El anticuerpo secundario Alexa Fluor[®] 568 fue comprado en Molecular Probes (Cat. # 11004, Eugene, OR, USA).

6 Cultivo de células endoteliales

La red arterial mesentérica fue canulada y perfundida por 15 min a temperatura ambiente (22°C) para remover la sangre, usando una solución Tyrode estéril (composición descrita anteriormente) más una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Anti-Anti (2X), Cat. # 15240, Invitrogen). Luego, los mesenterios fueron sacados del sistema de perfusión y agitados a 37°C durante 1 h en un tubo falcon con 5 mL de solución Tyrode estéril con Anti-Anti (2X), BSA (0,1%) y 10 mg de colagenasa tipo 2. Después de esto, se agregó al tubo falcon 20 mL de medio frío estéril M-199 (Gibco, Grand Island, NY, USA) y los mesenterios fueron centrifugados a 4°C durante 10 min a 1200 g (centrífuga modelo Kubota 8700, rotor RS-3000/6, Tokio, Japón). El pellet fue resuspendido con medio completo (esto es, el medio M-199 con 2% de ECGF y 20% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA)). Las células fueron colocadas durante 4 h en placas o cubreobjetos inmersos en medio completo dentro de estufas con 5% CO₂ – 95% aire atmosférico y ajustadas a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con una solución salina estéril PBS (composición (mM): NaCl 136,9; KCl 2,68; NaH₂PO₄ 10,44 y KH₂PO₄ 1,76). Finalmente, se dejó crecer a las células con medio completo a 37°C con 5% CO₂ – 95% aire atmosférico hasta alcanzar un 70 – 80% de confluencia.

7 Captación de colorante

La captación de colorante se evaluó de acuerdo a lo descrito por Figueroa *et al* (2013). La captación de los colorantes etidio o amarillo de lucifer se visualizó con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50W) y una cámara (Retiga 1394, Q Imaging) conectada a un computador. Dentro de la célula, el etidio se intercala con ácidos nucleicos y la intensidad de esta fluorescencia fue examinada por epifluorescencia (excitación: 530 – 550 nm, emisión: 590 nm; filtro UND-25-2). En contraste al etidio, el amarillo de lucifer marca el citoplasma completo y la señal fluorescente fue analizada por epifluorescencia (excitación: 470 – 490 nm, emisión: 515 nm, sin filtros). Las imágenes fueron visualizadas con el software IPLab 3.65 (Scanalytics, Inc) y analizadas usando el software ImageJ 1.37c (Wayne Rasband, NIH, USA).

8 Acoplamiento vascular

Se aislaron arterias de la red arterial mesentérica como se describió en el punto 4 y se fijaron con alfileres en una placa de Silgard[®] con una solución Tyrode-MOPS ajustada a pH = 7,4. Las células musculares de la arteria aislada fueron microinyectadas con una micropipeta cargada con bromuro de etidio (25 mM). Las micropipetas se fabricaron en un puller (Narishige, modelo PC-10, Tokio, Japón) a partir de capilares de vidrio de 1,2 mm de diámetro (WPI, Sarasota, FL, USA). Una vez que la punta de la micropipeta ingresó a la célula, se inyectó el colorante mediante pulsos de presión de nitrógeno con una pico-bomba (WPI, modelo PV 820, Sarasota, FL, USA). La difusión del colorante a las células vecinas se

visualizó a lo largo del tiempo con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50W) y una cámara Retiga 1394 (Q Imaging) conectada a un computador. Las imágenes fueron visualizadas utilizando el programa IPLab 3.65 (Scanalytics, Inc).

9 Western blot

La red arterial mesentérica perfundida se separó del páncreas y se homogenizó con un homogenizador de tejidos (OMNI International, modelo TM125, Kennesaw, GA, USA) en una solución Tyrode más un cocktail de anti-proteasas (Roche, Cat. # 11697498001, Alemania) y anti-fosfatasa (Roche, Cat. # 04906845001, Alemania). Los mesenterios se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 1200 g. El sobrenadante fue almacenado y las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (BioRad Laboratories, Inc., Cat. #500-0006, Hercules, CA, USA). El sobrenadante se mezcló con buffer de Laemmli y se hirvió por 1 min para desnaturalizar las proteínas. Una vez enfriadas, las muestras hervidas fueron almacenadas a -20°C para su posterior utilización o usadas inmediatamente para detectar las proteínas mediante inmunoblot. Para el último caso, muestras con 60 µg de proteína se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, 12%) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Pierce, Rockford, IL, USA). Para incubar el anticuerpo primario y secundario se utilizó el potenciador de la señal HIKARI (Nacalai Tesque, INC, Japón). Ambos anticuerpos se incubaron por 1 h a temperatura ambiente (22°C). Para detectar las bandas de las proteínas se usó el substrato quimioluminiscente SuperSignal® West Femto (Pierce, Rockford, IL, USA). La masa molecular se estimó con marcadores estándar (BioRad, Hercules, CA, USA). Los

blots se desarrollaron para cuantificar los niveles de fosforilación de eNOS en serina 1177 (P-eNOS^{Ser1177}) y treonina 495 (P-eNOS^{Tre495}). La misma membrana fue utilizada para analizar la eNOS total y la β -actina. Además, se analizaron los niveles de fosforilación de Panx-1 en tirosina 168 (P-Panx-1^{Tir168}). Esta membrana fue utilizada para analizar la Panx-1 total y la β -actina. También se evaluó la expresión de la Cx32, la Cx43 y la Panx-2. Los anticuerpos primarios (anti-eNOS (monoclonal, Cat. # 610296), anti-P-eNOS^{Ser1177} (monoclonal, Cat. # 612392), anti-P-eNOS^{Tre495} (monoclonal, Cat. # 612706) y anti-Cx43 (monoclonal, Cat. # 610062) fueron obtenidos de BD-Transduction Labs (Lexington, KY, USA). El anticuerpo anti-Cx32 (policlonal) fue comprado en Alpha Diagnostic International (Cat. # CX32A11-A, San Antonio, TX, USA). El anticuerpo anti-P-Panx-1^{Tir168} (policlonal), fue gentilmente donado por Brant Isakson (University of Virginia, SC, USA). El anticuerpo anti-Panx1 (monoclonal) fue comprado en Epitomics (Cat. # 3864-1, Burlingame, CA, USA). El anticuerpo anti-Panx2 (policlonal) fue obtenido de Abcam (Cat. # ab55917 Cambridge, MA, USA). El anticuerpo anti- β -actina (monoclonal) fue comprado en Sigma Aldrich (Cat. # A5441, St Louis, MO, USA). Los anticuerpos secundarios Anti-Rabbit (Cat. # 32460) y Anti-Mouse (Cat. # 32430) fueron comprados en Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Las bandas de las proteínas fueron analizadas usando el software ImageJ 1.37c (Wayne Rasband, NIH, USA).

10 Detección del NO

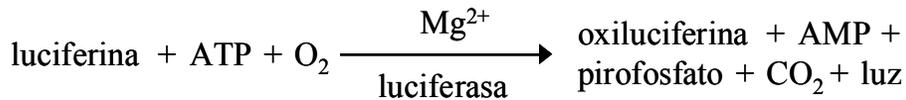
El NO fue detectado usando el sistema de medición inNO-T-II (Innovative instruments Inc., USA). Brevemente, un electrodo cubierto por una membrana selectivamente permeable a NO (AmiNO-700, Innovative instruments Inc., USA), se colocó en inmersión en 20 mL de una solución recomendada por el fabricante (Composición: H₂SO₄ (0,1 M) y KI (2 mg/mL)). Los nitritos de cada muestra se redujeron a NO en la solución del electrodo mediante la siguiente reacción:



La corriente detectada por el sensor fue monitoreada y cuantificada usando el software inNOII (versión 2.2) proveído por el fabricante. Después del término de cada experimento, el electrodo fue calibrado usando una concentración conocida de nitrito de sodio (0,1 – 100 nM) (ver figura 16A). Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente (22°C).

11 Detección del ATP

El ATP fue analizado por el ensayo de bioluminiscencia luciferina-luciferasa, usando un Kit de medición de ATP (Cat. #A22066, Molecular Probes, Life technologies, Eugene, OR, USA). El ensayo está basado en la producción de luz como consecuencia de la reacción del ATP, la luciferina y el O₂. La reacción es la siguiente:



Siguiendo las instrucciones del fabricante, las muestras se mezclaron suavemente con la solución de reacción y fueron inmediatamente medidas en un luminómetro (Turner TD-20e, Promega). La técnica fue calibrada después de cada experimento usando concentraciones conocidas de ATP (0,01-10 nM). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (22°C).

12 Detección del superóxido

Los cambios en los niveles del superóxido fueron analizados mediante bioluminiscencia usando el Kit ABEL (Cat. # ABEL-05, Knight Scientific Ltd., Plymouth, UK). Este método está basado en la oxidación de la folasina. Folasina emite luminiscencia debido a la reacción de su grupo prostético con radicales de superóxido. Para realizar las mediciones de superóxido, se aisló y perfundió la red arterial mesentérica como se describió en el punto 2 de esta sección. Siguiendo las instrucciones del fabricante, muestras de 20 µL del perfusado fueron mezclados con 100 µL de solución adyuvante-K. Después de 1 min de equilibrio, la reacción fue iniciada por la adición de 250 µL de folasina (10 µg/mL). La luminiscencia resultante se midió en un luminómetro Turner TD20e (Promega). Las soluciones de folasina y adyuvante-K, se prepararon usando un buffer de reconstitución (solución balanceada de Hanks con 20 mM Hepes, ajustado a pH = 7,4). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (22°C).

13 Detección de Ca²⁺

Los cambios en los niveles del calcio intracelular fueron analizados en cultivos de células endoteliales usando el indicador de Ca²⁺, Fluo-4-AM. Dentro de la célula, la unión del Ca²⁺ con el Fluo-4 incrementa la fluorescencia del indicador. La intensidad de esta fluorescencia fue examinada por epifluorescencia (excitador: 470 – 490 nm, emisión: 515 nm; filtro UND-25-2). Para la visualización del Fluo-4 se utilizó un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50W) y una cámara (Retiga 1394, Q Imaging) conectada a un computador. Las imágenes fueron visualizadas con el software IPLab 3.65 (Scanalytics, Inc) y analizadas usando el software ImageJ 1.37c (Wayne Rasband, NIH, USA).

14 Drogas

Capsaicina (Cat. # M2028), L-NA (Cat. # N5501), indometacina (Cat. # I7378), ATP (Cat. # A2383), MOPS (Cat. # M9381), DMSO (Cat. # D5879), bromuro de etidio (Cat. # E8751), BSA (Cat. # A7888), fenilefrina (Cat. # P6126), ACh (Cat. # A6625), β -GA (Cat. # G10105), lantano (Cat. # 262072) y probenecid (Cat. # P8761) fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El ODQ (Cat. # 0880), el KT 5823 (Cat. # 1289), el KT 5720 (Cat. # 1288), el PPADS (Cat. # 0625) y la sustancia P (Cat. # 1156) se compraron en Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). El CGRP (Cat. # H2265) y el CGRP₈₋₃₇ (Cat. # H4924) se obtuvieron de Bachem (Torrence, CA, USA). ¹⁰panx fue sintetizado por Genscript (Israel). El SNAP fue comprado en Calbiochem (Cat. # 487910, La Jolla, CA, USA). El amarillo de

lucifer se compró en Molecular Probes (Cat. # L453, Eugene, OR, USA). La Colagenasa tipo 2 se obtuvo de Worthington (Cat. # 4176, Lakewood, NJ, USA). El Fluo-4-AM se compró en Life Technologies (Cat. # F23917, Eugene, OR, USA). Todos los reactivos de grado analítico se disolvieron en agua destilada con excepción de capsaicina y β -GA (etanol analítico puro), indometacina, ODQ, KT 5720, KT 5823, Fluo-4-AM y SNAP (DMSO) y probenecid (NaOH 1M).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1 Activación de las fibras sensoriales perivasculares

La liberación transitoria y selectiva de neurotransmisores desde las fibras sensoriales perivasculares se logró mediante la perfusión (durante 20 min) de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μM). La perfusión de la capsaicina se realizó 45 min después de canular y aislar el mesenterio, para equilibrar la preparación. Para verificar la estabilidad y eficacia de la capsaicina, su perfusión se realizó en presencia de fenilefrina (60 μM) en todos los experimentos en los cuales se analizaron respuestas vasomotoras. La concentración de capsaicina utilizada en este estudio (1 μM) indujo una vasodilatación máxima cercana al 80% en la red arterial pre-contraída con fenilefrina, indicando que es una concentración suficiente y efectiva para inducir la liberación de los neurotransmisores desde las fibras sensoriales perivasculares, tales como el CGRP. En experimentos paralelos, la red arterial mesentérica fue perfundida 20 min con el vehículo de capsaicina (etanol, 0,0001%). Este procedimiento se utilizó como control.

En este trabajo se evaluó el efecto de distintos bloqueadores sobre la acción de la capsaicina: CGRP₈₋₃₇ (antagonista del receptor CGRP-1), lantano (inhibidor de hemicanales formados por conexinas), probenecid (inhibidor de los canales de Panx-1), ¹⁰panx (péptido mimético de Panx-1 e inhibidor de los canales de Panx-1), KT-5720 (inhibidor de la PKA), L-NA (inhibidor de la NOS) y PPADS (antagonista de los receptores purinérgicos P2). El protocolo experimental con respecto al uso de estos bloqueadores se describe con mayor detalle más adelante.

2 Respuestas vasomotoras

Las respuestas vasomotoras se estudiaron de acuerdo a lo descrito recientemente por nuestro grupo (Gaete *et al.*, 2012). Se analizó la respuesta vasodilatadora inducida por la estimulación durante 1 min con ACh (0,01 – 10 μ M) o durante 2 min con S-nitroso acetil penicilamina (SNAP, 0,1 – 1 μ M). También, se evaluó la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina (1 μ M, 20 min). Debido a que el mesenterio aislado no desarrolla tono miogénico, la red arterial mesentérica se pre-contrajo con el agonista del receptor α 1-adrenérgico, fenilefrina (30 – 60 μ M), o con una solución alta en K⁺ (70 mM KCl). De este modo, todas las respuestas vasodilatadoras fueron evaluadas durante la contracción de la red arterial mesentérica. La solución alta en K⁺ se preparó mediante el reemplazo equimolar de KCl por NaCl de la solución Tyrode (composición (mM): KCl 123,4; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 23,8 y glucosa 11,1). Las respuestas vasodilatadoras fueron evaluadas solas o después del tratamiento con L-NA (100 μ M), o indometacina (10 μ M), para inhibir la

producción de NO y prostaglandinas, respectivamente. La L-NA y la indometacina fueron preincubadas al menos 45 min y 15 min antes de que se realizaran las respuestas vasodilatadoras, respectivamente. Solo para los experimentos mostrados en las figuras 12 y 14C, la indometacina fue perfundida 15 min antes de todas las estimuciones con ACh, con el fin de prevenir la interferencia de prostaglandinas. La participación de las uniones comunicantes en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, se evaluó mediante el tratamiento de la red arterial mesentérica con β -GA (50 μ M), un inhibidor de uniones comunicantes. El β -GA se perfundió 15 min antes de que se estimulara con ACh. La L-NA, la indometacina y el β -GA se mantuvieron en la solución de perfusión durante todo el período de estimulación con ACh.

La respuesta vasodilatadora inducida por ACh o SNAP fue evaluada antes y 15 ó 60 min después del tratamiento de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μ M, 20 min) sola o en presencia de los bloqueadores CGRP₈₋₃₇ (300 nM), probenecid (1 mM) o lantano (200 μ M). El CGRP₈₋₃₇, el probenecid y el lantano fueron perfundidos 15 min antes de la aplicación de la capsaicina y se mantuvieron en la solución de perfusión durante todo el período de estimulación con capsaicina. Los resultados de estos experimentos están expresados como porcentaje de la reducción máxima en la presión de perfusión (% Relajación) o como porcentaje del cambio en la presión de perfusión a lo largo del tiempo (% Basal).

3 Medición del superóxido

La red arterial mesentérica fue estimulada con capsaicina (1 μM) durante 20 min como se describió en el punto 1 de esta sección. Las muestras del perfusado de la red arterial mesentérica fueron recolectadas antes (control) y 15 y 60 min después del tratamiento con capsaicina. El superóxido de cada muestra fue rápidamente medido en el luminómetro. Los resultados de las mediciones de superóxido se muestran como unidades arbitrarias (UA).

4 Medición del NO

El aumento en la tensión de roce producido durante la vasoconstricción genera NO (Boric *et al.*, 1999). Por lo tanto, en todas las mediciones realizadas en la red arterial mesentérica, el estímulo, se hizo sin pre-contracción para evitar que el NO generado por el agente vasoconstrictor interfiera con el NO generado por el estímulo. La red arterial mesentérica fue estimulada con ACh (100 nM) durante 1 min en condiciones control y 15 ó 60 min después del tratamiento con capsaicina o su vehículo. Las muestras del perfusado fueron recolectadas antes de la estimulación con ACh (basal) y al final de la estimulación con ACh (i.e. 1 min de estimulación). De forma adicional, la medición de NO también se realizó en mesenterios tratados con capsaicina más $^{10}\text{panx}$ (60 μM). El $^{10}\text{panx}$ fue perfundido 15 min antes de la aplicación de la capsaicina y se mantuvo en la solución de perfusión durante todo el período de estimulación con capsaicina. Los resultados presentados en este trabajo muestran la

producción neta de NO inducida por ACh (Producción en presencia de ACh menos la producción basal).

En otra serie de experimentos, cultivos de células endoteliales fueron estimulados con ACh en condiciones control o 60 min después del tratamiento con CGRP o su vehículo (H₂O). En estos experimentos, el protocolo fue el siguiente: Una vez alcanzada la confluencia necesaria (70 – 80%), las células fueron sacadas de la estufa. El medio de las placas que contenían las células fue reemplazado con 3 mL de solución Tyrode-MOPS (descrita en el punto 4 de la sección materiales y métodos) ajustada a pH = 7,4, a temperatura ambiente (22°C). Después de 20 min, las células se lavaron nuevamente con la misma solución para remover los nitritos acumulados durante el cambio de medio. Veinte minutos después, se estimuló con ACh (100 nM) durante 5 min. Las células fueron posteriormente lavadas (suavemente) tres veces con la solución Tyrode-MOPS para remover la ACh. Veinte minutos después, las células fueron incubadas con CGRP (100 nM) durante 20 min. Inmediatamente después, las células se lavaron tres veces con Tyrode-MOPS para remover el CGRP y se dejaron en esa solución durante 60 min. Finalmente, las células fueron incubadas nuevamente con ACh (100 nM) por 5 min. Se realizaron mediciones de NO en las muestras obtenidas durante la estimulación con ACh. Adicionalmente, se recolectaron muestras durante la estimulación con CGRP. Para analizar la producción basal de NO, se tomaron muestras antes de cada estimulación con ACh o CGRP. En los resultados de las mediciones en células, se muestra la producción neta de NO (Producción inducida por ACh o CGRP menos la producción basal) observada al minuto 5 de la ACh y al minuto 20 de la estimulación con CGRP.

Para las mediciones realizadas en la red arterial mesentérica, se tomaron muestras de 100 μL desde la solución de perfusión de la cámara que contiene el mesenterio. Para los experimentos con células, se tomaron muestras de 50 μL de las placas. Ya que el volumen de la solución del electrodo fue de 20 mL, se aplicó un factor de corrección para calcular la concentración real de NO en el perfusado o en la solución de las placas que contenían las células. Los resultados están expresados como concentración de NO (pmol/mL).

5 Expresión de proteínas

Para evaluar si la liberación transitoria de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares afecta la expresión de proteínas importantes para la función vascular, se analizó la expresión de la Cx32, la Cx43, la P-Panx-1^{Tir168}, la Panx-1 y la Panx-2, una y tres horas después de la estimulación de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μM , 20 min). La expresión de la eNOS y de sus formas fosforiladas en serina 1177 y treonina 495 también fueron cuantificadas usando este diseño experimental. Como control se utilizaron mesenterios homogenizados durante la estimulación con el vehículo de la capsaicina o mesenterios homogenizados 1 ó 3 horas después del tratamiento con el vehículo de la capsaicina. La elección de los controles se realizó de manera arbitraria ya que los tres tipos de controles no exhibieron diferencias entre sí en cuanto a la expresión de proteínas (datos no mostrados). En experimentos adicionales, la expresión de la eNOS, la Panx-1 (y sus formas fosforiladas) y la β -actina, fueron evaluadas en mesenterios tratados con capsaicina más CGRP₈₋₃₇ (300 nM) o probenecid (1 mM). El CGRP₈₋₃₇ y el probenecid fueron perfundidos 15 min antes de la aplicación de la capsaicina y se

mantuvieron en la solución de perfusión durante todo el período de estimulación con capsaicina. Los cambios en la fosforilación de eNOS y Panx-1 se expresaron como la razón de la proteína fosforilada sobre la proteína total. Los cambios en los niveles totales de eNOS, Panx-1, Panx-2, Cx32 y Cx43 se expresaron como la razón de la proteína sobre los niveles de β -actina.

6 Denervación de la red arterial mesentérica

La denervación de las arterias mesentéricas fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Hobara *et al.* (2006). Brevemente, ratas de 200 g fueron anestesiadas de acuerdo a lo descrito en el punto 1 de la sección materiales y métodos. Usando una afeitadora eléctrica, se rasuró el costado izquierdo de los animales para dejar expuesta la piel. Posteriormente, las ratas fueron inyectadas con ketoprofeno (subcutáneo, 3 mg/Kg) entre las escápulas. Las ratas se colocaron en una placa termo-regulada para mantener la temperatura corporal durante toda la cirugía. Luego, se hizo una pequeña incisión uniforme (~3 cm) en el costado izquierdo de cada animal. Cuidando no dañar ningún órgano interno, se expuso la arteria mesentérica superior con una pinza curva y se limpió del tejido conectivo que lo rodeaba. Luego, se aplicó cuidadosamente una gota de 10% fenol (90% etanol) sobre la superficie de la arteria. Utilizando una tira de algodón empapada con el fenol, se refregó delicadamente durante 20 min la arteria cuidando, en todo momento, de no tocar ningún otro tejido con el fenol. Después, el fenol fue removido de la arteria con un algodón seco. Como control, un grupo de ratas fue tratado con una solución salina estéril en vez del fenol (ratas sham). La incisión fue doblemente sellada con

aguja e hilo de sutura, suturando primero el músculo y luego la piel. Se limpió la sangre de la herida y se aplicó povidona yodada, un desinfectante y antiséptico. Después de la cirugía, las ratas fueron dejadas sobre la paleta termo-regulada hasta que despertaron de la anestesia. Finalmente, las ratas fueron dejadas en recuperación en cajas individuales con agua (con el antibiótico enrofloxacina, 0,5 mg/mL) y comida *ad libitum*. Además, se suministró el analgésico ketoprofeno (3 mg/Kg) oralmente por tres días consecutivos, a partir del segundo día de la operación. Siete días después de la cirugía, se aisló la red arterial mesentérica de acuerdo a lo descrito en el punto 2 de la sección materiales y métodos. Se ha demostrado que este protocolo de denervación es altamente efectivo a los siete días post-cirugía (Hobara *et al.*, 2006). Igualmente, se confirmó la eficacia de la denervación de las fibras sensoriales perivasculares mediante la inmunofluorescencia de las fibras CGRP-érgicas y mediante la eliminación de la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina en mesenterios pre-contraídos con fenilefrina (Figura 14 A y B).

7 Cambios en la permeabilidad de la membrana

Para analizar el cambio de la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los canales formados por Panx-1 o los hemicanales formados por conexinas, se utilizó la técnica de captación de colorante, la cual ha sido ampliamente descrita y aceptada para su estudio (Schalper *et al.*, 2008). En estos experimentos, la red arterial mesentérica se perfundió con el colorante bromuro de etidio (5 μ M). Luego, los mesenterios fueron lavados mediante la perfusión de la solución Tyrode durante 20 min para remover el etidio de la solución de perfusión. Después, se aislaron arterias mesentéricas de segundo orden de acuerdo a lo

descrito en la sección 4 de materiales y métodos y se analizó la captación del colorante. Para evaluar si el CGRP liberado por las fibras sensoriales perivasculares induce un incremento de la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular, el bromuro de etidio fue perfundido durante toda la estimulación con CGRP (100 nM, 5 min), capsaicina (1 μ M, 20 min), o sus respectivos vehículos. Los vehículos de CGRP y capsaicina fueron aplicados durante 5 y 20 min, respectivamente. La estimulación con capsaicina o CGRP se hizo sola o después del tratamiento de la red arterial mesentérica con lantano (200 μ M), probenecid (1 mM), CGRP₈₋₃₇ (300 nM), PPADS (30 μ M), KT-5720 (500 nM), L-NA (100 μ M) o KT-5823 (1 μ M, inhibidor de la PKG). El CGRP₈₋₃₇, el probenecid, el PPADS, el KT-5720 y el KT-5823, fueron pre-incubados 15 min antes de la estimulación con CGRP o capsaicina. La L-NA fue pre-incubada 45 min antes de la estimulación con CGRP o capsaicina. Todas las drogas mencionadas se mantuvieron durante el período de estimulación completo y fueron sacadas de la perfusión inmediatamente después de finalizada la estimulación con CGRP o capsaicina.

Para determinar la reversibilidad del incremento en la permeabilidad de la membrana inducida por CGRP o capsaicina, el bromuro de etidio se perfundió 1 h después del tratamiento con CGRP, capsaicina, o sus respectivos vehículos. En estos experimentos, el bromuro de etidio se perfundió durante 20 min. La captación del etidio fue evaluada en arterias aisladas de mesenterios tratados con capsaicina sola, o en presencia de los bloqueadores CGRP₈₋₃₇ (300 nM) o probenecid (1 mM). El CGRP₈₋₃₇ y el probenecid, fueron perfundidos 15 min antes de la aplicación de capsaicina y se mantuvieron en la solución de perfusión hasta el término de la estimulación. Adicionalmente, la identificación de los canales involucrados en el cambio de la permeabilidad de la membrana observada 1 h después del tratamiento con capsaicina se evaluó

mediante la perfusión de lantano (200 μM) o probenecid (1 mM) 15 min antes de la perfusión del bromuro de etidio. Ambos, lantano o probenecid, se mantuvieron durante todo el período de perfusión del bromuro de etidio.

En experimentos paralelos, se evaluó la reversibilidad del incremento de la permeabilidad de la membrana inducido por SNAP y ACh. En este contexto, la red arterial mesentérica fue estimulada durante 5 min con ACh (100 nM), SNAP (300 nM) o el vehículo de SNAP (DMSO). Posteriormente, los mesenterios fueron lavados con una solución Tyrode para remover la ACh, el SNAP o el vehículo. El bromuro de etidio fue perfundido 5 min, durante el período completo de estimulación y 15 ó 60 min después de terminada la estimulación (i.e. durante el lavado).

El etidio es una molécula de bajo peso molecular (314 Da), permeable a través de uniones comunicantes (Little *et al.*, 1995). Ya que en las arterias de resistencia las células endoteliales están extensamente conectadas con las células musculares a través de uniones comunicantes, no se puede confirmar el tipo celular por el cual el etidio es captado. Por lo tanto, para determinar si los cambios en la permeabilidad de la membrana ocurren en las células endoteliales y/o en las células musculares lisas, se usó otro colorante, el amarillo de lucifer (443 Da). A diferencia del etidio, el amarillo de lucifer marca el citoplasma completo y no difunde través de las uniones comunicantes mioendoteliales en los vasos sanguíneos (Little *et al.*, 1995). En nuestros experimentos, el amarillo de lucifer (30 μM) fue perfundido en la red arterial mesentérica durante la estimulación con capsaicina (1 μM , 20 min), CGRP (100 nM, 10 min) o sus vehículos. Adicionalmente, la captación de amarillo de lucifer fue evaluada 1 h

después de la estimulación con capsaicina, CGRP o sus vehículos. Solo en los experimentos donde se evaluó la captación de amarillo de lucifer, los vehículos de CGRP y capsaicina fueron aplicados durante 10 y 20 min, respectivamente.

Para todas las captaciones de colorante evaluadas en células, el protocolo experimental fue el siguiente: Una vez alcanzada la confluencia necesaria (70 – 80%), las células fueron sacadas de la estufa. El medio de las placas fue reemplazado inmediatamente con una solución Tyrode-MOPS (descrita en el punto 4 de la sección materiales y métodos) ajustada a pH = 7,4. Veinte minutos después, las células se lavaron con la misma solución Tyrode-MOPS más bromuro de etidio (5 μ M). Quince minutos después de la adición del bromuro de etidio se evaluó a lo largo del tiempo la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los canales formados por Panx-1. Las células fueron estimuladas con capsaicina (1 μ M), CGRP (100 nM), o el vehículo de CGRP. Se registró durante 5 min de condición basal y 10 min de estimulación. Se sacaron fotos cada 30 segundos, obteniendo un total de 31 fotos por experimento. Las células se estimularon con CGRP solo, o en presencia de CGRP₈₋₃₇ (300 nM), probenecid (1 mM) o ¹⁰panx (60 μ M). El CGRP₈₋₃₇, el probenecid y el ¹⁰panx fueron pre-incubados 15 min antes de la estimulación con CGRP y se mantuvieron durante todo el período de estimulación. Todos los experimentos con células se realizaron a temperatura ambiente (22°C). La captación de etidio está expresada como unidades arbitrarias (UA) o como la tasa de captación de etidio (UA/min).

8 Medición del ATP

La medición del ATP se realizó en un cultivo de células endoteliales siguiendo el protocolo que se detalla a continuación: Una vez alcanzada la confluencia necesaria (70 – 80%), las placas con las células se retiraron de la estufa. El medio de las placas fue reemplazado inmediatamente con 3 mL de solución Tyrode-MOPS (descrita en el punto 4 de la sección materiales y métodos) ajustada a pH = 7,4 (22°C). Veinte minutos después, las células se incubaron con CGRP (100 nM) o su vehículo. Muestras de 10 µL fueron tomadas antes (basal) y al minuto 1, 3 y 5 durante la estimulación con el CGRP. Las muestras obtenidas fueron inmediatamente mezcladas con 90 µL de la solución de reacción y analizadas rápidamente en el luminómetro. El control positivo de la técnica de medición del ATP se logró mediante la aplicación de ATP exógeno y mediante la medición de ATP en un cultivo de astrocitos estimulado con glutamato (datos no mostrados). Los resultados de las mediciones de ATP son mostrados como unidades arbitrarias (UA). El experimento se realizó a temperatura ambiente (22°C).

9 Medición del Ca²⁺

Una vez alcanzada la confluencia necesaria (70 – 80%), células cultivadas sobre cubreobjetos fueron retiradas de la estufa. El medio de las placas fue reemplazado inmediatamente con 3 mL de solución Tyrode-MOPS (descrita en el punto 4 de la sección materiales y métodos) ajustada a pH = 7,4 (32 – 35°C). Veinte minutos después, las células se lavaron con la misma

solución Tyrode-MOPS en presencia de CGRP (100 nM) o su vehículo. En experimentos adicionales, el CGRP fue incubado en presencia de $^{10}\text{panx}$ (60 μM) o de CGRP₈₋₃₇ (10 μM). Las células se estimularon con CGRP por un total de 20 minutos e inmediatamente después fueron lavadas (suavemente) con la solución Tyrode-MOPS. Posteriormente, las células fueron cargadas con Fluo-4-AM (10 μM) durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de carga, el Fluo-4-AM fue removido reemplazando la solución de las células por 3 mL de la solución Tyrode-MOPS. Después de 20 minutos de equilibrio se analizó a lo largo del tiempo el cambio en los niveles del Ca^{2+} intracelular. Las células fueron estimuladas con ACh (1 μM). Los registros incluyeron 30 s de basal y 1 min de estimulación. Se sacaron fotos cada 3 segundos, obteniendo un total de 31 fotos por experimento. El CGRP₈₋₃₇ y el $^{10}\text{panx}$ fueron pre-incubados 15 min antes de la estimulación con CGRP y se mantuvieron durante todo el período de estimulación. Todos los experimentos se realizaron en un cuarto oscuro termorregulado (32 – 35°C). El cambio en los niveles del Ca^{2+} intracelular a lo largo del tiempo se expresa como F/F_0 , donde F es la fluorescencia del Fluo-4 y F_0 es la fluorescencia del Fluo-4 basal. El aumento neto máximo del Ca^{2+} intracelular (menos la basal) se expresa como $\Delta F/F_0$.

10 Acoplamiento vascular mediante uniones comunicantes

Para estudiar el acoplamiento entre las células de la pared vascular, se microinyectó bromuro de etidio (25 mM) en una célula del músculo liso de arterias mesentéricas de segundo orden y se evaluó durante un período de 15 min la cinética de la difusión del etidio a las células

vecinas. La microinyección del bromuro de etidio se realizó 1 h después del tratamiento de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μ M, 20 min), CGRP (100 nM, 20 min) o el vehículo respectivo.

11 Análisis estadístico

Los resultados son presentados 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 analizaron mediante ANOVA de una o dos vías y el test *post hoc* de Newman Keuls. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $P < 0,05$. Todo el análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

1 La activación de las fibras sensoriales perivasculares regula la vasodilatación dependiente del endotelio.

1.1 Alteración de los componentes de la vasodilatación inducida por ACh.

En mesenterios pre-contraídos con fenilefrina (60 μ M), ACh indujo una reducción concentración-dependiente de la presión de perfusión (Figura 5A) como consecuencia de la relajación de las arterias de resistencia de la red arterial mesentérica (Figura 5B). La concentración de ACh en la cual se observó el 50% de la respuesta vasodilatadora máxima (EC_{50}) fue 49,1 nM. La vasodilatación inducida por ACh (100 nM) se bloqueó parcialmente con L-NA, un inhibidor de la producción de NO (Figura 6B). En contraste, el tratamiento con indometacina, un inhibidor de la producción de prostaglandinas, no afectó la vasodilatación inducida por ACh (Figura 6B).

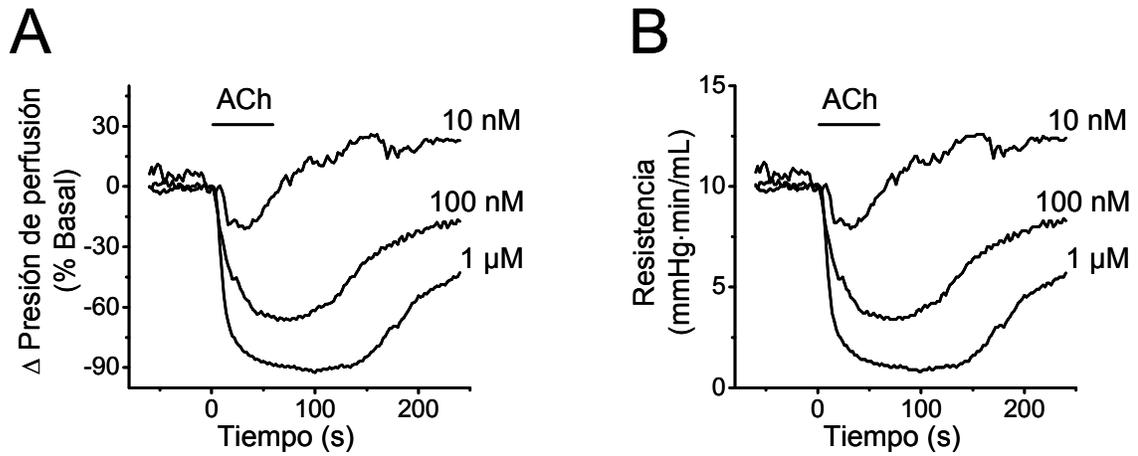


FIGURA 5. *Cursos temporales representativos de la vasodilatación inducida por ACh.* La respuesta vasodilatadora inducida por diferentes concentraciones de ACh (10 nM, 100 nM y 1 μM) fue evaluada en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina (60 μM). **(A)** Curso temporal de los cambios en la presión de perfusión **(B)** Curso temporal de los cambios en la resistencia periférica total de la red arterial mesentérica. Notar que 100 nM de ACh induce una vasodilatación cercana al 50% de la respuesta máxima (EC_{50}). ACh: acetilcolina. Modificado de Gaete *et al.* (2012).

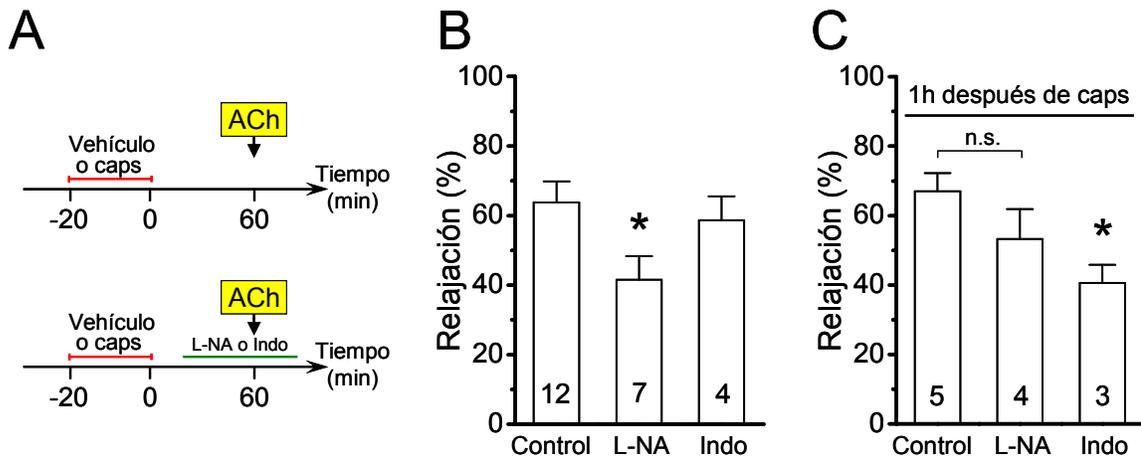


FIGURA 6. El tratamiento con capsaicina altera los componentes de la respuesta vasodilatadora inducida por ACh. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina (60 μ M). **(A)** Esquema del protocolo experimental. La vasodilatación inducida por ACh se evaluó en condiciones control (panel superior) y después del tratamiento con L-NA (100 μ M) o indometacina (10 μ M) panel inferior). Notar que la vasodilatación inducida por ACh se analizó 1 hora después de la estimulación por 20 min de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μ M) o su vehículo. La L-NA y la indometacina se perfundieron después de la aplicación de la capsaicina o de su vehículo, 45 min y 15 min antes de la estimulación con ACh, respectivamente. **(B)** Relajación máxima inducida por ACh 1 h después de la aplicación del vehículo. **(C)** Relajación máxima inducida por ACh 1 hora después de terminado el tratamiento con capsaicina. Los números en las barras indican el valor de n. ACh: acetilcolina; Caps: capsaicina; L-NA: N⁰-nitro-L-arginina. Indo: indometacina. * = P < 0,05 versus Control; n.s. = no significativo. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

La magnitud de la respuesta vasodilatadora inducida por ACh 1 h después de terminado el tratamiento con capsaicina fue similar a la observada en los mesenterios que no se estimularon con capsaicina (Figura 6C). No obstante, después del tratamiento con capsaicina la vasodilatación inducida por ACh fue insensible a L-NA y sensible a indometacina, indicando que en estas condiciones, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh no es mediada por NO, sino más bien por prostaglandinas (Figura 6C).

En la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina, la relajación máxima evocada por 10 nM, 100 nM y 1 μ M ACh fue completamente insensible a indometacina (Figura 7A). Más aún, ningún cambio aparente en el curso temporal de la respuesta vasodilatadora pudo observarse tras la aplicación de la indometacina (Figura 7B). No obstante, en los mesenterios tratados con capsaicina, indometacina no solo bloqueó la magnitud de la relajación máxima inducida por ACh (100 nM), sino que también bloqueó el componente rápido inicial de la respuesta vasodilatadora (Figura 7C).

Para determinar si la disminución en la producción o la ausencia de NO prolongada contribuye al surgimiento del componente vasodilatador sensible a indometacina, se analizó el efecto de indometacina sobre la vasodilatación inducida por ACh (100 nM) en mesenterios pre-contraídos con fenilefrina pre-tratados con L-NA por 75 min (Figura 8A). Notablemente, la vasodilatación inducida por ACh fue inhibida por indometacina después que el mesenterio se trató con L-NA (Figura 8 B y C).

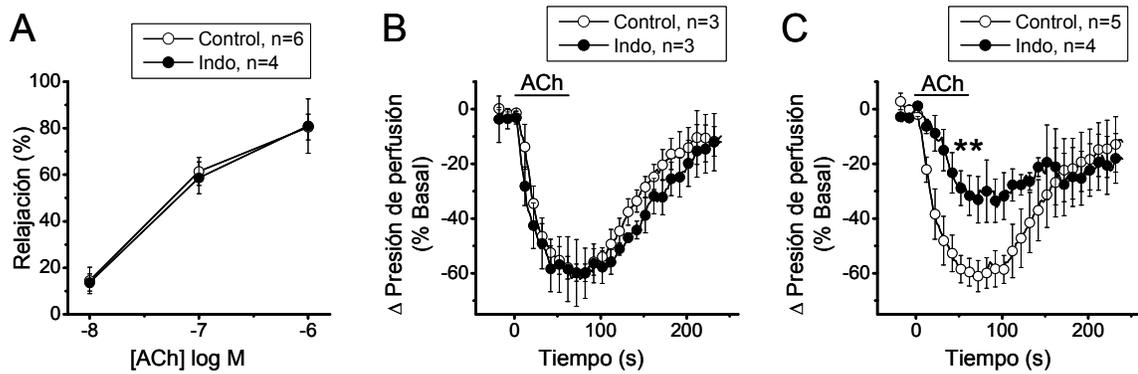


FIGURA 7. El tratamiento con capsaicina activa un componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh se evaluó en mesenterios pre-contraídos con fenilefrina (30 – 60 μ M). **(A)** Curva concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por ACh en condiciones control o después del tratamiento con indometacina (10 μ M). **(B)** Curso temporal de la relajación inducida por ACh (100 nM) en condiciones control o después del tratamiento con indometacina. **(C)** Curso temporal de la relajación inducida por ACh (100 nM) en condiciones control o después del tratamiento con indometacina en mesenterios estimulados 1 h antes con capsaicina. ACh: acetilcolina; Indo: indometacina. ** = $P < 0,01$ versus Control. Estadística: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls.

