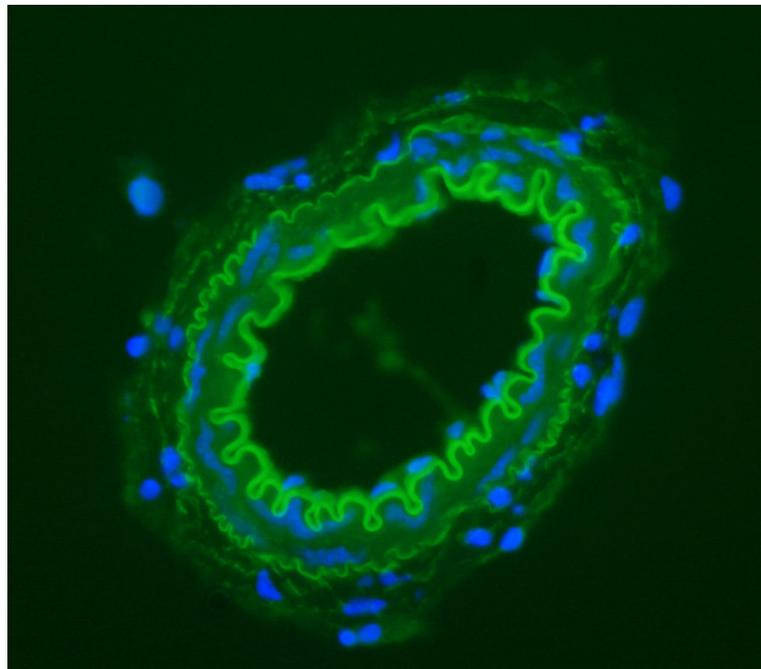


Tesis Doctoral  
Alejandro Moreno Domínguez

Papel de los canales de  $K^+$  del  
músculo liso vascular en el control del  
tono y el remodelado arterial



Universidad de Valladolid

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e  
Instituto de Biología y Genética Molecular (UVa-CSIC)





*Departamento de  
Bioquímica y Biología  
Molecular y Fisiología*

## INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 del 21 de Enero)

D. José Ramón López López, con D.N.I. nº 9277604W, y D<sup>a</sup> María Teresa Pérez García, con D.N.I. nº 12365002H, profesores del departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**Papel de los canales de K<sup>+</sup> de las células de músculo liso, en el control del tono vascular y el remodelado arterial**”, presentada por D. Alejandro Moreno Domínguez, Licenciado en Biología y alumno del programa de doctorado: Biotecnología: Aplicaciones Biomédicas, impartido por el departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología

### AUTORIZAN

La presentación de la misma, considerando que el trabajo de Tesis Doctoral que se presenta constituye un trabajo de investigación original y que el doctorando ha satisfecho todos los requisitos legales y ha superado con éxito su periodo de aprendizaje y especialización en el campo de la especialización básica en Biología.

Y para que así conste, firman el presente documento en Valladolid a 31 de Marzo de 2009.

Fdo. Dr. José Ramón López López

Fdo. Dra. María Teresa Pérez García



Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a comunicaciones en Congresos (publicadas como Abstracts) y a publicaciones como artículos en revistas internacionales.

Artículos en Revistas:

**Moreno-Domínguez A, Ciudad P, Miguel-Velado E, Lopez-Lopez JR and Perez-García MT.** "De novo" expression of Kv6.3 contributes to changes in vascular smooth muscle cell excitability in a hypertensive mice strain. **The Journal of Physiology (J Physiol.)**. 2009 Feb 1;587(Pt 3):625-640. 2008.

Ciudad P, **Moreno-Domínguez A**, Novensá R, Roqué M, Heras M, Pérez-García MT and López- López JR. Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (ATVB)**. (en revisión).

Comunicaciones a Congresos:

**Moreno-Domínguez A, Ciudad P, Alonso E, López-López JR and Pérez-García MT.** Modulation of Kv2.1 assembly contributes to the changes in vascular smooth muscle cell excitability in a hypertensive mice strain. XXXIV SECF Congress, in collaboration with the Physiological Society, Valladolid, España, Julio 3-7, 2007, Acta Physiologica, 190, 655 (P53), O25.

Ciudad P, **Moreno-Domínguez A**, Alonso E, López-López JR and Pérez-García MT. Role of vascular smooth muscle Kv channels in a mouse model of essential hypertension. The Physiological Society, focused meeting: ion channels and the microcirculation, Belfast, Northern Ireland, Abril 4-5, 2007.

**Moreno-Domínguez A, Ciudad P, Colinas O, Alonso E, López-López JR and Pérez-García MT.** La expresión "de novo" del Kv6.3 modifica la excitabilidad del músculo liso vascular en un modelo de ratón hipertenso. 1ª Reunión Española de Canales Iónicos (RECI), San Juan de Alicante, España, Mayo 16-18, 2007.

**Moreno-Domínguez A, Ciudad P, Alonso E, López-López JR and Pérez-García MT.** Expression of Kv2.1-Kv6.3 heteromultimers in mesenteric arteries of hypertensive mice. The Physiological Society, themed meeting: vascular and smooth muscle physiology, King's College London, UK, Diciembre 15-17, 2008.

Novensa L, Ciudad P, Barquin L, **Moreno-Domínguez A**, Heras M, Pérez MT, López JR, Roque M. Functional Characterization of Potassium Channels and Their Role in the Modulation of Smooth Muscle Cell Phenotype in the Arterial Wall. 58th Annual Scientific Session of the American-College-of-Cardiology, Marzo 28-31, 2009 Orlando FL, USA. Journal of the American College of Cardiology, 53, 10, A426-A426.



## ABREVIATURAS

<b>ACE</b>	Enzima convertidora de angiotensina ( <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> )
<b>ADH</b>	Vasopresina u hormona antidiurética
<b>AEBSF</b>	4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato
<b>ANP</b>	Péptido atrial natriurético ( <i>Atrial Natriuretic Peptide</i> )
<b>B2m</b>	$\beta$ -2 microglobulina
<b>BDS</b>	<i>Blood-Depressing Substance</i>
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento básico de fibroblastos ( <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>BPH</b>	Presión arterial alta ( <i>Blood Pressure High</i> )
<b>BPN</b>	Presión arterial normal ( <i>Blood Pressure Normal</i> )
<b>BrdU</b>	Bromodioxiuridina
<b>CFTR</b>	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística ( <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> )
<b>Ct</b>	Ciclo umbral ( <i>Threshold cycle</i> )
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDHF</b>	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio ( <i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-glicol tetraacético
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i>
<b>G/V</b>	relación Conductancia -Voltaje

<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GEPAS</b>	<i>Gene Expression Profile Analysis Suite</i>
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>Gmax</b>	Conductancia máxima
<b>GxTX</b>	Guangxitoxina
<b>HEK</b>	Línea celular de riñón embrionario humano ( <i>Human Embryonic Kidney</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido hidroxietilpiperazina-etanosulfónico
<b>Hprt-1</b>	Hipoxantina fosforibosil transferasa
<b>I/V</b>	relación Intensidad-Voltaje
<b>Klf5</b>	Factor Kruppel-like 5
<b>MHC</b>	Cadena pesada de miosina ( <i>Myosin Heavy Chain</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>PAF</b>	Factor activante de plaquetas ( <i>Platelet-Activating Factor</i> )
<b>PAP-1</b>	<i>5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
<b>PGE</b>	Prostaglandina de la serie E
<b>PGF</b>	Prostaglandina de la serie F
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PKA</b>	Proteína quinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína quinasa dependiente de fosfolipasa C
<b>PKG</b>	Proteína quinasa dependiente de GMPc
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno
<b>QPCR</b>	<i>Quantitative real time Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RP18s</b>	Proteína ribosomal 18s

<b>rScTx</b>	rEstromatoxina
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SMDS</b>	Solución de disociación de músculo liso ( <i>Smooth Muscle Dissociation Solution</i> )
<b>SHR</b>	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>
<b>STOC</b>	Corriente espontánea transitoria de salida ( <i>Spontaneous Transient Outward Current</i> )
<b>TBS</b>	<i>Tris Buffered Saline</i>
<b>TEA</b>	Tetraetilamonio
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
<b>TGM</b>	<i>Tris, Glycine, Methanol</i>
<b>TLDA</b>	Array Taqman de baja densidad ( <i>TaqMan Low Density Array</i> )
<b>T-Rex</b>	<i>Tools for relevant gene selection</i>
<b>TRIS</b>	Trishidroximetilaminometano
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling</i>
<b>VSMC</b>	Células de músculo liso vascular ( <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> )
<b>Vwf</b>	Factor Von Willebrand



