

**Título:** EFECTOS DE FÁRMACOS QUE MODIFICAN LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMPc EN ANILLOS DE RATA Y EN MIOCITOS VASCULARES

**Nombre:** Cuíñas Lavandeira, Andrea

**Universidad:** Universidad de Santiago de Compostela

**Departamento:** Farmacología

**Fecha de lectura:** 12/07/2013

**Programa de doctorado:** Investigación y Desarrollo de Medicamentos

**Dirección:**

> **Director:** MANUEL CAMPOS TOIMIL

**Tribunal:**

> **presidente:** MARÍA ISABEL CADAVID TORRES

> **secretario:** MARIA AMPARO ALFONSO RANCAÑO

> **vocal:** ASUNCIÓN MORÁN BENITO

> **vocal:** JACOBO ELÍES GOMEZ

> **vocal:** JOSÉ IGNACIO VERDE LUSQUIÑOS

**Descriptores:**

> FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL

**El fichero de tesis** ya ha sido incorporado al sistema

> 2013cuinaaefect.pdf

**Localización:** BIBLIOTECA XERAL DA USC

**Resumen:** Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad en los países desarrollados. Dado que estas patologías tienen su origen en un componente vasoconstrictor común, existe un gran interés científico por conocer los mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en la regulación de la contracción y la relajación del músculo liso vascular.

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  es un mensajero intracelular implicado en multitud de procesos fisiológicos, entre los que destaca el control del tono del músculo liso vascular. El  $\text{Ca}^{2+}$  regula la síntesis y la degradación del AMPc, así como muchos efectos del hasta ahora considerado principal efector del AMPc, la PKA. Por su parte el AMPc participa en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , regula la formación y la fosforilación del  $\text{IP}_3$ , la actividad de los canales y bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , o la formación de otros mensajeros que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$ . Las interacciones entre ambos mensajeros son amplias y numerosas, pero todavía quedan muchas incógnitas por resolver, ya que los mecanismos por los que actúan no son del todo conocidos y a veces contradictorios.

Entre los fármacos que modifican los niveles intracelulares de AMPc se encuentra la forskolina, un diterpeno que aumenta el AMPc intracelular y las acciones mediadas por este nucleótido, por activación del enzima adenilil ciclasa. El descubrimiento en los últimos años de una nueva clase de proteínas implicadas en la

transducción de la señal mediada por el AMPc, las proteínas Epac, ha abierto nuevos horizontes en la investigación en el campo del AMPc.

En esta Tesis Doctoral nos hemos planteado determinar qué canales y rutas de señalización están implicadas en la respuesta vasodilatadora de la forskolina y el AMPc, así como definir los mecanismos por los cuales tiene lugar la interconexión de las rutas de señalización en las que interviene el AMPc y el Ca<sup>2+</sup> y su implicación en la contractilidad vascular (papel del enzima PDE4, canales de K<sup>+</sup>, canales de Ca<sup>2+</sup> transmembrana, ruta de la p38 MAPK o el papel que ejerce el Ca<sup>2+</sup> almacenado en el interior celular), así como el papel que ejercen los principales mediadores de la señal del AMPc, las proteínas PKA y Epac.

Para ello hemos llevado a cabo estudios de contractilidad en aorta aislada sin endotelio, experimentos de señalización cálcica en célula única, medida de la [AMPc]<sub>i</sub> en célula única y en poblaciones celulares, medida de las corrientes iónicas en canales de Ca<sup>2+</sup> y en canales de K<sup>+</sup> y determinación de la expresión de proteínas. Nuestros resultados indican que: 1) en el efecto vasodilatador directo de la forskolina participan las proteínas Epac y PKA; 2) la actividad del enzima PDE4 se incrementa cuando aumentan los niveles de AMPc; 3) la activación de la ruta de la p38 MAPK contrarresta en parte la relajación mediada por la forskolina y el AMPc; 4) la forskolina y el AMPc activan las corrientes a través de canales de K<sup>+</sup> en células A7r5. Dicha activación no participa en el efecto vasodilatador de la forskolina y el AMPc; 5) los canales TRP no participan en el efecto vasodilatador de la forskolina; 6) la forskolina a dosis bajas activa las corrientes a través de canales VOCC tipo L a través de un mecanismo en el que participa la PKA. Este efecto a dosis elevadas se revierte; 7) la contracción de la aorta de rata producida por la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> es inhibida por la forskolina y el AMPc pero, a bajas concentraciones (rango nM), este efecto no es mediado por disminución de la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> extracelular; 8) la forskolina y el AMPc producen una depleción de reservorios de Ca<sup>2+</sup> intracelulares sensibles a IP3 y taspigargina por un mecanismo en el que participan las proteínas Epac y PKA. Dicha depleción produce un incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que no se corresponde con una contracción de la aorta de rata; 9) la PKA, Epac 1 y Epac 2 se expresan de manera constitutiva en las células A7r5. El aumento sostenido de los niveles de AMPc disminuye la expresión de la proteína PKA, y 10) la técnica de FRET detecta incrementos de AMPc únicamente producido por concentraciones de AMPc del orden μM en presencia de un inhibidor de PDE.