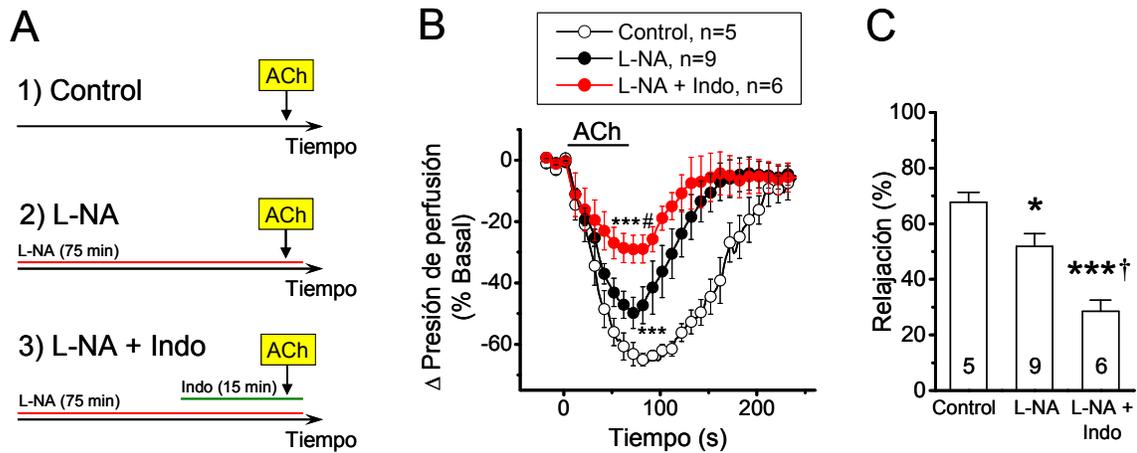


FIGURA 8. La inhibición de la producción de NO activa un componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina (60 μ M). **(A)** Esquema del protocolo experimental. La vasodilatación inducida por ACh se evaluó en condiciones control (panel 1), después del tratamiento con L-NA (100 μ M, panel 2) y después del tratamiento con L-NA más indometacina (10 μ M, panel 3). **(B)** Curso temporal de las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh. **(C)** Respuesta vasodilatadora máxima evocada por ACh. Los números en las barras indican el valor de n. L-NA: N^o-nitro-L-arginina; Indo: indometacina. * = P < 0,05 versus Control; *** = P < 0,001 versus Control; † = P < 0,01 versus L-NA; # = P < 0,001 versus L-NA. Estadística figura B: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls. Estadística figura C: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Para deshabilitar el componente vasodilatador mediado por EDHF y visualizar de mejor manera el efecto de la capsaicina sobre la relajación dependiente del NO, se pre-contrajo la red arterial mesentérica con 70 mM KCl. La pre-contracción con KCl no afectó la respuesta vasodilatadora inducida por el donador de NO, SNAP (300 nM) (Figura 9). En los mesenterios pre-contraídos con KCl, ACh evocó una relajación concentración-dependiente, con un $EC_{50} = 83,3$ nM (Gaete *et al.*, 2012). Como se esperaba, la respuesta vasodilatadora inducida por 100 nM ACh fue completamente bloqueada con L-NA y fue insensible a indometacina (Figura 10B). Al igual que lo observado en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina, en los mesenterios contraídos con KCl la vasodilatación inducida por ACh fue insensible a L-NA después del tratamiento con capsaicina (Figura 10C). Más aún, la vasodilatación inducida por ACh fue inhibida con indometacina (Figura 10C).

Para evaluar si la inhibición del componente de NO ocurre a tiempos más tempranos, se analizó la vasodilatación inducida por ACh (100 nM) en mesenterios pre-contraídos con KCl (70 mM) antes de la estimulación con capsaicina y 15 minutos después de este tratamiento (Figura 11A). En estos experimentos, la magnitud de la respuesta vasodilatadora producida por ACh fue parcialmente bloqueada a los 15 minutos con respecto al control. Notablemente, 15 min después del tratamiento con capsaicina, indometacina no afectó la vasodilatación inducida por ACh, indicando que la activación de las prostaglandinas no ocurre tempranamente (Figura 11B).

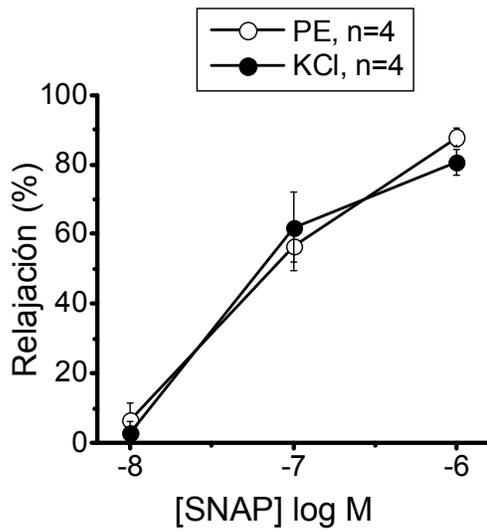


FIGURA 9. La pre-contracción con KCl no afecta la vasodilatación dependiente de NO. La respuesta vasodilatadora inducida por el donador de NO, SNAP (10 nM, 100 nM y 1 μ M), fue evaluada en la red arterial mesentérica pre-contráida con fenilefrina (60 μ M) o con KCl (70 mM). Notar que ambas curvas no son diferentes. PE: fenilefrina. SNAP: s-nitroso acetil penicilamina. Estadística: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls.

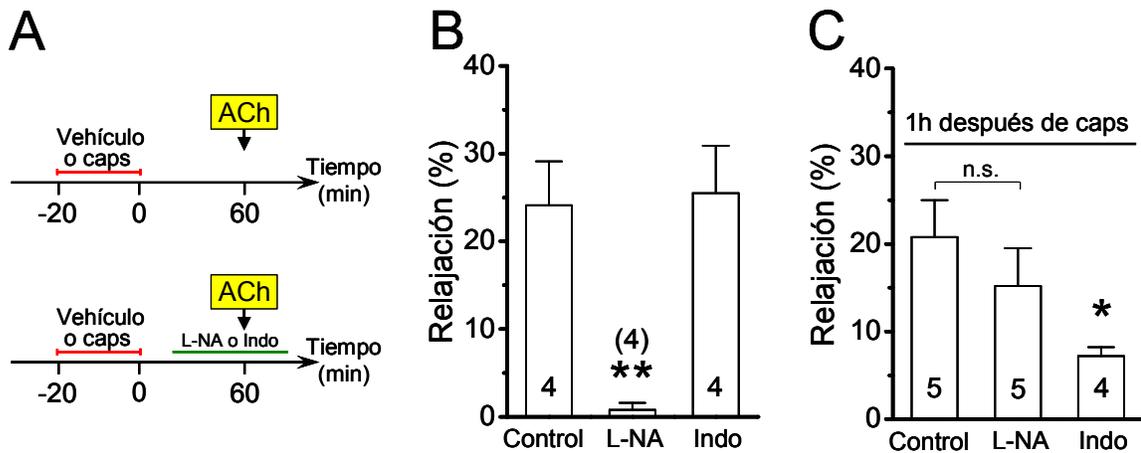


FIGURA 10. *El tratamiento con capsaicina inhibe la vasodilatación dependiente de NO.* La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con KCl (70 mM). **(A)** Representación esquemática del protocolo experimental. La vasodilatación inducida por ACh se evaluó en condiciones control (panel superior) y después del tratamiento con L-NA (100 μ M) o indometacina (10 μ M, panel inferior). Notar que la vasodilatación inducida por ACh se analizó 1 hora después de terminada la estimulación por 20 min de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μ M) o su vehículo. La L-NA y la indometacina se perfundieron por 45 min y 15 min, respectivamente, después de la aplicación de la capsaicina o de su vehículo. **(B)** Relajación inducida por ACh 1 h después de la aplicación del vehículo. **(C)** Relajación inducida por ACh 1 hora después del tratamiento con capsaicina. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. ACh: acetilcolina; Caps: capsaicina; L-NA: N^o-nitro-L-arginina; Indo: indometacina. * = P < 0,05 versus Control; ** = P < 0,01 versus Control; n.s. = no significativo. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

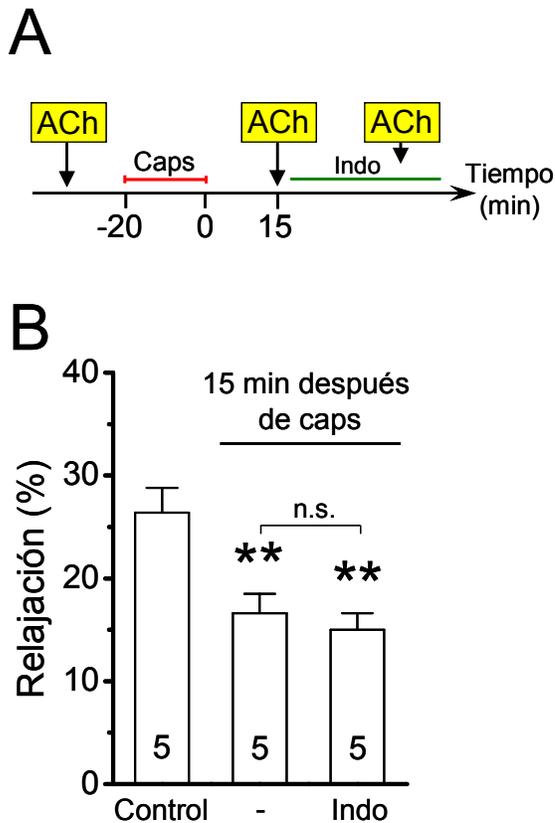


FIGURA 11. Inicio de la inhibición causada por capsaicina de la vasodilatación dependiente de NO. **(A)** Esquema que muestra el protocolo experimental. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en mesenterios pre-contraídos con KCl (70 mM), antes (control) y 15 min después del tratamiento con capsaicina (1 μ M, 20 min). Adicionalmente, la respuesta vasodilatadora activada por ACh (inducida 15 min después del tratamiento con capsaicina), se analizó después del tratamiento con indometacina (10 μ M). **(B)** Relajación máxima inducida por ACh. Los números en las barras indican el valor de n. ACh: acetilcolina; Caps: capsaicina; Indo: indometacina. ** = $P < 0,01$ versus Control; n.s. = no significativo. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Para evaluar el progreso en el tiempo de la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO, se analizó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) en mesenterios pre-contráidos con KCl (70 mM), antes y 15 ó 60 min después de la estimulación con capsaicina o su vehículo (Figura 12A). En todos estos experimentos, los mesenterios fueron tratados con indometacina (10 μ M) para observar los cambios en la vasodilatación mediada por NO sin la interferencia del componente compensatorio dependiente de prostaglandinas (Figura 12A). El tratamiento con el vehículo no afectó la magnitud de la respuesta vasodilatadora dependiente de NO inducida por ACh (Figura 12B). En contraste, después del tratamiento con capsaicina, la vasodilatación inducida por ACh disminuyó progresivamente (Figura 12B). El tratamiento con capsaicina no afectó la respuesta vasodilatadora inducida por SNAP (300 nM) (Figura 13 A y B).

Para confirmar la participación de los nervios sensoriales perivasculares en la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO, se evaluó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) en arterias mesentéricas denervadas y en arterias mesentéricas intactas con la operación de denervación simulada (Sham). Para este fin, primero se evaluó la vasodilatación inducida por capsaicina para confirmar la eficacia del protocolo de denervación de la red arterial mesentérica. En este contexto, la estimulación con capsaicina (1 μ M) indujo una potente vasodilatación en la red arterial mesentérica Sham con los nervios intactos (Figura 14A). En contraste, capsaicina no evocó relajación en las arterias mesentéricas denervadas (Figura 14A). Consistente con esto, la inmunofluorescencia de CGRP mostró que los nervios perivasculares estaban fragmentados 7 días después del proceso quirúrgico de denervación (Figura 14B).

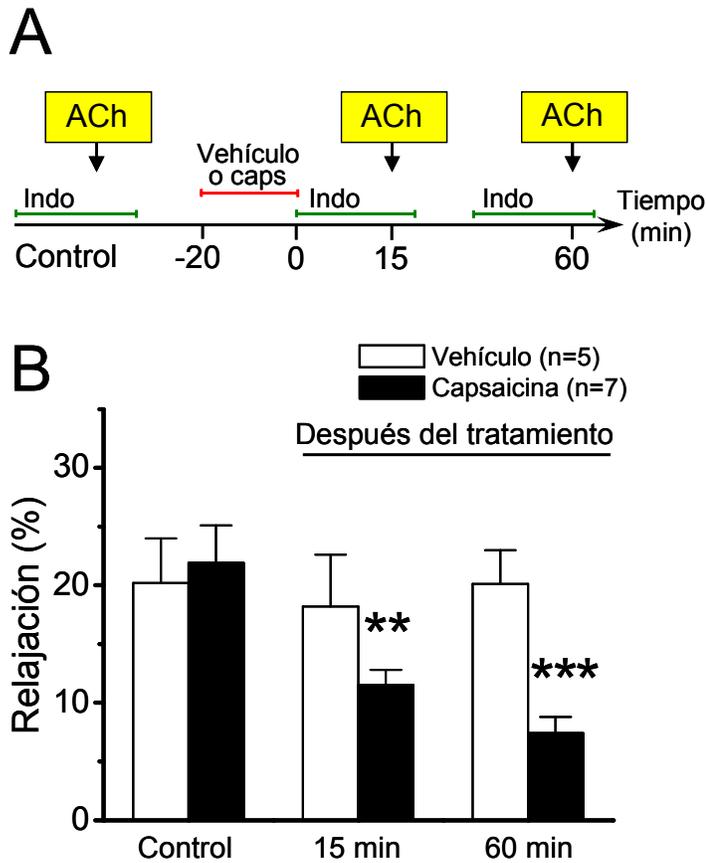


FIGURA 12. La inhibición causada por capsaicina de la vasodilatación dependiente de NO ocurre de manera progresiva en el tiempo. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contráida con KCl (70 mM). **(A)** Esquema del protocolo experimental. La vasodilatación inducida por ACh se evaluó antes (control) y después de 15 y 60 min de finalizada la estimulación transitoria (20 min) con capsaicina (1 μ M) o su vehículo. En esta serie de experimentos, los mesenterios fueron tratados con indometacina (10 μ M) 15 min antes de cada estimulación con ACh. **(B)** Relajación máxima inducida por ACh. ACh: acetilcolina; Indo: indometacina; Caps: capsaicina. ** = P < 0,01 versus Control. *** = P < 0,001 versus Control. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

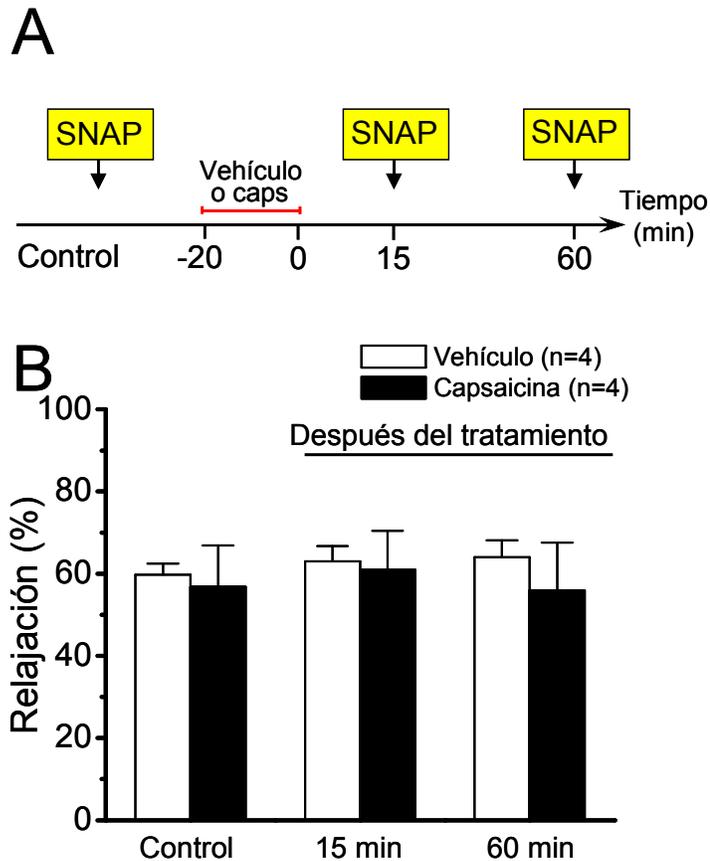


FIGURA 13. El tratamiento con capsaicina no afecta la acción del NO sobre el músculo liso. La respuesta vasodilatadora inducida por SNAP (300 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con KCl (70 mM). **(A)** Esquema del protocolo experimental. La vasodilatación inducida por SNAP se evaluó antes (control) y después de 15 ó 60 min de finalizada la estimulación transitoria (20 min) con capsaicina (1 μ M) o su vehículo. **(B)** Relajación máxima inducida por SNAP. Notar que el tratamiento con capsaicina no afectó la relajación inducida por SNAP. SNAP: s-nitroso acetil penicilamina; Caps: capsaicina. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

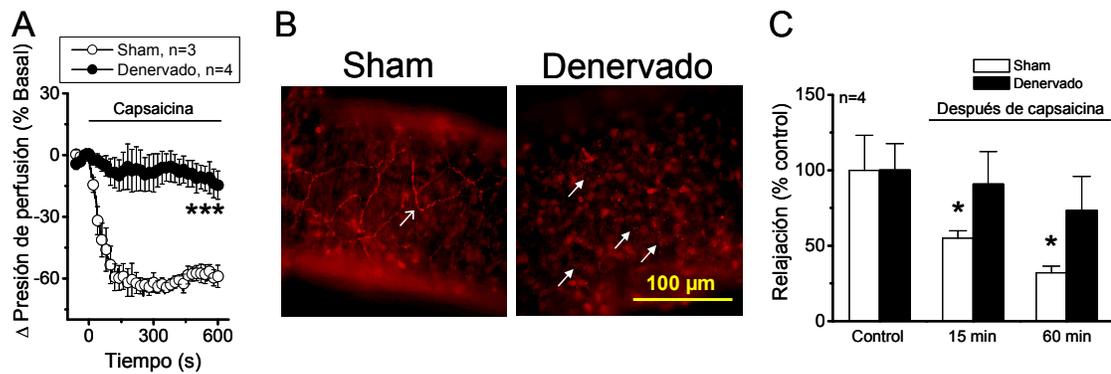


FIGURA 14. Capsaicina no afecta la respuesta vasodilatadora dependiente de NO en la red arterial mesentérica denervada. La red arterial mesentérica se denervó mediante la aplicación de fenol en la superficie de la pared de la arteria mesentérica superior. La efectividad del protocolo de denervación se muestra en A y B. **(A)** Curso temporal de la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina (1 μ M) en arterias intactas con denervación simulada (Sham) y en arterias denervadas. **(B)** Inmunofluorescencia para CGRP en arterias intactas y en arterias denervadas. La flecha delgada indica una fibra sensorial perivascular intacta. Las flechas gruesas señalan fragmentos dispersos de fibras sensoriales perivascuales, lo cual indica la fragmentación y degradación de la misma. **(C)** Relajación inducida por ACh (100 nM) en la red arterial mesentérica intacta (Sham) y denervada, pre-contraída con 70 mM KCl. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue evaluada antes (control) y 15 y 60 min después del tratamiento de la red arterial mesentérica con capsaicina (1 μ M, 20 min). En esta serie de experimentos, los mesenterios fueron tratados con indometacina 15 min antes de cada estimulación con ACh. Notar que en la red arterial denervada el tratamiento con capsaicina no inhibe la vasodilatación dependiente de NO. * = $P < 0,05$ versus Control; *** = $P < 0,0001$ versus Sham. Estadística figura A: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls. Estadística figura C: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Como se esperaba, en la red arterial mesentérica intacta (Sham), el tratamiento con capsaicina inhibió la vasodilatación inducida por ACh dependiente de NO imitando lo observado en la figura 12B (Figura 14C). En contraste, en arterias mesentéricas denervadas el tratamiento con capsaicina no afectó la respuesta vasodilatadora dependiente de NO (Figura 14C).

1.2 La activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares conduce a un incremento progresivo de la producción de superóxido.

Para evaluar si la activación de las fibras sensoriales con capsaicina conlleva a un incremento del estrés oxidativo, se analizó la producción de superóxido en la red arterial mesentérica tratada con capsaicina. Notablemente, 15 y 60 min después de la estimulación con capsaicina, la producción de superóxido aumentó de manera progresiva (Figura 15 A y B). Adicionalmente, el tratamiento con capsaicina condujo a un incremento en la producción de superóxido durante el período de estimulación (datos no mostrados).

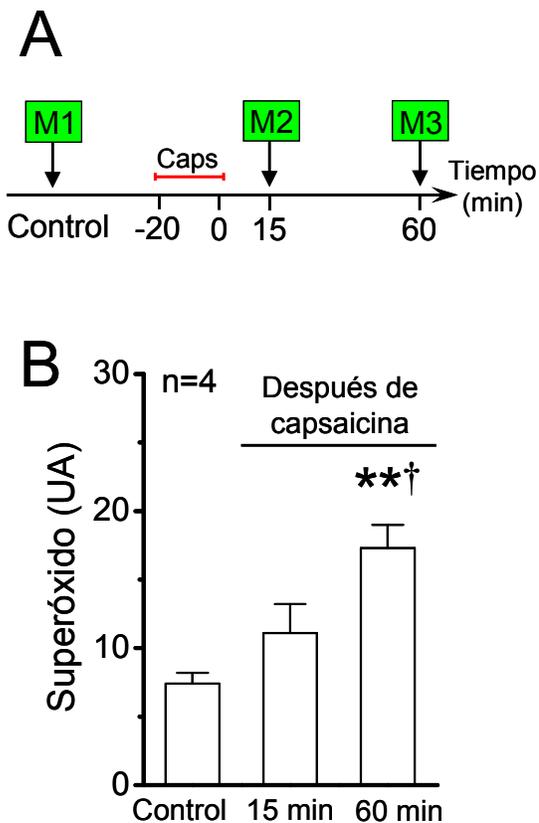


FIGURA 15. El tratamiento con capsaicina produce un incremento en la producción de superóxido a lo largo del tiempo. El superóxido del perfusado de la red arterial mesentérica fue detectado usando la proteína sensible a superóxido folasina. **(A)** Esquema del protocolo experimental, indicando la relación temporal del periodo de estimulación con capsaicina (1 μ M, 20 min) y las muestras analizadas. Se analizó un total de tres muestras (M1, M2, y M3) de cada mesenterio. La primera muestra (M1) se tomó antes de la estimulación con capsaicina (control); la segunda y tercera muestra (M2 y M3) se tomaron 15 y 60 min después de la estimulación con capsaicina, respectivamente. **(B)** Cuantificación de la producción del superóxido. Caps: capsaicina. UA: unidades arbitrarias. ** = $P < 0,01$ versus Control; † = $P < 0,05$ versus minuto 15 (segunda barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

1.3 Los nervios sensoriales perivasculares regulan la actividad de la eNOS.

Para confirmar que la inhibición inducida por capsaicina de la vasodilatación mediada por NO se debe a una disminución de la producción de NO, se midió la liberación de NO de la red arterial mesentérica estimulada con ACh (100 nM) usando un electrodo sensible a NO (Figura 16 A y B). El tratamiento con el vehículo de la capsaicina no afectó la magnitud de la producción de NO inducida por ACh (Figura 16C). No obstante, la producción de NO se redujo progresivamente a los 15 y 60 min después del tratamiento con capsaicina (Figura 16C). Más aún, la producción de NO inducida por ACh fue indetectable 60 min después de la estimulación con capsaicina (Figura 16C).

Como el CGRP es el principal neurotransmisor de los nervios sensoriales perivasculares en las arterias de resistencia, se decidió evaluar si el CGRP inhibe la señalización del NO en células endoteliales aisladas, imitando de esta manera el efecto de capsaicina en los vasos. En este contexto, se analizó la producción de NO inducida por ACh (100 nM) en un cultivo primario de células endoteliales mesentéricas. Las mediciones se realizaron 1 hora después de la estimulación transitoria (20 min) de las células con CGRP (100 nM) o su vehículo (Figura 17A). El CGRP indujo un incremento significativo en la producción de NO durante el período de estimulación (Figura 17B). Una hora después del tratamiento con el vehículo de CGRP, ACh incrementó la producción de NO en el cultivo celular. No obstante, consistente con lo observado en arterias intactas, la estimulación con CGRP condujo a una potente inhibición de la producción de NO inducida por ACh (Figura 17C).

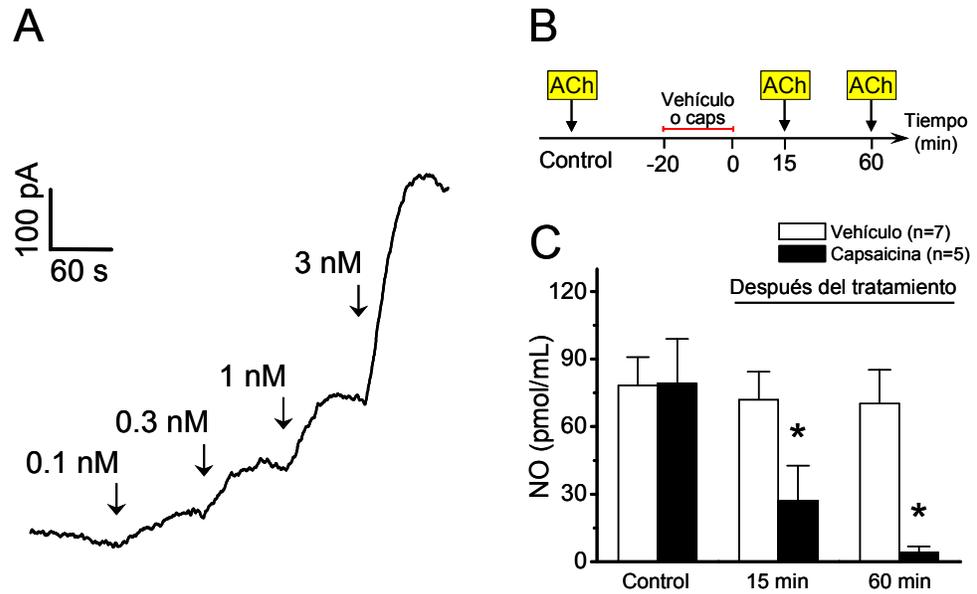


FIGURA 16. El tratamiento con capsaicina conduce a la inhibición progresiva de la producción de NO. La producción de NO se midió con un electrodo sensible y específico para NO. **(A)** Registro representativo de la detección del NO producido por la reducción de concentraciones conocidas de nitrito (ver el punto 10 de la sección de materiales y métodos). **(B)** Esquema del protocolo experimental. Las muestras del perfusado de la red arterial mesentérica se recolectaron durante la aplicación de ACh (100 nM) antes del tratamiento con capsaicina (1 μ M, 20 min) o su vehículo y 15 ó 60 min después. **(C)** Cuantificación de la producción de NO inducida por ACh. ACh: acetilcolina; Caps: capsaicina; NO: óxido nítrico * = $P < 0,05$ versus Control. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

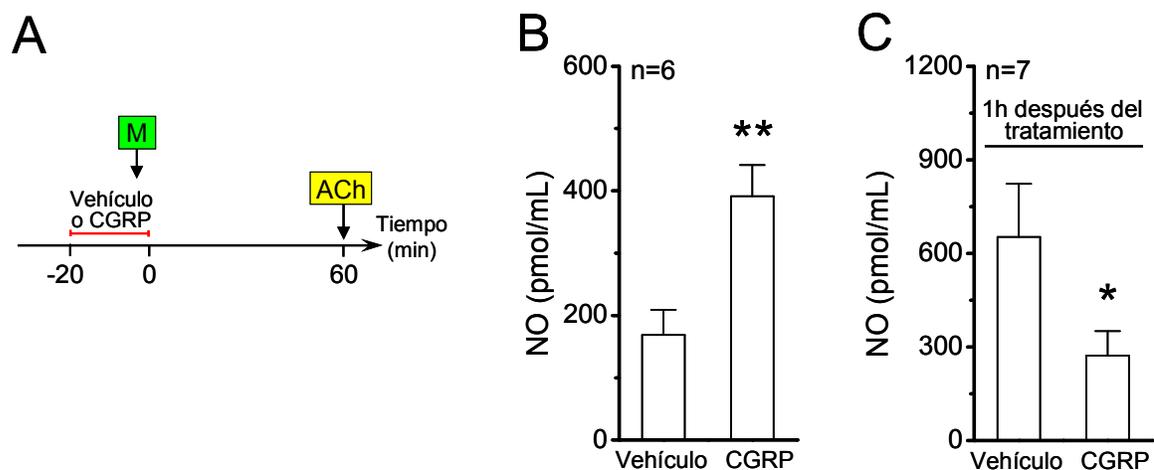


FIGURA 17. La estimulación con CGRP inhibe la producción de NO en células endoteliales. La producción de NO inducida por ACh (100 nM) o CGRP (100 nM) se analizó en un cultivo primario de células endoteliales mesentéricas. El NO se detectó usando un electrodo sensible a NO. **(A)** Esquema del protocolo experimental. La producción de NO inducida por ACh fue medida 1 h después de la estimulación transitoria (20 min) con CGRP o su vehículo. La muestra fue obtenida durante el período de estimulación con ACh. Una muestra adicional (M) fue recolectada al final del período de estimulación con CGRP. **(B)** Cuantificación de la producción de NO inducida por CGRP y su vehículo. **(C)** Cuantificación de la producción de NO inducida por ACh 1 h después del tratamiento con CGRP o su vehículo. * = $P < 0,05$ versus Vehículo; ** = $P < 0,001$ versus Vehículo. Estadística: test de t-student no pareado.

La actividad de la eNOS es regulada por fosforilación. Por lo tanto, para evaluar si la reducción en la producción del NO causada por la estimulación con capsaicina se asocia con cambios en la fosforilación de la eNOS, se evaluó el estado de fosforilación de la eNOS en los residuos serina 1177 y treonina 495 en arterias intactas. Notablemente, el nivel de fosforilación en el residuo serina 1177, pero no en treonina 495 fue reducido drásticamente 1 hora después de terminada la estimulación con capsaicina (Figura 18 A-C).

La producción de NO activada por ACh es mediada por un incremento en la concentración del calcio intracelular. Para evaluar si el CGRP regula la señalización de Ca^{2+} activada por ACh se utilizó un cultivo de células endoteliales aisladas de la red vascular mesentérica. En esta preparación se midieron los cambios del Ca^{2+} intracelular 1 h después del tratamiento con CGRP (100 nM, 20 min) o su vehículo. En condiciones control (i.e. después del tratamiento con el vehículo del CGRP), ACh (1 μM) evocó un incremento transitorio inicial de la concentración de Ca^{2+} que luego disminuyó y se estabilizó en un nivel notoriamente más bajo, pero sobre la basal (Figura 19 A y B). En contraste, el tratamiento con CGRP abolió completamente el aumento de la concentración de Ca^{2+} inducido por ACh (Figura 19 A y B).

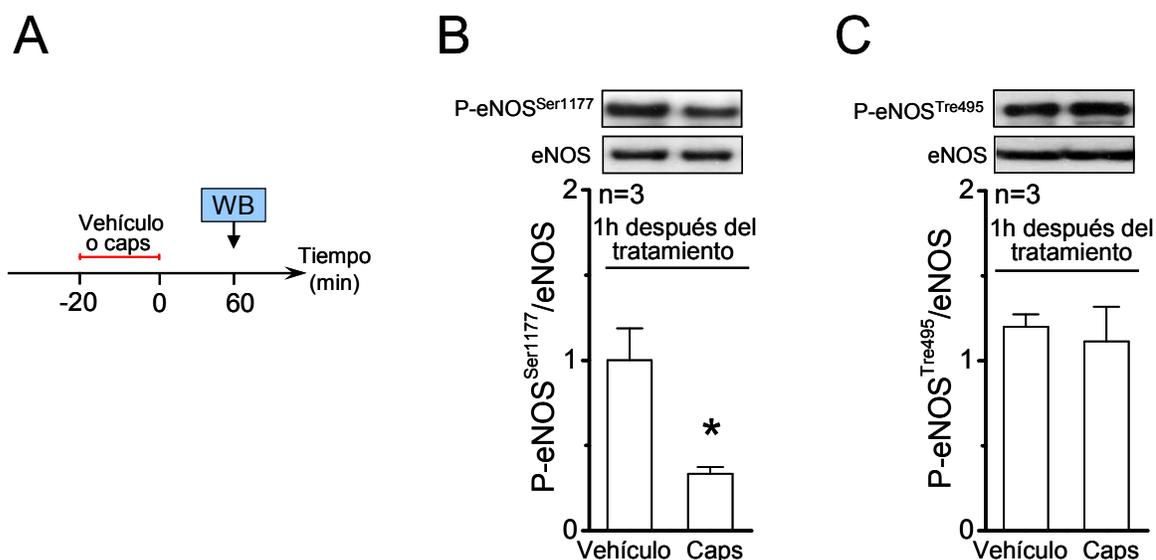


FIGURA 18. El tratamiento con capsaicina reduce el nivel de fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177. **(A)** Esquema del protocolo experimental. Los mesenterios fueron homogenizados 1 h después de la estimulación transitoria (20 min) con capsaicina (1 μ M) o con su vehículo y se cuantificaron los cambios en los niveles de fosforilación de la eNOS en serina 1177 (P-eNOS^{Ser1177}) y treonina 495 (P-eNOS^{Tre495}). **(B)** Análisis del nivel de fosforilación de la eNOS en serina 1177. **(C)** Análisis del nivel de fosforilación de la eNOS en treonina 495. Los paneles superiores muestran Western blot representativos. Los paneles inferiores presentan el análisis densitométrico de un total de tres experimentos. Caps: capsaicina; WB: Western blot. * = $P < 0,05$ versus Vehículo. Estadística: test de t-student no pareado.

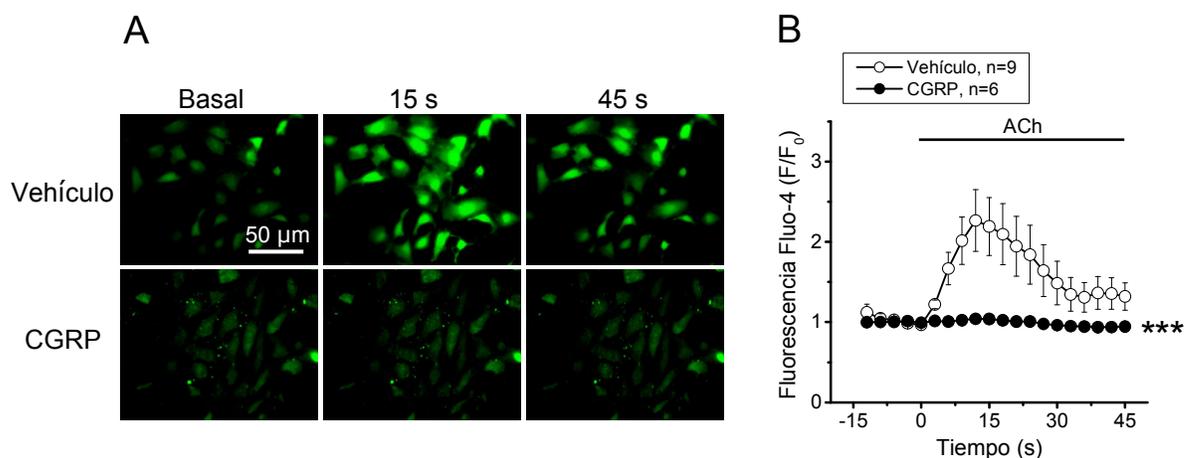


FIGURA 19. El tratamiento con CGRP inhibe la señalización de calcio activada por ACh. El cambio en los niveles de calcio intracelular se evaluó en un cultivo primario de células endoteliales aisladas de la red vascular mesentérica usando el indicador fluorescente Fluo-4. La señal de calcio activada por ACh (1 μ M) fue evaluada 1 h después de tratar las células por 20 min con CGRP (100 nM) o su vehículo. **(A)** Imágenes representativas de la señal de fluorescencia de Fluo-4 tomadas durante el período basal y 15 y 45 segundos después de la estimulación con ACh. **(B)** Análisis del curso temporal de los cambios de la fluorescencia de Fluo-4. *** = $P < 0,0001$ versus Vehículo. Estadística: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls.

1.4 La inhibición de la eNOS causada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares es mediada por los receptores CGRP-1.

En los mesenterios tratados con capsaicina en presencia del antagonista del receptor CGRP-1, el CGRP₈₋₃₇, la L-NA eliminó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) que se observó 1 h después de terminado el tratamiento (Figura 20 A y B). En estas condiciones, indometacina no afectó la vasodilatación inducida por ACh (Figura 20B). Además, el CGRP₈₋₃₇ también previno la reducción del nivel de fosforilación de la eNOS en serina 1177 observado 1 h después de la estimulación con capsaicina (Figura 20 C y D). No se detectaron cambios en la fosforilación de la eNOS en treonina 495 1 h después del tratamiento con capsaicina más el péptido CGRP₈₋₃₇ (datos no mostrados). Estos resultados confirman que la inhibición de la señalización del NO inducida por capsaicina es mediada por la liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares (sensibles a capsaicina).

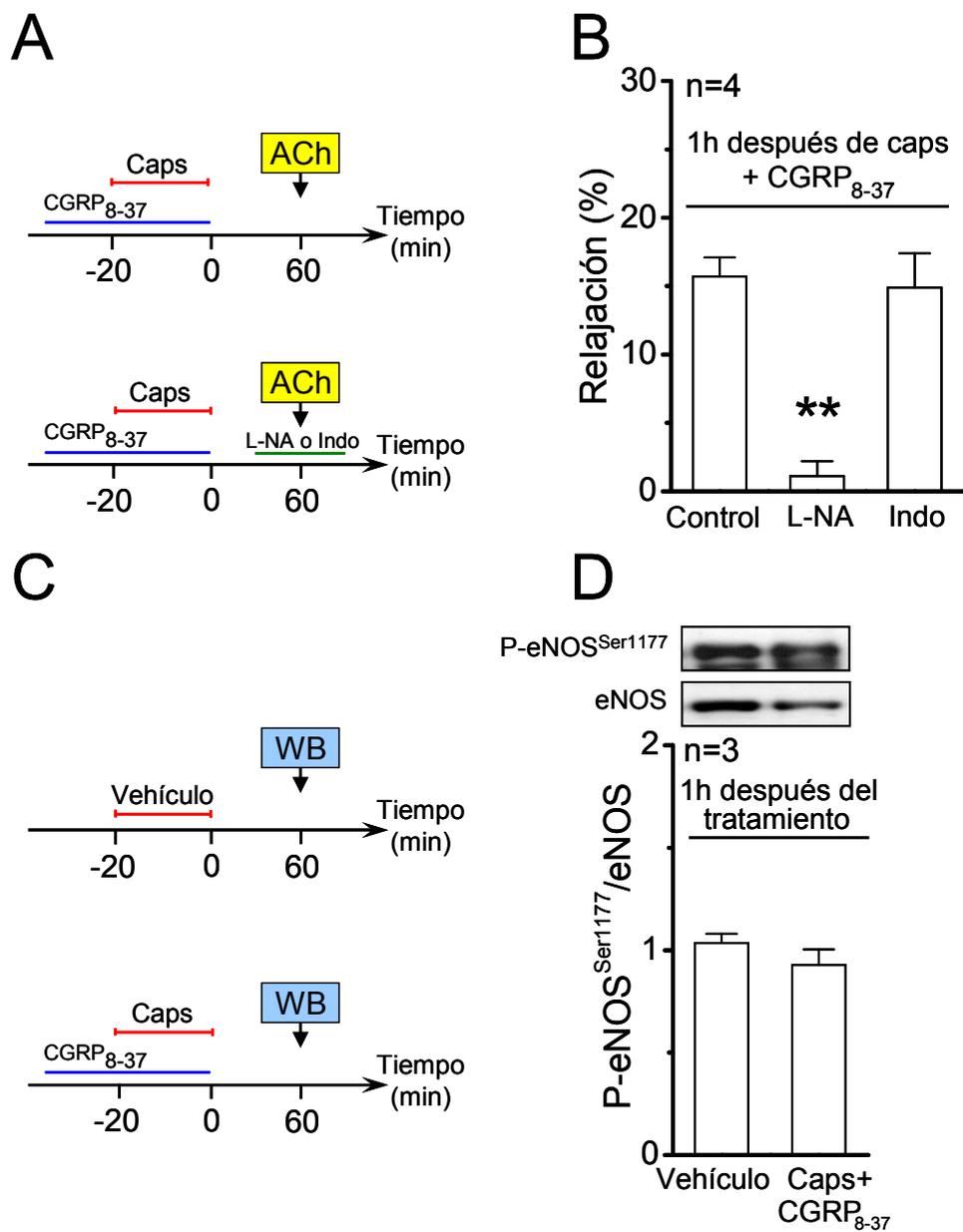


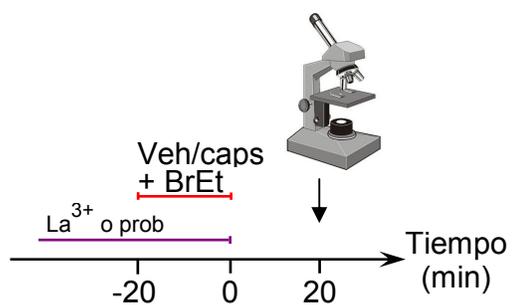
FIGURA 20. *El receptor CGRP-1 media la inhibición de la señalización del NO causada por el tratamiento con capsaicina. (A)* Esquema del protocolo experimental de (B). La relajación inducida por ACh (100 nM) se evaluó en mesenterios pre-contraídos con KCl (70 mM) 1 h después de la estimulación con capsaicina en presencia de CGRP₈₋₃₇ (300 nM). La relajación activada por ACh se evaluó en condiciones control (panel superior) o en presencia de L-NA o indometacina (panel inferior). **(B)** Cuantificación de la relajación máxima inducida por ACh. **(C)** Esquema del protocolo experimental de (D). La fosforilación de la eNOS se evaluó por Western blot en mesenterios homogenizados 1 h después del tratamiento con el vehículo de la capsaicina (panel superior) o 1 h después del tratamiento con capsaicina en presencia de CGRP₈₋₃₇ (panel inferior). **(D)** Análisis de la fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177. En el panel superior se muestra un Western blot representativo. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico. Notar que el bloqueo del receptor de CGRP previno la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO, la activación de la vasodilatación sensible a indometacina y la reducción de la fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177 causada por el tratamiento con capsaicina. Caps: capsaicina; L-NA: N⁰-nitro-L-arginina; Indo: indometacina; ACh: acetilcolina; WB: Western blot. ** = P < 0,01 versus Control. Estadística figura B: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls. Estadística figura D: test de t-student no pareado.