<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
1.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR.....	3
1.2. ESTRUCTURA DEL MIOCITO VASCULAR .....	6
1.3. FUNCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR .....	8
1.3.1. <i>Acoplamiento excitación-contracción en el músculo liso vascular</i> .....	9
1.3.2. <i>Control del tono vascular</i> .....	13
1.3.3. <i>Modulación fenotípica</i> .....	18
1.4. CANALES IÓNICOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR .....	23
1.4.1. <i>Estructura de los canales iónicos</i> .....	23
1.4.2. <i>Tipos de canales iónicos operados por voltaje</i> .....	26
1.4.2.1. Canales de Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	26
1.4.2.2. Canales de K <sup>+</sup> .....	27
1.4.2.3. Canales TRP .....	31
1.4.2.4. Canales de Cl <sup>-</sup> .....	33
1.5. FUNCIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR .....	34
1.5.1. <i>Papel de los canales de K<sup>+</sup> en el control del tono</i> .....	35
Implicación de los canales de K <sup>+</sup> en la hipertensión esencial .....	37
1.5.2. <i>Papel de los canales de K<sup>+</sup> en la modulación fenotípica</i> .....	39
Implicación de los canales de K <sup>+</sup> en la proliferación de la íntima.....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
3.1. MATERIALES.....	51
3.1.1. <i>Animales</i> .....	51
3.1.2. <i>Aparatos</i> .....	51
3.1.2.1. Amplificadores Axopatch-200 y Axopatch-4A (Axon Instruments).....	51
3.1.2.2. Interfase Digidata 1200 A/D (Axon Instruments) .....	51
3.1.2.3. Microscopio invertido OLYMPUS IX70 y Micromanipulador piezoeléctrico <i>burleigh</i> .....	52
3.1.2.4. Mesa antivibratoria TMC.....	52
3.1.2.5. Sistema de perfusión .....	52
3.1.2.6. Ordenador PC .....	53
3.1.2.7. Vidrio.....	53
3.1.3. <i>Soluciones</i> .....	53
3.1.3.1. Soluciones para la dispersión de VSMC de arteria mesentérica y femoral .....	53
3.1.3.2. Medios de cultivo para las VSMC y células HEK293 .....	54
3.1.3.3. Soluciones para realizar registros electrofisiológicos .....	55
3.1.3.4. Soluciones para las técnicas de detección de proteínas .....	56
3.1.4. <i>Constructos (plásmidos)</i> .....	57
3.1.5. <i>Drogas</i> .....	58
3.1.6. <i>Anticuerpos</i> .....	58
3.2. MÉTODOS.....	60
3.2.1. <i>Medida de presión Arterial</i> .....	60

3.2.2. Lesión vascular de la arteria femoral.....	61
3.2.3. Aislamiento de las VSMC de arteria mesentérica y femoral.....	61
3.2.3.1. Cirugía.....	61
3.2.3.2. Disociación.....	62
3.2.4. Mantenimiento, migración y proliferación de las VSMC de arteria femoral en cultivo ...	63
3.2.4.1. Establecimiento y mantenimiento de cultivos de VSMC .....	63
3.2.4.2. Tratamiento de los cristales de soporte de las células en cultivo .....	64
3.2.4.3. Estudio de migración.....	64
3.2.4.4. Estudio de proliferación .....	65
3.2.5. Mantenimiento y transfección de los cultivos de células HEK293 .....	66
3.2.5.1. Mantenimiento .....	66
3.2.5.2. Transfección .....	67
3.2.6. Técnicas electrofisiológicas de registro.....	68
3.2.6.1. La técnica de patch-clamp .....	68
3.2.6.2. Procedimiento experimental.....	70
3.2.6.3. Adquisición y análisis de los datos .....	72
3.2.7. Protocolos utilizados en el registro de corriente.....	72
3.2.7.1. Amplitud de corriente.....	72
3.2.7.2. Deactivación.....	73
3.2.7.3. Bloqueo con anticuerpos .....	73
3.2.8. Histología y morfometría.....	74
3.2.8.1. Arteria mesentérica.....	74
3.2.8.2. Arteria Femoral .....	74
3.2.9. Técnicas de detección de proteínas .....	75
3.2.9.1. Inmunohistoquímica.....	75
3.2.9.2. Inmunocitoquímica.....	76
3.2.9.3. Inmunoblot.....	76
3.2.10. Técnica de detección de RNA.....	77
3.2.10.1. Extracción del RNA, RT y PCR.....	77
3.2.10.2. PCR a tiempo real con Arrays de Baja Densidad con sondas Taqman.....	78
3.2.10.3. Análisis de los datos .....	80
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
4.1. REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS EN LA HIPERTENSIÓN ESENCIAL. IMPLICACIONES EN EL CONTROL DEL TONO VASCULAR.....	91
4.1.1. Cambios morfológicos de las arterias mesentéricas en el modelo de hipertensión.....	91
4.1.2. Expresión relativa del mRNA de los canales Kv de arterias de resistencia y conductoras, y sus cambios en el modelo de hipertensión.....	92
4.1.3. Caracterización funcional de las corrientes de K <sup>+</sup> activadas por voltaje y por calcio en VSMC de arteria mesentérica.....	94
4.1.3.1. Corrientes de K <sup>+</sup> activadas por Ca <sup>2+</sup> .....	95
4.1.3.2. Corrientes de K <sup>+</sup> dependientes de voltaje .....	97
4.1.3.2.1. Caracterización cinética de las corrientes Kv2.....	100

4.1.3.2.2. Expresión y contribución funcional de los canales Kv6.3 en VSMC de BPN y BPH.....	102
4.1.3.2.3. Modulación por Kv6.3 de las corrientes Kv2 en sistemas heterólogos.....	103
4.1.4. <i>Papel de las corrientes <math>K_{CA}</math> y <math>K_v</math> en la excitabilidad de las VSMC.</i> .....	105
4.2. REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS Y SUS IMPLICACIONES PARA LA PROLIFERACIÓN DEL MÚSCULO LISO ARTERIAL.....	106
4.2.1. <i>Cambios en la expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación in vivo e in vitro</i> .....	106
4.2.2. <i>Expresión y contribución funcional de los canales <math>K_v</math> y <math>BK_{CA}</math> en VSMC de arteria femoral</i> .....	111
4.2.3. <i>Inmunocitoquímica de VSMC en cultivo y de arteria femoral con hiperplasia intimal.</i> .....	114
4.2.4. <i>Estudio del cambio fenotípico en arterias mesentéricas</i> .....	116
4.2.5. <i>Efecto del bloqueo del canal <math>KV1.3</math> sobre la proliferación y la migración de las VSMC.</i> .....	118
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>121</b>
5.1. REMODELADO DE CANALES DE $K^+$ Y SUS IMPLICACIONES PARA EL CAMBIO DEL TONO VASCULAR EN UN MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ESENCIAL.....	123
5.1.1. <i>Cambios morfológicos de las arterias mesentéricas en el modelo de hipertensión</i> .....	124
5.1.2. <i>Contribución funcional de las corrientes <math>K_v</math> en VSMC de arteria mesentérica.</i> .....	126
5.1.3. <i>Modulación de las corrientes <math>K_v2</math> por las subunidades reguladoras <math>K_v6.3</math>.</i> .....	129
5.1.4. <i>Modulación de los canales <math>BK_{CA}</math> por las subunidades reguladoras <math>\beta1</math></i> .....	132
5.1.5. <i>Papel de las corrientes <math>K_v</math> en la excitabilidad de las VSMC.</i> .....	135
5.2. REMODELADO DE CANALES DE $K^+$ Y SUS IMPLICACIONES PARA LA PROLIFERACIÓN DEL MÚSCULO LISO EN UN MODELO ANIMAL DE HIPERPLASIA DE LA ÍNTIMA.....	137
5.2.1. <i>Expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación in vivo e in vitro.</i> .....	138
5.2.2. <i>Contribución funcional de los canales <math>K_v1.3</math> y su papel en la proliferación de las VSMC.</i> .....	140
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>147</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>151</b>
<b>8. ANEXO I</b> .....	<b>161</b>
PATCH-CLAMP EN LA CONFIGURACIÓN DE WHOLE-CELL. ANÁLISIS DEL CIRCUITO RC EQUIVALENTE. .....	163
UTILIZACIÓN DE UN PULSO DE POTENCIAL PARA ESTIMAR $R_a$ , $C_M$ Y $R_M$ .....	166
<b>9. ANEXO II</b> .....	<b>169</b>
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN LOS DOS MODELOS DE PROLIFERACIÓN.....	171



# **1** **Introducción**

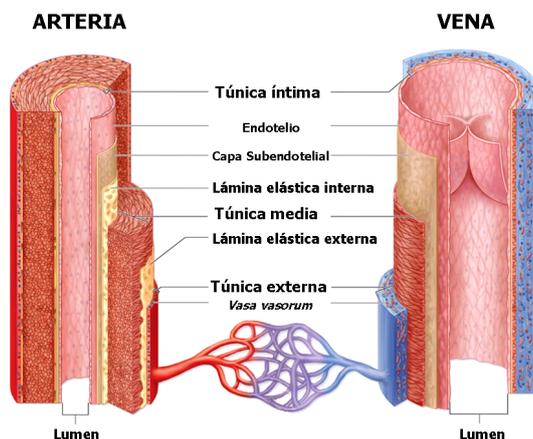
---



El sistema cardiovascular está formado por el corazón, los vasos sanguíneos y la sangre. En conjunto coordinan e integran el transporte de oxígeno, nutrientes, productos de deshecho y calor por todo el cuerpo. El corazón consta de dos bombas en serie: el ventrículo derecho que bombea la sangre hacia los pulmones para el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (circulación pulmonar), y el ventrículo izquierdo que bombea la sangre al resto de los tejidos (circulación sistémica). Aunque el bombeo de sangre hacia la aorta es intermitente, el flujo de sangre hacia la periferia se produce de forma continua gracias a la distensión de la aorta durante la contracción ventricular (sístole) y a la retracción elástica de las paredes vasculares de grandes arterias que impulsa la sangre hacia delante durante la relajación ventricular (diástole). Así, la sangre se mueve a gran velocidad a través de la aorta y de sus ramificaciones, las cuales se van estrechando a la vez que sus paredes cambian morfológicamente (Levy & Pappano, 2007).

## 1.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

Las paredes de los vasos sanguíneos están compuestas por tres capas



(Figura 1): la túnica íntima (la capa más interna), la túnica media (capa intermedia) y la túnica externa o adventicia (la más superficial). La **túnica íntima** es una lámina formada por una monocapa de células endoteliales que se apoyan sobre la lámina basal, constituida principalmente por tejido conectivo. Estas células

delimitan el lumen del vaso y se encuentran estrechamente unidas unas a otras restringiendo la difusión de moléculas de gran tamaño a través del endotelio. Así, La capa endotelial constituye una membrana semipermeable que retiene el plasma y los componentes celulares de la sangre en la

## Introducción

circulación, mientras que permite el paso de nutrientes entre la sangre y los tejidos. Las estructuras que controlan esta barrera de permeabilidad activa son el glicocálix y las uniones intercelulares. Estas estructuras son permeables a solutos de pequeño tamaño como la glucosa, la adrenalina y diversas drogas, pero impiden la difusión de solutos grandes como las proteínas del plasma. El endotelio además secreta agentes vasoactivos como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), o la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que actúan sobre las células sanguíneas y/o las células de músculo liso adyacentes regulando el flujo sanguíneo local, la angiogénesis y la hemostasis (Levick J.R., 2003). La túnica íntima es relativamente más gruesa en arterias grandes, y puede contener algunas células de músculo liso en venas y arterias de gran o medio calibre.

La **túnica media** suministra la fuerza mecánica para la contracción, y consiste en células de músculo liso dispuestas helicoidalmente embebidas en una matriz de fibras de colágeno, elastina y proteoglicanos. Existen dos capas de fibras de elastina, la *lámina elástica externa* y la *lámina elástica interna*, las cuales delimitarían la túnica media. La estructura molecular de la elastina permite a las arterias expandirse durante la sístole y encogerse durante la diástole, amortiguando los cambios en el flujo sanguíneo debidos al comportamiento pulsátil de la bomba cardiaca. Esta propiedad es fundamental en el caso de arterias elásticas como la aorta, en las que las células musculares de la túnica media están organizadas en múltiple capas concéntricas separadas por distintas láminas de elastina. El grosor relativo de la túnica media aumenta gradualmente desde la arteria aorta hasta las arteriolas, que poseen una estructura predominantemente muscular.

La **túnica externa** o adventicia es una vaina de tejido conectivo sin distinción con el borde exterior. Contiene fibras de colágeno que sirven de soporte de fibroblastos y nervios. Su función consiste en mantener unido el vaso al tejido circundante. El colágeno está presente en las tres capas de la pared vascular y actúa como un armazón de anclaje de las células musculares. A medida que la presión intraluminal aumenta, el entramado de fibras de colágeno se va haciendo más rígido, limitando la distensibilidad vascular. Este fenómeno es particularmente importante en venas, donde la abundancia de

esta proteína es mucho mayor. La adventicia de venas y arterias grandes contiene pequeños vasos denominados *vasa vasorum* (literalmente “vasos de vasos”) que abastecen de oxígeno y nutrientes a la túnica media (Aaronson & Ward, 2004).

Aunque las arterias y las venas comparten la misma estructura básica de la pared vascular, las diferentes capas están mucho menos definidas en el sistema venoso. Las venas, comparadas con las arterias, tienen una túnica media más delgada y con un menor número de células de músculo liso, que a su vez tienden a presentar una orientación más desordenada.

Los vasos sanguíneos, además de transportar la sangre, tienen propiedades funcionales específicas que permiten controlar el funcionamiento global del aparato circulatorio. Desde este punto de vista, las arterias se clasifican en dos categorías principales: arterias elásticas y arterias musculares.

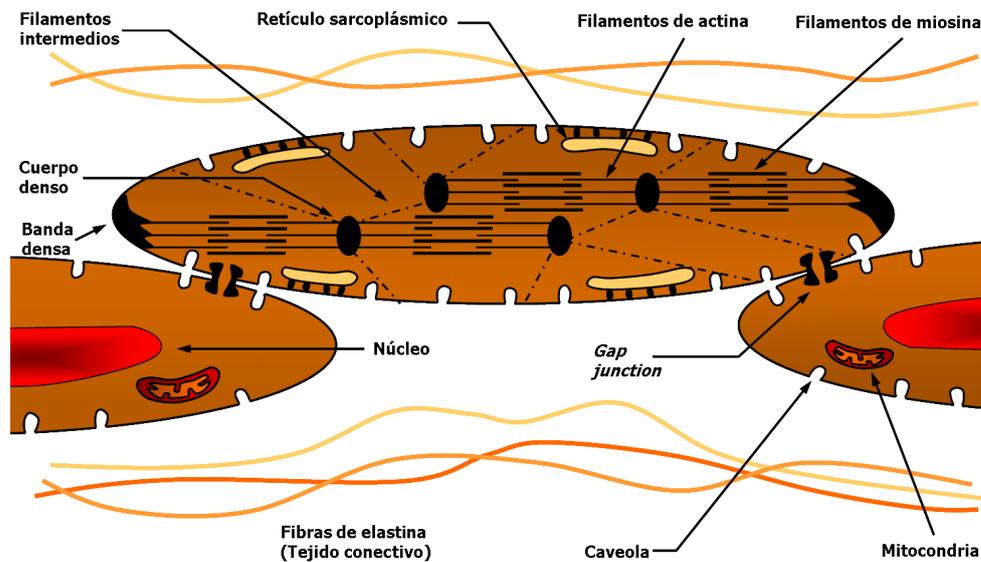
Las **arterias elásticas** como la arteria aorta y la ilíaca poseen una pared vascular muy distensible debido a que su túnica media es rica en elastina. La elastina proporciona a estas arterias la capacidad de expandirse hasta un 10% durante cada latido del corazón y por lo tanto permite dar cabida a toda la sangre propulsada. La retracción de los vasos elásticos durante la diástole convierte el flujo intermitente de la aorta ascendente en un flujo continuo a través de arterias más distales.