2 Las fibras sensoriales perivasculares regulan la función endotelial mediante la activación de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas.

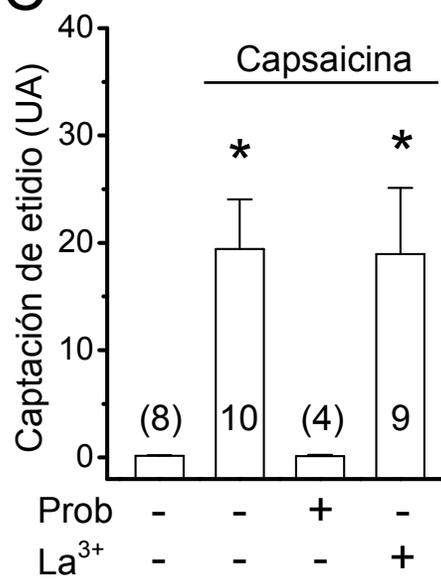
2.1 Los nervios sensoriales perivasculares controlan la activación de los canales formados por Panx-1.

El cambio en la permeabilidad de la membrana celular a través de canales tales como los formados por panexinas y hemicanales formados por conexinas se evaluó mediante la captación de etidio (Figura 21A). En condiciones control, la señal fluorescente del colorante etidio fue casi indetectable en las arterias mesentéricas (Figura 21 B y C). En contraste, capsaicina (1 μ M) indujo un fuerte incremento en la captación de etidio durante el período de estimulación (Figura 21 B y C). Probenecid, un inhibidor de los canales formados por Panx-1 previno completamente la captación inducida por capsaicina (Figura 21 B y C). Consistentemente, la captación inducida por capsaicina no fue afectada por lantano, un bloqueador de los hemicanales formados por conexinas (Figura 21 B y C).

A



C



B

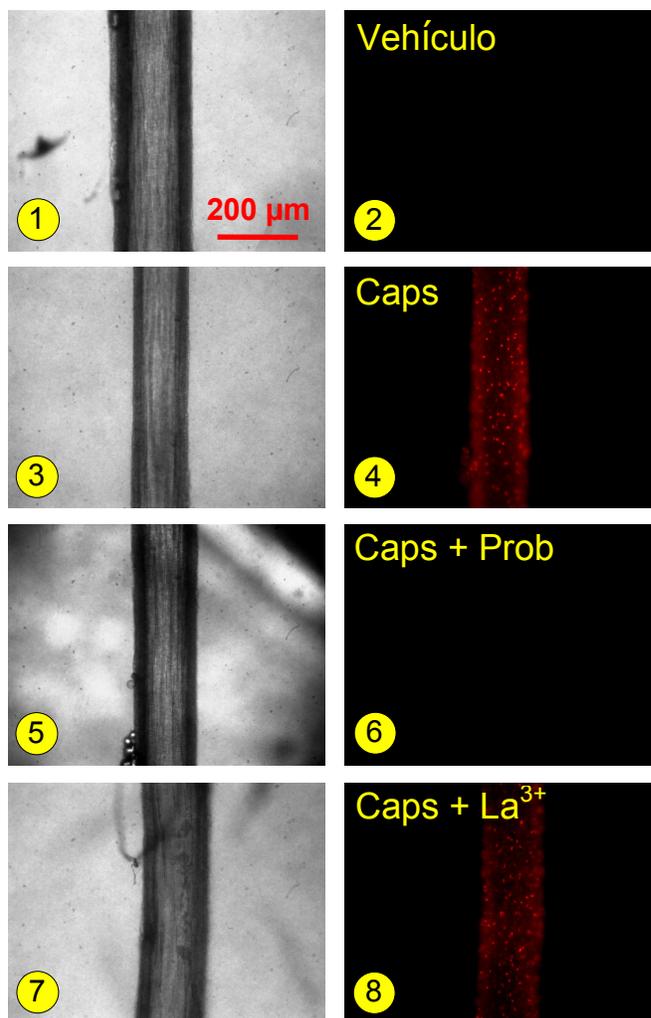


FIGURA 21. *Capsaicina incrementa la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular a través de la activación de los canales formados por Panx-1.* La activación de los canales de Panx-1 o de los hemicanales formados por conexinas se evaluó mediante la técnica de captación de colorante en la red arterial mesentérica. **(A)** Esquema del protocolo experimental. El colorante bromuro de etidio ($5\ \mu\text{M}$) se perfundió durante la estimulación con capsaicina ($1\ \mu\text{M}$, 20 min) o su vehículo, en presencia o ausencia de La^{3+} ($200\ \mu\text{M}$, bloqueador de hemicanales formados por conexinas) o probenecid ($1\ \text{mM}$, bloqueador de canales de Panx-1). Después de un período de lavado (20 min), se aislaron arterias de resistencia y se detectó la captación del etidio en la pared vascular. **(B)** Imágenes representativas de la captación de etidio en las arterias mesentéricas. Paneles 1, 3, 5 y 7: Imágenes de campo claro de los vasos correspondientes a las imágenes 2, 4, 6 y 8, respectivamente. **(C)** Cuantificación de los datos mostrados en (B). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. Veh: vehículo; Caps: capsaicina; BrEt: bromuro de etidio; Prob: probenecid; UA: unidades arbitrarias. * = $P < 0,05$ versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía.

Para confirmar la participación de los nervios sensoriales perivasculares en la captación de etidio inducida por capsaicina, se evaluó la captación de etidio en arterias mesentéricas intactas (Sham) y denervadas. Como se esperaba, en la red arterial mesentérica de animales Sham, capsaicina indujo un considerable aumento en la captación de etidio (Figura 22 A y B). En contraste, en arterias mesentéricas denervadas, capsaicina no indujo un aumento en la captación de etidio (Figura 22 A y B). Consistente con la participación de los nervios sensoriales perivasculares, la estimulación con CGRP exógeno (100 nM) indujo un considerable aumento en la captación de etidio en arterias mesentéricas, lo cual fue completamente prevenido con probenecid (Figura 23 A y B). La estimulación de la red arterial mesentérica con sustancia P (100 nM) no evocó cambios detectables en la permeabilidad de la membrana celular al colorante etidio (Figura 2A en paper adjunto, ver apéndice I).

2.2 La apertura de los canales formados por Panx-1 inducida por la activación de los nervios sensoriales perivasculares se produce en el endotelio vascular.

Para evaluar si la activación de las fibras sensoriales perivasculares induce la apertura de los canales de Panx-1 en las células endoteliales o en las células musculares de la pared vascular, se analizó la captación del colorante amarillo de lucifer. A diferencia del etidio, el amarillo de lucifer marca la célula completa y es impermeable a través de las uniones comunicantes mioendoteliales (Little *et al.*, 1995). Al igual que el etidio, no se detectó captación de amarillo de lucifer en condiciones control (Figura 24). Sin embargo, la estimulación con capsaicina (1 μ M, 20 min) o CGRP (100 nM, 10 min) incrementó la captación del colorante de manera considerable (Figura 24).

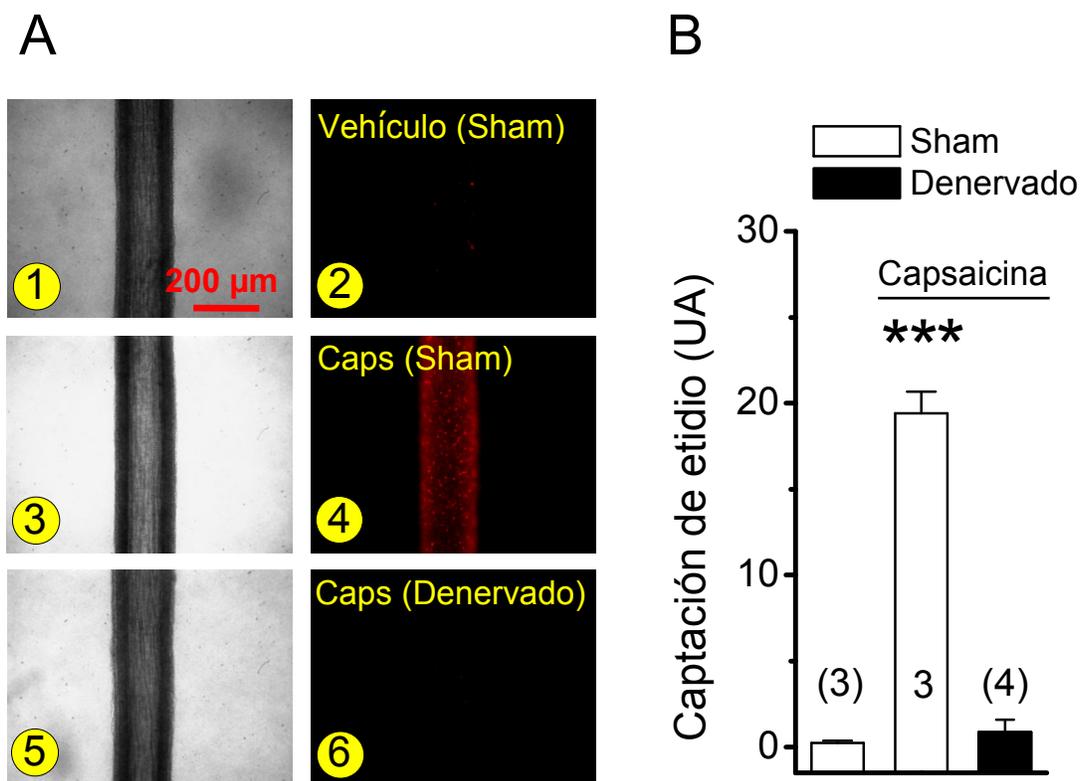


FIGURA 22. Capsaicina no incrementa la permeabilidad de membrana en la pared vascular de vasos denervados. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por Panx-1 se evaluó mediante la perfusión de bromuro de etidio ($5 \mu\text{M}$) durante la estimulación con capsaicina ($1 \mu\text{M}$, 20 min). La red arterial mesentérica se denervó mediante la aplicación de fenol en la superficie de la pared de la arteria mesentérica superior. La efectividad del protocolo de denervación se muestra en la figura 14 A y B. **(A)** Imágenes representativas de la captación de etidio en arterias mesentéricas intactas de ratas Sham y denervadas. Paneles 1, 3 y 5: Imágenes de campo claro de las imágenes 2, 4 y 6, respectivamente. **(B)** Resumen de los datos mostrados en (A). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. Caps: capsaicina; UA: unidades arbitrarias. *** = $P < 0,0001$ versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

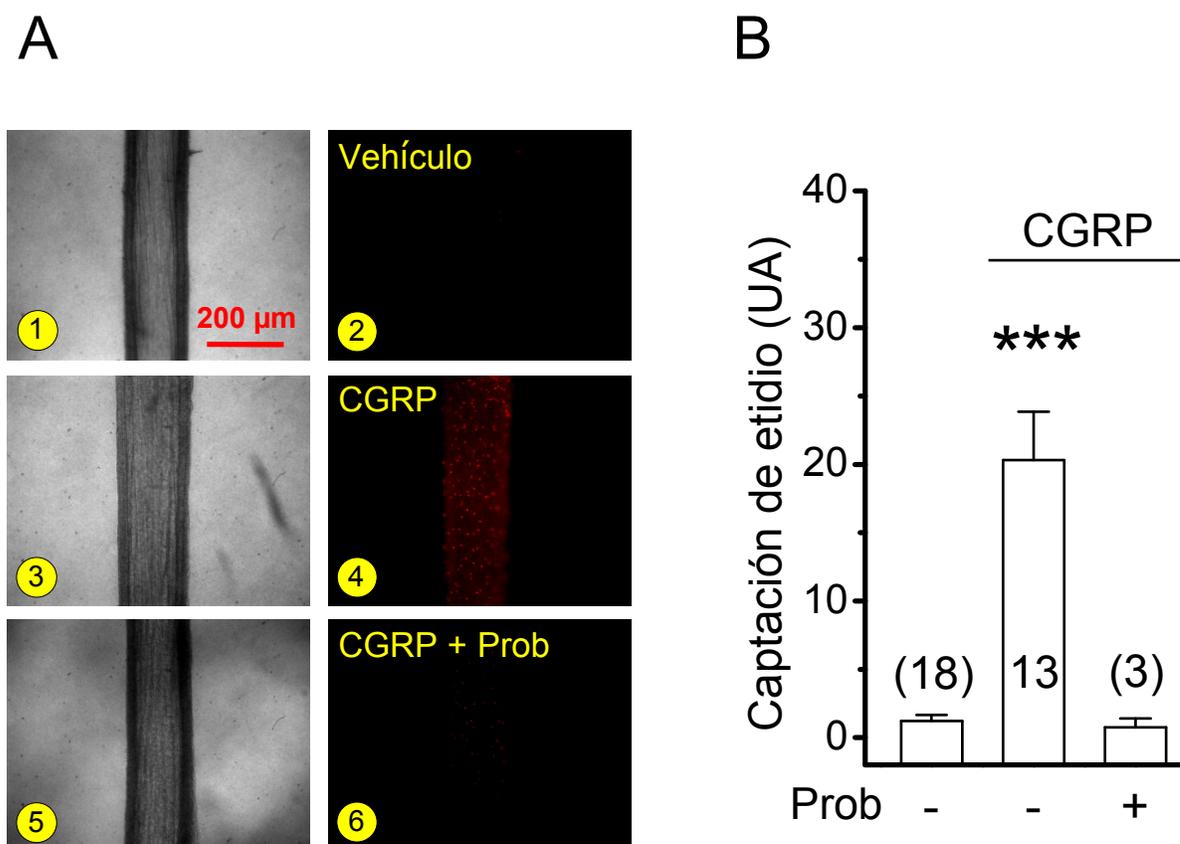


FIGURA 23. *CGRP* aumenta la permeabilidad de las células de la pared vascular mediante la activación de los canales formados por *Panx-1*. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los canales compuestos por *Panx-1* se evaluó mediante la perfusión de bromuro de etidio ($5 \mu\text{M}$) durante la estimulación con *CGRP* (100 nM , 5 min) o su vehículo. **(A)** Imágenes representativas de la captación de etidio en las arterias mesentéricas. Los paneles 1, 3 y 5 muestran las imágenes de campo claro de las figuras 2, 4 y 6, respectivamente. **(B)** Análisis de los datos mostrados en (A). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de *n*. Prob: probenecid; UA: unidades arbitrarias. *** = $P < 0,0001$ versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

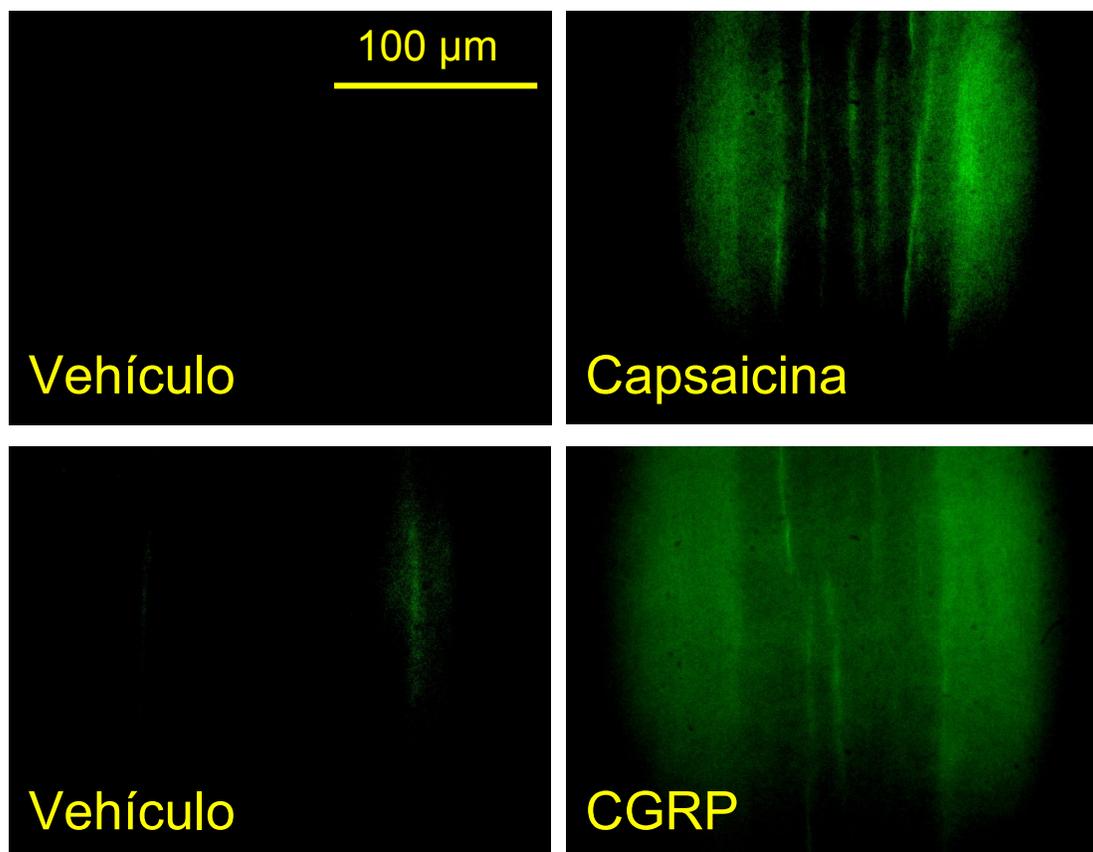


FIGURA 24. La captación del colorante amarillo de lucifer inducida por capsaicina o CGRP se restringe al endotelio vascular. El colorante amarillo de lucifer ($30 \mu\text{M}$) fue perfundido en la red arterial mesentérica durante la estimulación con capsaicina ($1 \mu\text{M}$, 20 min), CGRP (100 nM , 10 min), o sus respectivos vehículos. Notar que la captación de amarillo de lucifer inducida por capsaicina y CGRP se restringe principalmente a las células endoteliales, las cuales están dispuestas de manera paralela al eje longitudinal del vaso. En esta figura las arterias están dispuestas de forma vertical.

Notablemente, la captación del amarillo de lucifer se restringió principalmente a las células endoteliales, que se encuentran dispuestas de manera paralela al eje longitudinal del vaso (Figura 24).

Para confirmar que el CGRP abre los canales de Panx-1 en las células endoteliales, se evaluó la tasa de captación de etidio en un cultivo primario de células endoteliales aisladas de los vasos mesentéricos. Confirmando su selectividad por los nervios perivascuales, la estimulación con capsaicina (1 μ M) no afectó la tasa de captación basal de etidio en las células endoteliales (Figura 25 A y B). Sin embargo, la estimulación con CGRP (100 nM) incrementó de manera consistente la captación del etidio, lo cual se previno con el péptido CGRP₈₋₃₇ (Figura 25 A y B). Además, la captación inducida por CGRP fue completamente prevenida por probenecid o el péptido mimético de Panx-1, ¹⁰panx (Figura 25B).

2.3 Los canales de Panx-1 juegan un papel clave en la inhibición de la señalización del NO causada por el CGRP.

En mesenterios pre-contraídos con KCl, probenecid previno la inhibición de la vasodilatación inducida por ACh observada 15 min después del tratamiento con capsaicina (Figura 26A). Adicionalmente, 1 h después del tratamiento con capsaicina en presencia de probenecid, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue completamente bloqueada por L-NA y no fue afectada por indometacina (Figura 26B).

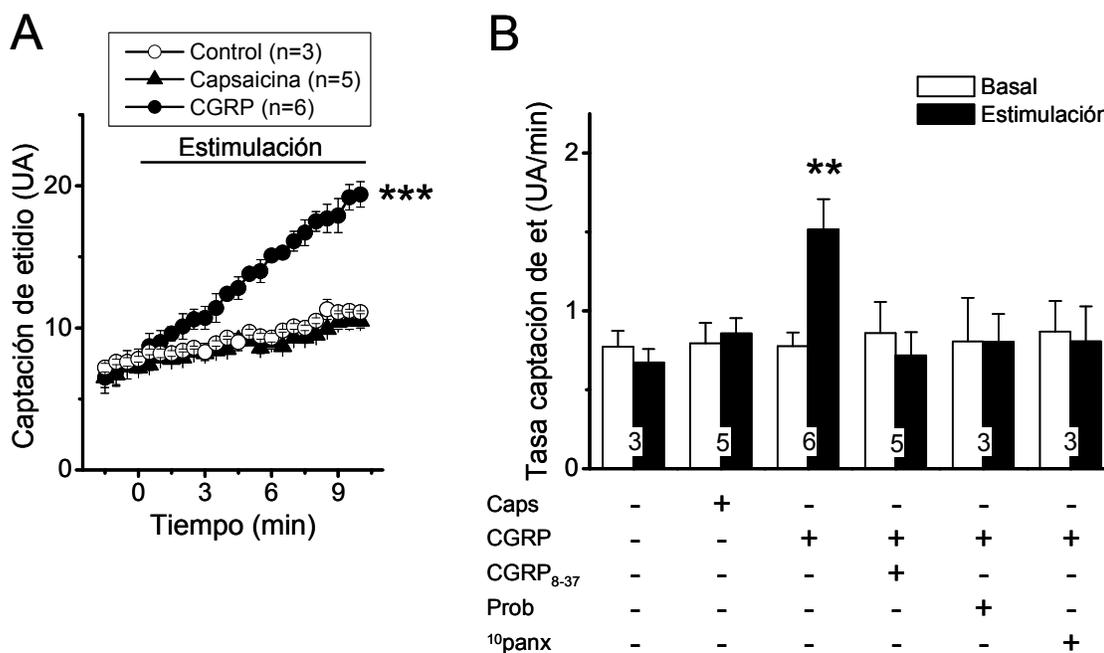


FIGURA 25. CGRP incrementa la permeabilidad de la membrana de células endoteliales mediante la activación de los canales de Panx-1. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales como los formados por Panx-1 se evaluó mediante la técnica de captación de etidio. Las células se estimularon con capsaicina (1 μ M), CGRP (100 nM) o el vehículo de CGRP. Adicionalmente, la estimulación con CGRP se realizó en presencia de CGRP₈₋₃₇ (10 μ M), probenecid (1 mM) o ¹⁰panx (60 μ M). **(A)** Curso temporal de la captación de etidio inducida por capsaicina, CGRP o el vehículo de CGRP. **(B)** Análisis de la tasa de captación de etidio (pendiente de las curvas) del período basal (barras blancas) y del período de estimulación (barras negras). Notar que la estimulación con capsaicina no afecta la tasa de captación de etidio en las células endoteliales. Los números en las barras indican el valor de n. Caps: capsaicina; Prob: probenecid; Et: etidio; UA: unidades arbitrarias. ** = P < 0,01 versus Basal; *** = P < 0,001 versus Vehículo. Estadística figura A: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls. Estadística figura B: test de t-student pareado.

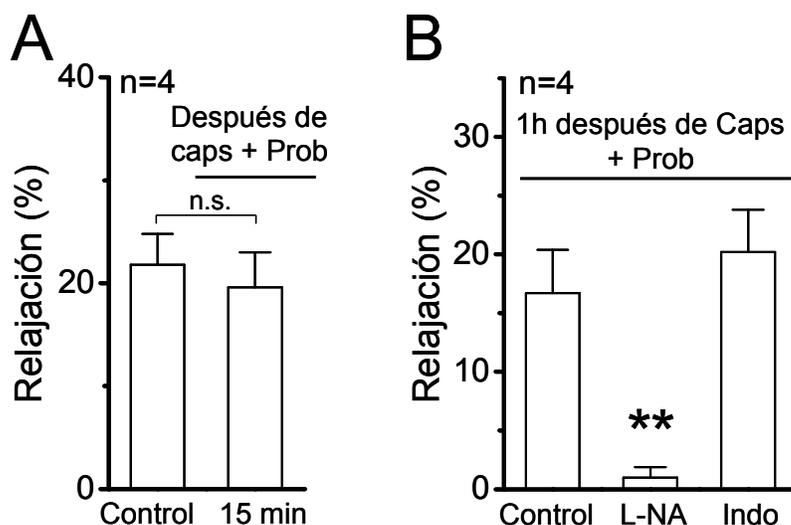


FIGURA 26. Los canales de *Panx-1* participan en la inhibición del componente vasodilatador dependiente de NO causado por el tratamiento con capsaicina. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con KCl (70 mM). La vasodilatación inducida por ACh se evaluó 15 min (A) y 1 h (B) después del tratamiento con capsaicina en presencia de probenecid (1 mM). El control en la figura A corresponde a la vasodilatación inducida por ACh antes de la estimulación de la red arterial mesentérica con capsaicina. Notar que el tratamiento con probenecid previene la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO observada a los 15 min y 1 h después del tratamiento con capsaicina. Caps: capsaicina; L-NA: N⁰-nitro-L-arginina; Indo: indometacina; Prob: probenecid. ** = P < 0,01 versus Control; n.s. = no significativo. Estadística figura A: test de t-student pareado. Estadística figura B: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Para confirmar si los canales de Panx-1 participan en la inhibición de la señalización del NO, se analizó la producción de NO en la red arterial mesentérica tratada con capsaicina en presencia del bloqueador de los canales de Panx-1, el 10 panx. La aplicación del 10 panx previno la inhibición de la producción de NO inducida por ACh (100 nM) observada 15 y 60 min después del tratamiento con capsaicina (Figura 27). Consistente con lo observado en arterias intactas, la inhibición de la producción de NO en las células endoteliales causada por el tratamiento con CGRP se previno con los péptidos CGRP₈₋₃₇ y 10 panx (Figura 28).

Consistente con lo anterior, en la red arterial mesentérica tratada con probenecid, capsaicina no afectó la fosforilación de la eNOS en la serina 1177 (Figura 29) o en la treonina 495 (datos no mostrados). Más aún, el bloqueo de los canales de Panx-1 con 10 panx previno la abolición de la señalización de Ca^{2+} activada por ACh observada 1 h después del tratamiento de las células endoteliales con CGRP (Figura 30 A y B).

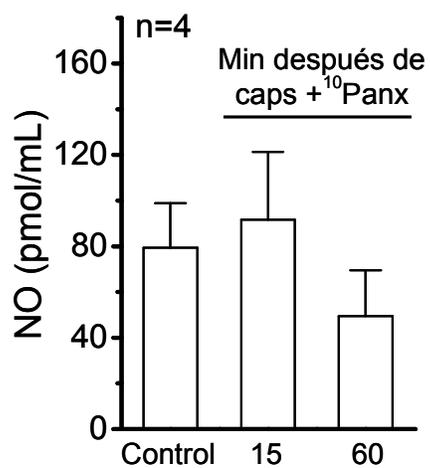


FIGURA 27. Los canales formados por *Panx-1* juegan un papel clave en la inhibición de la producción de NO causada por el tratamiento con capsaicina. La producción de NO inducida por ACh (100 nM) se evaluó en mesenterios tratados con capsaicina en presencia de 10 panx (60 μ M). Las muestras se tomaron antes (control) y 15 ó 60 min después del tratamiento. Caps: capsaicina. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

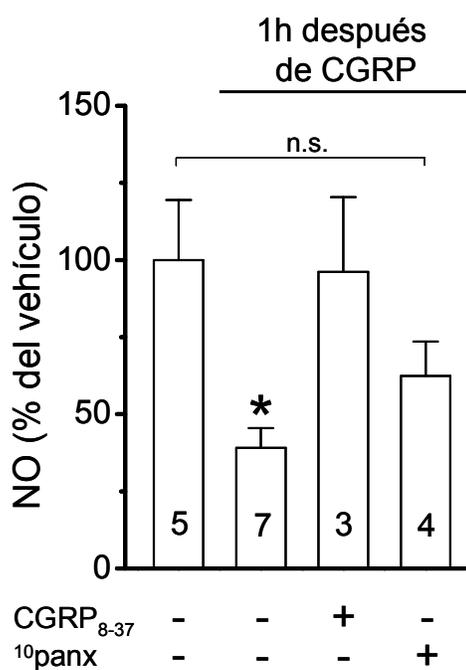


FIGURA 28. Los canales formados por *Panx-1* median la inhibición de la producción de NO inducida por CGRP en células endoteliales. La producción de NO inducida por ACh (100 nM) se analizó en un cultivo primario de células endoteliales mesentéricas. El NO se detectó usando un electrodo sensible a NO. La producción de NO inducida por ACh fue medida 1 h después de la estimulación transitoria (20 min) con CGRP (100 nM) o su vehículo en ausencia o presencia de CGRP₈₋₃₇ (10 μM) o ¹⁰panx (60 μM). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al NO producido por ACh 1 h después del vehículo. Los números en las barras indican el valor de n. * = P < 0,05 versus Vehículo (primera barra); n.s. = no significativo. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

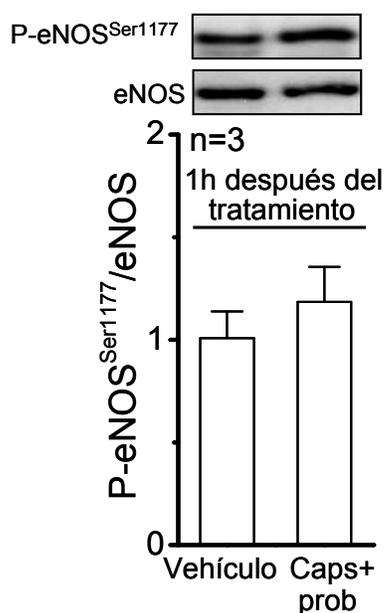


FIGURA 29. Los canales formados por *Panx-1* juegan un papel clave en el control de la fosforilación de eNOS causada por el tratamiento con capsaicina. Los niveles de fosforilación de la eNOS en serina 1177 fueron analizados en la red vascular mesentérica en condiciones control o 1 h después del tratamiento con capsaicina (1 μ M, 20 min) en presencia de probenecid (1 mM). En el panel superior se muestra un Western blot representativo y en el inferior el análisis densitométrico. Caps: capsaicina; Prob: probenecid. Estadística: test de t-student no pareado.

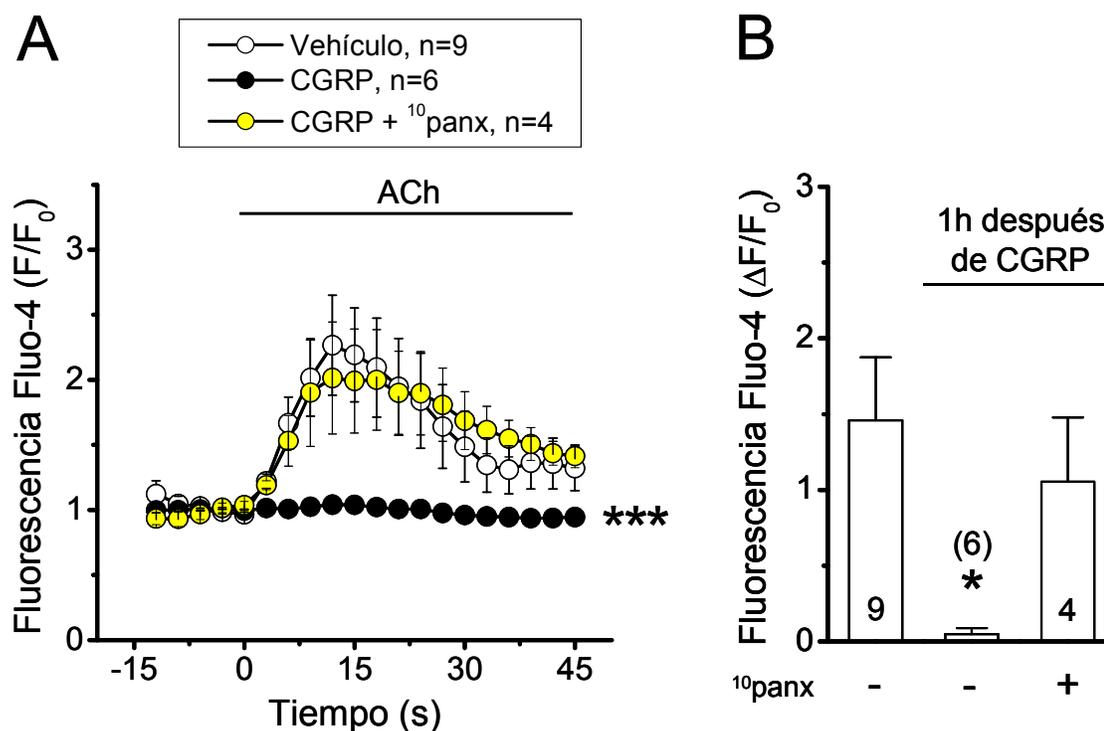
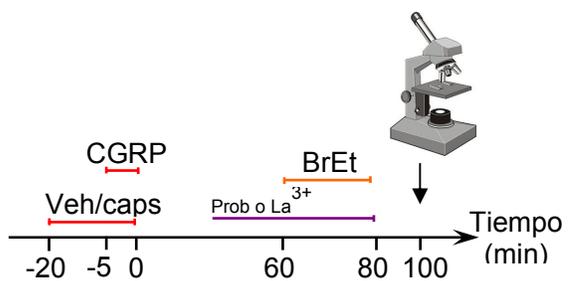


FIGURA 30. El bloqueo de los canales de Panx-1 previene la abolición de la señal de calcio activada por ACh. El cambio en los niveles globales de calcio intracelular se evaluó en un cultivo primario de células endoteliales aisladas de la red vascular mesentérica usando el indicador fluorescente Fluo-4. La señal de calcio activada por ACh (1 μ M) fue evaluada 1 h después de tratar las células por 20 min con CGRP (100 nM), su vehículo, o CGRP en presencia de ¹⁰panx (60 μ M). **(A)** Curso temporal de los cambios de la fluorescencia de Fluo-4. **(B)** Respuesta máxima (neta) inducida por ACh. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. ACh: acetilcolina. * = P < 0,05 versus Vehículo (primera barra en figura B). *** = P < 0,0001 versus Vehículo. Estadística figura A: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls. Estadística figura B: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

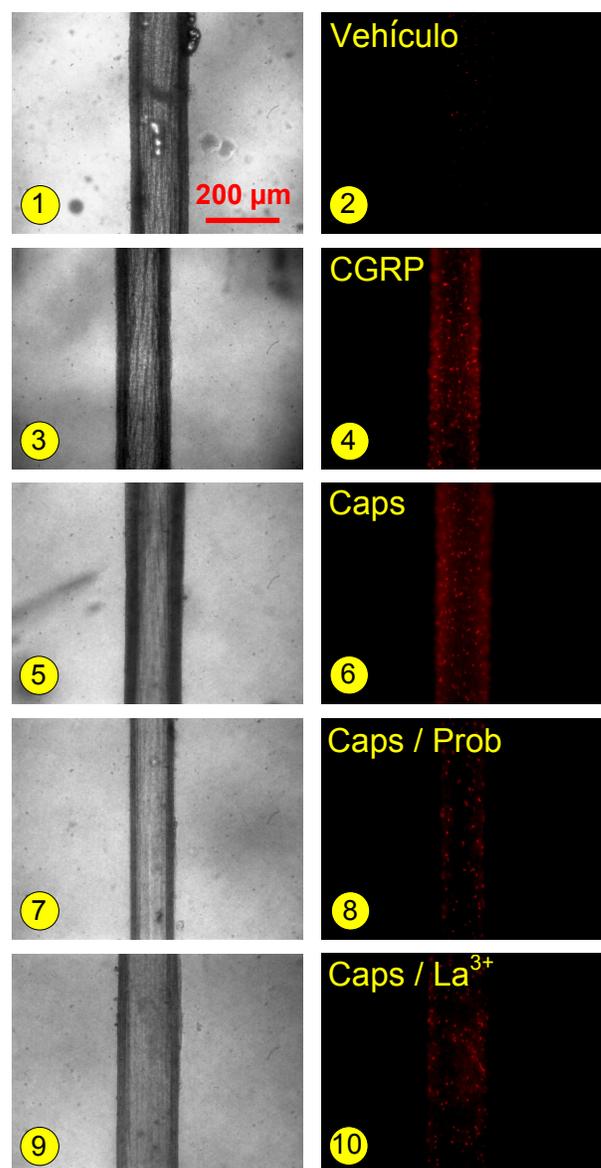
2.4 La activación del receptor CGRP-1 conduce a un incremento prolongado de la permeabilidad de la membrana endotelial a través de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas.

Para determinar si la activación de los nervios sensoriales perivasculares conduce a la activación prolongada de los canales formados por Panx-1, se perfundió el colorante bromuro de etidio 1 hora después de la estimulación transitoria de la red arterial mesentérica con CGRP (100 nM, 5 min), capsaicina (1 μ M, 20 min) o sus respectivos vehículos (Figura 31A). Como se esperaba, no se detectó captación de etidio en las arterias mesentéricas estimuladas previamente con los vehículos (Figura 31 B y C). Sin embargo, la señal fluorescente del etidio fue claramente detectada 1 hora después de la estimulación con el CGRP o la capsaicina (Figura 31 B y C). La captación observada 1 hora después de la estimulación con capsaicina fue sensible al tratamiento con lantano o probenecid (Figura 31 B y C). Notablemente, la perfusión de CGRP₈₋₃₇ o probenecid durante la estimulación con capsaicina previno completamente la captación de etidio observada 1 hora después del tratamiento con capsaicina (Figura 32 A-C).

A



B



C

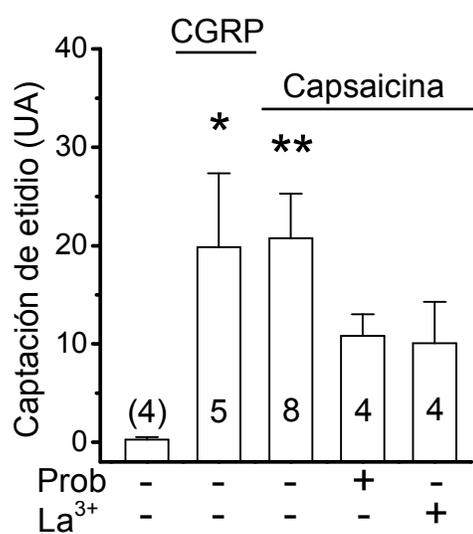


FIGURA 31. *El tratamiento con CGRP y capsaicina produce un incremento prolongado de la permeabilidad de las células de la pared vascular a través de los canales formados por Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas.* El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por conexinas o Panx-1 fue evaluado mediante la captación de etidio. **(A)** Esquema del protocolo experimental. En esta serie de experimentos, el bromuro de etidio (5 μ M) fue perfundido 1 hora después de la estimulación transitoria con CGRP (100 nM, 5 min), capsaicina (1 μ M, 20 min) o el vehículo de la capsaicina (20 min). Probenecid (1 mM) y La^{3+} (200 μ M) fueron aplicados 15 min antes de la perfusión del bromuro de etidio. **(B)** Imágenes representativas de la captación de etidio. Los paneles 1, 3, 5, 7 y 9 corresponden a las imágenes de campo claro de los vasos mostrados en 2, 4, 6, 8 y 10, respectivamente. **(C)** Resumen de los datos mostrados en (B). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. Veh: Vehículo; Caps: capsaicina; Prob: probenecid; BrEt: bromuro de etidio; UA: unidades arbitrarias. * = $P < 0,05$ versus Vehículo (primera barra); ** = $P < 0,01$ versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

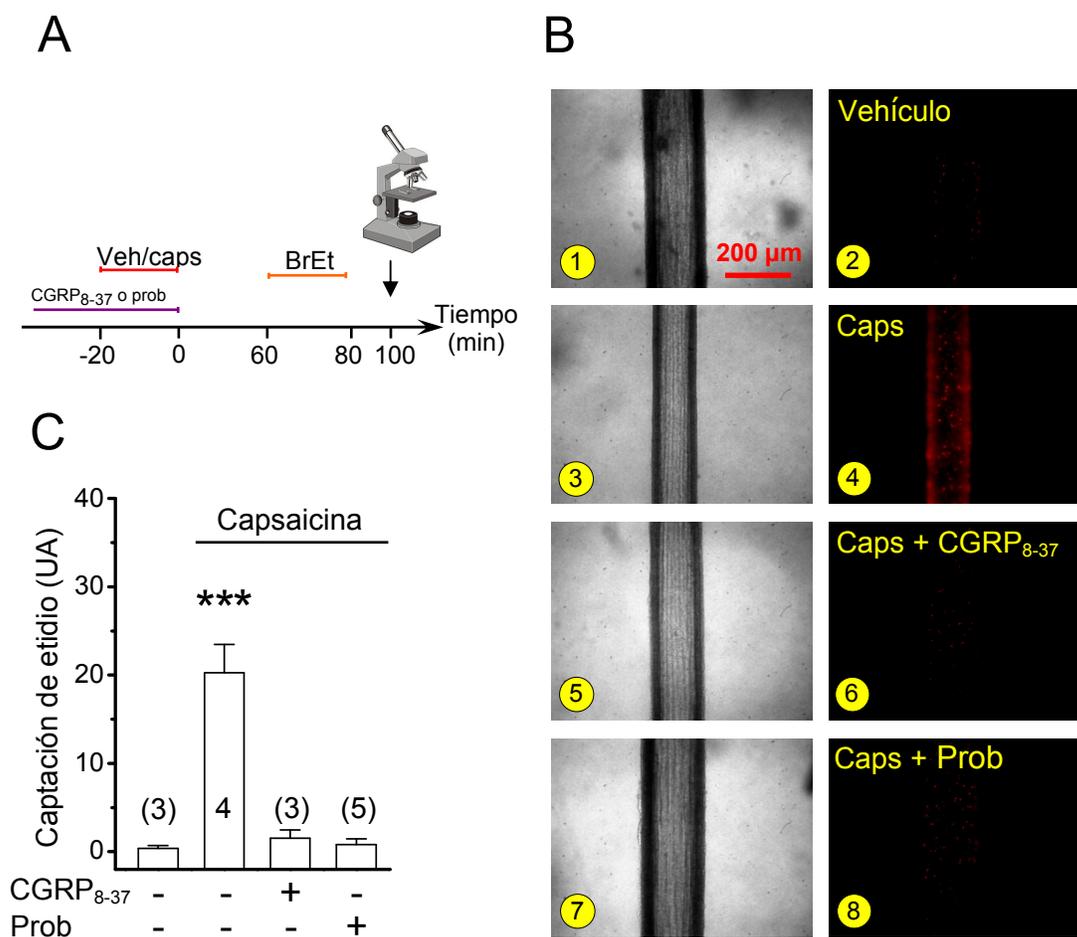


FIGURA 32. La estimulación del receptor CGRP-1 conduce a la activación prolongada de los canales de Panx-1 y al reclutamiento de los hemicanales de conexina en la pared vascular. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por conexina o Panx-1 fue evaluado mediante la captación de etidio. **(A)** Esquema del protocolo experimental. El bromuro de etidio (5 μ M) se perfundió 1 hora después de terminada la estimulación transitoria (20 min) con capsaicina (1 μ M) o su vehículo. CGRP₈₋₃₇ (300 nM) o probenecid (1 mM) fueron aplicados 15 min antes de la perfusión de la capsaicina y durante todo el período de estimulación. **(B)** Imágenes representativas de la captación de etidio en las arterias mesentéricas. Los paneles 1, 3, 5 y 7 corresponden a las imágenes de campo claro de las figuras 2, 4, 6 y 8, respectivamente. **(C)** Resumen de los datos mostrados en (B). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. Caps: capsaicina; Prob: probenecid; UA: unidades arbitrarias. *** = $P < 0,0001$ versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

El CGRP induce la producción de NO en células endoteliales durante el período de estimulación (Figura 17B). Consistente con esto, la estimulación de la red arterial mesentérica con el donador de NO, SNAP (300 nM), indujo un robusto incremento en la captación de etidio en las arterias mesentéricas (Figura 33 A-C). Sin embargo, 15 min después del lavado del SNAP no se detectó captación de etidio, sugiriendo que a diferencia del CGRP, el incremento en la permeabilidad de la membrana inducido por SNAP es transitorio (Figura 33 B y C).