Las **arterias musculares** están son arterias de medio a pequeño calibre como las arterias cerebrales, mesentéricas y coronarias. La túnica media de estas arterias es relativamente más gruesa y contiene más células de músculo liso en comparación con las arterias elásticas. La presión sanguínea media varía muy poco a lo largo de las arterias elásticas y conductoras debido a que su lumen ofrece poca resistencia al flujo sanguíneo. Los mayores cambios en la presión se producen en arterias pequeñas ya que su resistencia al flujo es mucho mayor, y en alusión a este hecho estas arterias terminales y arteriolas se denominan arterias de resistencia. Estas arterias pueden incrementar o reducir el flujo sanguíneo en función de la demanda local. Así, cuando el vaso de resistencia se dilata, la resistencia baja y el flujo local aumenta; por el

contrario la vasoconstricción de estas arterias aumenta la resistencia local y disminuye el flujo sanguíneo en el tejido (Levick J.R., 2003).

## 1.2. ESTRUCTURA DEL MIOCITO VASCULAR

La túnica media arterial está compuesta principalmente de células de músculo liso vascular (VSMC, *Vascular Smooth Muscle Cells*). Los miocitos vasculares son células con forma de huso, con una longitud que varía entre 20



**Figura 2.** Estructura del miocito vascular. (A partir de imágenes de microscopía electrónica) (Gabella, 1984).

y 100  $\mu\text{m}$  y una anchura en la zona central de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . Se disponen a lo largo del eje del vaso, envolviéndolo según un patrón helicoidal, con lo que su tensión contráctil (tono vascular) regula el diámetro del vaso. El citoplasma de las células de músculo liso vascular contiene filamentos delgados de actina y miosina (Figura 2). Los filamentos de actina son mucho más largos que los del músculo estriado, y en vez de estar organizados en sarcómeros como los miocitos cardíacos, se sitúan de una forma aparentemente más desorganizada, algunos paralelos y otros oblicuos o transversales con respecto al eje longitudinal de la célula, anclándose en su extremo a cuerpos densos dentro del citoplasma, y a bandas densas en la cara interna de la membrana plasmática. Las bandas y cuerpos densos se encuentran unidos mediante haces de filamentos intermedios, compuestos principalmente por proteínas del citoesqueleto, como la desmina y la vimentina.

Los extremos libres de los filamentos de actina interaccionan con los filamentos de miosina, de tal modo que los filamentos de actina situados a cada lado de un filamento de miosina se desplazan en direcciones opuestas durante el ciclo de los puentes cruzados. Esto produce el acercamiento de los cuerpos densos, provocando el acortamiento y engrosamiento del citoesqueleto y por lo tanto de la célula (Figura 3). Las bandas densas están unidas a la matriz extracelular mediante integrinas, permitiendo la distribución de la fuerza contráctil a través de toda la pared vascular (Gunst & Zhang, 2008).



**Figura 3.** Modelo integrado de la dinámica funcional del citoesqueleto en la contracción del músculo liso. La contracción estimula la asociación de complejos macro-moleculares en la membrana celular y determina la formación de una red de actina subcortical que refuerza las conexiones actina-integrinas.

El retículo sarcoplásmico de los miocitos vasculares está relativamente poco desarrollado, especialmente en los vasos de resistencia donde tan solo ocupa el 2-6% del volumen celular, por lo que los depósitos de  $Ca^{2+}$  no son muy grandes. El retículo sarcoplásmico se localiza muy próximo a la membrana, en zonas donde se concentran gran cantidad de canales iónicos y transportadores, denominadas plasmersomas, y que pueden tener un papel importante en la excitación celular (Aaronson & Ward, 2004).

## Introducción

El núcleo está localizado en la parte central de la célula, y las organelas como el retículo endoplásmico rugoso, el complejo de golgi y las mitocondrias se sitúan fundamentalmente en la región perinuclear.

Las células musculares adyacentes están unidas mediante *gap junctions*, formando áreas de contacto celular donde se localizan una serie de canales que atraviesan la membrana plasmática, denominados conexones, que comunican ambas células y facilitan el flujo de iones de una a otra. Esto permite la propagación de la despolarización de una célula a la siguiente (Levick J.R., 2003). En algunas arteriolas y arterias pequeñas también existen *gap junctions* entre los miocitos vasculares más cercanos a la túnica íntima y las células endoteliales, y se ha propuesto que estas uniones mioendoteliales transmitirían señales reguladoras hiperpolarizantes del endotelio a las células de músculo liso, aunque su función ha sido fuente de gran controversia en la literatura (de Wit *et al.*, 2008).

La superficie de los miocitos vasculares presenta pequeñas invaginaciones denominadas caveolas. Las caveolas son tan numerosas que incrementan el área total de la membrana hasta un 75%. La superficie interna de estas invaginaciones esta revestida por la proteína caveolina, y se localiza normalmente muy próxima al retículo sarcoplásmico. Existen evidencias de que estas caveolas participan en el transporte de calcio y en el tráfico de proteínas de membrana entre el interior y la superficie celular (Levick J.R., 2003).

### 1.3. FUNCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

Las células de músculo liso vascular pueden presentar dos fenotipos muy **fenotipo contráctil** son células altamente diferenciadas con muy poca o nula capacidad de proliferación y expresan un gran repertorio de receptores, canales iónicos, moléculas señalizadoras y proteínas reguladoras de calcio, y se caracterizan por su abundancia de proteínas contráctiles, como la actina y la miosina. En condiciones normales tienen una función eminentemente contráctil, adecuada a su papel fundamental en el control del diámetro y tono vascular. Por el contrario, en el **fenotipo proliferativo**, nos encontramos células muy poco diferenciadas que apenas expresan proteínas contráctiles, con abundancia de retículo endoplásmico rugoso y gran capacidad de síntesis de

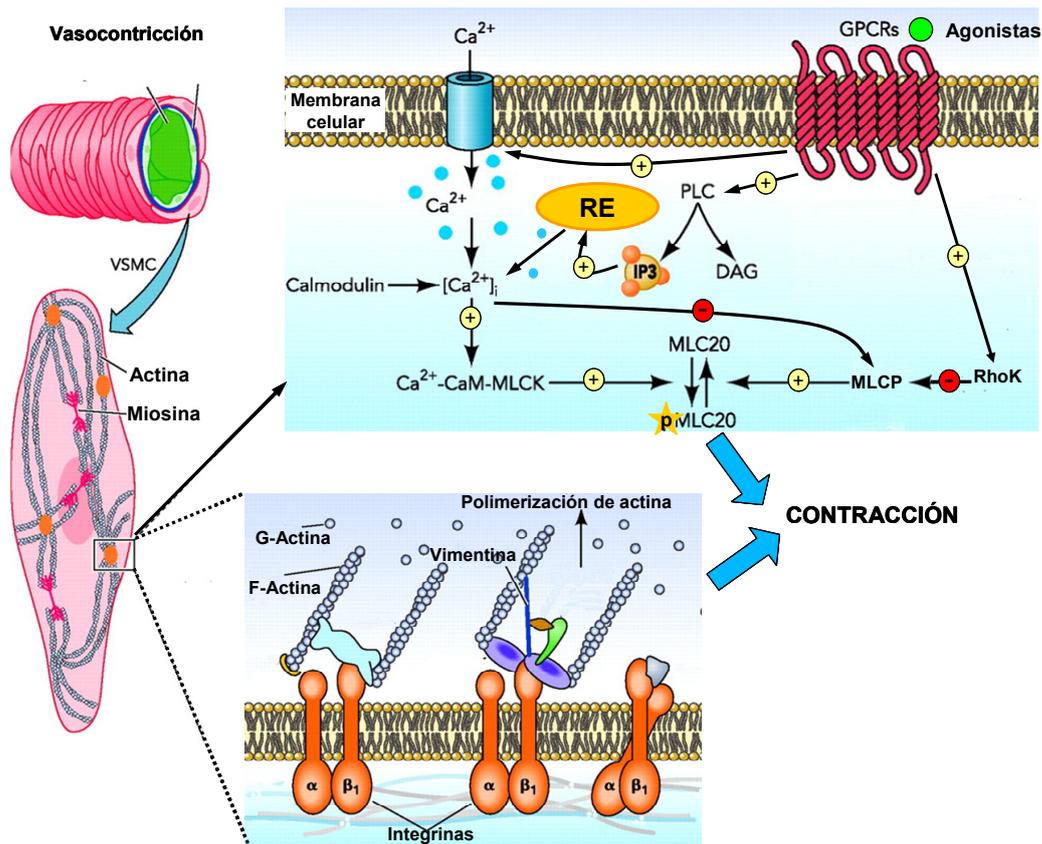
proteínas de la matriz extracelular. Estas células tienen gran capacidad proliferativa y migratoria a través de la íntima de los vasos (Owens, 1995; Owens *et al.*, 2004).

### 1.3.1. Acoplamiento excitación-contracción en el músculo liso vascular

Debido a los cambios continuos de las necesidades metabólicas del organismo, el sistema cardiovascular ha de estar ajustando de forma precisa el diámetro de los vasos sanguíneos, al objeto de regular el flujo sanguíneo a los tejidos y la distribución del volumen sanguíneo y el relleno del corazón. Estos ajustes del diámetro de los vasos se llevan a cabo mediante la regulación de la actividad contráctil de las VSMC. Esta es una tarea realmente especial, ya que la función de estas células permite que el vaso mantenga el diámetro adecuado frente a una presión de distensión continua de la sangre en su interior, para lo cual las VSMC han de ser capaces de desarrollar una tensión activa durante tiempos prolongados. Probablemente debido a la gran longitud de los filamentos de actina y a la ausencia de una organización en sarcómeros de los filamentos, el músculo liso es capaz de desarrollar tensión en un rango de longitudes mucho mayor que el músculo estriado o cardíaco.

Al igual que en otros tipos de músculo, la activación del mecanismo contráctil está desencadenada por el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ), que varía desde en torno a  $10^{-7}\text{M}$  en el músculo relajado a  $10^{-6}\text{M}$  durante una contracción máxima (Figura 4). El  $\text{Ca}^{2+}$  forma un complejo con una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$ , la calmodulina (CaM), y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM activa un enzima que fosforila a la miosina, la MLCK (*myosine light chain kinase*). La miosina fosforilada adquiere afinidad por la actina, con lo que se inicia el ciclo de los puentes cruzados, durante el cual la energía obtenida de la hidrólisis de ATP se utiliza para el acortamiento del músculo y el desarrollo de la tensión. Una vez que se consigue el desarrollo de la tensión, se puede mantener ésta a un coste energético muy bajo, mediante la regulación de la velocidad del ciclo de los puentes cruzados, que se consigue regulando el equilibrio entre la fosforilación y la defosforilación de la miosina por mecanismos dependientes de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. Así, a niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$  la MLCK está completamente activada y el enzima que defosforila la miosina (la MLCP,

## Introducción



**Figura 4.** La contracción de las VSMC de la túnica media de los vasos está mediada por procesos que determinan la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (diagrama superior) y el remodelado del citoesqueleto de actina (abajo). El acoplamiento excitación-contracción es un proceso  $Ca^{2+}$ -dependiente (ver detalles en el texto). Sin embargo, la activación por agonistas de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) produce de forma paralela la activación de Rho quinasa (RhoK), que determinan un cambio en la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  de la maquinaria contráctil de forma independiente de  $Ca^{2+}$  mediante la inactivación de la MLCP. La polimerización de actina participa también en la fase aguda de la contracción. La actina monomérica (G-actina) se incorpora en los filamentos de actina (F-actina) para reforzar el citoesqueleto. Este proceso involucra a un gran número de proteínas, algunas de ellas con actividad quinasa, y aunque no es necesario para la contracción muscular, participa de forma importante en el desarrollo de la respuesta miogénica y su bloqueo impide la generación de una tensión máxima. (modificado de (Martinez-Lemus *et al.*, 2009)

*myosin light chain phosphatase*) está inactivo, con lo cual todos los puentes cruzados están fosforilados y la velocidad de contracción es máxima. Por el contrario, a los niveles basales de  $Ca^{2+}_{cit}$ , en el músculo relajado, la MLCP está activa y la MLCK inactiva, todos los puentes cruzados defosforilados y la miosina y la actina separadas. Entre estas dos situaciones extremas, las variaciones en los niveles de  $Ca^{2+}_{cit}$  determinan niveles intermedios de activación de estos dos enzimas, lo que conlleva velocidades de contracción intermedias, proporcionales al porcentaje de cabezas de miosina fosforiladas.

Sin embargo, esta regulación covalente supone aparentemente un coste de ATP inconsistente con la extraordinaria economía del mantenimiento de la fuerza en el músculo liso. Por ello, se ha postulado que además de los mecanismos reguladores dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  existen mecanismos independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  capaces de modificar la sensibilidad  $\text{Ca}^{2+}$  de la maquinaria contráctil (Martinez-Lemus *et al.*, 2009), modulando la actividad de la MLCP. La hipótesis del “*latch-bridge*” (Murphy & Rembold, 2005) explica la capacidad del músculo liso de generar tensión con bajo gasto de ATP asumiendo que la MLCP es capaz de defosforilar tanto la miosina libre como la unida a actina. La defosforilación de la miosina unida a la actina tiene como consecuencia el enlentecimiento de la rotura del puente cruzado (“*latch state*”), generándose tensión con un mínimo gasto de ATP.

Puesto que en términos generales la velocidad a la que se realiza la contracción y el desarrollo de la tensión en el músculo liso está estrechamente determinado por la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ , existen varios mecanismos que van a permitir el ajuste fino de este parámetro. Los mecanismos fundamentales son:

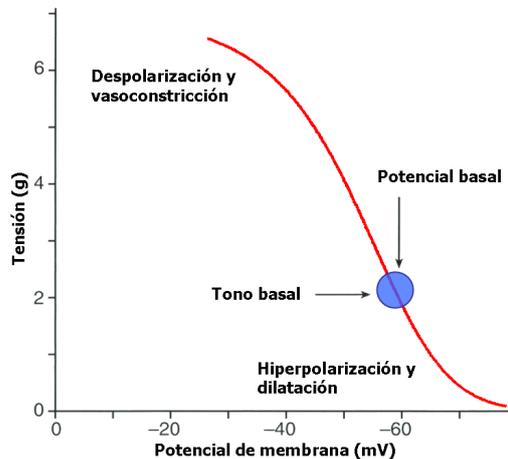
- Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje y/o canales operados por receptor en la superficie de la membrana.
- Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico.
- Bombeo activo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas de la membrana plasmática y de la membrana del retículo sarcoplásmico. Esta expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol se ve ayudada en algunas células por los intercambiadores  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  aunque en VSMC predominan las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas. Las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas del sarcolema tienen que expulsar  $\text{Ca}^{2+}$  continuamente para evitar su acumulación, ya que existe un *leak* de  $\text{Ca}^{2+}$  continuo debido principalmente a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, los cuales tienen una probabilidad de apertura pequeña pero finita en condiciones basales, y a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales catiónicos inespecíficos (TRPs), que estarían abiertos a potenciales de membrana en reposo.

Debido a la existencia de todos estos mecanismos, las variaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  en el músculo liso pueden ser debidas a cambios en el potencial de membrana ( $E_M$ ) pero también pueden ocurrir en ausencia de cambios en su  $E_M$ .

## Introducción

Los procesos involucrados se denominan **acoplamiento electromecánico** y **acoplamiento farmacomecánico** respectivamente.

En el **acoplamiento electromecánico**, la despolarización de la membrana aumenta la probabilidad de de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes



**Figura 5.** Dependencia entre la tensión contráctil y el potencial de membrana en una arteria (acoplamiento electromecánico) (Siegel *et al.*, 1991).

de voltaje (VDCC, *voltage-dependent calcium channels*), y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  induce la contracción del VSMC y la vasoconstricción. Puesto que el  $E_M$  de las VSMC en reposo está entre -40 y -65 mV, los VDCC están parcialmente activados en reposo, por lo cual los cambios en  $E_M$  alteran la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto el estado de contracción basal.

Por ello, una hiperpolarización

de la membrana conducirá a la relajación del VSMC y la vasodilatación al disminuir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 5).

En el **acoplamiento farmacomecánico**, diversos agentes químicos (hormonas circulantes, neurotransmisores, metabolitos...) inducen la vasoconstricción por su unión a receptores de membrana (**Figura 4**). La activación de estos receptores (generalmente receptores metabotropos, acoplados a proteínas G) induce un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  bien a través de segundos mensajeros como el IP3 que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo o bien activando canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (ROC, *receptor operated channels*). Sin embargo, es importante tener en cuenta que de hecho la mayor parte de las sustancias vasoactivas modifican además el  $E_M$  ya que los receptores, a través de vías de señalización que incluyen proteínas G, modifican la actividad de diversos tipos de canales iónicos. De hecho, experimentalmente se observa la existencia de una correlación muy buena entre el estado contráctil de las VSMC y las variaciones en su  $E_M$  (figura 5).