Una hora después de la estimulación con el vehículo de la capsaicina, las arterias mesentéricas no captaron el colorante amarillo de lucifer (Figura 34). Sin embargo, el tratamiento con capsaicina (1 μ M) o CGRP (100 nM) condujo a un considerable incremento en la captación del amarillo de lucifer 1 h después de la estimulación (Figura 34). Notablemente, el amarillo de lucifer captado 1 h después de CGRP o capsaicina se distribuyó principalmente en el endotelio de la pared vascular (Figura 34).

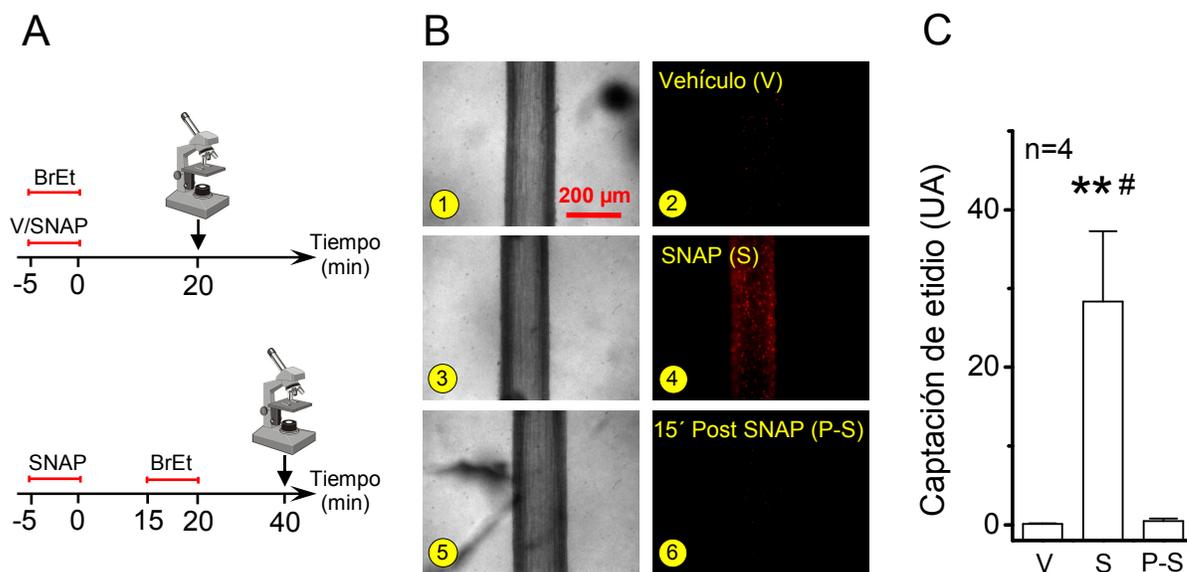


FIGURA 33. El NO induce un incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular. **(A)** Esquema del protocolo experimental. El colorante bromuro de etidio se perfundió en la red arterial mesentérica durante la estimulación con SNAP (300 nM, 5 min) o con su vehículo (panel superior), o durante el lavado (15 min después de la estimulación con SNAP) (panel inferior). **(B)** Imágenes representativas de la captación de etidio en arterias mesentéricas. Los paneles 1, 3 y 5 corresponden a las imágenes de campo claro de las figuras 2, 4 y 6, respectivamente. **(C)** Resumen de los datos mostrados en (B). BrEt: bromuro de etidio; SNAP: s-nitroso acetil penicilamina; V: vehículo; S: SNAP; P-S: post SNAP; UA: unidades arbitrarias. ** = $P < 0,01$ versus Vehículo (primera barra); # = $P < 0,01$ versus post SNAP (tercera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

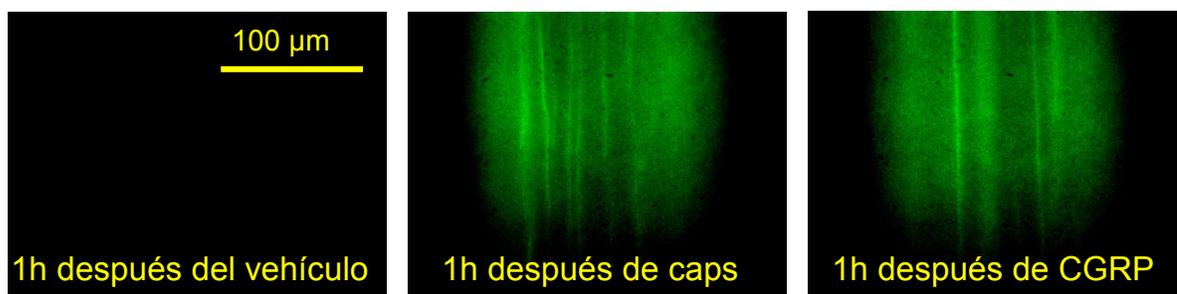


FIGURA 34. *La captación de colorante inducida por el tratamiento con capsaicina o CGRP se restringe principalmente al endotelio vascular. El colorante amarillo de lucifer (30 μ M) se perfundió en la red arterial mesentérica 1 hora después de terminada la estimulación transitoria con capsaicina (1 μ M, 20 min), CGRP (100 nM, 5 min), o el vehículo de la capsaicina (20 min). Notar que la captación del amarillo de lucifer se restringe principalmente a las células endoteliales, las cuales se disponen de manera paralela al eje longitudinal del vaso. En esta figura las arterias están dispuestas de forma vertical. Caps: capsaicina.*

2.5 Los hemicanales formados por conexinas juegan un papel importante en la inhibición de la señalización del NO causada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares.

Considerando que la actividad prolongada de los hemicanales formados por conexinas puede ser nociva para la célula, se evaluó si la activación de los hemicanales formados por conexina participa en la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO causada por el tratamiento con capsaicina. Para este fin, se bloquearon los hemicanales de conexina durante la estimulación con capsaicina. En mesenterios pre-contraídos con KCl, la aplicación de La^{3+} durante el tratamiento con capsaicina no afectó la inhibición temprana de la vasodilatación inducida por ACh (100 nM) (Figura 35A). Sin embargo, una hora después del tratamiento con capsaicina, el tratamiento con La^{3+} sí previno la inhibición de la señalización del NO, pues la respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue abolida con L-NA y fue insensible a indometacina (Figura 35B).

2.6 La liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares induce la activación de los canales de Panx-1 a través de la vía PKA-NO.

La captación de etidio inducida por capsaicina (1 μM) en las arterias de resistencia fue completamente prevenida por el CGRP_{8-37} , el KT-5720 (inhibidor de la PKA), y la L-NA (Figura 36 A-C). Consistente con estos resultados, la captación inducida por CGRP (100 nM) también fue prevenida totalmente por el CGRP_{8-37} , el KT-5720, y la L-NA (Figura 37 A y B).

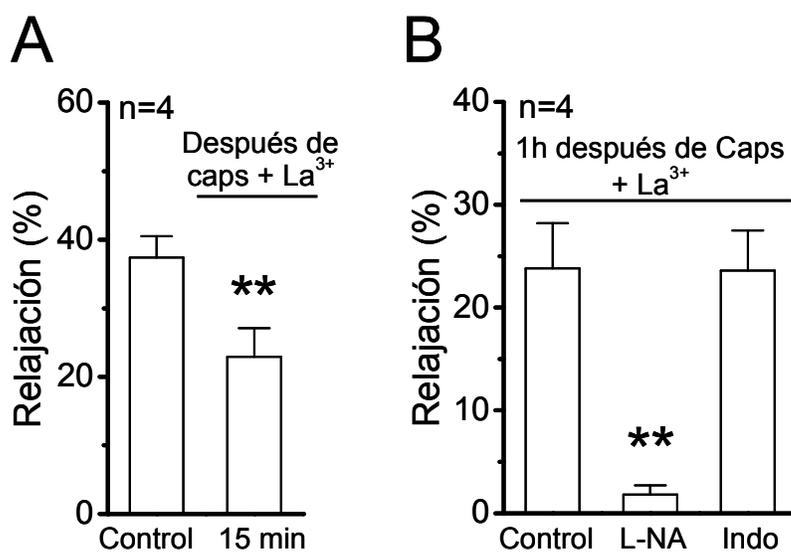
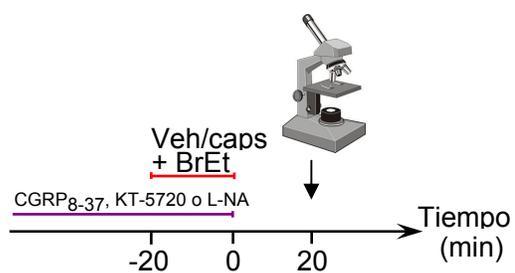
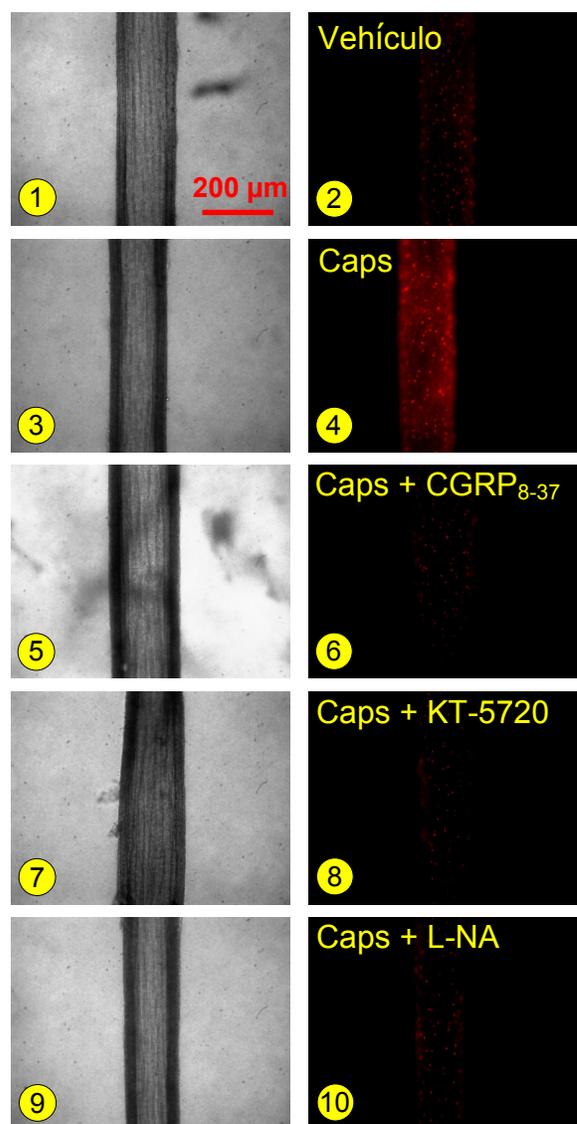


FIGURA 35. Los hemicanales formados por conexinas participan en la inhibición del componente vasodilatador dependiente de NO causado por el tratamiento con capsaicina. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con KCl (70 mM). La vasodilatación inducida por ACh se evaluó 15 min (A) y 1 h (B) después del tratamiento con capsaicina en presencia de La^{3+} (200 μM). El control en la figura A corresponde a la vasodilatación inducida por ACh antes de la estimulación de la red arterial mesentérica con capsaicina. Notar que el tratamiento con La^{3+} previene la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO detectada 1 h después de la estimulación con capsaicina, pero no la inhibición de la vasodilatación mediada por NO observada a los 15 min. Caps: capsaicina; L-NA: N^0 -nitro-L-arginina; Indo: indometacina. ** = $P < 0,01$ versus Control. Estadística figura A: test de t-student pareado. Estadística figura B: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

A



B



C

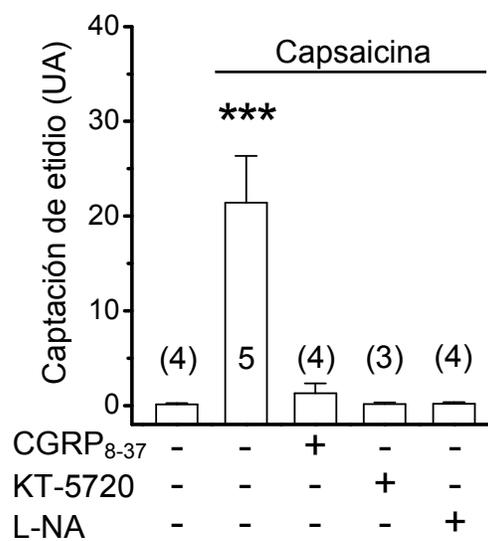


FIGURA 36. *La apertura de los canales de Panx-1 inducida por capsaicina depende de la activación del receptor CGRP-1 y la posterior activación de la vía PKA-NO.* El cambio en la permeabilidad de la membrana celular a través de canales como los formados por Panx-1 se evaluó mediante la captación de etidio. **(A)** Esquema del protocolo experimental. El bromuro de etidio (5 μ M) se perfundió durante la estimulación con capsaicina (1 μ M, 20 min) o su vehículo, en ausencia o presencia de CGRP₈₋₃₇ (300 nM, antagonista del receptor CGRP-1), KT-5720 (500 nM, inhibidor de la PKA) o L-NA (100 μ M, bloqueador de la NOS). **(B)** Imágenes representativas de la captación de etidio inducida por capsaicina o su vehículo. Los paneles 1, 3, 5, 7 y 9 corresponden a las imágenes de campo claro de los vasos mostrados en 2, 4, 6, 8 y 10, respectivamente. **(C)** Resumen de los datos mostrados en (B). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. Caps: capsaicina; L-NA: N⁰-nitro-L-arginina; UA: unidades arbitrarias. *** = P < 0,0001 versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

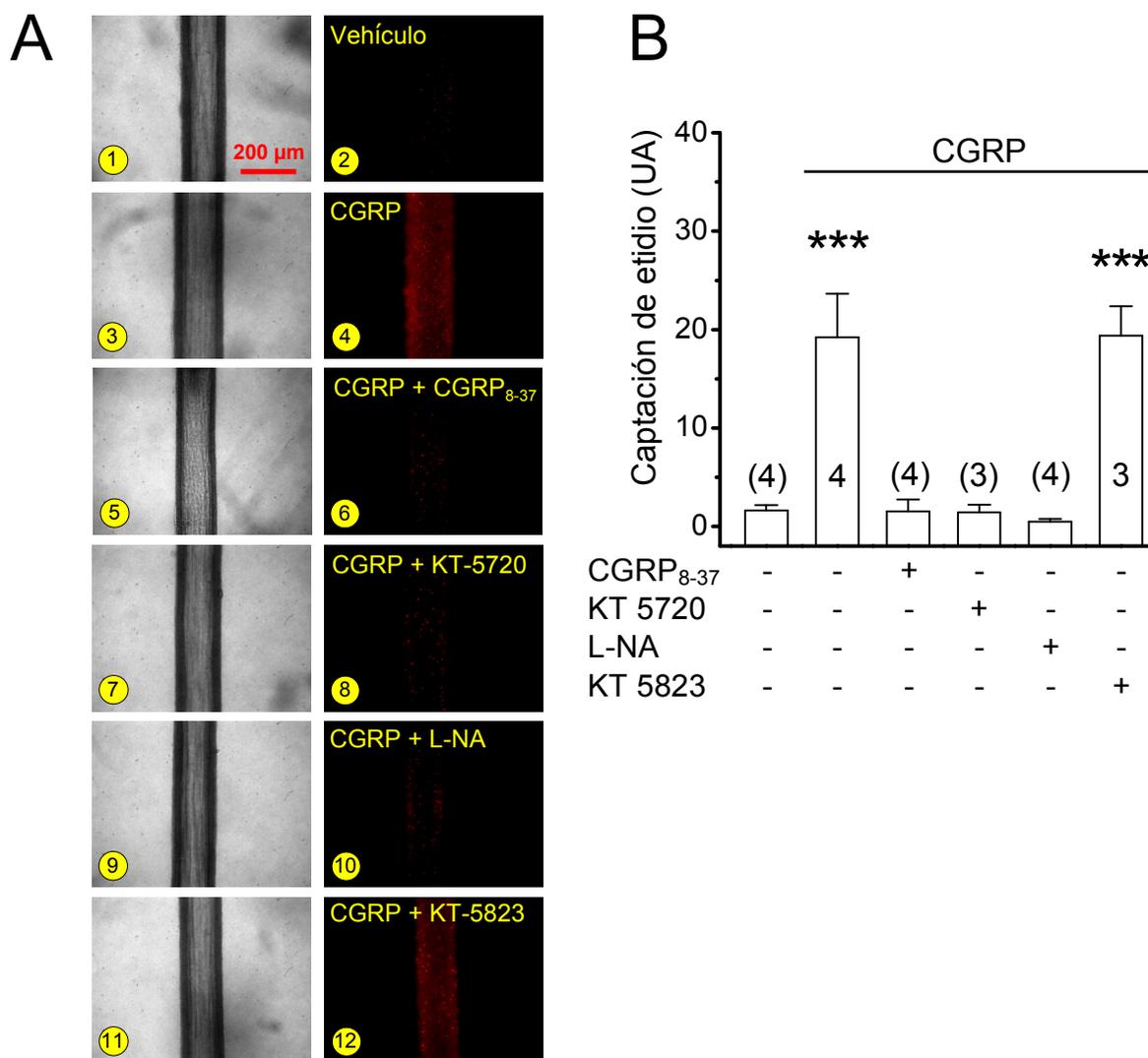


FIGURA 37. La apertura de los canales de *Panx-1* inducida por CGRP depende de la activación del receptor CGRP-1 y la posterior activación de la vía PKA-NO. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales como los formados por *Panx-1* se evaluó mediante la técnica de captación de etidio. El protocolo experimental fue similar al mostrado en la figura 36A con la excepción de que el estímulo se realizó con CGRP (100 nM, 5 min). El bromuro de etidio (5 μ M) se perfundió durante la estimulación con CGRP o su vehículo, en ausencia o presencia de CGRP₈₋₃₇ (300 nM, antagonista del receptor CGRP-1), KT-5720 (500 nM, inhibidor de la PKA), L-NA (100 μ M, bloqueador de la NOS) o KT-5823 (1 μ M, inhibidor de la PKG). **(A)** Imágenes representativas de la captación de etidio inducida por CGRP o su vehículo. Los paneles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 corresponden a las imágenes de campo claro de los vasos mostrados en 2, 4, 6, 8, 10 y 12, respectivamente. **(B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia de los datos mostrados en (A). Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. L-NA: N^o-nitro-L-arginina; UA: unidades arbitrarias. *** = $P < 0,0001$ versus Vehículo (primera barra). Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

En contraste, la captación inducida por CGRP no fue prevenida por el inhibidor de la PKG, el KT-5823 (Figura 37 A y B).

3 Las fibras sensoriales perivasculares regulan la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes.

3.1 La liberación de CGRP desde los terminales sensoriales perivasculares inhibe el acoplamiento celular en arterias mesentéricas.

Para evaluar si la activación de los nervios sensoriales perivasculares regula la comunicación entre las células de la pared vascular se evaluó el acoplamiento intercelular mediante la técnica de acoplamiento de colorante. En condiciones control, el colorante etidio difundió rápidamente (< 1 min) entre las células de la pared vascular (Figura 38 A-C). Sin embargo, la estimulación transitoria de la red arterial mesentérica con capsaicina ($1 \mu\text{M}$, 20 min) condujo a una drástica reducción en la difusión del etidio (Figura 38 D-F). La aplicación exógena de CGRP (100 nM , 20 min) imitó el efecto de la capsaicina sobre la difusión del colorante (Figura 38 G-I). En las arterias tratadas con capsaicina o CGRP, el etidio difundió a unas pocas células vecinas de la célula microinyectada y no se observó difusión del colorante incluso 15 min después de la microinyección (Figura 38 D-I).

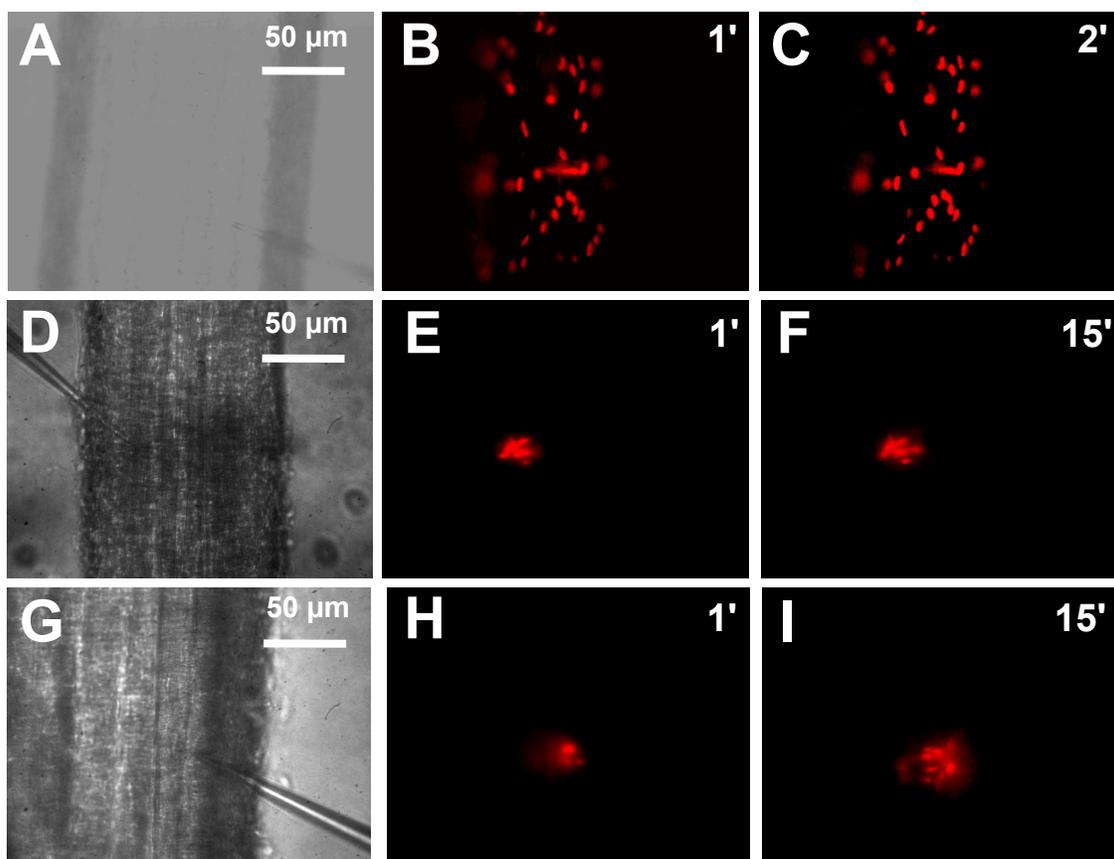


FIGURA 38. *El tratamiento con capsaicina o CGRP bloquea el acoplamiento intercelular en la pared vascular.* El acoplamiento celular se evaluó mediante la microinyección de bromuro de etidio (25 mM) en la pared vascular 1 hora después de tratar el mesenterio con capsaicina (1 μ M, 20 min), CGRP (100 nM, 20 min) o el vehículo de CGRP. **(A-C)** En condiciones control (vehículo), el etidio microinyectado difunde rápidamente a las células vecinas. **(D-F)** La activación de las fibras sensoriales con capsaicina bloquea la difusión del colorante. **(G-I)** La aplicación exógena de CGRP imita el efecto de capsaicina. **(A, D, G)** Imágenes de campo claro mostrando la localización de la micropipeta utilizada en la microinyección.

3.2 Las fibras sensoriales perivasculares regulan la vasodilatación dependiente de uniones comunicantes.

Como se esperaba, en mesenterios pre-contraídos con fenilefrina, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) fue drásticamente bloqueada por β -GA, un inhibidor de uniones comunicantes (Figura 39A). En contraste, en los mesenterios tratados con capsaicina el β -GA no afectó la vasodilatación inducida por ACh sugiriendo que el tratamiento con capsaicina inhibe el componente vasodilatador mediado por uniones comunicantes (Figura 39B).

4 La activación transitoria de las fibras sensoriales perivasculares afecta la función vascular por al menos tres horas.

4.1 La activación del receptor CGRP-1 y posterior apertura de los canales de Panx-1 regula la expresión de proteínas claves en el control de la función vascular.

Para evaluar si el CGRP controla la función vascular a largo plazo, se analizaron, en la red vascular mesentérica, los niveles de algunas proteínas importantes para la función vascular. La activación de las fibras sensoriales con capsaicina (1 μ M, 20 min) no afectó significativamente la expresión de la eNOS, la Cx32, la Cx43, la Panx-1 ni la Panx-2, 1 hora después del tratamiento (Figuras 3 y 4 en paper adjunto, ver apéndice I). Sin embargo, 3 horas después del tratamiento con capsaicina se detectó una reducción significativa de los niveles de Panx-1 (Figura 3A en paper adjunto, ver apéndice I).

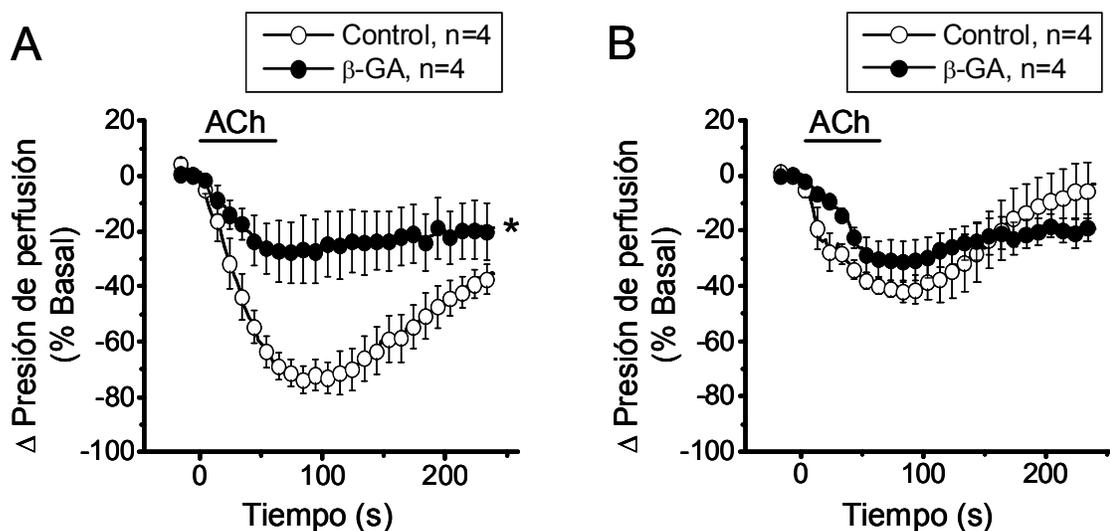


FIGURA 39. El tratamiento con capsaicina inhibe la vasodilatación dependiente del endotelio mediada por uniones comunicantes. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) fue evaluada en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina (60 μ M). La vasodilatación producida por ACh se estudió en la red arterial mesentérica 1 hora después de la estimulación transitoria (20 min) con 1 μ M capsaicina (B) o con su vehículo (A). **(A)** Curso temporal de la vasodilatación inducida por ACh en condiciones control y en presencia del bloqueador de uniones comunicantes, β -GA (50 μ M). **(B)** Curso temporal de la vasodilatación inducida por ACh en mesenterios tratados con capsaicina en condiciones control y en presencia de β -GA. Notar que el tratamiento con capsaicina reduce la respuesta vasodilatadora observada en condiciones control (círculos blancos) y previene el efecto inhibitor de β -GA observado en (A) (círculos negros). β -GA: ácido 18- β -glicirretínico; ACh: acetilcolina. * = $P < 0,05$ versus Control. Estadística: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls.

Notablemente, la presencia del CGRP₈₋₃₇ o probenecid previno la disminución en la expresión de Panx-1 observada 3 horas después del tratamiento de la red arterial con capsaicina, sugiriendo que el receptor CGRP-1 y los canales de Panx-1 participan en el control de la expresión de Panx-1 (Figura 3A en paper adjunto, ver apéndice I). En mesenterios tratados con capsaicina, la expresión de la eNOS también decayó significativamente tres horas después del tratamiento (Figura 3B en paper adjunto, ver apéndice I). Notablemente, el tratamiento con CGRP₈₋₃₇ aumentó la expresión de la eNOS tres horas después de la aplicación de capsaicina (Figura 3B en paper adjunto, ver apéndice I). Por otro lado, el tratamiento con probenecid previno la disminución de la expresión de la eNOS observada tres horas después del tratamiento con capsaicina (Figura 3B en paper adjunto, ver apéndice I). Finalmente, la estimulación con capsaicina no afectó la expresión de la Cx32, de la Cx43 ni de la Panx-2 (Figura 4 en paper adjunto, ver apéndice I).

DISCUSIÓN

En la vasculatura, las arterias de resistencia cumplen un papel esencial en el control de la resistencia periférica total y la regulación de la distribución del flujo sanguíneo. Lejos de ser tubos rígidos que conducen la sangre a los tejidos, las arterias de resistencia regulan finamente el diámetro del vaso, lo cual permite aumentar o reducir el flujo de la sangre de acuerdo a las demandas metabólicas. Los cambios en el diámetro de las arterias de resistencia dependen del control del tono vasomotor. El tono vasomotor se refiere al grado de contracción del músculo liso vascular y depende del balance entre las señales vasoconstrictoras y vasodilatadoras. Las células endoteliales que recubren el lumen de las arterias de resistencia juegan un rol clave en el control del tono vasomotor mediante la producción de agentes vasodilatadores, principalmente NO, EDHF y prostaglandinas. Además de las células endoteliales, se ha propuesto que los nervios sensoriales perivasculares también están involucrados en el control del tono vasomotor mediante la liberación de agentes vasodilatadores, principalmente, el CGRP y la sustancia P. Sin embargo, se desconoce si la activación de estos nervios regula a largo plazo la producción y/o acción de los agentes vasodilatadores derivados del endotelio o la función vascular. Por lo tanto, en este trabajo, se analizaron los mecanismos involucrados en la regulación de la vasodilatación dependiente del endotelio por los nervios sensoriales perivasculares en arterias de resistencia. Ya que la comunicación a través de canales

intercelulares es esencial en la coordinación de las respuestas vasomotoras en las arterias de resistencia, también se exploró si la activación de los nervios sensoriales perivasculares regula la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes.

Los principales descubrimientos obtenidos en esta tesis son que la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares conduce a un desbalance de los componentes vasodilatadores derivados del endotelio. En este sentido, la activación de las fibras conlleva a la inhibición progresiva de la producción de NO mediante una vía dependiente del receptor de CGRP, el CGRP-1, y de la subsecuente activación prolongada de los canales de membrana formados por conexinas y Panx-1 en el endotelio vascular. La inhibición de la señalización del NO gatilla la activación de un componente vasodilatador compensatorio dependiente de prostaglandinas. Finalmente, la activación de las fibras conlleva a un desacoplamiento de las células de la pared vascular, lo cual está íntimamente asociado a un bloqueo de las respuestas vasodilatadoras dependientes de uniones comunicantes.

1 Desbalance de los componentes vasodilatadores derivados del endotelio

Para evaluar la función endotelial en arterias de resistencia, se estudió la respuesta vasodilatadora inducida por ACh en la red arterial mesentérica de rata. La utilización de ACh como herramienta para estudiar los componentes vasodilatadores derivados del endotelio es ampliamente reconocida en el campo de la biología vascular (Tousoulis *et al.*, 2005). ACh es un vasodilatador dependiente del endotelio que induce relajación de manera concentración-

dependiente en arterias mesentéricas (Figura 5) (Gaete *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2013b). Ya que el EC₅₀ de la respuesta máxima inducida por ACh es cercano a 100 nM, se decidió usar esta concentración en la gran mayoría de los experimentos realizados en este trabajo.

En la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina, la vasodilatación inducida por ACh dependió parcialmente de NO pero no de la producción de prostaglandinas (Figura 6B). Estos datos son consistentes con reportes que indican que la relajación inducida por ACh en arterias mesentéricas no depende de prostaglandinas, sino que de la producción de NO y de la transmisión de una señal generada en el endotelio que conlleva a la hiperpolarización del músculo liso (i.e. el EDHF, ver figura 39A) (Adeagbo y Triggle, 1993; Hwa *et al.*, 1994; Gaete *et al.*, 2012). Notablemente, una hora después de la activación transitoria (20 min) de los nervios sensoriales perivasculares con capsaicina, la magnitud de la vasodilatación máxima inducida por ACh fue similar a la observada en condiciones control (i.e. mesenterios que no fueron estimulados con capsaicina; ver figura 6C). Sin embargo, en estas condiciones la respuesta vasodilatadora inducida por ACh no fue afectada por L-NA indicando que, tras la estimulación de los nervios sensoriales perivasculares, la vasodilatación inducida por ACh no dependió de la producción de NO. Consistente con esto, el bloqueo de las COXs con indometacina, inhibió la vasodilatación inducida por ACh en los mesenterios pre-contraídos con fenilefrina tratados con capsaicina en una magnitud similar a la vasodilatación inhibida por L-NA en los mesenterios no tratados con capsaicina (Figura 6). Este resultado sugiere que la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares no solo inhibe el componente de NO sino que además activa un componente vasodilatador compensatorio que depende de la producción de prostaglandinas. Notablemente, Crossman *et al.* mostraron que el tratamiento

con CGRP potencia la producción de prostaciclina inducida por bradicinina en células endoteliales (Crossman *et al.*, 1987). Estos antecedentes sugieren fuertemente que la activación de la producción de prostaglandinas es mediado por la liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares.

Para visualizar mejor la inhibición de la señalización del NO, se eliminó el componente vasodilatador mediado por EDHF (resistente a L-NA e indometacina) pre-contrayendo la red arterial mesentérica con una solución alta en potasio (70 mM KCl). Bajo estas condiciones, la gradiente electroquímica del K^+ se reduce de tal forma que no se producen corrientes hiperpolarizantes como consecuencia de la apertura de los canales de K^+ . Por lo tanto, durante la contracción inducida por la solución alta en potasio, cualquier respuesta vasodilatadora observada no dependerá de la hiperpolarización del endotelio o del músculo liso. Ya que, dependiendo del territorio vascular, el NO producido en el endotelio puede causar vasodilatación mediante mecanismos dependientes de la hiperpolarización del músculo liso (Murphy y Brayden, 1995; Yuan *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997), antes de realizar los experimentos, se analizó si la respuesta vasodilatadora inducida por NO en la red arterial mesentérica es mediada por la hiperpolarización del músculo liso. En este contexto, se encontró que la vasodilatación dependiente de NO no es mediada por hiperpolarización ya que la vasodilatación inducida por NO exógeno (SNAP) fue idéntica en la red arterial pre-contraída con KCl y la pre-contraída con fenilefrina (Figura 9).

En mesenterios pre-contraídos con KCl, la vasodilatación inducida por ACh, dependió completamente de NO (Figura 10B), lo cual es consistente con lo descrito en otros trabajos

(Gaete *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2013b). Una hora después de la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares, la magnitud de la respuesta vasodilatadora máxima inducida por ACh fue similar a la observada en condiciones control (Figura 10C). Sin embargo, al igual que lo observado en los mesenterios pre-contraídos con fenilefrina, la vasodilatación fue insensible a L-NA y parcialmente inhibida con indometacina, lo cual confirma que la estimulación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares conduce a la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO y a la activación de un componente vasodilatador compensatorio que depende principalmente de la producción de prostaglandinas (Figura 10).

En este trabajo se encontró que la producción de NO inducida por ACh estaba drásticamente inhibida 15 min después de la estimulación con capsaicina (Figura 16). Sin embargo, la activación del componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas fue detectable solo a los 60 min (Figura 6 y 10) y no a los 15 min después del tratamiento con capsaicina (Figura 11). Estos datos sugieren que la activación del componente de prostaglandinas se encuentra río abajo de la inhibición del NO. Interesantemente, diversos reportes, indican que la producción de prostaglandinas es regulada por el NO (Salvemini *et al.*, 1993; Stadler *et al.*, 1993; Clancy *et al.*, 2000). De esta manera, se hipotetizó que la activación de las prostaglandinas requiere de un período prolongado de inhibición de la producción del NO. Por esta razón, para determinar si la inhibición del NO conduce a la activación de las prostaglandinas, se evaluó la sensibilidad a indometacina de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio en mesenterios tratados con L-NA por más de una hora. Como se esperaba, en los mesenterios pre-contraídos con fenilefrina, la inhibición de la producción de las prostaglandinas no afectó

la magnitud ni la cinética de la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (Figura 7 A y B). Sin embargo, la inhibición de la producción del NO con L-NA gatilló la activación de un componente vasodilatador sensible a la inhibición de las COXs, al igual que lo observado después de la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares (Figura 8). Estos resultados indican que la producción basal de NO suprime la síntesis de prostaglandinas vasodilatadoras en el endotelio, lo cual puede explicar el componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas observado después del tratamiento con capsaicina. Estos resultados son consistentes con un trabajo que muestra que la respuesta vasodilatadora dependiente de prostaglandinas se encuentra exacerbada en ratones deficientes de la eNOS (Sun *et al.*, 1999).

Si la inhibición de la producción del NO conduce a la activación de un componente compensatorio dependiente de prostaglandinas, debería suponerse que el tratamiento con L-NA por sí solo active este componente. Si ese fuera el caso, el componente vasodilatador dependiente de NO debiese ser mayor al componente sensible a L-NA. Consistente con esta idea, el bloqueo de la señalización del NO con ODQ (un inhibidor de la guanilato ciclasa) condujo a una inhibición mucho más potente que la inhibición de la producción del NO con L-NA en la misma preparación experimental (Figura 40). Esta observación sugiere fuertemente que el NO, por una vía independiente de cGMP, regula la activación de otros agentes vasodilatadores como por ejemplo, las prostaglandinas.

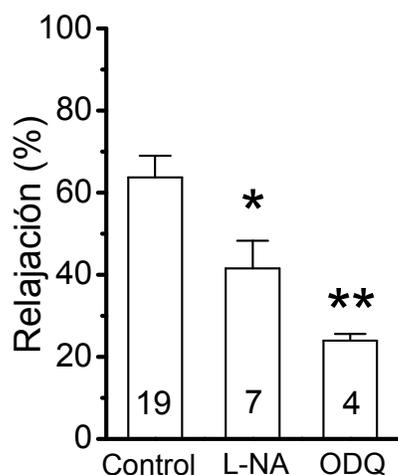


FIGURA 40. El bloqueo de la producción o de la señalización del NO sugiere que la inhibición de la producción de NO activa un componente vasodilatador compensatorio. La respuesta vasodilatadora inducida por ACh (100 nM) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina (30 – 60 μ M). La vasodilatación inducida por ACh se evaluó en condiciones control o después del tratamiento con L-NA (100 μ M) o ODQ (3 μ M). Notar que el bloqueo de la señalización del NO con ODQ conduce a una inhibición más potente que el bloqueo de la producción del NO. Los números en las barras indican el valor de n. L-NA: N^o-nitro-L-arginina. * = P < 0,05 versus Control; ** = P < 0,01 versus Control. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Sorprendentemente, a diferencia de lo observado en los mesenterios pre-contraídos con fenilefrina, la inhibición de la producción del NO con L-NA eliminó por completo la respuesta vasodilatadora inducida por ACh en los mesenterios pre-contraídos con KCl (Figura 10B). En otras palabras, el componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas que se activa después de la inhibición del NO solo se observó en los mesenterios pre-contraídos con fenilefrina (Figura 8) y no en los pre-contraídos con KCl. Esta observación podría sugerir que la inhibición de la producción del NO conduce a la activación de la producción de prostaglandinas, las cuales inducen vasodilatación por un mecanismo dependiente de hiperpolarización y que por lo tanto, no se puede observar en los mesenterios pre-contraídos con KCl (Figura 10B). Consistente con esta hipótesis, se ha descrito que la vasodilatación inducida por algunos productos de la COX (tales como, la PGI₂) requiere de la hiperpolarización del músculo liso vascular (Parkington *et al.*, 2004). Sin embargo, en los mesenterios tratados con capsaicina y pre-contraídos con KCl, ACh indujo una respuesta vasodilatadora de igual magnitud con respecto a los mesenterios que no fueron tratados con capsaicina (Figura 10C). Más aún, la vasodilatación inducida por ACh fue insensible a L-NA indicando que la respuesta vasodilatadora observada 1 h después del tratamiento con capsaicina depende por completo de la activación de un componente vasodilatador compensatorio distinto de NO. Notablemente, la vasodilatación inducida por ACh fue parcialmente inhibida con indometacina (Figura 10C), indicando que después del tratamiento con capsaicina también ocurre la compensación dependiente de prostaglandinas que se observó en los mesenterios pre-contraídos con fenilefrina. En este caso, las prostaglandinas sintetizadas (todas o una fracción de ellas) no actúan por hiperpolarización, pues es posible detectar su efecto durante la pre-contracción con KCl. Esto último sugiere que el tratamiento

con capsaicina induce la síntesis de prostaglandinas adicionales que no son reguladas por la biodisponibilidad del NO. De esta manera, la inhibición de la producción del NO como causante de la activación de prostaglandinas en los mesenterios estimulados con capsaicina no explica todo el fenómeno y futuros estudios deben planificarse para resolver esta incógnita.