### 1.3.2. Control del tono vascular

El tono vascular regula el flujo sanguíneo local, la presión arterial, la presión capilar y la presión venosa central. El flujo sanguíneo local de un tejido es controlado por el diámetro de los vasos de resistencia, concretamente las arteriolas y arterias terminales. Un pequeño cambio en el diámetro del vaso produce grandes cambios en la resistencia, y consecuentemente cambios moderados en el tono vascular pueden alterar enormemente el flujo sanguíneo<sup>1</sup>. La presión arterial es el producto de la resistencia periférica total por el gasto cardíaco, y se regula de forma continua mediante el ajuste del tono de los vasos de resistencia. Por su parte, la presión capilar está regulada por el tono arteriolar local. Como resultado, el tono arteriolar influye sobre la heterogeneidad de perfusión, sobre la tasa de filtración local y finalmente sobre el flujo sanguíneo. Finalmente, la presión venosa central se ve afectada por la distribución de la sangre entre las venas centrales y periféricas. La contracción de las vénulas y venas periféricas desplaza un volumen de sangre considerable hacia las venas centrales, aumentando de este modo la presión de llenado cardíaco y el volumen del latido. Con todo ello, los cambios en el tono vascular actúan tanto a nivel local regulando la perfusión de los tejidos y el intercambio de agua y nutrientes, como a nivel general regulando la presión arterial, el flujo sanguíneo, la presión venosa central y el volumen de contracción cardíaco.

El tono vascular es un término que se usa comúnmente para caracterizar el estado contráctil de un vaso, y se puede tomar como indicador del nivel de activación de las VSMC de ese vaso. El tono vascular es funcionalmente relevante, puesto que determina el diámetro de los vasos sanguíneos. Así, un aumento en el tono causa vasoconstricción y una disminución del mismo causa vasodilatación, ya que la pared se distiende debido al aumento de la presión arterial al relajarse la túnica media. Este tono basal de las arterias de

---

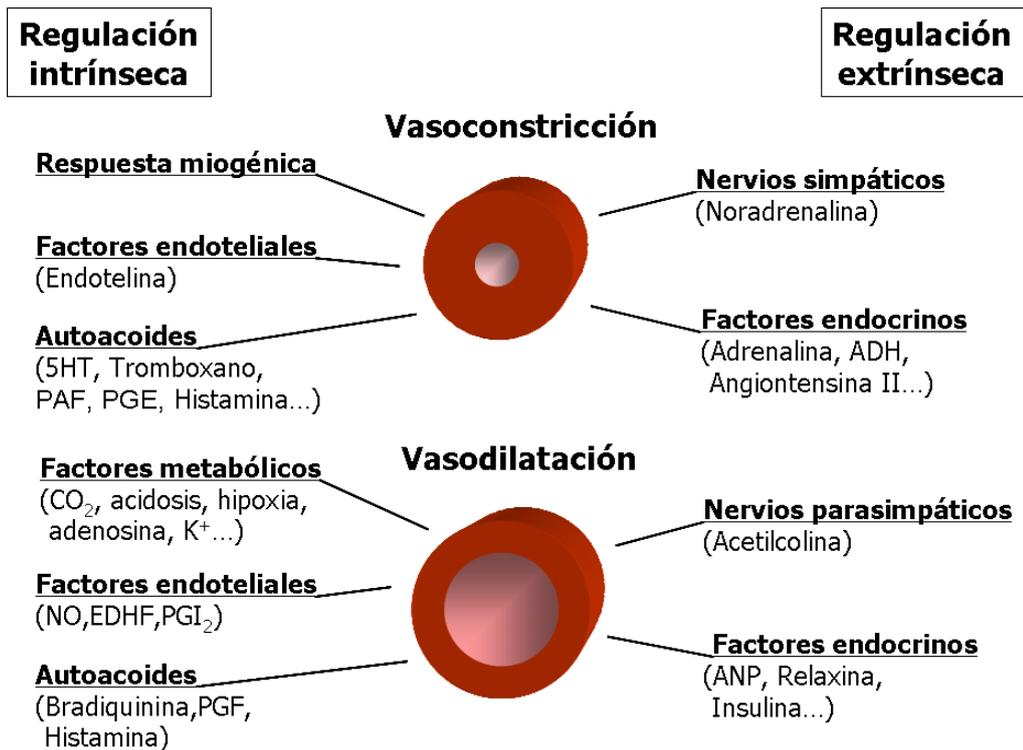
<sup>1</sup> Este hecho es fácilmente explicable teniendo en cuenta la ecuación de Poiseuille,  $R = 8\eta L / (\pi r^4)$ , según la cual la resistencia (R) que ofrece el vaso al flujo sanguíneo es directamente proporcional a la viscosidad del plasma ( $\eta$ ) y a la longitud del vaso (L), e inversamente proporcional al radio (r) del vaso elevado a la cuarta potencia: pequeños cambios en el radio del vaso se traducen en un gran cambio en la resistencia al flujo sanguíneo.

## *Introducción*

resistencia se mantiene incluso después del bloqueo de los nervios simpáticos vasoconstrictores, indicando que los mecanismos que lo regulan son fundamentalmente mecanismos intrínsecos al propio lecho vascular.

Como ya se ha comentado, y a diferencia de lo que ocurre en el músculo cardíaco ó esquelético, los potenciales de acción no son esenciales para la contracción del músculo vascular, y por tanto, para la generación del tono. Generalmente en el músculo vascular el grado de contracción viene dado por el grado de despolarización de las células sin llegar a generarse potenciales de acción. Cuando se dan, estos potenciales de acción se inician por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (ya que el músculo liso carece de canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje) y son muy lentos. La fase de repolarización de estos potenciales se produce por la salida de  $\text{K}^+$  a través de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje y de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando la actividad de los nervios simpáticos o los agonistas circulantes inclinan este balance a favor de un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ , la tensión de los miocitos se incrementa produciendo la contracción del vaso. En cambio, cuando estos agonistas favorecen la caída en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la tensión baja y el vaso se dilata (Levick J.R., 2003).

El tono vascular se consigue como resultado de la continua interacción entre mecanismos vasodilatadores y vasoconstrictores que actúan sobre el vaso sanguíneo (Figura 6). Estos mecanismos se pueden dividir en mecanismos intrínsecos, que regulan el tono mediante factores locales producidos en el mismo vaso o en tejidos circundantes, y mecanismos extrínsecos mediados por factores originados fuera del órgano (Mohrman DE & Heller LJ, 2003). De este modo la regulación vascular se organiza como un proceso de control jerárquico. El nivel más bajo se corresponde con la forma más básica de regulación, la respuesta miogénica. El nivel siguiente está compuesto por el sistema de regulación intrínseca, que atiende las necesidades locales para un órgano individual y el nivel superior está formado por el sistema de regulación extrínseca, que puede modificar las respuestas locales según las necesidades del organismo (Levick J.R., 2003).



**Figura 6.** Resumen de los factores que determinan la regulación extrínseca e intrínseca del tono vascular.

La función principal de los mecanismos extrínsecos es la de regular la presión arterial alterando la resistencia vascular sistémica, mientras que los mecanismos intrínsecos son importantes para la regulación del flujo sanguíneo local dentro del órgano, contribuyendo también en respuestas patológicas como la inflamación y el vasoespasmio arterial. La idea central es que el tono vascular en un momento dado está determinado por el balance entre factores vasoconstrictores y vasodilatadores, que a su vez pueden ser debidos a influencias intrínsecas y extrínsecas.

Los principales mecanismos **reguladores intrínsecos** son:

- **La respuesta miogénica.** Cuando la presión interna aumenta en una arteria o arteriola, el efecto inmediato que se origina es la distensión mecánica de la pared del vaso. La distensión provoca el estiramiento de los miocitos de la túnica media, y el estímulo mecánico produce una despolarización, probablemente mediada por la activación de canales de cloruro regulados por volumen y canales catiónicos no selectivos que se activan por vías de señalización sensibles a la distensión (Schnitzler *et al.*, 2008). Esta despolarización aumenta la probabilidad de apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup>

## Introducción

tipo L incrementando la  $[Ca^{2+}]_{cit}$ , y activando el mecanismo de contracción. Este mecanismo de contracción sostenida en respuesta a la distensión del vaso se denomina respuesta miogénica. Este es un mecanismo autorregulador esencial ya que contribuye a mantener el tono basal y a estabilizar el flujo sanguíneo local y la presión capilar en respuesta a cambios en la presión arterial (Bayliss, 1902).