2 Mecanismo de inhibición de la vasodilatación dependiente de NO

Como se mencionó anteriormente, la estimulación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares con capsaicina induce un desbalance de los componentes vasodilatadores derivados del endotelio. El NO es una señal endotelial esencial en el control del tono vasomotor y en la regulación de la función vascular. Por lo tanto, en esta tesis enfoqué mis esfuerzos en determinar cómo la activación de los nervios sensoriales perivasculares durante un período transitorio conduce a la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO. Para esto, se analizó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, esta vez, en mesenterios pre-contráidos con KCl y pre-tratados con indometacina para prevenir la activación del componente vasodilatador compensatorio dependiente de las prostaglandinas. En estas condiciones, se observó que 15 min y 1 h después del tratamiento con capsaicina, la relajación máxima inducida por ACh decayó de manera progresiva a lo largo del tiempo. En este contexto, 15 min después de la estimulación de las fibras sensoriales perivasculares con capsaicina se detectó una inhibición significativa de la vasodilatación dependiente de NO, la cual fue más potente 1 h después de la estimulación con capsaicina (Figura 12). Notablemente, 1 h después del tratamiento con capsaicina, se observó una vasodilatación remanente que no es consistente con los datos que muestran que la respuesta vasodilatadora inducida por ACh en

estas condiciones es completamente insensible a L-NA (Figura 8C). Por otro lado, en estos mesenterios pre-contraídos con KCl, la vasodilatación compensatoria observada 1 h después de capsaicina solo es inhibida de manera parcial por indometacina (Figura 8C), indicando que parte de la respuesta compensatoria no depende de NO, de prostaglandinas ni de EDHF. En consecuencia, la respuesta vasodilatadora remanente mostrada en la figura 12 podría resultar engañosa en el sentido que un componente vasodilatador desconocido, diferente a NO, EDHF y prostaglandinas podría enmascarar el efecto inhibitorio del tratamiento con capsaicina sobre la vasodilatación dependiente de NO.

La estimulación de los nervios sensoriales perivasculares no afecta el mecanismo de acción del NO sobre el músculo liso vascular pues el tratamiento con capsaicina no inhibió la vasodilatación inducida por el donador de NO, SNAP (Figura 13). Esto sugiere que los nervios sensoriales perivasculares regulan probablemente la producción, la vida media y/o la transmisión del NO hacia el músculo liso. Consistente con estas especulaciones, se encontró que la producción del NO inducida por ACh es eliminada de forma gradual después de la estimulación de los nervios sensoriales perivasculares con capsaicina (Figura 16). Interesantemente, el tratamiento con capsaicina condujo a la producción, también de forma progresiva, del radical superóxido (Figura 15), el cual puede reaccionar con el NO disminuyendo su biodisponibilidad (Pryor y Squadrito, 1995; Beckman y Koppenol, 1996). Finalmente, como se discutirá mas adelante, la comunicación intercelular y la vasodilatación dependiente de uniones comunicantes están bloqueadas después del tratamiento con capsaicina (Figuras 38 y 39). Estos antecedentes indican fuertemente que la activación de las fibras sensoriales podría conducir a la abolición de la vasodilatación dependiente de NO por

diferentes mecanismos. Primero, la producción del NO es inhibida. Segundo, el escaso NO que logra ser sintetizado en el endotelio rápidamente es convertido a peroxinitrito mediante la reacción del NO con el superóxido. Tercero, la vía de transmisión del NO (i.e. uniones comunicantes (Figuroa *et al.*, 2013b) está bloqueada, lo cual impide la conducción y la acción del NO sobre el músculo liso.

La regulación de la producción del NO mediante la activación de los nervios sensoriales perivasculares pareciera ser el primer eslabón de la cadena de eventos que podrían afectar la vasodilatación dependiente de NO. En este contexto, dilucidar cómo ocurre la inhibición de la producción de NO resulta esencial. En esta tesis, se muestra que la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares conlleva a la drástica reducción de los niveles de fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177 (Figura 18). Recordemos que la fosforilación de la eNOS en serina 1177 incrementa la actividad de la enzima (Dimmeler *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 2000). Ya que la fosforilación de la eNOS regula la sensibilidad de la enzima por el Ca^{2+} , se hipotetizó que la reducción de la fosforilación de serina 1177 está estrechamente relacionada con la inhibición de la producción de NO inducida por ACh causada por capsaicina. Notablemente, experimentos realizados en cultivos primarios de células endoteliales de la red vascular mesentérica sugieren que la inhibición de la producción de NO también está asociada a defectos en la señalización del Ca^{2+} . En este sentido, se encontró que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ACh fue drásticamente reducido después del tratamiento con CGRP (Figura 19). Probablemente, esto no se debe a una internalización de los receptores de ACh debido a que después del tratamiento de los vasos con capsaicina, ACh induce una respuesta funcional como lo es la activación de un componente vasodilatador

compensatorio. Si bien debe confirmarse si la señalización del Ca^{2+} está afectada en vasos intactos, es posible que la reducción de la fosforilación de la serina 1177 sumado a la reducción del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ACh participen en forma conjunta en la inhibición de la formación de NO en las células endoteliales.

La estimulación con concentraciones altas de capsaicina induce la desensibilización de los terminales sensoriales, proceso conocido como denervación química de las aferencias sensoriales (Cholewinski *et al.*, 1993). Por lo tanto, la estimulación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares con capsaicina podría conducir a la inhibición de la liberación tónica o basal de neurotransmisores de origen sensorial sobre la pared vascular. Efectivamente, la concentración de capsaicina que se utilizó en esta tesis (1 μM) es suficiente para producir tal desensibilización de las fibras ya que un segundo estímulo de la red arterial mesentérica con capsaicina fue incapaz de producir vasodilatación, lo cual refleja la inhibición de la liberación de neurotransmisores sobre la pared vascular (Figura 41). Sin embargo, la hipótesis que la denervación química de las fibras sensoriales conduce a la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO se descartó, pues se confirmó que el mecanismo que gatilla el fenómeno ocurre en el período de estimulación de los nervios. En este contexto, se demostró que el bloqueo de los receptores de CGRP durante la estimulación con capsaicina previene completamente la inhibición de la señalización de NO activada por ACh y la reducción de la fosforilación de la eNOS en serina 1177 observados 1 h después de la activación transitoria de los nervios sensoriales perivasculares (Figura 20).

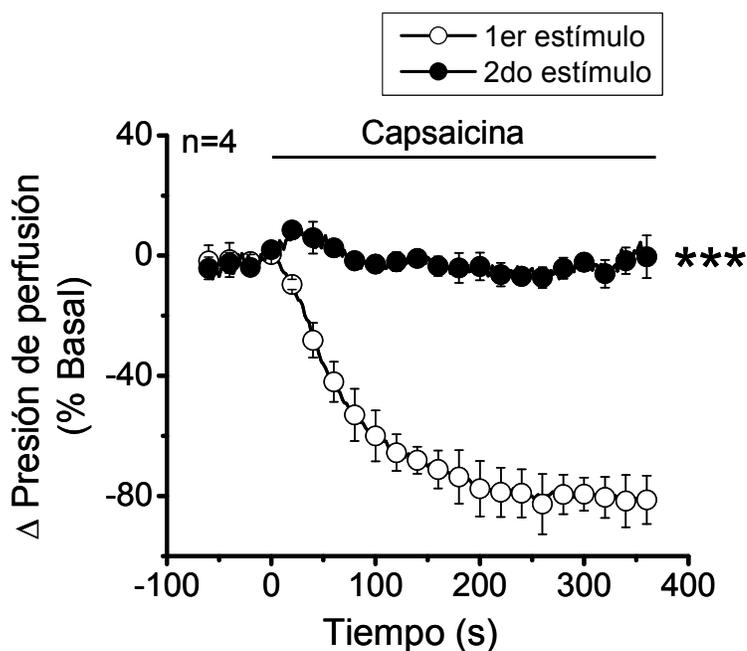


FIGURA 41. El tratamiento con capsaicina conduce a la desensibilización de las fibras sensoriales perivasculares. El curso temporal de la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina ($1 \mu\text{M}$) se evaluó en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina ($60 \mu\text{M}$). Notar que la primera estimulación con capsaicina induce una robusta respuesta vasodilatadora. No obstante la segunda estimulación con capsaicina (en la misma preparación, 60 min después del primer estímulo) no induce vasodilatación. *** = $P < 0,0001$ versus Control (primer estímulo). Estadística: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Newman Keuls.

Consistente con esto, la activación del receptor CGRP-1 en células endoteliales aisladas condujo a una potente inhibición de la producción de NO (Figura 17C). Estos antecedentes sugieren fuertemente que la liberación de CGRP desde los nervios sensoriales perivasculares y no la desensibilización de las fibras conduce a la inhibición de la producción del NO observada en arterias intactas.

Los canales de panexinas y los hemicanales constituidos por conexinas tienen un poro acuoso poco selectivo que permite el paso de iones y moléculas importantes para la función celular. Por lo tanto, se ha hipotetizado en los últimos años que un incremento desmedido en su probabilidad de apertura podría generar un desajuste en las variables celulares tales como el potencial de membrana, la $[Ca^{2+}]_i$, la concentración de ATP, entre otras variables (Schalper *et al.*, 2009; Orellana *et al.*, 2014). Estas desfavorables condiciones son la base para suponer que un incremento prolongado en la actividad de los hemicanales es potencialmente nocivo para la célula. Consistente con esto, estudios en modelos de inflamación, isquemia e inhibición metabólica, entre otros, han asociado la apertura de hemicanales formados por conexina y canales de panexina con daño celular (John *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2004; Retamal *et al.*, 2007; Shintani-Ishida *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008; Chekeni *et al.*, 2010; Bargiotas *et al.*, 2011; Orellana *et al.*, 2014). Interesantemente, el CGRP induce la activación de los canales formados por Panx-1 en arterias mesentéricas (Gaete *et al.*, 2014). Estos antecedentes pueden ser un sólido argumento para proponer que la disfunción endotelial causada por CGRP puede ser mediada por la apertura de los canales de Panx-1 o de los hemicanales formados por conexinas presentes en las células de la pared vascular. Consistente con esta hipótesis, se encontró que el bloqueo farmacológico de los canales formados por Panx-1 durante la

activación de las fibras sensoriales previno completamente la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO, la abolición de la producción del NO y la reducción de los niveles basales de la fosforilación de la eNOS en serina 1177 en arterias intactas (Figuras 26, 27 y 29). Más aún, la inhibición de los canales de Panx-1 previno la reducción de la producción del NO y la inhibición de la señalización de Ca^{2+} activada por ACh gatillada por CGRP en células endoteliales (Figuras 28 y 30). En consecuencia, la activación de los receptores de CGRP-1 y la posterior apertura de los canales formados por Panx-1 conducen a la disfunción endotelial causada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares en arterias mesentéricas.

3 Mecanismo de activación de los canales formados por Panx-1

Recientemente, nosotros mostramos que en condiciones basales, la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular a través de canales de Panx-1 y de hemicanales formados por conexinas (analizada mediante la captación del colorante etidio) es mínima (Gaete *et al.*, 2014). Esto indica que los canales de Panx-1 tienen una probabilidad de apertura muy baja en reposo, lo cual es consistente con estudios en otras preparaciones (Saez *et al.*, 2005). Los nervios sensoriales perivasculares almacenan y liberan varios neurotransmisores, principalmente, CGRP y sustancia P (Uddman *et al.*, 1986). Notablemente, el CGRP, pero no la sustancia P, aumenta la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular en arterias de resistencia a través de los canales formados por Panx-1 (Gaete *et al.*, 2014) (ver figura 2 en paper adjunto, apéndice I). Junto con confirmar estos datos (Figura 23), esta tesis muestra que la estimulación de los nervios sensoriales perivasculares con capsaicina, al igual que CGRP, induce un fuerte incremento en la permeabilidad de la membrana de las células de

la pared vascular. Este aumento en la permeabilidad de la membrana inducido por capsaicina no es mediado por hemicanales de conexina pero sí por los canales formados por Panx-1 (Figura 21). Más aún, consistente con los resultados mostrados por Gaete y colaboradores (Gaete *et al.*, 2014), el aumento en la permeabilidad de la membrana inducido por capsaicina fue completamente prevenido con el péptido CGRP₈₋₃₇ (un antagonista del receptor de CGRP, el CGRP-1), lo cual sugiere que la liberación de CGRP desde los nervios sensoriales perivasculares y la activación de los receptores CGRP-1 localizados en las células de la pared vascular conducen a la activación de los canales formados por Panx-1 (Figura 36).

A excepción de los experimentos realizados en células endoteliales aisladas, la concentración del CGRP₈₋₃₇ usada en este trabajo (0,3 μ M) es levemente menor que la concentración comúnmente utilizada en la mayoría de los trabajos donde usan este péptido (10-1000 veces más que la concentración utilizada de CGRP (Legros *et al.*, 2007)). Sin embargo, para la preparación de la red arterial mesentérica se determinó usar una concentración menor a lo habitual para inhibir principalmente los receptores de CGRP localizados en el endotelio y no en el músculo liso. Esto se debe a que el CGRP₈₋₃₇ es un péptido de gran tamaño y su permeabilidad a través de las células endoteliales de las arterias de resistencia debería ser baja. Así, al disminuir la concentración del péptido en la solución de perfusión se reduce la cantidad de CGRP₈₋₃₇ que alcanza los receptores en el músculo liso.

El efecto inhibitorio del CGRP₈₋₃₇ sobre la permeabilización de las células de la pared vascular fue directamente proporcional a la concentración del antagonista (Figura 42).

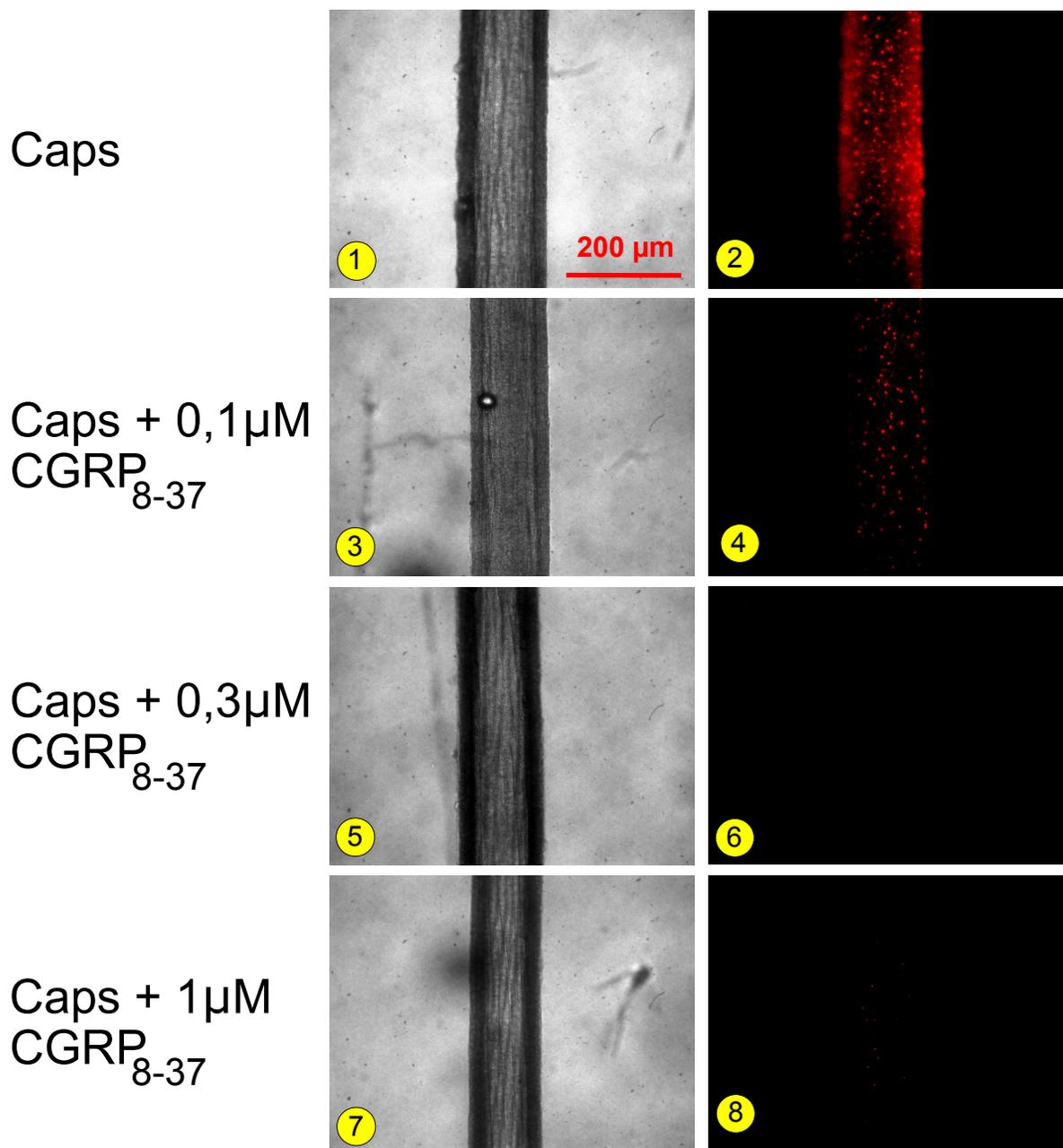


FIGURA 42. El CGRP₈₋₃₇ inhibe de manera concentración-dependiente la captación de etidio inducida por capsaicina. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por Panx-1 se evaluó mediante la captación de etidio. El bromuro de etidio (5 μM) se perfundió en la red arterial mesentérica durante la estimulación con capsaicina (1 μM , 20 min). El péptido inhibidor del receptor CGRP-1, el CGRP₈₋₃₇, se incubó 15 minutos antes de la capsaicina y se mantuvo en la perfusión durante todo el período de estimulación. Notar que 100 nM del CGRP₈₋₃₇ reduce parcialmente la captación de etidio inducida por capsaicina, mientras que concentraciones mayores (0,3 μM y 1 μM) bloquean por completo la captación de etidio producida por capsaicina. Los paneles 1, 3, 5 y 7 muestran imágenes de campo claro de los paneles 2, 4, 6 y 8, respectivamente. Caps: capsaicina.

Así, se determinó que la concentración 0,3 μM fue efectiva para bloquear completamente el incremento en la permeabilidad de la membrana celular inducida por la capsaicina. Posteriormente confirmamos que 0,3 μM fue efectiva en bloquear completamente el efecto de capsaicina o CGRP sobre la función endotelial (Figuras 20, 32, 36 y 37) lo cual validó nuestro diseño experimental.

Consistente con la inhibición selectiva de los receptores de CGRP en el endotelio, 0,3 μM CGRP₈₋₃₇ no inhibió de forma drástica la vasodilatación inducida por capsaicina (Figura 43). Es importante destacar que la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina corresponde a la suma de las señales vasodilatadoras inducidas por diversos neurotransmisores liberados desde los terminales sensoriales sensibles a capsaicina, de los cuales se piensa que el CGRP es el principal agente vasodilatador (Brain *et al.*, 1985; Kawasaki *et al.*, 1988). Más aún, en la red arterial mesentérica, se piensa que la vasodilatación inducida por CGRP depende principalmente de los receptores CGRP-1 (sensibles a CGRP₈₋₃₇) (Legros *et al.*, 2007). Además, la vasodilatación mediada por la liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares sensibles a capsaicina es mediada principalmente por receptores localizados en el músculo liso (Han *et al.*, 1990a; Li y Duckles, 1992). En consecuencia, la reducida inhibición de 0,3 μM CGRP₈₋₃₇ sobre la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina no debería interpretarse como que la concentración de CGRP₈₋₃₇ es insuficiente para bloquear los receptores de CGRP sino como que los receptores de CGRP del músculo podrían no estar siendo mayormente bloqueados con 0,3 μM CGRP₈₋₃₇. Este experimento apoya la idea que la activación de los canales de Panx-1 requiere de la activación de los receptores CGRP-1 localizados en el endotelio vascular.

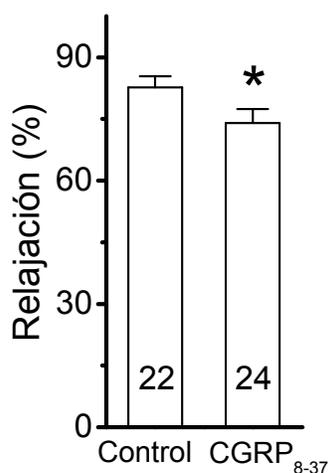


FIGURA 43. La concentración de $CGRP_{8-37}$ usada en esta tesis inhibe parcialmente la respuesta vasodilatadora inducida por capsaicina. La vasodilatación máxima inducida por capsaicina ($1 \mu\text{M}$, 20 min) se evaluó en condiciones control o después de la inhibición de los receptores CGRP-1 con el péptido $CGRP_{8-37}$ ($0,3 \mu\text{M}$). La vasodilatación se observó en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina ($60 \mu\text{M}$). El $CGRP_{8-37}$ fue perfundido (de manera intraluminal) para bloquear preferentemente los receptores de CGRP localizados en el endotelio vascular. Los números en las barras indican el valor de n. * = $P < 0,05$ versus Control. Estadística: test de t-student no pareado.

Adicionalmente, se descartó que el CGRP₈₋₃₇ tuviera efectos inespecíficos sobre la actividad de los canales de Panx-1. En este contexto, se confirmó que el CGRP₈₋₃₇ no es un bloqueador de los canales formados por Panx-1 o de los hemicanales formados por conexinas porque el péptido no afectó la captación de etidio inducida por NO exógeno (Figura 44), el cual induce la apertura de ambos canales (de conexinas y Panx-1) en la pared vascular (Lillo, 2011).

Capsaicina es un compuesto que activa los canales TRPV-1, los cuales, en la pared vascular, se piensa que están expresados específicamente en los terminales de las fibras sensoriales perivasculares (Zygmunt *et al.*, 1999; Ralevic *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos pocos trabajos han propuesto que los canales TRPV-1 también se podrían encontrar en el endotelio vascular (Poblete *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010). En este trabajo se descartó que el incremento en la actividad de los canales de Panx-1 en la pared vascular inducida por capsaicina se debiera a la activación de canales TRPV-1 en las células endoteliales porque capsaicina no afectó la permeabilidad de la membrana en células endoteliales aisladas (Figura 25). Más aún, capsaicina no incrementó la permeabilidad de la membrana en arterias denervadas (Figura 22), lo cual confirma que el aumento en la activación de los canales de Panx-1 inducida por capsaicina obedece a la activación de los canales TRPV-1 localizados en los nervios sensoriales perivasculares. Este hallazgo es consistente con el hecho de que el cambio en la permeabilidad de la membrana a través de los canales de Panx-1 inducido por capsaicina es mediado por los receptores de CGRP, ya que el CGRP extracelular proviene principalmente de la liberación de los terminales sensoriales perivasculares (Zaidi *et al.*, 1985; Emson y Zaidi, 1989).

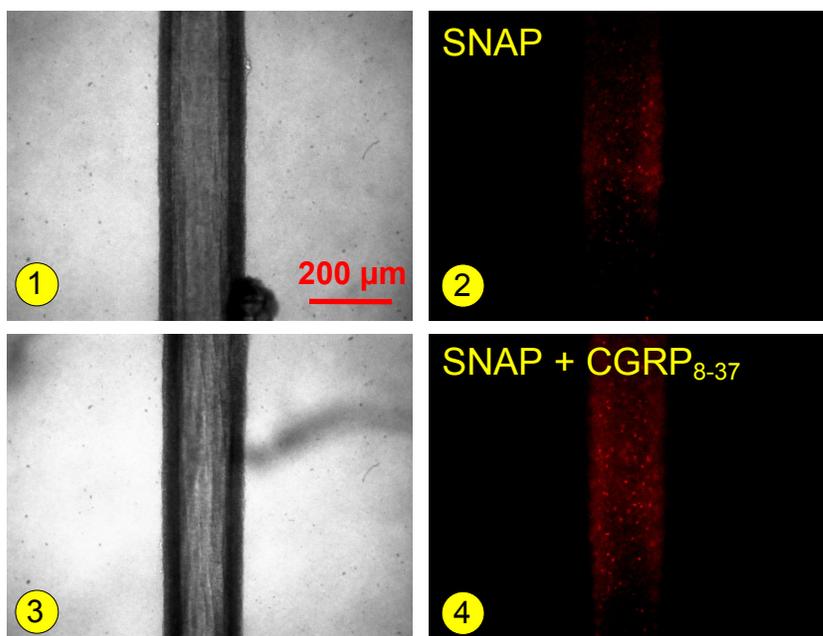


FIGURA 44. *El CGRP₈₋₃₇ no inhibe los canales de Panx-1 ni los hemicanales formados por conexinas.* El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por Panx-1 se evaluó mediante la captación de etidio. El bromuro de etidio (5 μM) se perfundió en la red arterial mesentérica durante la estimulación con SNAP (300 nM, 5 min) en ausencia o presencia del péptido inhibidor del receptor CGRP-1, el CGRP₈₋₃₇ (300 nM). El CGRP₈₋₃₇ fue incubado 15 minutos antes de la aplicación de SNAP y se mantuvo en la perfusión durante todo el período de estimulación. Notar que el CGRP₈₋₃₇ no previene la captación de etidio inducida por SNAP. Los paneles 1 y 3 son las imágenes de campo claro de las imágenes 2 y 4, respectivamente. SNAP: s-nitroso acetil penicilamina.

El NO es sintetizado por la eNOS en las células endoteliales (Wu, 2002; Fleming y Busse, 2003; Mount *et al.*, 2007). Ya que la activación de los canales de Panx-1 conlleva a la inhibición de la producción del NO, se hipotetizó que los canales de Panx-1 se activan en las células endoteliales. Consistente con esta idea, la estimulación con CGRP o capsaicina activó los canales de Panx-1 principalmente en el endotelio de la pared vascular ya que la captación del colorante amarillo de lucifer se distribuyó principalmente en las células orientadas en forma paralela con respecto al eje longitudinal del vaso (i.e. células endoteliales) (Figura 24). Más aún, las células endoteliales responden al CGRP y la activación del receptor CGRP-1 en las células endoteliales imita la activación de los canales de Panx-1 observada en arterias intactas. De este modo, se confirmaron los resultados obtenidos por nuestro grupo anteriormente (Gaete *et al.*, 2014) y se demostró que la apertura de los canales formados por Panx-1 inducida por la activación de las fibras sensoriales perivasculares ocurre principalmente en las células endoteliales de las arterias de resistencia, las cuales tienen la maquinaria para sintetizar el NO en respuesta a vasodilatadores dependientes del endotelio, tales como la ACh.

En este trabajo se muestra, mediante la técnica de captación de etidio, que la activación de los canales formados por Panx-1 inducida por capsaicina depende de la liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares y de la subsiguiente activación del receptor de CGRP, el CGRP-1 (Figura 37). Más aún, el incremento en la probabilidad de apertura de los canales de Panx-1 inducida por el CGRP depende de la activación de la PKA pues el bloqueo de la PKA con un inhibidor específico, el KT 5720, previno completamente la captación de etidio inducida por capsaicina o CGRP (Figuras 36 y 37). Esto último es consistente con

publicaciones que han sugerido que el receptor CGRP-1 está acoplado principalmente a una proteína G del tipo G_s , la cual estimula la adenilato ciclasa e incrementa la concentración intracelular del cAMP, lo cual es esencial para la activación de la PKA (Crossman *et al.*, 1987; Hirata *et al.*, 1988; Juaneda *et al.*, 2000) (Figura 4). Es importante notar que la eNOS puede ser activada por fosforilación en el residuo de serina 1177, mediante la PKA (Fleming y Busse, 2003; Mount *et al.*, 2007). Por lo tanto, el NO resultante podría activar los canales de Panx-1 de acuerdo a lo observado por Lillo (Lillo, 2011). Notablemente, la inhibición de la producción del NO con L-NA también previno totalmente el incremento en la captación de colorante inducido por capsaicina o CGRP, lo cual indica que la activación de la eNOS es un paso esencial en el mecanismo de activación de los canales formados por Panx-1 (Figuras 36 y 37). Es importante notar que numerosos reportes sugieren que la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por CGRP es mediada, principalmente, por la producción de NO mediante la vía cAMP-PKA (Figura 3) (Wellman *et al.*, 1998; Zhang y Hintze, 2001). Este antecedente sugiere que la activación de los receptores de CGRP en el endotelio activa la producción de NO. Consistente con esto, la estimulación con CGRP incrementa la producción de NO en cultivos de células endoteliales de la red vascular mesentérica (Figura 17B). Interesantemente, el NO puede activar la PKG y en consecuencia, la PKG podría participar en la activación del canal de Panx-1. Sin embargo, se descartó que la PKG forme parte de la vía de señalización que activa los canales de Panx-1 pues el bloqueo de esta enzima no previno la captación de etidio inducida por CGRP (Figura 37). En resumen, la activación de los canales de Panx-1 ocurre por una vía dependiente de NO pero independiente de la PKG.

4 Incremento prolongado de la permeabilidad de la pared vascular a través de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas

Uno de los hallazgos más interesantes de esta tesis fue que la activación de los canales formados por Panx-1 no solo perdura durante el tiempo de activación de los nervios sensoriales perivasculares sino que permanecen activados, al menos, 1 hora después de la activación de las fibras nerviosas (Figura 31). Consistente con esto, el tratamiento con CGRP, al igual que lo observado con capsaicina, condujo a un incremento prolongado en la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular, el cual se mantuvo, al menos, 1 hora después del tratamiento (Figura 31). Sorprendentemente, 1 hora después de la estimulación de los nervios sensoriales perivasculares, la membrana de las células de la pared vascular fue altamente permeable no solo a través de los canales de Panx-1, sino que también a través de los hemicanales formados por conexinas, pues la captación de etidio observada a la hora, fue prevenida parcialmente por La^{3+} (un bloqueador de hemicanales formados por conexina), además de probenecid (Figura 31). Es importante destacar que La^{3+} y probenecid previnieron cada uno aproximadamente un 50% de la captación, indicando que 1 hora después de la estimulación de los nervios sensoriales perivasculares, los canales de Panx-1 y los hemicanales formados por conexinas contribuyen de igual forma al incremento de la permeabilidad de la pared vascular. Estos antecedentes indican que la activación de los hemicanales formados por conexinas es un proceso posterior a la activación de los canales formados por Panx-1, pues son principalmente los canales de Panx-1 los que se activan durante la estimulación de los nervios sensoriales perivasculares (Figura 21).

Basados en el análisis de la captación del colorante amarillo de lucifer, se encontró que el incremento en la actividad de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas observado 1 h después de la activación de los nervios sensoriales perivasculares ocurre principalmente en las células endoteliales de la pared vascular (Figura 34). Recordemos que la captación del amarillo de lucifer durante la estimulación con CGRP o capsaicina también se restringió a las células endoteliales (Figura 24). Esto apoya la hipótesis que la activación de los nervios sensoriales perivasculares y la posterior liberación de CGRP conducen a un incremento prolongado en la permeabilidad de la membrana de la célula endotelial. No se sabe si los mismos canales formados por Panx-1 son los que permanecen abiertos a lo largo del tiempo después de la activación de los nervios sensoriales perivasculares con capsaicina. Esta hipótesis debe aclararse en el futuro.

Como se esperaba, el incremento prolongado de la activación de los canales formados por Panx-1 no se debió a la denervación química de las fibras sensoriales perivasculares porque la aplicación de un clamp de CGRP posterior a la estimulación con capsaicina (para simular la liberación tónica de CGRP), no previno el incremento en la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular observado 1 hora después del tratamiento con capsaicina (datos no mostrados). Consistente con esto, se confirmó que la señal que activa este fenómeno ocurre durante la activación de las fibras sensoriales y no es gatillada durante la denervación (i.e. después de la estimulación con capsaicina). En este contexto, se mostró que el incremento prolongado en la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular depende de la activación del receptor CGRP-1 durante la activación de las fibras sensoriales perivasculares (Figura 32). Más aún, el incremento prolongado de la permeabilidad de las

células de la pared vascular es mediado totalmente por la activación de los canales de Panx-1 durante la activación de las fibras sensoriales perivasculares (Figura 32). De este modo, la activación del receptor CGRP-1 y la inmediata activación de los canales de Panx-1 constituyen un requisito esencial para la mantención de la actividad de los canales de Panx-1 y la posterior apertura o reclutamiento de los hemicanales formados por conexinas, 1 h después de la activación de los nervios sensoriales perivasculares.

Conocer el mecanismo por el cual el incremento en la permeabilidad a través de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas ocurre de manera sostenida en el tiempo después de la activación de las fibras sensoriales perivasculares es una pregunta crítica. Una posibilidad es el reclutamiento (i.e. un aumento en el número de canales funcionales en la membrana celular) de nuevos canales de Panx-1 y/o de hemicanales formados por conexinas que contribuyan a la mantención del fenómeno. Lamentablemente, con los resultados expuestos en esta tesis no se puede confirmar que el incremento prolongado de la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular sea un reflejo de un reclutamiento de nuevos canales de Panx-1 o de hemicanales formados por conexinas por lo cual futuros experimentos deben realizarse para resolverlo.

Una segunda hipótesis con respecto al mecanismo por el cual el incremento de la permeabilidad de la pared vascular ocurre de manera sostenida en el tiempo tras la activación de las fibras sensoriales perivasculares es que los canales de Panx-1 fuesen activados por una señalización permanente en el tiempo (e.g. mediante un sistema de regulación de tipo feedback positivo). Un candidato que genere este tipo de señalización es el ATP. Se ha

demostrado que el ATP incrementa la activación de los canales de Panx-1 (Locovei *et al.*, 2006). Más aún, se ha sugerido que los canales de Panx-1, al igual que los hemicanales formados por conexinas (como los formados por Cx43), son permeables al ATP (Bao *et al.*, 2004; Pearson *et al.*, 2005; Faigle *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008). Por lo tanto, la activación de los canales de Panx-1 inducida por el CGRP podría conducir a la liberación de ATP al compartimiento extracelular. El ATP liberado, podría actuar de forma autocrina o paracrina sobre receptores purinérgicos favoreciendo la activación de los canales de Panx-1 y manteniendo abierta la vía de salida de ATP. Este mecanismo prolongaría la activación del canal a lo largo del tiempo. Esta hipótesis fue descartada pues el tratamiento con PPADS, un bloqueador de los receptores purinérgicos P2X y P2Y, no afectó la captación de colorante inducida por capsaicina (Figura 45). Además, después de la estimulación de la red arterial mesentérica con CGRP, el tratamiento con el PPADS no previno la captación observada al menos, 1 h después del tratamiento con CGRP (datos no mostrados). Consistente con esto, la estimulación de las células endoteliales con CGRP no estimuló la liberación de ATP, al menos en una cantidad detectable por el método luciferina-luciferasa (Figura 46). Estos resultados sugieren fuertemente que la activación de los nervios sensoriales perivasculares no genera liberación de ATP, ni menos aún, una señalización dependiente de ATP que conlleve a la activación prolongada de los canales de Panx-1. En consecuencia, la señalización purinérgica no explica la activación prolongada de los canales formados por Panx-1.

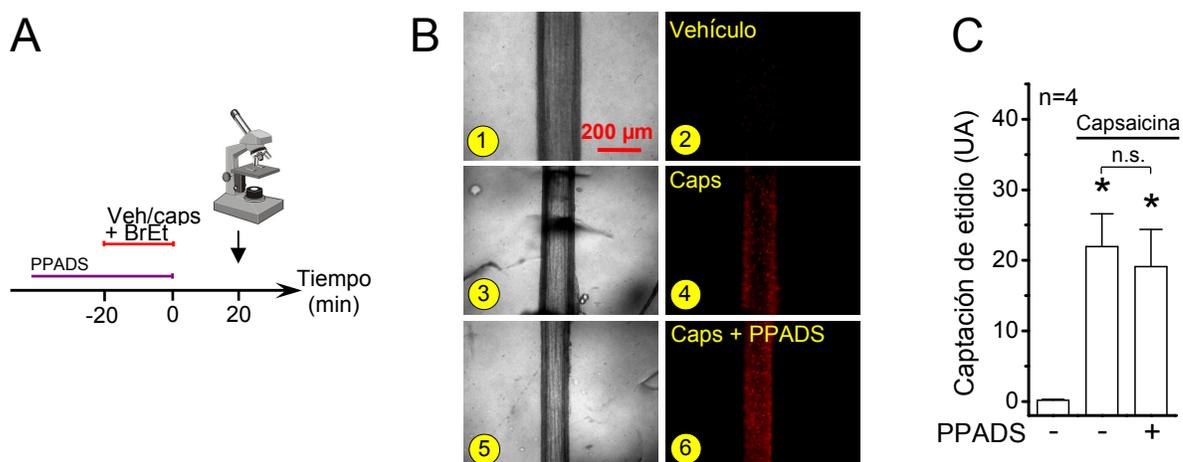


FIGURA 45. La activación de los canales de *Panx-1* inducida por capsaicina no es mediada por los receptores purinérgicos. El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por *Panx-1* se evaluó mediante la captación de etidio. **(A)** Esquema del diseño experimental. El bromuro de etidio (5 μ M) se perfundió en la red arterial mesentérica durante la estimulación con capsaicina (1 μ M, 20 min) en ausencia o presencia de PPADS (30 μ M). **(B)** Imágenes representativas de la captación de etidio inducida por capsaicina. Las imágenes 1, 3 y 5 corresponden al campo claro de los registros de fluorescencia mostrados en 2, 4 y 6, respectivamente **(C)** Análisis de los datos mostrados en (B). * = $P < 0,05$ versus Vehículo (primera barra). n.s. = no significativo. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

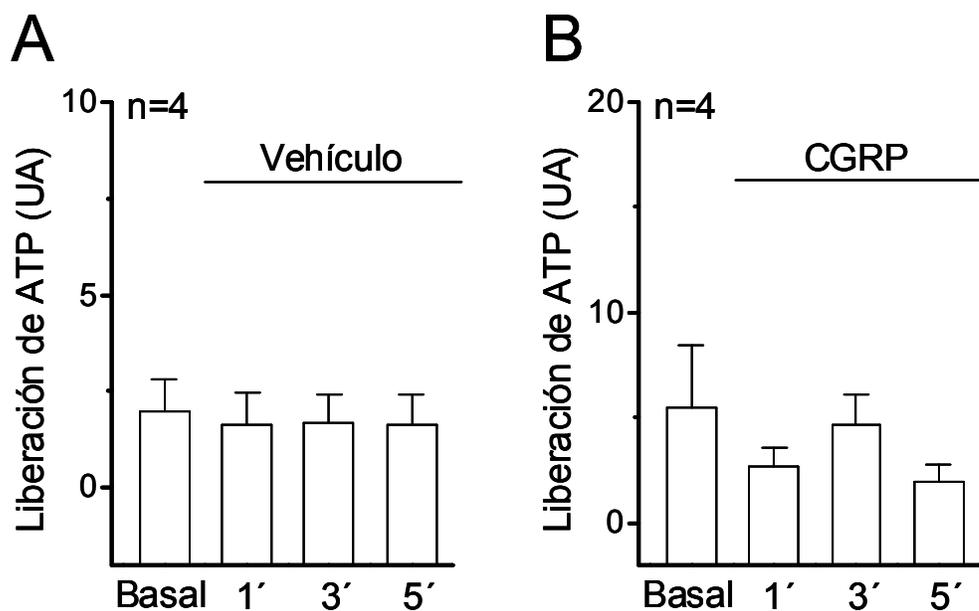


FIGURA 46. La estimulación de las células endoteliales con CGRP no está asociada a la liberación de ATP. La liberación de ATP se analizó en cultivos primarios de células endoteliales aisladas de la red vascular mesentérica. Las muestras se tomaron antes de la estimulación (basal) y al minuto 1, 3 y 5 durante la estimulación con CGRP (100 nM) o su vehículo. **(A)** Liberación de ATP inducida por el vehículo de CGRP. **(B)** Liberación de ATP inducida por CGRP. UA: unidades arbitrarias. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Se ha propuesto que la probabilidad de apertura de los canales de Panx-1 se puede modular por cambios post-traduccionales tales como fosforilación (Johnstone *et al.*, 2012; Lohman y Isakson, 2014). En este contexto, la fosforilación de Panx-1 en el residuo tirosina 168 ha sido recientemente propuesta como un índice de activación del canal (Lohman y Isakson, 2014). Sin embargo, se descartó que la activación prolongada de Panx-1 inducida por CGRP se deba a un incremento en la fosforilación del canal ya que el estado basal de fosforilación de Panx-1 en tirosina 168 no fue afectado 1 h después de la activación de los nervios sensoriales perivasculares (Figura 47). No obstante, se encontró un gran incremento en la fosforilación de Panx-1 después de 3 horas del tratamiento con capsaicina (Figura 47). Esto sugiere que los canales de Panx-1 podrían seguir activados en tiempos superiores a 1 hora después de la activación de las fibras sensoriales perivasculares por una vía de señalización diferente.

En este trabajo se muestra que la activación inicial de los canales de Panx-1, inducida por la liberación del CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares, condujo a la activación prolongada de los canales formados por Panx-1 en el endotelio vascular y a la inhibición de la producción del NO. Más aún, la activación inicial de los canales de Panx-1 dependió completamente de la producción de NO inducida por el CGRP (Figuras 36 y 37). Como se mencionó anteriormente, el NO es una señal esencial en el control fisiológico del tono vasomotor; en este sentido, existe una producción basal de NO e incrementos en la actividad de la eNOS a cada instante generado por diferentes estímulos fisiológicos como la tensión de roce (i.e. el *shear stress*), entre otros. Bajo este contexto, resulta poco lógico que un incremento transitorio en la producción de NO, conlleve a una inhibición prolongada de la señalización del NO.

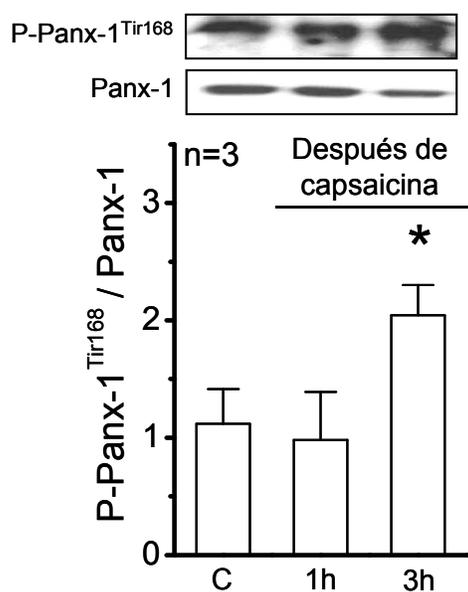


FIGURA 47. El tratamiento con capsaicina regula la fosforilación de la Panx-1. Los niveles de la fosforilación de Panx-1 en el residuo tirosina 168 (P-Panx-1^{Tir168}) fueron cuantificados en mesenterios homogenizados después de 1 y 3 horas del tratamiento con capsaicina (1 μ M, 20 min) o su vehículo. En el panel superior se muestra un Western blot representativo y en el panel inferior se presenta el análisis densitométrico de esos experimentos. C: Control. * = $P < 0,05$ versus Control. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* Newman Keuls.

Recientemente Lillo encontró que la producción de NO inducida por ACh (100 nM) activa los canales de Panx-1 en arterias de resistencia (Lillo, 2011). Sin embargo, 100 nM ACh (estímulo que en células endoteliales de la red vascular mesentérica induce una similar producción de NO con respecto a la producida por 100 nM CGRP ($652,9 \pm 170,8$ pmoL/mL versus $391,4 \pm 50,1$ pmoL/mL, Figura 17)) no conduce a un incremento prolongado (al menos 1 h después de la estimulación con ACh) en la permeabilidad de la membrana de las células de la pared vascular (Figura 48). Más aún, experimentos internos confirman que la activación de los canales de Panx-1 inducida por ACh es transitoria pues 15 min después de la estimulación con ACh la captación de etidio es indetectable, al igual que lo observado con SNAP. Esto sugiere que existe otro componente, además del NO, que induce la activación prolongada de los canales observada en respuesta a CGRP. Consistente con esta hipótesis, la estimulación de los vasos con NO exógeno, al igual que ACh, induce un incremento transitorio en la permeabilidad de las células de la pared vascular, ya que la captación de etidio a través de los canales formados por panexina o conexina es indetectable a los 15 minutos después de quitar el NO de la perfusión (Figura 33). Estos resultados sugieren que para que la activación de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexina se prolongue en el tiempo se requiere de otra señal además del NO. Por lo tanto, se deben realizar futuros experimentos para resolver esta interrogante.

Cómo el NO puede conducir a la activación de los canales de Panx-1 en nuestro modelo es una pregunta abierta. Se sabe que la actividad de los canales de Panx-1 puede ser controlada por nitrosilación (Johnstone *et al.*, 2012; Lohman *et al.*, 2012b).

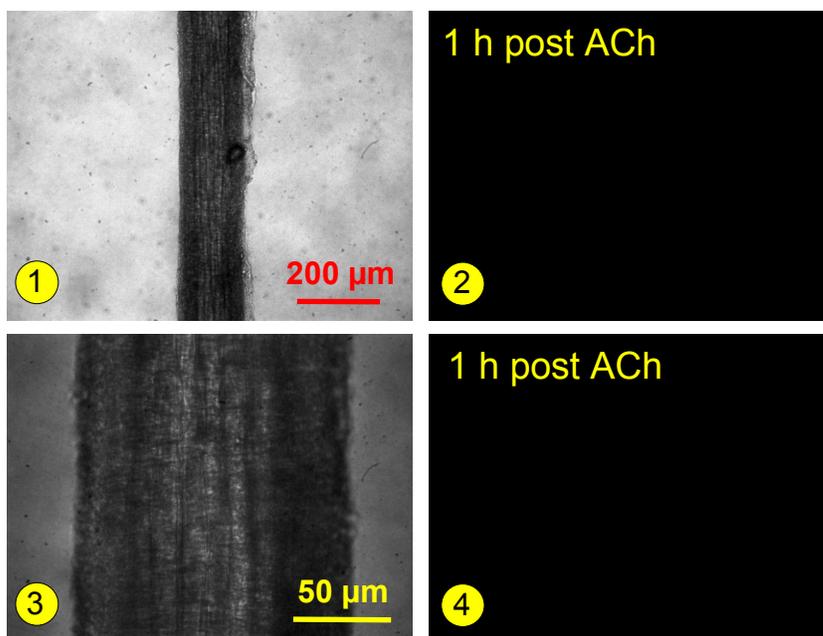


FIGURA 48. *La estimulación con ACh no conduce a la activación prolongada de los canales de Panx-1 o de los hemicanales formados por conexinas.* El cambio en la permeabilidad de la membrana a través de canales tales como los formados por Panx-1 o de los hemicanales formados por conexinas se evaluó mediante la técnica de captación de etidio. El bromuro de etidio ($5 \mu\text{M}$) se perfundió durante 20 min en la red arterial mesentérica 1 h después de la estimulación con ACh (100 nM , 5 min). Notar que la estimulación con ACh no conlleva a un incremento sostenido en el tiempo de la permeabilidad de la pared vascular. Las imágenes 1 y 3 corresponden al campo claro de los registros de fluorescencia mostrados en 2 y 4, respectivamente. Las imágenes 3 y 4 corresponden a los mismos vasos mostrados en 1 y 2.

Aunque Panx-1 tiene múltiples residuos de cisteína en su estructura, por predicción bioinformática (GPS-SNO v1.0, <http://sno.biocuckoo.org/>) esta proteína solo tiene tres residuos con altas probabilidades de ser nitrosilados, la cisteína 66, la cisteína 245 y la cisteína 426. Sin embargo, la estimulación de arterias de resistencia con 100 nM ACh no se asocia a la nitrosilación de Panx-1 (Lillo, 2011). En contraste, la nitrosilación de Panx-1 solo se ha observado utilizando elevadas concentraciones (no fisiológicas) de NO con donadores de esta molécula de señalización (Lohman *et al.*, 2012b). En estas condiciones, la nitrosilación de Panx-1 está asociada a la inhibición del canal (Lohman *et al.*, 2012b). Así, es poco probable que el NO producido por CGRP active los canales de Panx-1 mediante nitrosilación. Sin embargo, no se puede descartar que el NO y/o la señal paralela (probablemente alguna fosforilación vía PKA), necesaria para la activación prolongada de los canales de Panx-1, actúen sobre intermediarios (i.e. otras moléculas de señalización) que afecten la activación del canal de Panx-1, por ejemplo, mediante una interacción alostérica que modifique la estructura del canal. Tampoco se puede descartar que el NO pueda modificar la actividad de Panx-1 mediante nitración (la Panx-1 posee al menos un sitio (tirosina 10) con altas probabilidades de nitración (GPS-YNO2 v1.0, <http://yno2.biocuckoo.org/>)). En este trabajo se mostró que capsaicina induce un incremento en la producción de superóxido en la red arterial mesentérica. La producción de superóxido está directamente relacionada con la producción de peroxinitrito lo cual incrementa la probabilidad de modificación de proteínas por nitración.

Cabe destacar que el NO también puede activar hemicanales formados por conexinas (Retamal *et al.*, 2009; Figueroa *et al.*, 2013b). Más aún, este mecanismo de señalización ha sido recientemente observado en arterias de resistencia (Lillo, 2011). Sin embargo, se desconoce

por qué CGRP, a través de la producción de NO solo activa los canales de Panx-1 y no los hemicanales formados por conexinas. Desde esta perspectiva, la señalización mediada por NO que regula la actividad de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas es bastante más compleja de lo que podría esperarse.

5 Regulación de la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar si la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes es regulada por la activación de los nervios sensoriales perivasculares. Aunque no se profundizó en esta área de investigación, se obtuvo evidencia contundente que sugiere que la activación de las fibras sensoriales perivasculares conlleva a una drástica y prolongada reducción en el acoplamiento intercelular a través de uniones comunicantes. En este contexto, usando la técnica de acoplamiento por colorante, se observó que el tratamiento de la red arterial mesentérica con capsaicina condujo a un bloqueo significativo de la difusión del colorante etidio a las células vecinas (Figura 38 A-F). Si bien no se muestra evidencia directa que descarte que este resultado se deba a la denervación química de las fibras sensoriales perivasculares por la acción de la capsaicina, yo pienso que la inhibición del acoplamiento intercelular no obedece a la denervación de las arterias, sino que a la activación de las fibras, porque la aplicación exógena del péptido CGRP, al igual que capsaicina, también indujo la pérdida de acoplamiento intercelular (Figura 38 G-I). Por lo tanto, los resultados en conjunto sugieren que el CGRP liberado desde los nervios perivasculares sensoriales gatilla un mecanismo de señalización que conduce a la inhibición de la comunicación vía uniones comunicantes entre las células que componen la pared de las arterias de resistencia. Es

importante notar que en estos experimentos, el etidio se microinyectó en las células musculares lisas. Little y colaboradores mostraron el año 1995 que el etidio cuando se microinyecta en una célula muscular de una arteria de resistencia, no difunde a las células endoteliales, pero sí a otras células musculares lisas (Little *et al.*, 1995). Por lo tanto, es importante destacar que los resultados de esta tesis sugieren que al menos la comunicación entre células musculares es afectada después de la activación de las fibras sensoriales perivasculares.

Como se ha descrito en el inicio de este trabajo, las uniones comunicantes son consideradas un elemento clave para la función microvascular. Consistente con esto, las uniones comunicantes median gran parte de la transmisión (hacia el músculo liso) de los agentes vasodilatadores derivados del endotelio producidos por ACh. En este contexto, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue drásticamente reducida en la red arterial mesentérica pre-contraída con fenilefrina y tratada con el bloqueador de uniones comunicantes, β -GA (Figura 39A). Es importante notar que la liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares inducida por capsaicina condujo a un bloqueo de la vasodilatación mediada por uniones comunicantes ya que el bloqueo de éstas con el β -GA no tuvo efecto sobre la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (Figura 39B). Todos estos resultados sugieren que un incremento en la liberación de CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares conlleva a la pérdida funcional de las uniones comunicantes mioendoteliales en arterias de resistencia.

La técnica de acoplamiento de colorante utilizada para evaluar la comunicación intercelular tiene la limitación que el bloqueo del paso de un colorante no necesariamente implica que los

canales intercelulares están completamente cerrados, sino que podría reflejar un cambio de la permeabilidad de esa molécula por el canal. En este contexto, la selectividad del poro de los canales podría haber sido afectada por nuestro tratamiento. Otra limitación de los experimentos de microinyección de colorante realizados es que no nos permitió evaluar el acoplamiento entre células endoteliales ni el acoplamiento mioendotelial pues, como se mencionó antes, el etidio microinyectado en la célula muscular lisa de una arteria de resistencia no difunde a las células endoteliales (Little *et al.*, 1995). Por lo tanto, futuros experimentos serán necesarios para confirmar si el CGRP o la activación de las fibras sensoriales perivasculares inhiben la comunicación endotelio-endotelio y el acoplamiento mioendotelial. No obstante, los datos mostrados en la figura 39 sugieren fuertemente que la activación de las fibras sensoriales perivasculares conduce a la inhibición, al menos, de la comunicación mioendotelial, la cual es importante en la respuesta vasodilatadora mediada por el EDHF y el NO (Goto *et al.*, 2002; Ungvari *et al.*, 2002; Dora *et al.*, 2003; Feletou y Vanhoutte, 2009; Figueroa *et al.*, 2013b).

En este trabajo, se muestra que la activación de los nervios sensoriales perivasculares y la subsiguiente liberación de CGRP, conduce a la activación prolongada de los canales de Panx-1. Adicionalmente, se confirmó que la activación prolongada de los canales de Panx-1 inducida por CGRP conlleva a la disfunción del endotelio vascular. Así, aún queda por dilucidar si la inhibición de la comunicación intercelular es gatillada y mediada por el mismo mecanismo. Debido a que la comunicación a través de uniones comunicantes es altamente regulada por el NO (Hoffmann *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2005; Looft-Wilson *et al.*, 2012), es posible que la inhibición de la señalización del NO causada por la activación de los canales de

Panx-1 podría ser el mecanismo central por el cual capsaicina y CGRP inhiben el acoplamiento intercelular en la pared vascular.

6 Regulación de la función vascular por los nervios sensoriales perivasculares.

Debido a que una de las principales “manifestaciones” de la disfunción endotelial es una disminución en la producción y/o biodisponibilidad del NO, se evaluó si la activación de los nervios sensoriales perivasculares regula la señalización del NO a estadios más tardíos (ver paper Gaete *et al.*, 2014 adjunto en apéndice I). En este sentido, se evaluó la expresión de la eNOS hasta 3 horas después de la activación de las fibras sensoriales. Sorprendentemente, se encontró que los niveles proteicos de la eNOS decaen paulatinamente después de estimular la activación de los terminales sensoriales con capsaicina (Gaete *et al.*, 2014). Más aún, tres horas después de la activación de las fibras, se observó una disminución significativa de los niveles de la eNOS. Notablemente, se observó lo mismo con los niveles de Panx-1. En contraste, no se detectaron diferencias cuando se analizaron los niveles de la Cx32, la Cx43 y la Panx-2, indicando que la activación de las fibras sensoriales perivasculares afecta la expresión de solo algunas proteínas de señalización. Notablemente, la regulación de la expresión de la eNOS y de la Panx-1 es mediada por el receptor de CGRP-1 y la posterior activación de los canales de Panx-1 porque la reducción de la expresión de la eNOS y de la Panx-1 causada por el tratamiento con capsaicina fue prevenida con el bloqueo de los receptores CGRP-1 o de los canales formados por Panx-1 (Gaete *et al.*, 2014). Un hallazgo que me llamó poderosamente la atención fue que el tratamiento con el antagonista del receptor CGRP-1 no solo previno la reducción de la eNOS observada 3 h después de la activación de

las fibras sensoriales, sino que aumentó la expresión de esta enzima en aproximadamente 5 veces (Gaete *et al.*, 2014). Este interesante resultado indica que no solo el CGRP liberado de los terminales sensoriales inhibe la expresión de la eNOS, sino que otro neurotransmisor liberado junto con CGRP desde los terminales sensoriales (probablemente sustancia P), actúa potenciando la expresión de la eNOS. En consecuencia, la regulación de la expresión de la eNOS mediante la activación de las fibras sensoriales perivasculares, depende de un balance entre las señalizaciones del CGRP y otro neurotransmisor que se desconoce.

En este trabajo no se evaluó directamente si los canales de Panx-1 permanecen activados por un período superior a 1 h después del tratamiento con capsaicina. No obstante, basados en los antecedentes que indican que la expresión de proteínas está afectada 3 h después de la activación de las fibras sensoriales y que éste efecto es mediado por la activación de los canales de Panx-1 durante el período de activación, creo que posiblemente los canales de Panx-1 permanecen activados al menos 3 h después del tratamiento con capsaicina. Esta hipótesis es apoyada por el hallazgo que la Panx-1 está significativamente más fosforilada 3 h después de la activación de las fibras sensoriales (Figura 47).

7 Proyecciones

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que CGRP participa en el desarrollo de disfunción endotelial y han avanzado significativamente en dilucidar el mecanismo principal por el cuál éste fenómeno ocurre. No obstante, el desarrollo de este trabajo también ha abierto numerosas otras interrogantes como por ejemplo, ¿por qué los canales de Panx-1 quedan

activados a lo largo del tiempo?, ¿cómo la activación de los canales de Panx-1 conlleva al reclutamiento de nuevos hemicanales formados por conexinas?, ¿cómo la activación de los canales de Panx-1 regula la activación de la eNOS?, ¿cómo la liberación de CGRP conlleva al bloqueo de las uniones comunicantes?, ¿cuánto tiempo después de la activación de las fibras se mantienen activados los canales de Panx-1?, ¿ocurre este fenómeno en preparaciones *in vivo* durante eventos inflamatorios?, ¿puede ser revertida la disfunción endotelial inducida por CGRP?, ¿cuál es el rol que cumple sustancia P en la regulación de la función vascular?, etc. Indudablemente, la dilucidación de estas interrogantes ofrece un amplio campo de investigación.

En esta tesis, muestro que tras la activación de los nervios sensoriales perivasculares sensibles a capsaicina, los agentes vasodilatadores derivados del endotelio son modificados de una manera drástica. Aunque la magnitud de la vasodilatación dependiente del endotelio está intacta, la producción del NO es inhibida, lo cual puede tener una relevancia trascendental en la mantención de la función vascular normal; por ejemplo, el crecimiento del músculo liso, la formación de nuevos vasos sanguíneos, la adhesión y agregación plaquetaria, la sincronización célula-célula a través de canales intercelulares formados por conexinas, etc. Notablemente, los niveles proteicos de la eNOS y de Panx-1, dos proteínas importantes para el control de la función vascular, fueron drásticamente reducidas 3 horas después de la activación de los receptores de CGRP (Gaete *et al.*, 2014), sugiriendo que la activación de los nervios sensoriales perivasculares conduce a la alteración de otras vías de señalización, las cuales pueden contribuir a lo largo del tiempo a la disfunción vascular. Debido a su potente acción como vasodilatador, CGRP ha sido propuesto por mucho tiempo como un péptido protector

para la función vascular en enfermedades como la hipertensión (Xu *et al.*, 1989). Sin embargo, nuestros resultados indican que la acción del CGRP modifica drásticamente la función endotelial a lo largo del tiempo y futuros estudios deberían reconsiderar el efecto a largo plazo de la aplicación del CGRP y fármacos o agonistas que activen la liberación de CGRP tales como la capsaicina (típicamente encontrado en cremas y dietas ricas en ají).

El CGRP es un vasodilatador muy potente (Brain *et al.*, 1985; Girgis *et al.*, 1985; Tippins, 1986). Por lo tanto, en orden de mantener la función vascular, la concentración de CGRP plasmática tiene que ser baja. Aunque el CGRP es comúnmente detectado en el plasma, su medición se encuentra normalmente en los límites de detección de la técnica utilizada (Mason *et al.*, 1986). Esto indica que la liberación basal de CGRP desde los nervios sensoriales es muy baja o que la tasa de degradación del péptido es alta. Consistente con esto, la participación del CGRP en el control del tono vasomotor en condiciones fisiológicas es controversial (Smillie y Brain, 2011). Notablemente, no existe ningún trabajo que demuestre directamente que el CGRP participe en la regulación tónica (minuto a minuto) del control del tono vasomotor. Más aún, la eliminación específica de la expresión génica del CGRP o la aplicación intravenosa de antagonistas del receptor de CGRP no afectan la presión arterial media (Supowit *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Katki *et al.*, 2001; Nishikimi *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2002), indicando que los niveles plasmáticos basales de CGRP provenientes de la liberación tónica de los nervios sensoriales perivasculares se encuentran bajo el umbral necesario para activar los receptores en la vasculatura. Consistente con esta idea, la captación de colorante (etidio o amarillo de lucifer) es casi indetectable en la red arterial mesentérica en condiciones basales. En vista del efecto negativo que tiene el CGRP sobre la función

endotelial, es probable que la liberación tónica de CGRP tampoco alcance el umbral necesario para gatillar la activación de los canales de Panx-1 en el endotelio vascular. En contraste, la activación de los nervios sensoriales perivasculares y la subsiguiente liberación de grandes cantidades de CGRP están más relacionadas a condiciones patológicas tales como la inflamación, entre otras (Wang *et al.*, 1992; Arden *et al.*, 1994; Arnalich *et al.*, 1995; Hou y Wang, 2001).

El estudio de la participación de las fibras sensoriales perivasculares en la respuesta inflamatoria se ha limitado a las vénulas post-capilares, lugar donde ocurren los cambios en la permeabilidad de la pared vascular y la subsecuente extravasación del plasma. Sin embargo, el proceso inflamatorio es un proceso mucho más complejo e involucra otros componentes que comprometen también la función del lado arterial. En este contexto, ha sido ampliamente documentado que la respuesta inflamatoria produce disfunción endotelial en las arterias de resistencia. Como se mencionó anteriormente, la disfunción endotelial se refiere a la disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio y generalmente se ha atribuido a una reducción en la producción y/o biodisponibilidad del NO (Rudic y Sessa, 1999). Sin embargo, diferentes reportes apuntan a que la disfunción vascular inducida por agentes inflamatorios es más compleja y también puede involucrar la pérdida funcional de otros componentes vasodilatadores, como el EDHF que se transmite por las uniones comunicantes. En este contexto, estudios en arterias omentales humanas tratadas con TNF- α , uno de los principales mediadores liberados en la respuesta inflamatoria, mostraron una disminución de los componentes dependientes de NO y EDHF de la respuesta vasodilatadora inducida por bradicinina (Gillham *et al.*, 2008). Este fenómeno también se puede observar en arterias

mesentéricas aisladas, donde el componente vasodilatador dependiente del EDHF también disminuyó en vasos tratados con LPS, un componente de la pared de bacterias gram negativas que actúa como agente inflamatorio (Mitsumizo *et al.*, 2004). Más aún, consistente con la inhibición del EDHF observada en esos trabajos, un estudio en anillos aórticos mostró que el tratamiento con LPS produjo una reducción en la expresión de conexinas vasculares y la pérdida del acoplamiento celular (Simon *et al.*, 2004). Estos resultados indican que la disfunción endotelial inducida por agentes inflamatorios compromete no solo la señalización del NO, sino también la coordinación de la función vascular vía uniones comunicantes. Notablemente, el mecanismo por el cual ocurre esta disfunción en los vasos sanguíneos es todavía incierto. Se sabe que las fibras sensoriales perivasculares expresan receptores de distintos mediadores liberados durante la respuesta inflamatoria (e.g. TNF- α , interleukina (IL) 1 β , IL-6) (Sommer y Kress, 2004). Más aún, el tratamiento con TNF- α incrementa la actividad eléctrica de fibras sensoriales tipo C (Sorkin *et al.*, 1997). Consistente con todo esto, la estimulación con LPS induce la expresión y liberación de CGRP en cultivos de neuronas sensoriales y en preparaciones *in vivo* (Tang *et al.*, 1997; Hou y Wang, 2001). Más aún el tratamiento con LPS conlleva a un incremento progresivo en la concentración del CGRP plasmático (Tang *et al.*, 1997). Estos antecedentes sugieren que la disfunción endotelial generada durante la respuesta inflamatoria podría ser mediada por la activación de las fibras sensoriales perivasculares y la subsiguiente liberación de CGRP.

Es importante destacar, que numerosas enfermedades o estados patológicos asociados al proceso inflamatorio tales como hipertensión, obesidad, diabetes, aterosclerosis, isquemia-reperusión, entre otras, comparten en común la disfunción del endotelio vascular. Como se

sabe, la disfunción del endotelio en las arterias de resistencia tiene un profundo impacto en la función vascular, por lo cual el estudio de los mecanismos que conllevan a la disfunción endotelial ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para contrarrestar el efecto adverso de la inflamación sobre la función arterial.

Los resultados presentados en esta tesis indican que la liberación del CGRP desde las fibras sensoriales perivasculares tiene un impacto negativo sobre la función vascular debido a un incremento prolongado en la actividad de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas presentes en el endotelio vascular. La relevancia de este trabajo se basa en que estados patofisiológicos que involucran disfunción endotelial en los cuales existe un incremento en la activación de las fibras sensoriales perivasculares (e.g. inflamación), podrían ser mediados por el CGRP. Desde esta perspectiva, el estudio de las fibras sensoriales perivasculares sobre la función vascular en la respuesta inflamatoria ofrece una interesante área de investigación de gran relevancia clínica.

CONCLUSIÓN

La activación de los nervios sensoriales perivasculares conduce a una pérdida progresiva de la función endotelial. En este contexto, 15 minutos después de la activación de las fibras sensoriales perivasculares, la vasodilatación dependiente de NO es inhibida parcialmente (Figura 49). Una hora después de la activación de las fibras sensoriales perivasculares, la vasodilatación dependiente de NO está inhibida y se detecta un componente vasodilatador compensatorio dependiente de prostaglandinas. Además, se reduce de manera drástica la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes (Figura 49). Finalmente, 3 h después de la activación de las fibras sensoriales perivasculares, hay una considerable reducción en la expresión de proteínas importantes para el control de la función vascular (Figura 49).

La activación de los nervios sensoriales perivasculares conduce a la liberación de CGRP desde los terminales sensoriales y a la activación, en la pared vascular, de los receptores de CGRP sensibles a CGRP₈₋₃₇, los CGRP-1 (Figura 50). La estimulación de los receptores de CGRP induce la activación prolongada de los canales de Panx-1 en el endotelio vascular, mediante una vía dependiente de la activación de la PKA y de la producción de NO (Figura 50). La activación de los canales de Panx-1 inducida por CGRP conlleva al reclutamiento de

hemicanales formados por conexina en el endotelio (Figura 50). La activación de los canales de Panx-1 constituye un paso crítico en la cadena de eventos que conduce a la inhibición de la señalización del NO causada por el CGRP (Figura 50).

Finalmente, los resultados de esta tesis apuntan a las fibras sensoriales perivasculares, a los receptores CGRP-1, a los canales formados por Panx-1 y a los hemicanales formados por conexinas como potenciales blancos terapéuticos para proteger la función vascular en enfermedades o estados patológicos que involucren la activación de los nervios sensoriales perivasculares y la disfunción endotelial, como por ejemplo, la inflamación.

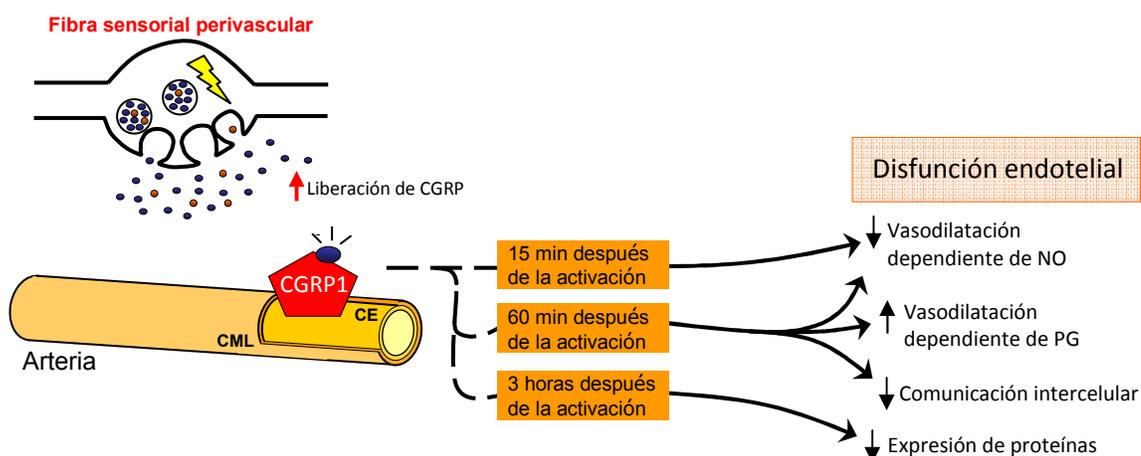


FIGURA 49. Efecto de la activación de los nervios sensoriales perivasculares sobre la función endotelial. La liberación de CGRP desde los terminales nerviosos regula la función endotelial de manera témporo-dependiente. Quince minutos después de la activación de las fibras sensoriales, la vasodilatación mediada por NO inducida por ACh está inhibida. Una hora después de la activación, la vasodilatación dependiente de NO y la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes están abolidas. Además, se activa un componente vasodilatador dependiente de prostaglandinas que compensa la inhibición de la respuesta vasodilatadora dependiente de NO. Tres horas después de la activación, hay una reducción en la expresión de proteínas relevantes para la función vascular, tales como la eNOS. Abreviaciones: CGRP1: Receptor de CGRP-1; PG: prostaglandinas; NO: óxido nítrico. CML: células del músculo liso; CE: células endoteliales.

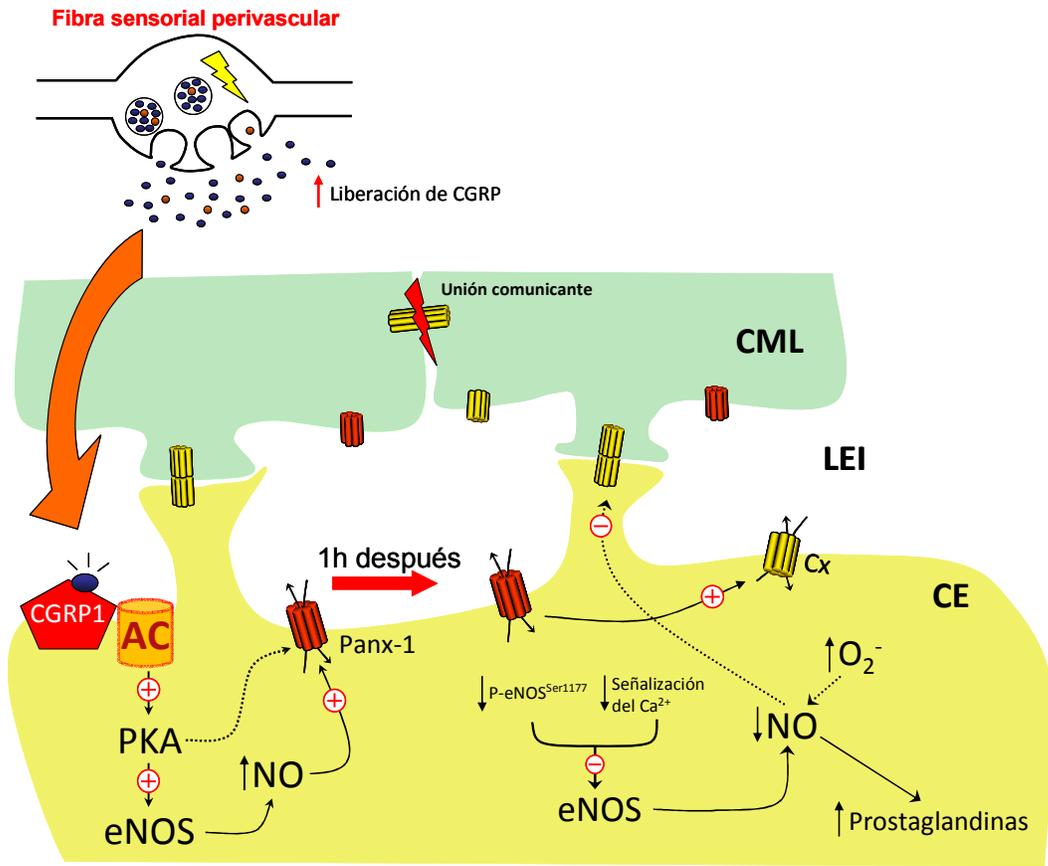


FIGURA 50. *Resumen de los mecanismos implicados en la disfunción endotelial causada por CGRP.* La activación de las fibras sensoriales perivasculares con capsaicina conlleva a la liberación de CGRP desde los terminales sensoriales. El CGRP activa los receptores CGRP-1 en las células endoteliales de la pared vascular. La activación del receptor CGRP-1 gatilla la activación de la PKA y la activación de la eNOS. La producción de NO y posiblemente la PKA inducen la activación de los canales formados por Panx-1. Al menos una hora después de la estimulación de las fibras sensoriales, los canales de Panx-1 continúan activados. Más aún, la activación inicial de los canales de Panx-1 conlleva a la activación de los hemicanales formados por conexinas. La activación de los hemicanales formados por Panx-1 y de los hemicanales compuestos por conexinas conlleva a la inhibición de la vasodilatación dependiente de NO. La activación del receptor CGRP-1 y la posterior activación prolongada de los canales de Panx-1 conducen a la reducción de la fosforilación de la eNOS en el residuo serina 1177 y a la inhibición de la señalización por Ca^{2+} activada por acetilcolina (ACh), lo cual está asociado a una disminución en la producción de NO. La activación de las fibras sensoriales también conduce a un incremento en la producción del radical superóxido (O_2^-), el cual puede contribuir a la reducción en la biodisponibilidad del NO y a la mantención de la activación de los canales de Panx-1 y de los hemicanales formados por conexinas. La inhibición de la producción del NO gatilla la activación de un componente vasodilatador compensatorio que depende de prostaglandinas. El CGRP también afecta la comunicación mioendotelial y el acoplamiento intercelular entre las células del músculo liso, posiblemente mediante la reducción en la biodisponibilidad del NO. Aún queda por resolver si la activación de las fibras sensoriales perivasculares regula la comunicación entre células endoteliales, lo cual es esencial en la transmisión de respuestas vasomotoras a lo largo del vaso. Las líneas punteadas indican señalizaciones hipotéticas que no fueron abordadas en esta tesis y que aún requieren ser resueltas. Abreviaciones: CML: célula muscular lisa; LEI: lámina elástica interna; CE: célula endotelial; CGRP1: Receptor de CGRP-1; AC: adenilato ciclasa; PKA: proteína kinasa A; NO: óxido nítrico; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; Panx-1: panexina 1; Cx: conexina; PG: prostaglandina.

BIBLIOGRAFÍA

Adeagbo AS, Triggle CR. (1993). Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol* 21(3):423-429.

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298(5871):240-244.

Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. (1985). Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229(4718):1094-1097.

Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, Dahl G, Steinem C, Sosinsky GE. (2010). Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *J Biol Chem* 285(32):24420-24431.

Arden WA, Fiscus RR, Wang X, Yang L, Maley R, Nielsen M, Lanzo S, Gross DR. (1994). Elevations in circulating calcitonin gene-related peptide correlate with hemodynamic deterioration during endotoxic shock in pigs. *Circ Shock* 42(3):147-153.

Arnalich F, Sanchez JF, Martinez M, Jimenez M, Lopez J, Vazquez JJ, Hernanz A. (1995). Changes in plasma concentrations of vasoactive neuropeptides in patients with sepsis and septic shock. *Life Sci* 56(2):75-81.

Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Olesen J. (2000). Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain* 86(1-2):133-138.

Bank N, Aynedjian HS, Khan GA. (1994). Mechanism of vasoconstriction induced by chronic inhibition of nitric oxide in rats. *Hypertension* 24(3):322-328.

Bao L, Locovei S, Dahl G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572(1-3):65-68.

Bargiotas P, Krenz A, Hormuzdi SG, Ridder DA, Herb A, Barakat W, Penuela S, von Engelhardt J, Monyer H, Schwaninger M. (2011). Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51):20772-20777.

Baylis C, Mitruka B, Deng A. (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90(1):278-281.

Beckman JS, Koppenol WH. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1424-1437.

Bell D, McDermott BJ. (1996). Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol Rev* 48(2):253-288.

Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, Best AK, Chekeni F, Ravichandran K, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. (2011). Pannexin1 Regulates α 1-Adrenergic Receptor-Mediated Vasoconstriction. *Circ Res*.

Bleys RL, Cowen T, Groen GJ, Hillen B, Ibrahim NB. (1996). Perivascular nerves of the human basal cerebral arteries: I. Topographical distribution. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(5):1034-1047.

Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. (2002). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 277(5):3388-3396.

Boric MP, Figueroa XF, Donoso MV, Paredes A, Poblete I, Huidobro-Toro JP. (1999). Rise in endothelium-derived NO after stimulation of rat perivascular sympathetic mesenteric nerves. *Am J Physiol* 277(3 Pt 2):H1027-1035.

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313(5997):54-56.

Brain SD, MacIntyre I, Williams TJ. (1986). A second form of human calcitonin gene-related peptide which is a potent vasodilator. *Eur J Pharmacol* 124(3):349-352.

Brain SD, Hughes SR, Cambridge H, O'Driscoll G. (1993). The contribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) to neurogenic vasodilator responses. *Agents Actions* 38 Spec No:C19-21.

Brain SD, Grant AD. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 84(3):903-934.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9747-9752.

Brink PR, Cronin K, Banach K, Peterson E, Westphale EM, Seul KH, Ramanan SV, Beyer EC. (1997). Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1):C1386-1396.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13644-13649.

Burnstock G. (1980). Cholinergic and purinergic regulation of blood vessels. *Comprehensive Physiology*.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23(8):374-380.

Bylund DB. (1992). Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB J* 6(3):832-839.

Carr PA, Yamamoto T, Nagy JI. (1990). Calcitonin gene-related peptide in primary afferent neurons of rat: co-existence with fluoride-resistant acid phosphatase and depletion by neonatal capsaicin. *Neuroscience* 36(3):751-760.

Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, Abramson SB. (2000). Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol* 165(3):1582-1587.

Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. (2004). Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 64(1):172-178.

Cohen RA, Plane F, Najibi S, Huk I, Malinski T, Garland CJ. (1997). Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8):4193-4198.

Contreras JE, Sanchez HA, Veliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC. (2004). Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res Brain Res Rev* 47(1-3):290-303.

Cowen T, Burnstock G. (1980). Quantitative analysis of the density and pattern of adrenergic innervation of blood vessels. A new method. *Histochemistry* 66(1):19-34.

Crane GJ, Gallagher N, Dora KA, Garland CJ. (2003). Small- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* 553(Pt 1):183-189.

Crossman D, McEwan J, MacDermot J, MacIntyre I, Dollery CT. (1987). Human calcitonin gene-related peptide activates adenylate cyclase and releases prostacyclin from human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 92(4):695-701.

Csanyi G, Lepran I, Flesch T, Telegdy G, Szabo G, Mezei Z. (2007). Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacol Rep* 59(4):447-455.

Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467(7317):863-867.

Chen G, Suzuki H, Weston AH. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95(4):1165-1174.

Chen QQ, Li D, Guo R, Luo D, Yang J, Hu CP, Li YJ. (2008). Decrease in the synthesis and release of calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia of spontaneously hypertensive rat: role of nitric oxide synthase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 596(1-3):132-137.

Chiasson VL, Quinn MA, Young KJ, Mitchell BM. (2011). Protein kinase CbetaII-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase threonine 495 mediates the endothelial dysfunction induced by FK506 (tacrolimus). *J Pharmacol Exp Ther* 337(3):718-723.

Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S. (1993). The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 55(4):1015-1023.

Dananberg J, Sider RS, Grekin RJ. (1993). Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. *Hypertension* 21(3):359-363.

de Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U. (2003). Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 13(2):169-177.

Deng PY, Li YJ. (2005). Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides* 26(9):1676-1685.

Dennis T, Fournier A, Cadieux A, Pomerleau F, Jolicoeur FB, St Pierre S, Quirion R. (1990). hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. *J Pharmacol Exp Ther* 254(1):123-128.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399(6736):601-605.

Dora KA, Sandow SL, Gallagher NT, Takano H, Rummery NM, Hill CE, Garland CJ. (2003). Myoendothelial gap junctions may provide the pathway for EDHF in mouse mesenteric artery. *J Vasc Res* 40(5):480-490.

Doyle MP, Duling BR. (1997). Acetylcholine induces conducted vasodilation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 272(3 Pt 2):H1364-1371.

Duncan M, Kendall DA, Ralevic V. (2004). Characterization of cannabinoid modulation of sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. *J Pharmacol Exp Ther* 311(1):411-419.

Edvinsson L, Gulbenkian S, Jansen I, Wharton J, Cervantes C, Polak JM. (1989). Comparison of peptidergic mechanisms in different parts of the guinea pig superior mesenteric artery: immunocytochemistry at the light and ultrastructural levels and responses in vitro of large and small arteries. *J Auton Nerv Syst* 28(2):141-154.

Edvinsson L, Erlinge D, Ekman R, Thulin T. (1992). Sensory nerve terminal activity in severe hypertension as reflected by circulating calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P. *Blood Press* 1(4):223-229.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. (1998). K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396(6708):269-272.

Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Kohler R. (2003). Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 138(4):594-601.

Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129(3):805-817.

Emson PC, Zaidi M. (1989). Further evidence for the origin of circulating calcitonin gene-related peptide in the rat. *J Physiol* 412:297-308.

Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM. (2000). CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* 275(40):31438-31443.

Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmi KC, Eltzschig HK. (2008). ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. *PLoS One* 3(7):e2801.

Feletou M, Vanhoutte PM. (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 117(4):139-155.

Figuroa XF, Paul DL, Simon AM, Goodenough DA, Day KH, Damon DN, Duling BR. (2003). Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* 92(7):793-800.

Figuroa XF, Isakson BE, Duling BR. (2006). Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension* 48(5):804-811.

Figuroa XF, Chen CC, Campbell KP, Damon DN, Day KH, Ramos S, Duling BR. (2007). Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3):H1371-1383.

Figuroa XF, Duling BR. (2008). Dissection of two Cx37-independent conducted vasodilator mechanisms by deletion of Cx40: electrotonic versus regenerative conduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(5):H2001-2007.

Figuroa XF, Duling BR. (2009). Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal* 11(2):251-266.

Figuroa XF, Gonzalez DR, Puebla M, Acevedo JP, Rojas-Libano D, Duran WN, Boric MP. (2013a). Coordinated endothelial nitric oxide synthase activation by translocation and phosphorylation determines flow-induced nitric oxide production in resistance vessels. *J Vasc Res* 50(6):498-511.

Figuroa XF, Lillo MA, Gaete PS, Riquelme MA, Saez JC. (2013b). Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. *Neuropharmacology* 75:471-478.

Fisslthaler B, Loot AE, Mohamed A, Busse R, Fleming I. (2008). Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin. *Circ Res* 102(12):1520-1528.

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88(11):E68-75.

Fleming I, Busse R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(1):R1-12.

Forstermann U, Hertting G, Neufang B. (1986). The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. *Br J Pharmacol* 87(3):521-532.

Franco-Cereceda A, Saria A, Lundberg JM. (1989). Differential release of calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y from the isolated heart by capsaicin, ischaemia, nicotine, bradykinin and ouabain. *Acta Physiol Scand* 135(2):173-187.

Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-376.

Gaete PS, Lillo MA, Ardiles NM, Perez FR, Figueroa XF. (2012). Ca²⁺-activated K⁺ channels of small and intermediate conductance control eNOS activation through NAD(P)H oxidase. *Free Radic Biol Med* 52(5):860-870.

Gaete PS, Lillo MA, Figueroa XF. (2014). Functional role of connexins and pannexins in the interaction between vascular and nervous system. *J Cell Physiol* 229(10):1336-1345.

Gangula PR, Chauhan M, Reed L, Yallampalli C. (2009). Age-related changes in dorsal root ganglia, circulating and vascular calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentrations in female rats: effect of female sex steroid hormones. *Neurosci Lett* 454(2):118-123.

Geppetti P. (1993). Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept* 47(1):1-23.

Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S. (1985). Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett* 57(2):125-130.

Gibson SJ, Polak JM, Giaid A, Hamid QA, Kar S, Jones PM, Denny P, Legon S, Amara SG, Craig RK, et al. (1988). Calcitonin gene-related peptide messenger RNA is expressed in sensory neurones of the dorsal root ganglia and also in spinal motoneurones in man and rat. *Neurosci Lett* 91(3):283-288.

Gillham JC, Myers JE, Baker PN, Taggart MJ. (2008). TNF-alpha alters nitric oxide- and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilatation in human omental arteries. *Hypertens Pregnancy* 27(1):29-38.

Girgis SI, Macdonald DW, Stevenson JC, Bevis PJ, Lynch C, Wimalawansa SJ, Self CH, Morris HR, MacIntyre I. (1985). Calcitonin gene-related peptide: potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *Lancet* 2(8445):14-16.

Goto K, Fujii K, Kansui Y, Abe I, Iida M. (2002). Critical role of gap junctions in endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29(7):595-602.

Gray DW, Marshall I. (1992). Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br J Pharmacol* 107(3):691-696.

Griffith TM, Chaytor AT, Taylor HJ, Giddings BD, Edwards DH. (2002). cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6392-6397.