- *Factores endoteliales.* El endotelio sintetiza y libera agentes vasodilatadores como el NO, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y la prostaciclina ( $PGI_2$ ), y a su vez también produce agentes vasoconstrictores como la endotelina. Estas sustancias actúan de un modo paracrino sobre los miocitos adyacentes. El principal estímulo que provoca la producción endotelial de NO es el “*shear stress*” (fuerza de cizallamiento) ejercido por la sangre al moverse en el interior del vaso<sup>2</sup>. El aumento del *shear stress* que se produce como consecuencia de un aumento en la viscosidad de la sangre o del flujo estimula la liberación de NO, provocando la dilatación del vaso, con la consiguiente disminución de la resistencia local.

- *Factores metabólicos.* El aumento del flujo sanguíneo mediado por el metabolismo de un organismo se denomina hiperemia funcional o metabólica. La hiperemia se produce gracias a la liberación de sustancias vasodilatadoras desde el parénquima activo al fluido intersticial, desde donde difunden a la túnica media de las arterias de resistencia. Entre los factores y agentes químicos que aumentan en los tejidos activos, y tienen un efecto vasodilatador, durante la hiperemia metabólica se encuentran el  $CO_2$ , el lactato, la acidosis, la hipoxia, la adenosina, iones de  $K^+$  y fosfato, y la hiperosmolaridad.

- *Autoacoides.* Los autoacoides son moléculas secretadas de forma paracrina implicadas en eventos patológicos como la inflamación y la hemorragia. Estas sustancias químicas vasoactivas pueden ser

---

<sup>2</sup> El *shear stress* ( $\tau$ ) depende del flujo, la viscosidad y el radio del vaso según la siguiente relación:  $\tau = 4\eta Q / (\pi r^3)$ . Por tanto aumenta con la viscosidad y el flujo, y su relación inversa con el radio hace que sea más relevante en los vasos de resistencia (de pequeño diámetro).

vasoconstrictoras, como la serotonina (5-HT), el tromboxano, los leucotrienos, el factor activante de plaquetas (PAF) y las prostaglandinas de la serie E (PGE), o vasodilatadores, como la bradiquinina y las prostaglandinas de la serie F (PGF). La histamina es otro autoacoide que puede producir ambos efectos dependiendo del tipo de receptores presentes en el vaso sobre el que es liberada. Así, si se une a receptores  $H_1$  activa la vía de PLC-IP<sub>3</sub> dando lugar a una vasoconstricción, en cambio si se une a receptores  $H_2$  activa la vía de la adenilato ciclasa-AMPC produciendo la relajación del vaso.

Los principales factores que median la **regulación extrínseca** son:

- *Los nervios vasomotores.* Los nervios *simpáticos vasoconstrictores* constituyen un sistema fundamental para el control de la resistencia periférica total y de la regulación de la presión arterial. Liberan noradrenalina desde sus terminales, que provoca un aumento del tono vascular después de unirse a receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos de las células de músculo liso, modulando de este modo la presión arterial y el flujo sanguíneo local. Los nervios *parasimpáticos vasodilatadores* no son tónicamente activos y sólo se estimulan cuando el órgano demanda un aumento en el flujo sanguíneo. Como norma general, los vasos sanguíneos no reciben inervación parasimpática del sistema nervioso autónomo, sin embargo, estos nervios están presentes en vasos del cerebro y del corazón, aunque su influencia sobre el tono vascular parece ser poco importante. (Mohrman DE & Heller LJ, 2003).

- *Factores endocrinos (hormonas circulantes).* Las principales hormonas que controlan la actividad de las células musculares lisas son las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), la angiotensina II, la vasopresina y el péptido atrial natriurético.

La *adrenalina* y *noradrenalina* son secretadas por la medula adrenal en respuesta a la actividad simpática preganglionar. Pueden estimular receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos cardíacos, causando un aumento de la frecuencia cardíaca y de la contractilidad miocárdica, o bien producir la vasoconstricción de arterias y venas al activar receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Además a concentraciones fisiológicas pueden producir vasodilatación en el músculo esquelético activando

## Introducción

receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, que están acoplados a la cascada de la adenilato ciclasa-AMPC.

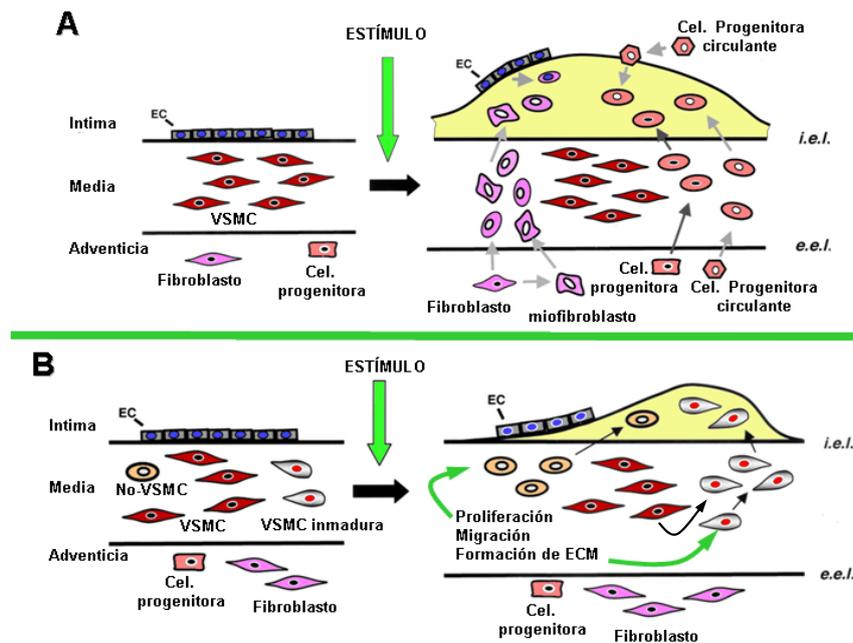
La concentración de *angiotensina II* en la sangre depende de la actividad del sistema *renina-angiotensina-aldosterona*. La renina es secretada por el aparato yuxtaglomerular en respuesta a una disminución de la presión arterial o de la concentración de NaCl en plasma, y a la actividad simpática renal. La renina una vez liberada a la sangre cataliza la conversión del angiotensinógeno (proteína secretada por el hígado) en angiotensina I, y ésta a su paso por los pulmones se transforma en *angiotensina II* por acción de la ACE (enzima convertidora de angiotensina) endotelial. La *angiotensina II* regula la presión arterial mediante dos mecanismos: indirectamente, estimulando la secreción de aldosterona por la corteza adrenal, la cual actúa sobre los túbulos renales favoreciendo la retención de agua y sal, manteniendo así constante el volumen plasmático; y directamente, al ejercer una acción vasoconstrictora tónica sobre el músculo liso vascular, que ayuda a mantener las resistencias periféricas y la presión arterial (Levick J.R., 2003).

La *vasopresina* u hormona antidiurética (ADH) se produce en el hipotálamo y es liberada desde la glándula pituitaria posterior en respuesta a la hipertonicidad y a la hipotensión. Su acción vasoconstrictora mantiene la presión arterial en un estado de hipovolemia.

El *péptido atrial natriurético* (ANP) se segrega desde las aurículas del corazón en respuesta a la distensión, reduciendo el volumen sanguíneo mediante un efecto diurético y mediante el aumento de la filtración capilar a través de la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad.

### 1.3.3. Modulación fenotípica

El proceso de diferenciación de las VSMC comprende una gran variedad de fenotipos que se manifiestan en los distintos estadios del desarrollo. De hecho, en los organismos adultos las células no están totalmente diferenciadas y aún son capaces de inducir cambios en su fenotipo (*modulación fenotípica*) en respuesta a cambios en su entorno (Owens, 1995). En las etapas tempranas de la vasculogénesis, las VSMC manifiestan una gran capacidad migratoria, una tasa de proliferación muy rápida y un alto índice de síntesis de



**Figura 7.** Representación esquemática de los mecanismos celulares potencialmente involucrados en el remodelado arterial asumiendo una población homogénea (A) o heterogénea (B) de VSMC en la capa media del vaso. EC = célula endotelial; i.e.l. = lámina elástica interna; e.e.l. = lámina elástica externa. Modificado de (Stenmark *et al.*, 2006)

componentes de la matriz extracelular (*fenotipo proliferativo*), entre los que se incluyen el colágeno, la elastina, proteoglicanos, cadherinas, e integrinas. Además, en estos estadios tempranos, las VSMC forman abundantes *gap junctions* con células endoteliales, ya que la interacción entre estos dos tipos celulares es crítica para la maduración y el remodelado de los vasos sanguíneos. Por el contrario, las células de músculo liso de vasos sanguíneos maduros muestran poca o nula capacidad de proliferación y migración, así como una tasa muy baja de síntesis de componentes de la matriz extracelular, por lo que la célula se restringe casi únicamente a desempeñar su función contráctil (*fenotipo contráctil*).