Gulbenkian S, Merighi A, Wharton J, Varndell IM, Polak JM. (1986). Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea pig. *J Neurocytol* 15(4):535-542.

Gulbenkian S, Saetrum Opgaard O, Ekman R, Costa Andrade N, Wharton J, Polak JM, Queiroz e Melo J, Edvinsson L. (1993). Peptidergic innervation of human epicardial coronary arteries. *Circ Res* 73(3):579-588.

Gustafsson F, Mikkelsen HB, Arensbak B, Thuneberg L, Neve S, Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH. (2003). Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol* 119(2):139-148.

Guyenet PG. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7(5):335-346.

Hamel E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 100(3):1059-1064.

Han SP, Naes L, Westfall TC. (1990a). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J Pharmacol Exp Ther* 255(2):423-428.

Han SP, Naes L, Westfall TC. (1990b). Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilation of the mesenteric arterial bed by CGRP (8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 168(2):786-791.

Harris AL. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* 94(1-2):120-143.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC. (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 276(19):16587-16591.

Haubrich S, Schwarz HJ, Bukauskas F, Lichtenberg-Frate H, Traub O, Weingart R, Willecke K. (1996). Incompatibility of connexin 40 and 43 Hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Mol Biol Cell* 7(12):1995-2006.

He DS, Jiang JX, Taffet SM, Burt JM. (1999). Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11):6495-6500.

Hirata Y, Takagi Y, Takata S, Fukuda Y, Yoshimi H, Fujita T. (1988). Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 151(3):1113-1121.

Hobara N, Goda M, Kitamura Y, Takayama F, Kawasaki H. (2006). Innervation and functional changes in mesenteric perivascular calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-containing nerves following topical phenol treatment. *Neuroscience* 141(2):1087-1099.

Hoffmann A, Gloe T, Pohl U, Zahler S. (2003). Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovasc Res* 60(2):421-430.

Holzer P. (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24(3):739-768.

Holzer P, Maggi CA. (1998). Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience* 86(2):389-398.

Horie S, Michael GJ, Priestley JV. (2005). Co-localization of TRPV1-expressing nerve fibers with calcitonin-gene-related peptide and substance P in fundus of rat stomach. *Inflammopharmacology* 13(1-3):127-137.

Hou L, Wang X. (2001). PKC and PKA, but not PKG mediate LPS-induced CGRP release and $[Ca^{2+}]_i$ elevation in DRG neurons of neonatal rats. *J Neurosci Res* 66(4):592-600.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377(6546):239-242.

Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chatterjee M. (1994). Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. *Am J Physiol* 266(3 Pt 2):H952-958.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):9265-9269.

Itoh H, Sakai J, Imoto A, Creed KE. (1995). [The control of smooth muscle tissues by nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve fibres in the autonomic nervous system]. *J Smooth Muscle Res* 31(3):67-78.

John SA, Kondo R, Wang SY, Goldhaber JI, Weiss JN. (1999). Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *J Biol Chem* 274(1):236-240.

Johnstone SR, Billaud M, Lohman AW, Taddeo EP, Isakson BE. (2012). Posttranslational modifications in connexins and pannexins. *J Membr Biol* 245(5-6):319-332.

Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. (2000). The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21(11):432-438.

Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR, Jr., Murphy WR, Hockel GM. (1976). Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 38(6 Suppl 2):21-29.

Juhasz G, Zsombok T, Modos EA, Olajos S, Jakab B, Nemeth J, Szolesanyi J, Vitrai J, Bagdy G. (2003). NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain* 106(3):461-470.

Kaji A, Shigematsu H, Fujita K, Maeda T, Watanabe S. (1988). Parasympathetic innervation of cutaneous blood vessels by vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive and acetylcholinesterase-positive nerves: histochemical and experimental study on rat lower lip. *Neuroscience* 25(1):353-362.

Kakuyama M, Vallance P, Ahluwalia A. (1998). Endothelium-dependent sensory NANC vasodilatation: involvement of ATP, CGRP and a possible NO store. *Br J Pharmacol* 123(2):310-316.

Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28(18):4702-4711.

Katki KA, Supowit SC, DiPette DJ. (2001). Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in Dahl-salt hypertension. *Hypertension* 38(3 Pt 2):679-682.

Katki KA, Supowit SC, DiPette DJ. (2002). Substance P in subtotal nephrectomy-salt hypertension. *Hypertension* 39(2 Pt 2):389-393.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. (2013). *Fisiologia Médica de Ganong* - 23ed.

Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature* 335(6186):164-167.

Kawasaki H, Okazaki M, Nakatsuma A, Mimaki Y, Araki H, Gomita Y. (1999). Long-term treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor restores reduced calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerve function in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 79(2):221-229.

Kawasaki H, Eguchi S, Miyashita S, Chan S, Hirai K, Hobara N, Yokomizo A, Fujiwara H, Zamami Y, Koyama T, Jin X, Kitamura Y. (2009). Proton acts as a neurotransmitter for nicotine-induced adrenergic and calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric artery. *J Pharmacol Exp Ther* 330(3):745-755.

Kohlmann O, Jr., Cesaretti ML, Ginoza M, Tavares A, Zanella MT, Ribeiro AB, Ramos OL, Leeman SE, Gavras I, Gavras H. (1997). Role of substance P in blood pressure regulation in salt-dependent experimental hypertension. *Hypertension* 29(1 Pt 2):506-509.

Kurth T, Gaziano JM, Cook NR, Bubes V, Logroscino G, Diener HC, Buring JE. (2007). Migraine and risk of cardiovascular disease in men. *Arch Intern Med* 167(8):795-801.

Legros E, Tirapelli CR, Carrier E, Brochu I, Fournier A, D'Orleans-Juste P. (2007). Characterization of the non-adrenergic/non-cholinergic response to perivascular nerve stimulation in the double-perfused mesenteric bed of the mouse. *Br J Pharmacol* 152(7):1049-1059.

Lever JD, Ahmed M, Irvine G. (1965). Neuromuscular and intercellular relationships in the coronary arterioles. A morphological and quantitative study by light and electron microscopy. *J Anat* 99(Pt 4):829-840.

Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaut E, Safar ME, Struijker-Boudier HA. (2008). Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* 118(9):968-976.

Li YJ, Duckles SP. (1992). Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol* 210(1):23-30.

Liao Y, Day KH, Damon DN, Duling BR. (2001). Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9989-9994.

Lillo MA. (2011). Participación de los canales formados por conexinas y panexinas en el transporte del óxido nítrico en la pared vascular. Tesis para obtener el título de Bioquímico. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Lillo MA, Pérez FR, Puebla M, Gaete PS, Figueroa XF. (2012). Control and Coordination of Vasomotor Tone in the Microcirculation.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. (2001). Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 91(3):1421-1430.

Little TL, Xia J, Duling BR. (1995). Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res* 76(3):498-504.

Locovei S, Wang J, Dahl G. (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580(1):239-244.

Lohman A, Isakson B. (2014). Pannexin 1-dependent ATP release from venous endothelium promotes acute vascular inflammation (669.8). *The FASEB Journal* 28(1 Supplement):669.668.

Lohman AW, Billaud M, Straub AC, Johnstone SR, Best AK, Lee M, Barr K, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. (2012a). Expression of pannexin isoforms in the systemic murine arterial network. *J Vasc Res* 49(5):405-416.

Lohman AW, Weaver JL, Billaud M, Sandilos JK, Griffiths R, Straub AC, Penuela S, Leitinger N, Laird DW, Bayliss DA, Isakson BE. (2012b). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *J Biol Chem* 287(47):39602-39612.

Looft-Wilson RC, Billaud M, Johnstone SR, Straub AC, Isakson BE. (2012). Interaction between nitric oxide signaling and gap junctions: effects on vascular function. *Biochim Biophys Acta* 1818(8):1895-1902.

Lu JT, Son YJ, Lee J, Jetton TL, Shiota M, Moscoso L, Niswender KD, Loewy AD, Magnuson MA, Sanes JR, Emeson RB. (1999). Mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol Cell Neurosci* 14(2):99-120.

Lu LF, Fiscus RR. (1999). Calcitonin gene-related peptide causes long-term inhibition of contraction in rat thoracic aorta through a nitric oxide-dependent pathway. *Neuropeptides* 33(2):145-154.

Luff SE, Young SB, McLachlan EM. (2000). Ultrastructure of substance P-immunoreactive terminals and their relation to vascular smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *J Comp Neurol* 416(3):277-290.

Maggi CA. (1995). The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 26(5):911-944.

Malcangio M, Garrett NE, Tomlinson DR. (1997). Nerve growth factor treatment increases stimulus-evoked release of sensory neuropeptides in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 9(5):1101-1104.

Mark AL. (1996). The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens Suppl* 14(5):S159-165.

Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. (2002). Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 90(10):1100-1107.

Mason RT, Shulkes A, Zajac JD, Fletcher AE, Hardy KJ, Martin TJ. (1986). Basal and stimulated release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 25(6):675-685.

Masuda A, Shimamoto K, Mori Y, Nakagawa M, Ura N, Iimura O. (1992). Plasma calcitonin gene-related peptide levels in patients with various hypertensive diseases. *J Hypertens* 10(12):1499-1504.

McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. (2000). Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275(9):6123-6128.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393(6683):333-339.

Merighi A, Polak JM, Gibson SJ, Gulbenkian S, Valentino KL, Peirone SM. (1988). Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. *Cell Tissue Res* 254(1):101-109.

Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE. (2002). Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem* 277(44):42344-42351.

Mistry DK, Garland CJ. (1998). Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 124(6):1131-1140.

Mitsumizo S, Nakashima M, Hamada T, Totoki T. (2004). NOS II inhibition restores attenuation of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery exposed to lipopolysaccharide. *J Cardiovasc Pharmacol* 43(4):589-594.

Miyoshi H, Nakaya Y. (1995). Calcitonin gene-related peptide activates the K⁺ channels of vascular smooth muscle cells via adenylate cyclase. *Basic Res Cardiol* 90(4):332-336.

Moller M, Botti H, Batthyany C, Rubbo H, Radi R, Denicola A. (2005). Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 280(10):8850-8854.

Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6):2166-2170.

Mount PF, Kemp BE, Power DA. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42(2):271-279.

Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM, Legon S, et al. (1988). Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25(1):195-205.

Mulvany MJ, Aalkjaer C. (1990). Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 70(4):921-961.

Murphy ME, Brayden JE. (1995). Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol* 486 (Pt 1):47-58.

Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. (1990). Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature* 344(6268):770-773.

Nishikimi T, Yoshihara F, Kanazawa A, Okano I, Horio T, Nagaya N, Yutani C, Matsuo H, Matsuoka H, Kangawa K. (2001). Role of increased circulating and renal adrenomedullin in rats with malignant hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(6):R2079-2087.

Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Muller-Esterl W. (2006). Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 396(3):401-409.

Okamoto T, Akiyama M, Takeda M, Gabazza EC, Hayashi T, Suzuki K. (2009). Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication. *Biochem Biophys Res Commun* 382(2):264-268.

Orellana JA, Avendano BC, Montero TD. (2014). Role of connexins and pannexins in ischemic stroke. *Curr Med Chem* 21(19):2165-2182.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524-526.

Panchin YV. (2005). Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol* 208(Pt 8):1415-1419.

Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ. (2002). Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* 277(34):31020-31030.

Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. (2001). Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation* 103(13):1752-1758.

Parameswaran N, Spielman WS. (2006). RAMPs: The past, present and future. *Trends Biochem Sci* 31(11):631-638.

Parkington HC, Coleman HA, Tare M. (2004). Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res* 49(6):509-514.

Partovian C, Zhuang Z, Moodie K, Lin M, Ouchi N, Sessa WC, Walsh K, Simons M. (2005). PKC α activates eNOS and increases arterial blood flow in vivo. *Circ Res* 97(5):482-487.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. (2005). ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46(5):731-744.

Piasecki MT, Perez DM. (2001). Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther* 298(2):403-410.

Poblete IM, Orliac ML, Briones R, Adler-Graschinsky E, Huidobro-Toro JP. (2005). Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed. *J Physiol* 568(Pt 2):539-551.

Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. (1998). Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 273(42):27383-27388.

Pryor WA, Squadrito GL. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1):L699-722.

Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. (1994). Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol* 475(1):9-13.

Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y, St-Pierre S, Fournier A. (1992). Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 657:88-105.

Ralevic V, Kendall DA, Randall MD, Zygmunt PM, Movahed P, Hogestatt ED. (2000). Vanilloid receptors on capsaicin-sensitive sensory nerves mediate relaxation to methanandamide in the rat isolated mesenteric arterial bed and small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 130(7):1483-1488.

Ralevic V, Kendall DA. (2001). Cannabinoid inhibition of capsaicin-sensitive sensory neurotransmission in the rat mesenteric arterial bed. *Eur J Pharmacol* 418(1-2):117-125.

Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, Giaume C. (2007). Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* 27(50):13781-13792.

Retamal MA, Yin S, Altenberg GA, Reuss L. (2009). Modulation of Cx46 hemichannels by nitric oxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(6):C1356-1363.

Rosenfeld MG, Amara SG, Roos BA, Ong ES, Evans RM. (1981). Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism. *Nature* 290(5801):63-65.

Rudic RD, Sessa WC. (1999). Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* 64(3):673-677.

Ruocco I, Cuello AC, Parent A, Ribeiro-da-Silva A. (2002). Skin blood vessels are simultaneously innervated by sensory, sympathetic, and parasympathetic fibers. *J Comp Neurol* 448(4):323-336.

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83(4):1359-1400.

Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1711(2):215-224.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15):7240-7244.

Sanchez FA, Savalia NB, Duran RG, Lal BK, Boric MP, Duran WN. (2006). Functional significance of differential eNOS translocation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(3):H1058-1064.

Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J, Kotsonis P, Oh U, Ahluwalia A. (2004). Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res* 95(10):1027-1034.

Scotland RS, Madhani M, Chauhan S, Moncada S, Andresen J, Nilsson H, Hobbs AJ, Ahluwalia A. (2005). Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation* 111(6):796-803.

Schalper KA, Palacios-Prado N, Orellana JA, Saez JC. (2008). Currently used methods for identification and characterization of hemichannels. *Cell Commun Adhes* 15(1):207-218.

Schalper KA, Orellana JA, Berthoud VM, Saez JC. (2009). Dysfunctions of the diffusional membrane pathways mediated by hemichannels in inherited and acquired human diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 7(4):486-505.

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. (1996). The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28(5):703-711.

Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K. (2007). Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3):H1714-1720.

Simon AM, McWhorter AR, Chen H, Jackson CL, Ouellette Y. (2004). Decreased intercellular communication and connexin expression in mouse aortic endothelium during lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Vasc Res* 41(4):323-333.

Smillie SJ, Brain SD. (2011). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. *Neuropeptides* 45(2):93-104.

Sokoya EM, Burns AR, Setiawan CT, Coleman HA, Parkington HC, Tare M. (2006). Evidence for the involvement of myoendothelial gap junctions in EDHF-mediated relaxation in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1):H385-393.

Sommer C, Kress M. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 361(1-3):184-187.

Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR. (1997). Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience* 81(1):255-262.

Stadler J, Harbrecht BG, Di Silvio M, Curran RD, Jordan ML, Simmons RL, Billiar TR. (1993). Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells. *J Leukoc Biol* 53(2):165-172.

Stauffer KA. (1995). The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J Biol Chem* 270(12):6768-6772.

Studel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, Fishman MC, Zapol WM. (1997). Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res* 81(1):34-41.

Sud N, Wedgwood S, Black SM. (2008). Protein kinase Cdelta regulates endothelial nitric oxide synthase expression via Akt activation and nitric oxide generation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(3):L582-591.

Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G. (1999). Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 85(3):288-293.

Sun P, Takatori S, Jin X, Koyama T, Tangsucharit P, Li S, Zamami Y, Kitamura Y, Kawasaki H. (2011). Histamine H(3) receptor-mediated modulation of perivascular nerve transmission in rat mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* 655(1-3):67-73.

Supowit SC, Christensen MD, Westlund KN, Hallman DM, DiPette DJ. (1995). Dexamethasone and activators of the protein kinase A and C signal transduction pathways regulate neuronal calcitonin gene-related peptide expression and release. *Brain Res* 686(1):77-86.

Supowit SC, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ. (1997). Calcitonin gene-related peptide is a depressor of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 29(4):945-950.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6(5):357-372.

Tang Y, Han C, Fiscus RR, Wang X. (1997). Increase of calcitonin gene-related peptide (CGRP) release and mRNA levels in endotoxic rats. *Shock* 7(3):225-229.

Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, MacDonald JF, MacVicar BA. (2008). Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* 322(5907):1555-1559.

Tippins JR. (1986). CGRP: a novel neuropeptide from the calcitonin gene is the most potent vasodilator known. *J Hypertens Suppl* 4(5):S102-105.

Tousoulis D, Antoniadis C, Stefanadis C. (2005). Evaluating endothelial function in humans: a guide to invasive and non-invasive techniques. *Heart* 91(4):553-558.

Tsai SH, Tew JM, McLean JH, Shipley MT. (1988). Cerebral arterial innervation by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide (CGRP): I. Distribution and origin of CGRP perivascular innervation in the rat. *J Comp Neurol* 271(3):435-444.

Tsuru H, Tanimitsu N, Hirai T. (2002). Role of perivascular sympathetic nerves and regional differences in the features of sympathetic innervation of the vascular system. *Jpn J Pharmacol* 88(1):9-13.

Uddman R, Edvinsson L, Ekblad E, Hakanson R, Sundler F. (1986). Calcitonin gene-related peptide (CGRP): perivascular distribution and vasodilatory effects. *Regul Pept* 15(1):1-23.

Ungvari Z, Csiszar A, Koller A. (2002). Increases in endothelial Ca²⁺ activate K(Ca) channels and elicit EDHF-type arteriolar dilation via gap junctions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(5):H1760-1767.

Valiunas V, Weingart R, Brink PR. (2000). Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43. *Circ Res* 86(2):E42-49.

Venkatachalam K, Montell C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76:387-417.

Verma S, Anderson TJ. (2002). Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105(5):546-549.

Wang LH, Luo M, Wang Y, Galligan JJ, Wang DH. (2006). Impaired vasodilation in response to perivascular nerve stimulation in mesenteric arteries of TRPV1-null mutant mice. *J Hypertens* 24(12):2399-2408.

Wang X, Jones SB, Zhou Z, Han C, Fiscus RR. (1992). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and neuropeptide Y (NPY) levels are elevated in plasma and decreased in vena cava during endotoxin shock in the rat. *Circ Shock* 36(1):21-30.

Wang X, Wu Z, Tang Y, Fiscus RR, Han C. (1996). Rapid nitric oxide- and prostaglandin-dependent release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) triggered by endotoxin in rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 118(8):2164-2170.

Wang Y, Wang DH. (2004). Prevention of endothelin-1-induced increases in blood pressure: role of endogenous CGRP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4):H1868-1874.

- Watson RE, Supowit SC, Zhao H, Katki KA, Dipette DJ. (2002). Role of sensory nervous system vasoactive peptides in hypertension. *Braz J Med Biol Res* 35(9):1033-1045.
- Wellman GC, Quayle JM, Standen NB. (1998). ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 507 (Pt 1):117-129.
- White TW, Paul DL, Goodenough DA, Bruzzone R. (1995). Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 6(4):459-470.
- Wilkinson JD, Kendall DA, Ralevic V. (2007). Delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits electrically-evoked CGRP release and capsaicin-sensitive sensory neurogenic vasodilatation in the rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 152(5):709-716.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383(5):725-737.
- Wu D, Doods H, Arndt K, Schindler M. (2002). Development and potential of non-peptide antagonists for calcitonin-gene-related peptide (CGRP) receptors: evidence for CGRP receptor heterogeneity. *Biochem Soc Trans* 30(4):468-473.
- Wu KK. (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 962:122-130.
- Xu D, Wang XA, Wang JP, Yuan QX, Fiscus RR, Chang JK, Tang JA. (1989). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Peptides* 10(2):309-312.
- Yang D, Luo Z, Ma S, Wong WT, Ma L, Zhong J, He H, Zhao Z, Cao T, Yan Z, Liu D, Arendshorst WJ, Huang Y, Tepel M, Zhu Z. (2010). Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metab* 12(2):130-141.
- Yao J, Hiramatsu N, Zhu Y, Morioka T, Takeda M, Oite T, Kitamura M. (2005). Nitric oxide-mediated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 16(1):58-67.

Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H. (1998). Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 123(8):1645-1654.

Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. (1996). NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca²⁺ concentration by activating voltage-gated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19):10489-10494.

Zaidi M, Bevis P, Girgis S, Lynch C, Stevenson J, MacIntyre I. (1985). Circulating CGRP comes from the perivascular nerves. *European journal of pharmacology* 117(2):283-284.

Zelissen PM, Koppeschaar HP, Lips CJ, Hackeng WH. (1991). Calcitonin gene-related peptide in human obesity. *Peptides* 12(4):861-863.

Zhang X, Hintze TH. (2001). cAMP signal transduction cascade, a novel pathway for the regulation of endothelial nitric oxide production in coronary blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(5):797-803.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400(6743):452-457.

APÉNDICE I

Functional Role of Connexins and Pannexins in the Interaction Between Vascular and Nervous System

PABLO S. GAETE, MAURICIO A. LILLO, AND XAVIER F. FIGUEROA*

Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

The microvascular network of the microcirculation works in tight communication with surrounding tissues to control blood supply and exchange of solutes. In cerebral circulation, microvascular endothelial cells constitute a selective permeability barrier that controls the environment of parenchymal brain tissue, which is known as the blood–brain barrier (BBB). Connexin- and pannexin-formed channels (gap junctions and hemichannels) play a central role in the coordination of endothelial and smooth muscle cell function and connexin-mediated signaling in endothelial cells is essential in the regulation of BBB permeability. Likewise, gap junction communication between astrocyte end-feet also contributes to maintain the BBB integrity, but the participation of hemichannels in this process cannot be discarded. Sympathetic and sensory perivascular nerves are also involved in the control and coordination of vascular function through the release of vasoconstrictor or vasodilator signals and by the regulation of gap junction communication in the vessel wall. Conversely, ATP release through pannexin-I-formed channels mediates the α 1-adrenergic signaling. Furthermore, here we show that capsaicin-induced CGRP release from mesenteric perivascular sensory nerves induces pannexin-I-formed channel opening, which in turn leads to reduction of pannexin-I and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression along the time. Interestingly, blockade of CGRP receptors with CGRP₈₋₃₇ increased eNOS expression by ~5-fold, suggesting that capsaicin-sensitive sensory nerves are involved in the control of key signaling proteins for vascular function. In this review, we discuss the importance of connexin-based channels in the control of BBB integrity and the functional interaction of vascular connexins and pannexins with the peripheral nervous system.

J. Cell. Physiol. 229: 1336–1345, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Blood vessels are typically thought as a simply irrigation system intended to provide nutrients to the tissues and remove metabolic waste. However, the vascular system forms a complex and dynamic network that must work in fine coordination with all surrounding cells. This coordination is especially important in tissues that present a high metabolic demand such as nervous tissue or cardiac and skeletal muscle (Rolfe and Brown, 1997), since variations in cell activity must be paralleled by a proportional change in blood flow to adjust the supply of energy substrate to tissue metabolism (Iadecola et al., 1997; Iadecola, 2004; Segal, 2000, 2005; Filosa et al., 2006; Figueroa and Duling, 2009). Hence control of vascular function does not depend only on the fine communication between smooth muscle and endothelial cells, but also on tight coordination of resistance vessels and capillaries with the tissue requirements.

In addition to match oxygen and nutrient supply to metabolic demand, blood vessels of the cerebral microcirculation also contribute to control the environment of parenchymal brain tissue, since microvascular cerebral endothelial cells form a barrier between systemic blood circulation and brain tissue (Gloor et al., 2001; Wachtel et al., 2001; Ballabh et al., 2004; Hawkins and Davis, 2005; Abbott et al., 2010; Liebner et al., 2011). This blood–brain barrier (BBB) is a highly selective, permeability barrier that separates and protects the central nervous system (CNS) from potentially damaging blood-borne substances, which is essential for maintaining homeostasis in the CNS. Then, the stability of BBB is key for keeping a proper neuronal activity and brain function (Gloor et al., 2001; Wachtel et al., 2001; Ballabh et al., 2004; Hawkins and Davis, 2005; Abbott et al., 2010; Liebner et al., 2011). Interestingly, although the interaction between endothelial cells is critical for the barrier function, communication among vascular cells and brain cells, especially astrocytes and neurons, appears to play a central role in the development and maintenance of the barrier (Goldstein, 1988; Kuchler-Bopp et al., 1999; Hawkins and Davis, 2005; Abbott et al., 2010).

Vascular function must not be coordinated only between adjacent smooth muscle cells and endothelial cells, but also along the length of different segments of the arteriolar network in the microcirculation, which is essential for the regulation of blood flow distribution (Figueroa et al., 2004; Segal, 2005). Additionally, a significant part of the resistance to blood flow resides on the proximal vessels that directly supply the microcirculation (Davis et al., 1986; Mulvany and Aalkjaer, 1990; Segal, 2000), and then, changes in diameter must also be synchronized between arterioles (diameter, 10–100 μ m) and feed arteries (diameter, 100–500 μ m). In this context, it should be noted that the peripheral vascular system is tightly associated to a complex network of vasoconstrictor and vasodilator nerve fibers (Rubino and Burnstock, 1996; Kawasaki, 2002; Tsuru et al., 2002; Brain and Grant, 2004). Although the gap junction-mediated linkage of cells of the vessel wall certainly contribute to the coordination of

The authors have no conflict of interest.

Contract grant sponsor: FONDECYT;
Contract grant numbers: 1100850, 1111033.
Contract grant sponsor: CONICYT;
Contract grant number: 24121388.

*Correspondence to: Xavier F. Figueroa, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
E-mail: xfigueroa@bio.puc.cl

Manuscript Received: 14 October 2013

Manuscript Accepted: 16 January 2014

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 21 January 2014.
DOI: 10.1002/jcp.24563

vasomotor tone in the microvascular network (Figuroa and Duling, 2009), the innervation of peripheral vessels play a key role in the local and central control of blood flow distribution by functionally connecting proximal and distal vessel segments (Burnstock, 1990; Kawasaki, 2002; Tsuru et al., 2002). Therefore, perivascular nerves are an intrinsic functional component of the vasculature that must work in concert with the gap junction-related intercellular communication system of the vessel wall.

Gap junctions are low resistance channels that directly communicate the cytoplasm of adjacent cells, allowing intercellular transfer of current and small solutes (<1.4 nm of diameter) (Perkins et al., 1998; Unger et al., 1999), such as ions and second messengers (e.g. Ca^{2+} and IP_3) (Evans and Martin, 2002; Saez et al., 2003; Isakson et al., 2007). These intercellular channels are formed by serial docking, at the plasma membrane, of two hemichannels (i.e. half gap junction channels) provided by each neighboring cell. In turn, hemichannels are made up by the arrangement of six connexin (Cx) proteins around a pore. At least twenty connexin isoforms have been described in mammals and each connexin isoform is typically termed according to their apparent molecular weight (Evans and Martin, 2002; Saez et al., 2003). Cells often express more than one connexin isoform (Saez et al., 2003) and hemichannels can be composed by association of one (homomeric channels) or a mixture (heteromeric channels) of different connexin isoforms, which typically differ in unitary conductance, permeability, and regulation (He et al., 1999; Cottrell et al., 2002; Martinez et al., 2002; Moreno, 2004). Then, homomeric and heteromeric hemichannels provide signaling pathways with unique communication properties. Nevertheless, direct cell-to-cell communication via gap junctions is not the only mechanism of connexin-mediated signaling, because functional hemichannels may also remain unpaired and release paracrine signals such as ATP, NAD^+ , prostaglandins or NO (Bruzzzone et al., 2001; Stout et al., 2002; Goodenough and Paul, 2003; Saez et al., 2003; Cherian et al., 2005; Figuroa et al., 2013).

Interestingly, another family of membrane proteins named pannexins (Panxs) was recently described to present similar characteristics of connexins (Panchin et al., 2000; Bruzzzone et al., 2003). Three members of this protein family have currently been described (Panx-1, Panx-2, and Panx-3) (Panchin et al., 2000; Bruzzzone et al., 2003). Although the homology in the amino acid sequence of connexins and pannexins is very low (~16%), these proteins share a similar membrane topology (Bruzzzone et al., 2003). Hitherto pannexins have been observed to form only hemichannels in physiological conditions, which provides an additional mechanism of hemichannel-mediated paracrine or autocrine signaling processes (Locovei et al., 2006; Billaud et al., 2011; Orellana et al., 2011; Chandrasekhar and Bera, 2012).

Connexins and pannexins in central and peripheral vasculature

Communication via connexin-formed channels in the vascular system may be mediated by interaction of one or more of 5 connexin isoforms. In general, the expression of Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, and Cx45 has been detected in the vessel wall (van Kempen et al., 1995; van Kempen and Jongmsa, 1999; Severs et al., 2001; Hill et al., 2002; Haefliger et al., 2004; Figuroa and Duling, 2008; Okamoto et al., 2009). However, it is important to note that the pattern of connexin expression in the vasculature is variable and depends on vessel size, vascular territory, and species (van Kempen et al., 1995; van Kempen and Jongmsa, 1999; Hill et al., 2002; Figuroa et al., 2004) (Table I). Cx32 was just recently detected in endothelial cells (Okamoto et al., 2009), but this connexin has not been

described to be expressed in the cerebral circulation. Cx37 and Cx40 are also typically confined to endothelial cells (Gabriels and Paul, 1998; van Kempen and Jongmsa, 1999; Severs et al., 2001; Kwak et al., 2002; Simon and McWhorter, 2002; Figuroa et al., 2003; Figuroa and Duling, 2008), although, in rat, both connexins have been found in smooth muscle cells as well (Little et al., 1995; Gabriels and Paul, 1998; van Kempen and Jongmsa, 1999; Severs et al., 2001; Rummery et al., 2002a). Likewise, in cerebral circulation, Cx40 is mainly found in the endothelium and Cx37 has been detected in both endothelial and smooth muscle cells (Ujiie et al., 2003; Haddock et al., 2006). Cx43 is not restricted to a specific cell type (Little et al., 1995; Gabriels and Paul, 1998; van Kempen and Jongmsa, 1999; Severs et al., 2001), but, is most prominently found in smooth muscle cells of peripheral blood vessels (van Kempen and Jongmsa, 1999) or, in contrast, in endothelial cells of cerebral vessels (Virgintino et al., 2001; Ujiie et al., 2003; Haddock et al., 2006). Cx45, however, has been observed only in smooth muscle cells and is mainly expressed in cerebral vessels (Kruger et al., 2000; Li and Simard, 2001; Li and Simard, 2002). The expression pattern of Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, and Cx45 in the vessel wall of different vascular territories is summarized in Table I.

The distribution of pannexins in the vasculature has not been well-characterized, but the first reports indicate that, as in the case of connexins, the expression of pannexins is heterogeneous along the vascular tree and seems to depend on vessel size and vascular territory (Lohman et al., 2012) (Table I). Panx-1 is the most abundant pannexin protein in peripheral blood vessels and has consistently been found to be expressed in the endothelium of conduit and resistance vessels of all vascular territories, but, in smooth muscle cells, this protein has only been detected in small arteries and arterioles (Billaud et al., 2011; Lohman et al., 2012). In contrast to the peripheral circulation, Panx-1 was detected exclusively in smooth muscle cells of the middle cerebral artery, suggesting a different distribution and, probably, function in the cerebral vasculature (Burns et al., 2012). The expression of Panx-2 and Panx-3 seems to be restricted to the smooth muscle and endothelium of small resistance vessels of some vascular territories. Panx-2 has only been detected in first order pulmonary arteries (Lohman et al., 2012) and middle cerebral artery (Burns et al., 2012), and Panx-3 in small coronary arteries, renal cortex arterioles, and first order arterioles of distal lung (Lohman et al., 2012). However, the expression of Panx-3 has not been studied in detail in cerebral blood vessels. The expression and distribution of Panx-1, Panx-2, and Panx-3 in the vessel wall is summarized in Table I.

Regulation of blood-brain barrier function by connexins

Neuronal environment is finely controlled by a barrier that restricts the transport of solutes between blood and brain tissue. The BBB is composed by endothelial cells, capillary basal membrane, astrocyte end-feet, and pericytes (Kuchler-Bopp et al., 1999; Ballabh et al., 2004; Hawkins and Davis, 2005; Abbott et al., 2010; Liebner et al., 2011). In contrast to the peripheral circulation, the BBB endothelial cells do not present fenestrations, exhibit scarce vesicular transcytosis and are highly sealed by an extensive tight junction complex that selectively excludes most hydrophilic molecules to get into the brain by paracellular flux (Gloor et al., 2001; Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010). Nevertheless, tight junctions do not limit the movement of small lipophilic substances such as O_2 and CO_2 , which can diffuse directly through plasma membrane. In addition, specific transport of glucose and amino acids is achieved by carriers and the transport of large essential molecules is attained by receptor-mediated endocytosis (Gloor et al., 2001; Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010). The

TABLE I. Connexin and pannexin distribution in the vascular wall

Protein	Blood vessel	EC	SMC	Specie	Reference
Cx32	Inferior vena cava	+	-	Mouse	Okamoto et al. (2009)
Cx37	Aorta	+	-	Rat	van Kempen and Jongsma (1999), Severs et al. (2001), Gabriels et al. (1998), Rummery et al. (2002a)
	Coronary artery	+	+	Rat	van Kempen and Jongsma (1999)
	Caudal artery	+	+/-	Rat	Hill et al. (2002), Rummery et al. (2002a,b)
	Mesenteric arteries (200–300 μm) and arterioles (<50 μm)	+	-	Rat	Gustafsson et al. (2003)
	Basilar artery	+	+/-	Rat	Hill et al. (2002), Haddock et al. (2006)
	Aorta	+	-	Mouse	Kwak et al. (2002), Kruger et al. (2002)
	Cremaster muscle arterioles	+	-	Mouse	Figueroa and Duling (2008)
	Skin, testis, intestine and lung vessels	+	-	Mouse	Simon and McWhorter (2002)
	Cheek pouch arterioles, retractor muscle feed arteries	+	+/-	Hamster	Sandow et al. (2003)
	Coronary artery	+	-	Pig	van Kempen and Jongsma (1999)
	Middle cerebral artery	+	-	Rabbit	Ujii et al. (2003)
Cx40	Aorta	+	-	Rat	Bruzzone et al. (1993), van Kempen and Jongsma (1999), Severs et al. (2001), Gabriels et al. (1998), Rummery et al. (2002a)
	Coronary artery	+	+	Rat	van Kempen and Jongsma (1999)
	Caudal artery	+	-	Rat	Hill et al. (2002), Rummery et al. (2002a,b)
	Mesenteric arteries (200–300 μm) and arterioles (<50 μm)	+	-	Rat	Gustafsson et al. (2003)
	Basilar artery	+	+/-	Rat	Li and Simard (1999), Hill et al. (2002), Haddock et al. (2006)
	Brain Pial arterioles	+	+/-	Rat	Little and Duling (1995)
	Aorta	+	-	Mouse	Kwak et al. (2002), Kruger et al. (2002), Isakson et al. (2006)
	Cremaster muscle arterioles	+	-	Mouse	Figueroa et al. (2003), Figueroa and Duling (2008)
	Skin, testis, intestine and lung vessels	+	-	Mouse	Simon and McWhorter (2002)
	Cheek pouch arterioles, retractor muscle feed arteries	+	-	Hamster	Sandow et al. (2003)
	Aorta and coronary artery	+	+	Pig	van Kempen and Jongsma (1999)
	Aorta and coronary artery	+	+	Cow	van Kempen and Jongsma (1999)
	Middle cerebral artery	+	+/-	Rabbit	Ujii et al. (2003)
Cx43	Aorta	+	+	Rat	Bruzzone et al. (1993), van Kempen and Jongsma (1999), Severs et al. (2001), Gabriels et al. (1998), Rummery et al. (2002a)
	Coronary artery	-	+	Rat	van Kempen and Jongsma (1999)
	Caudal artery	+	-	Rat	Hill et al. (2002), Rummery et al. (2002a,b)
	Mesenteric arteries (200–300 μm) and arterioles (<50 μm)	+	-	Rat	Gustafsson et al. (2003)
	Basilar artery	+	+	Rat	Li and Simard (1999), Hill et al. (2002), Haddock et al. (2006)
	Brain pial arterioles	+	+/-	Rat	Little and Duling (1995)
	Aorta	+/-	+	Mouse	Kwak et al. (2002), Kruger et al. (2002), Isakson et al. (2006)
	Cheek pouch arterioles, retractor muscle feed arteries	+	-	Hamster	Sandow et al. (2003)
	Aorta and coronary artery	+	+	Pig	van Kempen and Jongsma (1999)
	Aorta	-	+	Cow	van Kempen and Jongsma (1999)
	Internal mammary artery	-	+	Human	Severs et al. (2001)
	Telencephalon vessels	+	-	Human Rabbit	Virgintino et al. (2001)
	Middle cerebral artery	+/-	+	Rat	Ujii et al. (2003)
Cx45	Thoracic aorta	-	+/-	Rat	Rummery et al. (2002a)
	Caudal artery	-	+/-	Rat	Rummery et al. (2002a)
	Basilar and posterior cerebral arteries	-	+	Rat	Li and Simard (2001)
Panx-1	Middle cerebral artery	-	+	Rat	Burns et al. (2012)
	Aorta, carotid artery, femoral artery	+	-	Mouse	Lohman et al. (2012)
	Renal artery	+	+/-	Mouse	Lohman et al. (2012)
	Intrapulmonary, coronary, abdominal arteries	+	+	Mouse	Lohman et al. (2012)
	Spinotrapezius muscle and cremaster muscle arterioles	+	+	Mouse	Lohman et al. (2012)
	Thoracodorsal artery	+	+	Mouse	Billaud et al. (2011), Lohman et al. (2012)
Panx-2	Middle cerebral artery	+	+	Rat	Burns et al. (2012)
	Intrapulmonary artery	+/-	+	Mouse	Lohman et al. (2012)
Panx-3	Intrapulmonary artery	+	+/-	Mouse	Lohman et al. (2012)
	Small coronary arteries (<100 μm)	+	+	Mouse	Lohman et al. (2012)
	Cortical kidney Arterioles	+	+/-	Mouse	Lohman et al. (2012)

EC: endothelial cells; SMC: smooth muscle cells.

capillary basal membrane physically separates the astrocytic end-feet and endothelial cells. Although astrocytic end-feet tightly ensheath the capillary wall (Fig. 1), they are not involved directly in the barrier function, but rather play a critical role in the signaling that induces the generation and functional maintenance of the tight junction barrier (Goldstein, 1988; Kuchler-Bopp et al., 1999; Iadecola, 2004; Hawkins and Davis, 2005; Leybaert, 2005; Liebner et al., 2011). Pericytes are embedded within the basal membrane and are also involved in the formation of endothelial tight junctions (Lai and Kuo, 2005; Dore-Duffy, 2008; Bell et al., 2010). The functional integrity of all components of the BBB is critical for the normal function and stability of the permeability barrier, and, in this context, gap junction channels and hemichannels of astrocytes as well as endothelial cells have emerged as novel, key regulators of BBB.

Connexin signaling in astrocytes

The connexin-mediated signaling in astrocytes depends on the expression of Cx30 and Cx43 (Thompson and Macvicar, 2008) and, consistent with the participation of connexin-based channels in the BBB function, the time pattern of postnatal expression of Cx30 and Cx43 in astrocyte end-feet correlates with the maturation of the BBB (Ezan et al., 2012). In addition, the combination of global Cx30 knockout (Teubner et al., 2003) with astrocyte-specific deletion of Cx43 (deletion targeted to glial fibrillary acidic protein-expressing cells) (Theis et al., 2001) leads to morphological and functional barrier alterations (Ezan et al., 2012). Microvessels in the cortex and hippocampus of animals with astrocytes lacking Cx30 and Cx43 were observed to be surrounded by swollen edematous

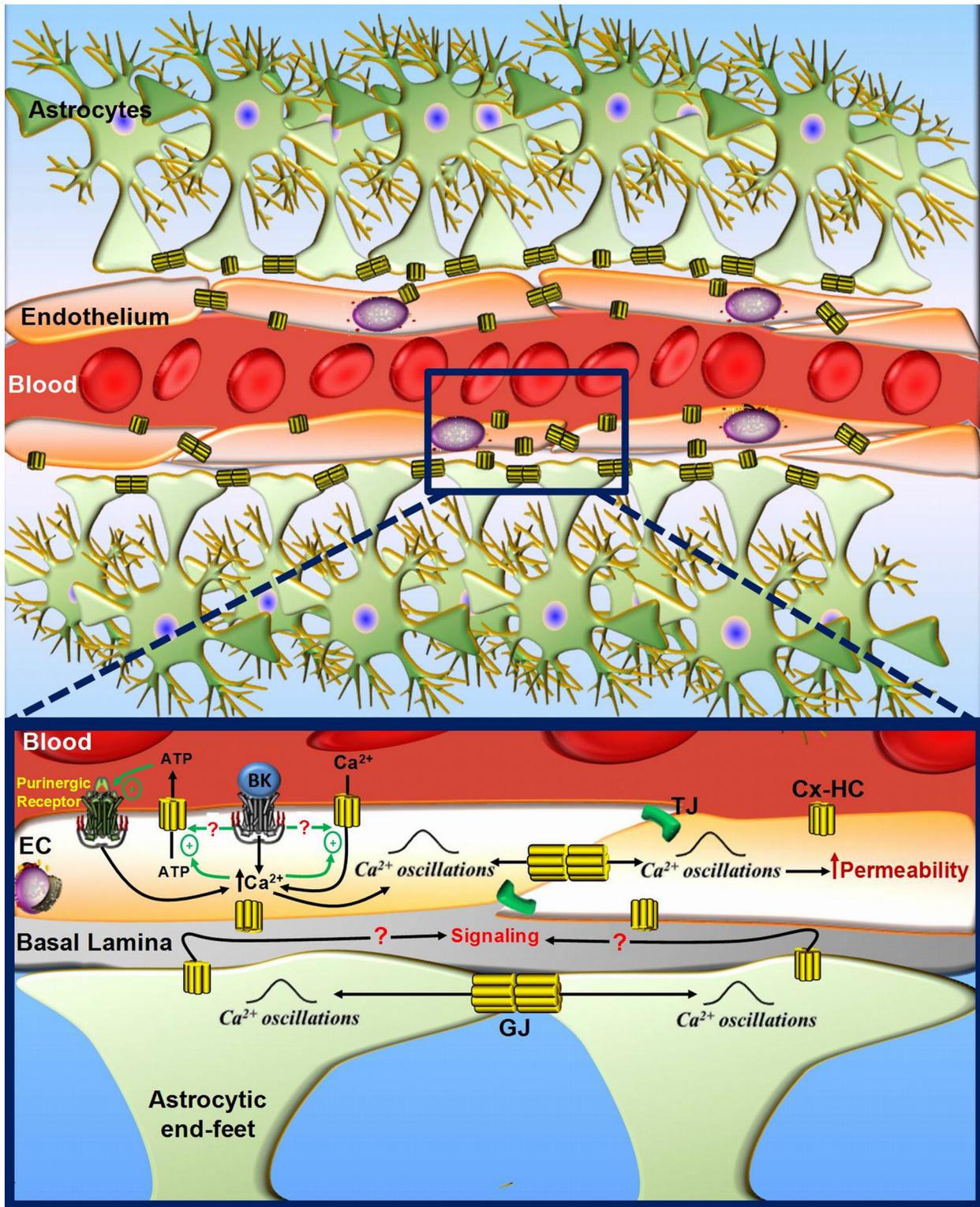


Fig. 1. Control of blood–brain barrier (BBB) permeability by connexin-formed channels. BBB function is regulated and coordinated by interaction of gap junction (GJ)- and hemichannel-mediated signaling between endothelial cells (EC) and astrocytic end-feet. Although endothelial cells and astrocytic end-feet are physically separated by the capillary basal membrane, astrocytes play a central role in the control of BBB generation and tight junction barrier (TJ) stability, at least in part, through astrocytic end-feet-dependent signaling via gap junction channels and hemichannels. In endothelial cells, the Ca^{2+} signaling associated to the bradykinin (BK)-stimulated increase in BBB permeability is mediated by concerted activation of ATP release and Ca^{2+} influx through connexin-formed hemichannels (Cx-HC). Stimulation of P2Y purinergic receptors by the ATP released via hemichannels contributes to increase and coordinate the bradykinin-initiated Ca^{2+} signal. Additionally, gap junction communication is essential for the synchronization of the Ca^{2+} oscillations between neighboring endothelial cells. Gap junctions are also important in the functional coordination of the astrocytic end-feet Ca^{2+} signals.

perivascular end-feet, which was associated with a decrease by half in the expression of aquaporin 4 (AQP4), an astrocyte perivascular end-feet marker, and β -dystroglycan (Ezan et al., 2012). Although β -dystroglycan is involved in the linking of astrocyte and endothelial cytoskeleton to the perivascular basal lamina (Ervasti and Campbell, 1993; James et al., 1996; del Zoppo and Milner, 2006), deletion of Cx30 and Cx43 did not change the expression and distribution of basal lamina molecules interacting with β -dystroglycan (Ezan et al., 2012). Likewise, the overall structure and expression of tight junction proteins in the cerebral endothelium were not affected in the double knockout. However, the BBB strength was diminished in these animals, as evidenced by changes in intraluminal vascular pressure. Although deletion of Cx30 and Cx43 did not affect permeability in control conditions (in situ brain perfusion at 100–110 mmHg of hydrostatic pressure), the increase in hydrostatic pressure (\sim 180 mmHg) by adding human serum albumin to the perfusion saline solution resulted in an increment in the permeability to high molecular weight molecules (Ezan et al., 2012). Changes in BBB permeability were assessed by using [14 C]sucrose and horseradish peroxidase (HRP). Although HRP may be transported by a transendothelial pathway (Lossinsky and Shivers, 2004), the HRP signal was only detected in the extracellular space and not within endothelial cells (Ezan et al., 2012), suggesting that the increase in HRP permeability was rather via a paracellular pathway. All together, these results indicate that the absence of astrocytic connexins weakens the BBB, which suggest that connexin-mediated signaling in the astrocyte end-feet plays a central role in the preservation of the functional integrity of BBB properties (Fig. 1). Interestingly, disruption of the BBB leads to gradual development of an epileptic focus in 4–7 days (Seiffert et al., 2004; Ivens et al., 2007 Tomkins et al., 2007; Tomkins et al., 2008). The development of epilepsy in these conditions appears to be initiated by plasma extravasation and, the subsequent, albumin-mediated transforming growth factor β (TGF β)-dependent astrocyte activation (Friedman et al., 2009; Heinemann et al., 2012; Kovacs et al., 2012). This process is associated with functional changes in astrocytes, such as control of extracellular K^+ and glutamate homeostasis, which contribute to the increased neuronal excitability (David et al., 2009; Friedman et al., 2009; Kovacs et al., 2012). Activation of astrocytes is also paralleled by downregulation of Cx30 and Cx43 expression in these cells (David et al., 2009), which may contribute to prolong the BBB disruption and facilitate the development of epilepsy along the time.

Connexin signaling in cerebral endothelial cells

As observed in astrocytes, connexins expressed in endothelial cells are involved in the operative structure of the BBB, but in this case, connexin-based channels seem to play a more radical role. In porcine BBB endothelial cells, the tight junction proteins occludin, claudin-5, and zonula occludens-1 (ZO-1) were found to co-localize and co-immunoprecipitate with either Cx40 or Cx43 (Nagasawa et al., 2006), which is consistent with previous reports (Giepmans and Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998; Figueroa et al., 2004). Although this spatial association may contribute to stabilize the intercellular gap junction communication, apparently, the connexin-mediated signaling is also essential for the functional integrity of BBB, because treatment with 20 μ M 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA) or 100 μ M oleamide, two connexin-formed channel blockers, resulted in a reduction in transendothelial electrical resistance and in an increase in paracellular permeability to mannitol, which was not related to an alteration in the subcellular localization or expression of connexins (Cxs 37, 40 or 43) or tight junction proteins (occludins, claudin-5, ZO-1, junctional adhesion molecule

(JAM)-A, JAM-B and JAM-C) (Nagasawa et al., 2006). Changes in intracellular Ca^{2+} concentration play a key role in the control of BBB permeability properties (De Bock et al., 2012), and then, these results may be consistent with the notion that gap junction intercellular communication may coordinate the Ca^{2+} signaling between neighboring endothelial cells (Figueroa et al., 2004) (Fig. 1). However, connexin-formed functional hemichannels may also be involved in the control of Ca^{2+} dynamics in cerebral endothelial cells (Fig. 1), as recently demonstrated by De Bock and collaborators. The participation of hemichannels in this process was tested by using RBE4 (rat brain endothelial) cells and bovine brain capillary endothelial cells grown in a noncontact co-culture with rat mixed glial cells, in which endothelial cells were seeded on membrane inserts and glial cells on the bottom dish (De Bock et al., 2011). Interestingly, these authors found that blockade of connexin-based channels using carbenoxolone, GAP27 (a mimetic peptide of the second extracellular loop of Cx37 and Cx43) or siRNA silencing of Cx37 and Cx43 inhibits the Ca^{2+} oscillations and, the subsequent increase in BBB permeability activated by the pro-inflammatory agent bradykinin (BK) (De Bock et al., 2011). Notably, GAP27 also blocked the increase in BBB permeability evoked by BK *in vivo* (De Bock et al., 2011). Furthermore, the BK-induced Ca^{2+} oscillations correlated with a GAP27-sensitive hemichannel opening, as demonstrated by the assessment of Lucifer yellow or propidium iodide uptake or pre-loaded calcein release (De Bock et al., 2011). It is important to note that cells were treated with GAP27 for short periods of time (from 10 min to 1 h), which only inhibits hemichannel activity, without affecting the intercellular gap junction-mediated communication (Braet et al., 2003; Eltzschig et al., 2006; Evans et al., 2006), as confirmed in this study by De Bock et al. (2011).

Hemichannel-dependent responses may be mediated by ATP release and although BK-triggered Ca^{2+} oscillations were inhibited after interfering with ATP signaling, Ca^{2+} oscillations activated by ATP stimulation were not associated with an increase in BBB permeability or hemichannel opening (De Bock et al., 2011). Then, in contrast to the gap junction contribution to maintain the BBB function (Nagasawa et al., 2006), hemichannels appear to play a key role in the generation and, probably, modulation of the Ca^{2+} oscillations associated with the increase in BBB permeability induced by BK (Fig. 1). Although hemichannel-driven ATP release certainly participates in the control of brain endothelial cell function, the BK-evoked increase in permeability is a complex signaling process and the activation of a parallel signal, such as a hemichannel-mediated Ca^{2+} influx, seems to be required (Fig. 1). Disruption or loosening of the tight junction complex with the consequent BBB detriment is a critical feature of neuroinflammatory diseases such as multiple sclerosis, cancer and HIV (de Vries et al., 1996 Davies, 2002; Eugenin et al., 2011; Miller, 2012; Spindler and Hsu, 2012), and then, hemichannels may provide a novel pharmacological target for therapeutic strategies design to protect the BBB function in pro-inflammatory conditions.

Perivascular nerves in the regulation of vascular connexins and pannexins

Peripheral blood vessels are extensively surrounded by a dense network of autonomic nerve fibers of both sympathetic and sensory nerves (Kawasaki, 2002; Tsuru et al., 2002). Perivascular nerves play an important role in the control and coordination of vascular function between different vessel segments through the release of neurotransmitters that activate specific receptors localized in endothelial cells and/or smooth muscle cells (Burnstock, 1990; Rubino and Burnstock, 1996; Tsuru et al., 2002). Interestingly, the signaling pathways activated by most of these neurotransmitters in

different cells have been associated with a fine regulation of connexins or pannexins (Giaume et al., 1991; De Mello, 1997; Head et al., 1998; Haug and Segal, 2005; Billaud et al., 2011; Piao et al., 2011; Billaud et al., 2012).

Perivascular sympathetic nerves

The sympathetic neurotransmission is mediated by the release of noradrenaline, neuropeptide Y and ATP, but, among these, noradrenaline is the most prominent sympathetic neurotransmitter (Tsuru et al., 2002) and several studies indicate that this neuronal signal is involved in the control of gap junction-mediated intercellular communication in different cell types. Twenty years ago, Giaume et al. found that β - and α -adrenergic signaling possesses a dual regulatory effect on gap junction channels in primary cultures of mouse striatal astrocytes (Giaume et al., 1991). While the increase in cAMP associated to β -adrenoceptor activation enhanced dye-coupling in these cells, stimulation of α 1-adrenergic receptor with noradrenaline inhibited the intercellular gap junction communication through a phospholipase C-dependent signaling pathway (Giaume et al., 1991). Likewise, the electrical coupling of ventricular cardiac cells was observed to be strongly reduced by the stimulation with phenylephrine, an α 1-adrenoceptor agonist (De Mello, 1997). Consistent with these findings, electrical stimulation of perivascular nerves or exogenous application of noradrenaline inhibited the longitudinal conduction of acetylcholine-induced vasodilation in retractor muscle arterioles of hamster (Haug and Segal, 2005). As conduction of vasomotor responses depends on spread of an electrical signal along the vessel length through gap junctions (Figuroa et al., 2003, 2004; Figuroa and Duling, 2009), the inhibition of the conducted vasodilation induced by acetylcholine suggest that sympathetic activation reduces the gap

junction-mediated coupling in the vascular wall. It is important to note, however, that freezing-induced perivascular denervation did not affect the conducted vasomotor responses initiated by acetylcholine or phenylephrine (Looft-Wilson et al., 2004), which suggests that basal, tonic activity of perivascular sympathetic nerves is likely to be below the signaling threshold for the adrenoceptor-mediated control of gap junction activity. Taken together, these data suggest that, in addition to control vasomotor tone, sympathetic nerves also are involved in the regulation of gap junction-mediated synchronization of vascular function.

Perivascular sympathetic nerves also appear to work in coordination with pannexin- and connexin-based hemichannels in resistance vessels. Recently, Billaud et al. found that phenylephrine-induced vasoconstriction of isolated and pressurized mouse thoracodorsal arteries is drastically reduced after blocking Panx-I-based channels or ATP signaling (Billaud et al., 2011, 2012). Phenylephrine stimulation of smooth muscle cells evoked a Panx-I channel-dependent ATP release, and then, the authors proposed that α 1-adrenoceptor stimulation is coupled to P2Y receptor activation via ATP release through Panx-I channel opening, which partially contributes to the noradrenaline-induced vasoconstriction (Billaud et al., 2011, 2012). Therefore, these results indicate that Panx-I is involved in the perivascular sympathetic nerve-mediated control of vasomotor tone. Interestingly, Cx40 may also participate in the α 1-adrenoceptor signaling, since the blockade of connexin-based channels with 18 β -GA or Cx40 mimetic peptide ⁴⁰GAP27 was recently reported to attenuate the increase of phenylephrine-induced perfusion pressure in rat isolated kidney (Piao et al., 2011). The specific participation of Cx40 in the response to phenylephrine was confirmed by the lack of effect of the connexin-blocker peptides ^{37,43}GAP27, which targets Cx37- and Cx43-based channels, and ⁴³GAP26,

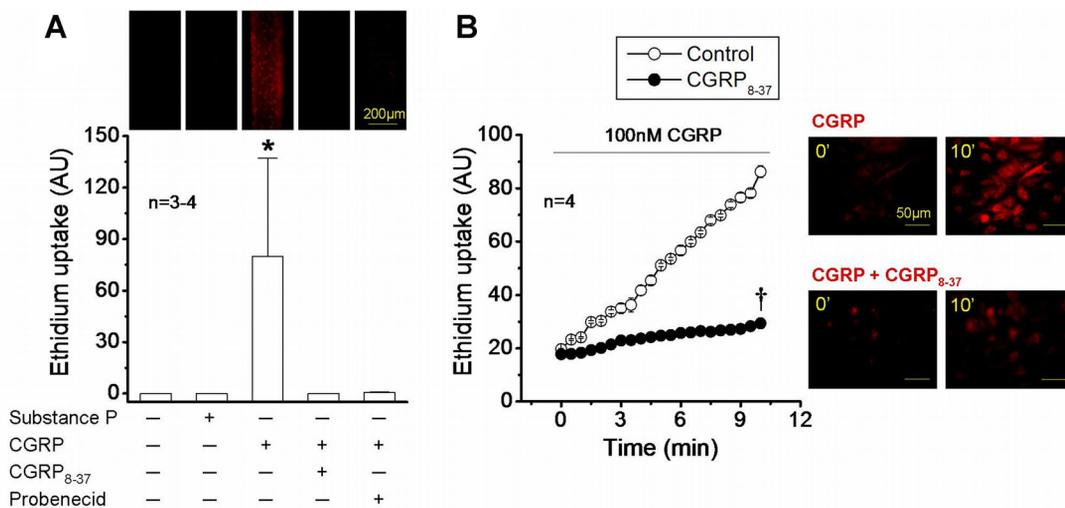


Fig. 2. Activation of vascular pannexin-1 channels by CGRP. (A) CGRP induces pannexin-1 channel opening in the wall of resistance arteries. The isolated arterial mesenteric bed of rat was perfused at 2 ml/min with a Tyrode-buffer saline solution kept at 37 °C. Then, mesenteric resistance arteries were stimulated with 100 nM substance P or 100 nM CGRP for 5 min in the presence of 5 μ M ethidium bromide to assess hemichannel opening by measuring ethidium uptake at the end of the stimulation period. In addition, the effect of CGRP₈₋₃₇ (300 nM), a CGRP receptor-1 inhibitor, or probenecid (1 mM), a pannexin-1 channel blocker, on CGRP-induced ethidium uptake was evaluated. (B) CGRP induces pannexin-1 channel opening in primary cultures of mesenteric endothelial cells. Cultured endothelial cells were incubated in MOPS-buffered physiological saline solution (pH 7.4) containing 5 μ M ethidium bromide, and then, the ethidium uptake observed in response to 100 nM CGRP was evaluated over time (time lapse recording) in control conditions and in the presence of 300 nM CGRP₈₋₃₇. The horizontal bar indicates the period of stimulation. Ethidium produces nuclear fluorescence after intercalating with DNA, which was evaluated by epifluorescence (exciter: 530–550 nm, emission: 590 nm) and quantified using the software ImageJ. Changes in ethidium-fluorescence signal are expressed in arbitrary units (AU). *, $P < 0.05$ vs. vessels in control conditions by one-way ANOVA plus Newman–Keuls post hoc test. †, $P < 0.05$ vs. Control by two-way ANOVA.

which is a Cx43 selective peptide (Piao et al., 2011). The mechanisms involved in the inhibition of phenylephrine-evoked increment in perfusion pressure were not elucidated in this study. However, the effect of the peptide ⁴⁰GAP27 was observed in a few minutes (Piao et al., 2011), which suggests the participation of Cx40-formed hemichannels.

Perivascular sensory nerves

The primary neurotransmitters of perivascular sensory nerves are calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (Rubino and Burnstock, 1996) and, in thymic cells, both substance P or CGRP application has been observed to reduce the intercellular diffusion of Lucifer yellow (Head et al., 1998), suggesting that sensory nerves may be involved in the

regulation of intercellular communication via gap junction channels. However, in contrast to the reduction in gap junction communication observed in thymic cells, we found that CGRP, but not substance P, leads to hemichannel activation in the vessel wall, as attested by the strong increase in ethidium uptake detected in mesenteric resistance vessels (Fig. 2A) and primary cultures of mesenteric endothelial cells (Fig. 2B). As expected, the CGRP-induced hemichannel activation was fully prevented by CGRP₈₋₃₇, a CGRP receptor antagonist, but also by probenecid, a Panx-1 hemichannel blocker, which indicates that CGRP activates Panx-1-based channel opening in the vascular wall, most likely, in endothelial cells (Fig. 2). Although the physiological or pathophysiological relevance of the CGRP-induced Panx-1-based channel opening remains to be determined, this neuropeptide may be involved in the control of the

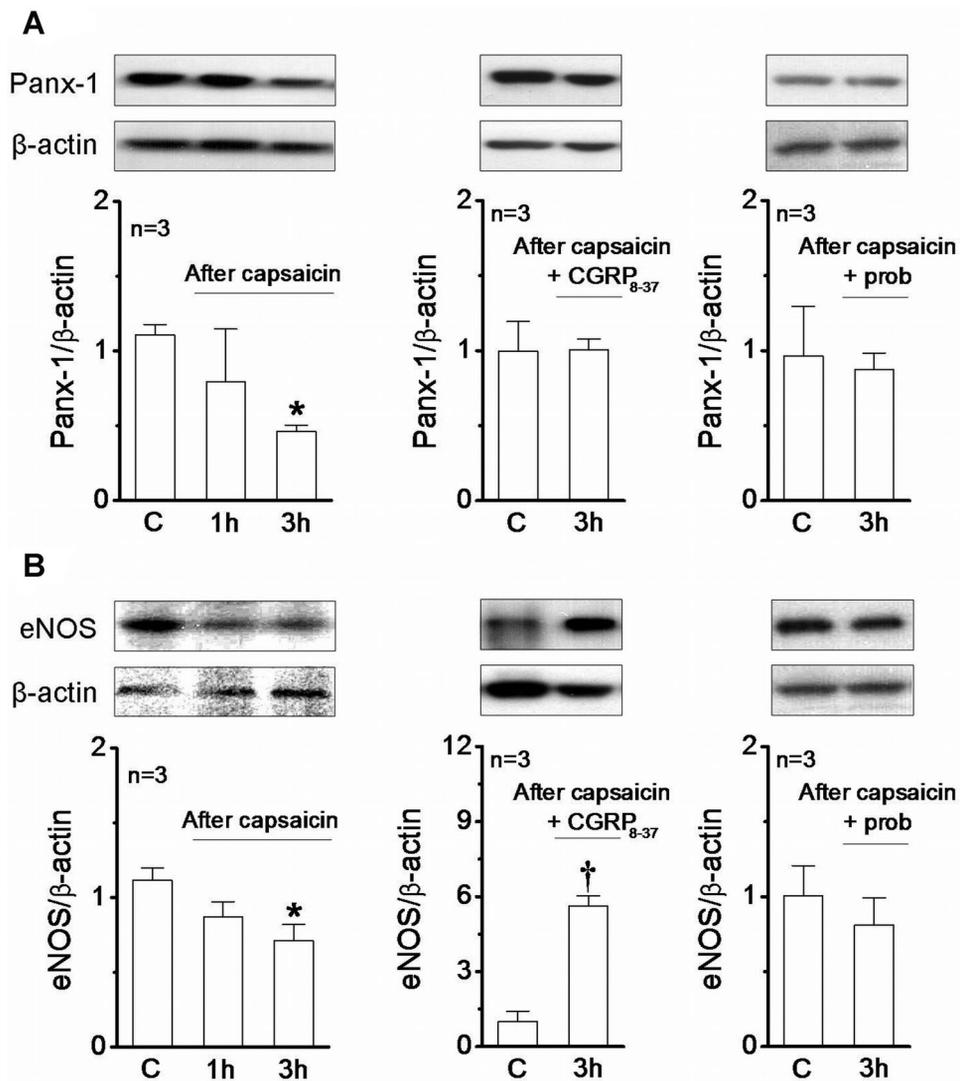


Fig. 3. Capsaicin-induced CGRP release from perivascular sensory nerves controls the expression of pannexin-1 and eNOS in resistance arteries. The isolated arterial mesenteric bed of rat was perfused at 2 ml/min with a Tyrode-buffer saline solution kept at 37°C. Then, mesenteric vessels were homogenized in control conditions (C) and 1 h or 3 h after 20 min treatment with 1 μM capsaicin to analyze the expression of pannexin-1 (Panx-1) and endothelial NO synthase (eNOS) by Western blot. In addition, the effect of CGRP₈₋₃₇ (300 nM), a CGRP receptor-1 inhibitor, or probenecid (prob, 1 mM), a pannexin-1 channel blocker, on the response to capsaicin treatment was also evaluated (horizontal bars). Controls were treated with the vehicle of capsaicin. The blots were stripped and re-probed for β-actin. Protein bands were analyzed using the software ImageJ and β-actin was used to normalize the changes in Panx-1 and eNOS expression. *, $P < 0.05$ vs. Control by one-way ANOVA plus Newman-Keuls post hoc test. †, $P < 0.05$ vs. Control by unpaired Student's t-test.

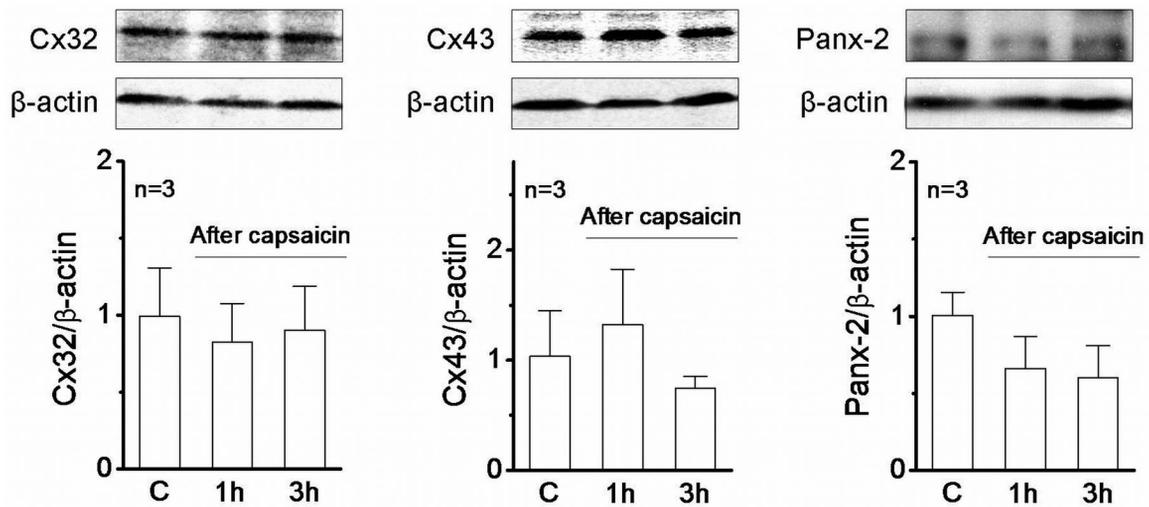


Fig. 4. CGRP release from perivascular sensory nerves does not affect the expression of connexin 32 (Cx32), connexin 43 (Cx43), or pannexin 2 (Panx-2). The isolated arterial mesenteric bed of rat was perfused at 2 ml/min with a Tyrode-buffer saline solution kept at 37 °C. Then, mesenteric vessels were homogenized in control conditions (C) and 1 h or 3 h after treatment with 1 μ M capsaicin for 20 min to analyze the expression of Cx32, Cx43 and Panx-2 by Western blot. Controls were treated with the vehicle of capsaicin. The blots were stripped and re-probed for β -actin. Protein bands were analyzed using the software ImageJ and β -actin was used to normalize the changes in Cx32, Cx43, and Panx-2.

expression of critical signaling proteins for vascular function. In this context, here we show that stimulation of CGRP release from perivascular sensory fibers of isolated arterial mesenteric bed of rat with 1 μ M capsaicin for 20 min results in a gradual reduction in the expression of Panx-1 and eNOS that reaches significance 3 h after capsaicin application (Fig. 3). Interestingly, capsaicin treatment did not affect the expression level of Panx-2, Cx32, and Cx43 (Fig. 4). Capsaicin induces the release of neurotransmitters specifically from perivascular sensory nerves by activating vanilloid receptors (i.e. TRPV1 channels) of sensory C and A δ fibers, which increases permeability to cations and leads to nerve depolarization (Caterina et al., 1997; Wood and Docherty, 1997; Zygmunt et al., 1999). Consistent with the involvement of CGRP in the response to capsaicin, blockade of CGRP receptors with CGRP₈₋₃₇ prevented the capsaicin-induced decrease in Panx-1 expression (Fig. 3). Surprisingly, in the case of eNOS, treatment with CGRP₈₋₃₇ not only abolished the effect of capsaicin, but also produced an increase of ~5-fold in eNOS expression (Fig. 3). The reduction in Panx-1 and eNOS expression was also prevented by probenecid (Fig. 3), which suggests that opening of Panx-1-formed channels is involved in this response. CGRP and substance P are widely-known as potent vasodilators (Rubino and Burnstock, 1996; Brain and Grant, 2004); however, these data strongly suggest that, in addition of their vasomotor activity, perivascular sensory nerves also regulate the expression of important signaling proteins in resistance arteries, at least in part, through a CGRP-dependent activation of Panx-1 channels in the vessel wall.

It is noteworthy that the blockade of CGRP receptors led to an increase in eNOS expression (Fig. 3), which suggests that release of CGRP inhibits the expression level of this enzyme. Then, the activation of perivascular sensory nerves observed in pro-inflammatory responses (Wang et al., 1996; Sorokin et al., 1997; Brain and Grant, 2004) may explain the endothelial dysfunction related to a reduction of eNOS levels typically described in pathological conditions associated with inflammation (Yoshizumi et al., 1993; Huang and Vita, 2006; Ding

et al., 2009). However, the contribution of substance P in the changes of eNOS expression induced by capsaicin cannot be discarded.

Conclusion

Blood vessels are complex multicellular structures that work as a unit and connexin- and pannexin-based channels are essential in the control and coordination of vascular function along the length of microvessels. Interestingly, the connexin- and pannexin-mediated control of vascular function is modulated by astrocytes, in the CNS, and by perivascular nerves, in peripheral tissues. In cerebral microcirculation, Cx-formed channels of both astrocytes and endothelial cells are critical in the control of BBB function. Interestingly, gap junction channels and hemichannels of endothelial cells appear to play opposite roles in the regulation of BBB permeability; while gap junction communication contribute to maintain the barrier integrity, hemichannel signaling is essential in the generation of the Ca²⁺ oscillations associated to the BBB disruption induced by pro-inflammatory signals such as BK. It is important to note that the participation of Cx-formed hemichannels in the astrocyte-mediated control of BBB function cannot be discarded. In peripheral circulation, gap junction-dependent coordination of vasomotor tone is modulated by perivascular sympathetic and sensory nerves. In addition, Cx40- and Panx-1-formed hemichannels in smooth muscle cells participate in the vasoconstriction elicited by α 1-adrenoceptor activation and, apparently, CGRP signaling is coupled to Panx-1 hemichannel opening. In this context, it is noteworthy that CGRP release by sensory nerves seems to be involved in the control of the expression of critical signaling proteins for vascular function such as Panx-1 and eNOS. However, the participation of substance P in this process is an interesting substrate for future investigations. Likewise, the function of Panx-2 and Panx-3 in resistance vessels remains to be determined. Then, it is becoming evident that gap junction channels and connexin- and Panx-1-formed hemichannels have different roles in the

regulation of vascular function, which may represent an attractive opportunity to the design of new specific pharmacological approaches for the manipulation of BBB permeability or the treatment of diseases-associated with the development of vascular or endothelial dysfunction such as hypertension or diabetes.

Acknowledgments

This work was supported by Grant Anillos ACT-71 from Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT, Grant #1100850 and #1111033 from Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico – FONDECYT and by Ph.D and Thesis support scholarship #24121388 from CONICYT.

Literature Cited

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the bloodbrain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. 2004. The bloodbrain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1–13.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, Zlokovic BV. 2010. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68:409–427.
- Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, Best AK, Chakraborty FB, Ravichandran KS, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. 2011. Pannexin1 regulates alpha-1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction. *Circ Res* 109:80–85.
- Billaud M, Sandilos JK, Isakson BE. 2012. Pannexin 1 in the regulation of vascular tone. *Trends Cardiovasc Med* 22:68–72.
- Braet K, Aspeslagh S, Vandamme W, Willecke K, Martin PE, Evans WH, Leybaert L. 2003. Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. *J Cell Physiol* 197:205–213.
- Brain SD, Grant AD. 2004. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 84:903–934.
- Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL, Paul DL. 1993. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* 4:7–20.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13644–13649.
- Bruzzone R, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A. 2001. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 15:110–110.
- Burns AR, Phillips SC, Sokoya EM. 2012. Pannexin protein expression in the rat middle cerebral artery. *J Vasc Res* 49:101–110.
- Burnstock G. 1990. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *J Hypertens Suppl* 8:S95–S106.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- Chandrasekhar A, Bera AK. 2012. Hemichannels: Permeants and their effect on development, physiology and death. *Cell Biochem Funct* 30:89–100.
- Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. 2005. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: A novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16:3100–3106.
- Cottrell GT, Wu Y, Burt JM. 2002. Cx40 and Cx43 expression ratio influences heteromeric/heterotypic gap junction channel properties. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1469–C1482.
- David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufner D, Friedman A. 2009. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: Consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J Neurosci* 29:10588–10599.
- Davies DC. 2002. Bloodbrain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *J Anat* 200:639–646.
- Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW. 1986. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 250:H291–H303.
- De Bock M, Culot M, Wang N, Bol M, Decroock E, De Vuyst E, da Costa A, Dauwe I, Vinken M, Simon AM, Rogiers V, De Ley G, Evans WH, Bultynck G, Dupont G, Cecchelli R, Leybaert L. 2011. Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and bloodbrain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1942–1957.
- De Bock M, Culot M, Wang N, da Costa A, Decroock E, Bol M, Bultynck G, Cecchelli R, Leybaert L. 2012. Low extracellular Ca²⁺ conditions induce an increase in brain endothelial permeability that involves intercellular Ca²⁺ waves. *Brain Res* 1487:78–87.
- De Mello WC. 1997. Influence of alpha-adrenergic-receptor activation on junctional conductance in heart cells: Interaction with beta-adrenergic adrenergic agonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:273–277.
- de Vries HE, Blom-Roosmalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. 1996. The influence of cytokines on the integrity of the bloodbrain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 64:37–43.
- del Zoppo GJ, Milner R. 2006. Integrinmatrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1966–1975.
- Ding J, Song D, Ye X, Liu SF. 2009. A pivotal role of endothelial-specific NF-kappaB signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction. *J Immunol* 183:4031–4038.
- Dore-Duffy P. 2008. Pericytes: Pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 14:1581–1593.
- Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Kuper N, Karcher C, Weissmuller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP. 2006. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99:1100–1108.
- Ervasti JM, Campbell KP. 1993. A role for the dystroglycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122:809–823.
- Eugenin EA, Clements JE, Zink MC, Berman JW. 2011. Human immunodeficiency virus infection of human astrocytes disrupts bloodbrain barrier integrity by a gap junction-dependent mechanism. *J Neurosci* 31:9456–9465.
- Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. 2006. The gap junction cellular internet: Connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* 397:1–14.
- Evans WH, Martin PE. 2002. Gap junctions: Structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19:121–136.
- Ezan P, Andre P, Cisternino S, Saubamea B, Boulay AC, Doutremere S, Thomas MA, Quenec'h du N, Giaume C, Cohen-Salmon M. 2012. Deletion of astroglial connexins weakens the bloodbrain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1457–1467.
- Figueroa XF, Duling BR. 2008. Dissection of two Cx37-independent conducted vasodilator mechanisms by deletion of Cx40: Electrotonic versus regenerative conduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H2001–H2007.
- Figueroa XF, Duling BR. 2009. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal* 11:251–266.
- Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. 2004. Connexins: Gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology* (Bethesda) 19:277–284.
- Figueroa XF, Lillo MA, Gaete PS, Riquelme MA, Saez JC. 2013. Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. *Neuropharmacology* 75:471–478.
- Figueroa XF, Paul DL, Simon AM, Goodenough DA, Day KH, Damon DN, Duling BR. 2003. Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* 92:793–800.
- Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, Nelson MT. 2006. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9:1397–1403.
- Friedman A, Kaufner D, Heinemann U. 2009. Bloodbrain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res* 85:142–149.
- Gabriels JE, Paul DL. 1998. Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res* 83:636–643.
- Giaume C, Marin P, Cordier J, Glowinski J, Premont J. 1991. Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5577–5581.
- Giepmans BN, Mooleenaar WH. 1998. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol* 8:931–934.
- Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Landmann R, Frei K. 2001. Molecular and cellular permeability control at the bloodbrain barrier. *Brain Res Brain Res Rev* 36:258–264.
- Goldstein GW. 1988. Endothelial cellastrocyte interactions. A cellular model of the bloodbrain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 529:31–39.
- Goodenough DA, Paul DL. 2003. Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:285–294.
- Gustafsson F, Mikkelsen HB, Arensbak B, Thuneberg L, Neve S, Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH. 2003. Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol* 119:139–148.
- Haddock RE, Grayson TH, Brackenburg TD, Meaney KR, Neylon CB, Sandow SL, Hill CE. 2006. Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2047–H2056.
- Haefliger JA, Nicod P, Meda P. 2004. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* 62:345–356.
- Haug SJ, Segal SS. 2005. Sympathetic neural inhibition of conducted vasodilation along hamster feed arteries: Complementary effects of alpha-1- and alpha2-adrenoreceptor activation. *J Physiol* 563:541–555.
- Hawkins BT, Davis TP. 2005. The bloodbrain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173–185.
- He DS, Jiang JX, Taffet SM, Burt JM. 1999. Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6495–6500.
- Head GM, Mentlein R, von Patay B, Downing JE, Kendall MD. 1998. Neuropeptides exert direct effects on rat thymic epithelial cells in culture. *Dev Immunol* 6:95–104.
- Heinemann U, Kaufner D, Friedman A. 2012. Bloodbrain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia* 60:1251–1257.
- Hill CE, Rummery N, Hickey H, Sandow SL. 2002. Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: Implications for function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:620–625.
- Huang AL, Vita JA. 2006. Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation. *Trends Cardiovasc Med* 16:15–20.
- Iadecola C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347–360.
- Iadecola C, Yang G, Ebner TJ, Chen G. 1997. Local and propagated vascular responses evoked by focal synaptic activity in cerebellar cortex. *J Neurophysiol* 78:651–659.
- Isakson BE, Damon DN, Day KH, Liao Y, Duling BR. 2006. Connexin40 and connexin43 in mouse aortic endothelium: Evidence for coordinated regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1199–H1205.
- Isakson BE, Ramos SI, Duling BR. 2007. Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circ Res* 100:246–254.
- Ivens S, Kaufner D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A. 2007. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 130:535–547.
- James M, Nguyen TM, Wise CJ, Jones GE, Morris GE. 1996. Urothindystroglycan complex in membranes of adherent cultured cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 33:163–174.
- Kawasaki H. 2002. Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves. *Jpn J Pharmacol* 88:39–43.
- Kovacs R, Heinemann U, Steinhilber C. 2012. Mechanisms underlying bloodbrain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: Role of astroglia. *Epilepsia* 53:53–59.
- Kruger O, Beny JL, Chabaud F, Traub O, Theis M, Brix K, Kirchhoff S, Willecke K. 2002. Altered dye diffusion and upregulation of connexin37 in mouse aortic endothelium deficient in connexin40. *J Vasc Res* 39:160–172.
- Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. 2000. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127:4179–4193.
- Kuchler-Bopp S, Delaunoy JP, Artault JC, Zaepfel M, Dietrich JB. 1999. Astrocytes induce several bloodbrain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport* 10:1347–1353.

- Kwak BR, Mulhaupt F, Veillard N, Gros DB, Mach F. 2002. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:225–230.
- Lai CH, Kuo KH. 2005. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* 50:258–265.
- Leybaert L. 2005. Neurobarrier coupling in the brain: A partner of neurovascular and neurometabolic coupling?. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:2–16.
- Li X, Simard JM. 1999. Multiple connexins form gap junction channels in rat basilar artery smooth muscle cells. *Circ Res* 84:1277–1284.
- Li X, Simard JM. 2001. Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1890–H1898.
- Li X, Simard JM. 2002. Increase in Cx45 gap junction channels in cerebral smooth muscle cells from SHR. *Hypertension* 40:940–946.
- Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. 2011. Current concepts of bloodbrain barrier development. *Int J Dev Biol* 55:467–476.
- Little TL, Beyer EC, Duling BR. 1995. Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *Am J Physiol* 268:H729–H739.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580:239–244.
- Lohman AW, Billaud M, Straub AC, Johnstone SR, Best AK, Lee M, Barr K, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. 2012. Expression of pannexin isoforms in the systemic murine arterial network. *J Vasc Res* 49:405–416.
- Looff-Wilson RC, Haug SJ, Neuffer PD, Segal SS. 2004. Independence of connexin expression and vasomotor conduction from sympathetic innervation in hamster feed arteries. *Microcirculation* 11:397–408.
- Lossinsky AS, Shivers RR. 2004. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the bloodbrain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol* 19:535–564.
- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. 2002. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 90:1100–1107.
- Miller E. 2012. Multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 724:222–238.
- Moreno AP. 2004. Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins. *Cardiovasc Res* 62:276–286.
- Mulvany MJ, Aalkjaer C. 1990. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 70:921–961.
- 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. *J Cell Physiol* 208:123–132.
- Okamoto T, Akiyama M, Takeda M, Gabazza EC, Hayashi T, Suzuki K. 2009. Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gapjunction intercellular communication. *Biochem Biophys Res Commun* 382:264–268.
- Orellana JA, Figueroa XF, Sanchez HA, Contreras-Duarte S, Velarde V, Saez JC. 2011. Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:404–414.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10:R473–R474.
- Perkins GA, Goodenough DA, Sosinsky GE. 1998. Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277:171–177.
- Piao H, Sato A, Nozawa Y, Sun W, Morioka T, Oite T. 2011. Effects of connexin-mimetic peptides on perfusion pressure in response to phenylephrine in isolated, perfused rat kidneys. *Clin Exp Nephrol* 15:203–211.
- Rolfe DF, Brown GC. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77:731–758.
- Rubino A, Burnstock G. 1996. Capsaicin-sensitive sensory-motor neurotransmission in the peripheral control of cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 31:467–479.
- Rummary NM, Hickey H, McGurk G, Hill CE. 2002a. Connexin37 is the major connexin expressed in the media of caudal artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1427–1432.
- Rummary NM, McKenzie KU, Whitworth JA, Hill CE. 2002b. Decreased endothelial size and connexin expression in rat caudal arteries during hypertension. *J Hypertens* 20:247–253.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359–1400.
- Sandow SL, Looff-Wilson R, Doran B, Grayson TH, Segal SS, Hill CE. 2003. Expression of homocellular and heterocellular gap junctions in hamster arterioles and feed arteries. *Cardiovasc Res* 60:643–653.
- Segal SS. 2000. Integration of blood flow control to skeletal muscle: Key role of feed arteries. *Acta Physiol Scand* 168:511–518.
- Segal SS. 2005. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation* 12:33–45.
- Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A. 2004. Lasting bloodbrain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 24:7829–7836.
- Severs NJ, Rothery S, Dupont E, Coppens SR, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T, Kaba R, Halliday D. 2001. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech* 52:301–322.
- Simon AM, McWhorter AR. 2002. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol* 251:206–220.
- Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR. 1997. Tumour necrosis factor- α induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience* 81:255–262.
- Spindler KR, Hsu TH. 2012. Viral disruption of the bloodbrain barrier. *Trends Microbiol* 20:282–290.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277:10482–10488.
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K. 2003. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 12:13–21.
- Theis M, Mas C, Doring B, Kruger O, Herrera P, Meda P, Willecke K. 2001. General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a lacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun Adhes* 8:383–386.
- Thompson RJ, Macvicar BA. 2008. Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2:81–86.
- Tomkins O, Friedman A, Ivens S, Reiffurth C, Major S, Dreier JP, Heinemann U, Friedman A. 2007. Bloodbrain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 25:367–377.
- Tomkins O, Shelef I, Kaizerman I, Eliushin A, Afawi Z, Misk A, Gidon M, Cohen A, Zumsteg D, Friedman A. 2008. Bloodbrain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:774–777.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. 1998. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:12725–12731.
- Tsuru H, Tanimitsu N, Hirai T. 2002. Role of perivascular sympathetic nerves and regional differences in the features of sympathetic innervation of the vascular system. *Jpn J Pharmacol* 88:9–13.
- Ujije H, Chaytor AT, Bakker LM, Griffith TM. 2003. Essential role of Gap junctions in NO- and prostanoid-independent relaxations evoked by acetylcholine in rabbit intracerebral arteries. *Stroke* 34:544–550.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. 1999. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283:1176–1180.
- van Kempen MJ, Jongsma HJ. 1999. Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochem Cell Biol* 112:479–486.
- van Kempen MJ, ten Velde I, Wessels A, Oosthoek PW, Gros D, Jongsma HJ, Moorman AF, Lamers VH. 1995. Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. *Microsc Res Tech* 31:420–436.
- Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Bertossi M, Ambrosi G, Roncali L. 2001. Expression of the gap junction protein connexin43 in human telencephalon microvessels. *Microvasc Res* 62:435–439.
- Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Frei K, Bluethmann H, Gloor SM. 2001. Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor- κ B activation. *J Neurochem* 78:155–162.
- Wang X, Wu Z, Tang Y, Fiscus RR, Han C. 1996. Rapid nitric oxide- and prostaglandin-dependent release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) triggered by endotoxin in rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 118:2164–2170.
- Wood JN, Docherty R. 1997. Chemical activators of sensory neurons. *Annu Rev Physiol* 59:457–482.
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME. 1993. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73:205–209.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452–457.