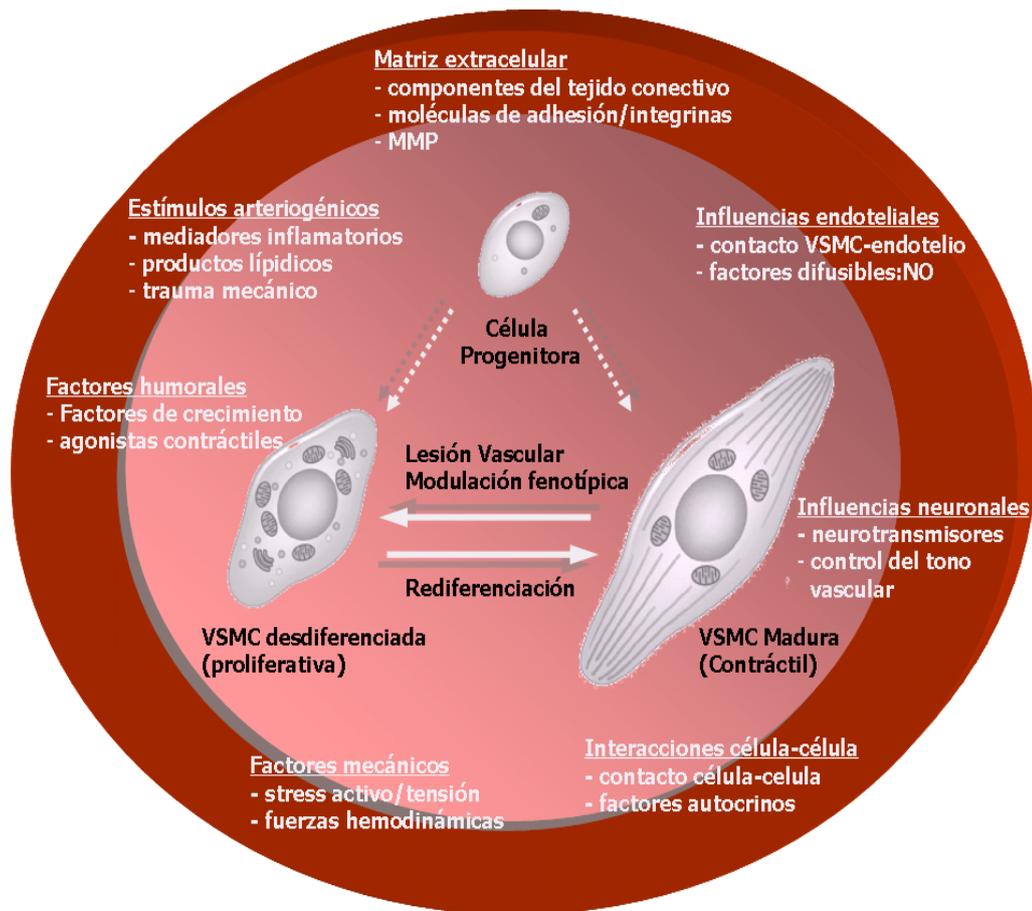
Tras una lesión vascular las VSMC contráctiles y diferenciadas sufren modificaciones transitorias en su fenotipo pasando de nuevo a un estado sintético y desdiferenciado, jugando un papel fundamental en la reparación de estas lesiones. Aunque la reparación del vaso dañado se lleva a cabo principalmente a través de la modulación fenotípica reversible y transitoria de VSMC preexistentes, también pueden participar células circulantes de la medula ósea, células originarias de la adventicia, e incluso subpoblaciones de

## Introducción

VSMC preexistentes pero fenotípicamente distintas a las VSMC contráctiles (figura 7, Owens *et al.*, 2004). Aunque la modulación fenotípica y sus implicaciones se conocen desde hace tiempo, solo unos pocos marcadores de diferenciación de las VSMC se han identificado hasta la fecha. Así por ejemplo, se sabe que la desdiferenciación y el consiguiente paso a fenotipo proliferativo se asocia a una disminución de la expresión de determinadas proteínas contráctiles y del citoesqueleto, como la  $\alpha$ -actina, la cadena pesada de la miosina, calponina, caldesmon, smoothelina y vinculina (Schwartz *et al.*, 1990; Owens, 1998).

El alto grado de plasticidad mostrado por las VSMC puede tener consecuencias adversas llegándose a producir cambios fenotípicos anormales que contribuyen al desarrollo y progresión de enfermedades vasculares. De hecho, existen evidencias de que el remodelado fenotípico de las VSMC, puede provocar la proliferación inadecuada de las VSMC, como se ha constatado en arterias de sujetos hipertensos, y jugar un papel clave en el desarrollo de placas ateroscleróticas y en la restenosis post-angioplástica. Por ello, la identificación de los factores que puedan participar en el control y la regulación del proceso de desdiferenciación tiene sin duda un enorme interés médico. Este proceso depende de la integración constante de un gran número de factores ambientales que en conjunto determinan el perfil de expresión de los genes característicos de las VSMC. Entre estos factores se incluyen factores de crecimiento, influencias mecánicas, interacciones célula-célula, componentes de la matriz extracelular, así como varios mediadores inflamatorios (Figura 8, Owens *et al.*, 2004). También parece decisivo el papel que juegan en este proceso los canales iónicos, como se expone detalladamente más adelante.

- *Factores de crecimiento.* La proliferación de las VSMC viene precedida por la modulación fenotípica de las mismas hacia un estado sintético en la que se produce una gran pérdida de filamentos de actina y miosina. En presencia de factores de crecimiento como el *factor derivado de plaquetas* (PDGF), producido por plaquetas y macrófagos, las VSMC sufren una drástica disminución de la síntesis y de los niveles de mRNA de la  $\alpha$ -actina de músculo liso, teniendo también un efecto supresivo sobre la expresión de otros



**Figura 8.** Factores que regulan la modulación fenotípica de las VSMC.

marcadores de diferenciación como la cadena pesada de miosina (MHC) y la  $\alpha$ -tropomiosina. El TGF- $\beta$  (*factor de crecimiento transformante beta*) está implicado en la rediferenciación celular y en la estabilización de la placa aterosclerótica, ya que promueve la diferenciación de células en cultivo, aumentando la expresión de marcadores de músculo liso como la  $\alpha$ -actina y la MHC. Las MMP (*metaloproteinasas de la matriz*) son endopeptidasas producidas por las VSMC y macrófagos, que contribuyen a la degradación y al remodelado de la matriz extracelular. La expresión de estos MMP en VSMC presentes en lesiones vasculares induce la modificación de la matriz celular, promoviendo la modulación fenotípica de estas células (Owens *et al.*, 2004).

- **Interacciones célula-célula.** Durante la vasculogénesis las VSMC precursoras se reclutan desde el mesénquima que rodea el endotelio, y se diferencian a VSMC. Por lo tanto parece razonable sugerir que las células endoteliales jueguen un papel importante en el proceso de vasculogénesis. De

## Introducción

hecho, las células endoteliales en cultivo segregan una gran variedad de factores de crecimiento como el PDGF y el bFGF (*factor de crecimiento de fibroblastos*), así como inhibidores de crecimiento como la heparina y el TGF- $\beta$ , que pueden bien estimular o inhibir la proliferación y crecimiento de las VSMC en cultivo. Muchos de estos factores derivados del endotelio tienen también actividad quimiotáctica para las VSMC y contribuyen al reclutamiento y migración de los precursores de las VSMC durante la vasculogénesis. También la interrupción del estímulo neuronal produce una disminución del crecimiento celular y de la contractibilidad en el músculo liso, implicando por tanto al sistema nervioso en la diferenciación de las VSMC. Esta influencia es recíproca, ya que existen evidencias de la contribución de las VSMC en el desarrollo de la innervación neuronal.

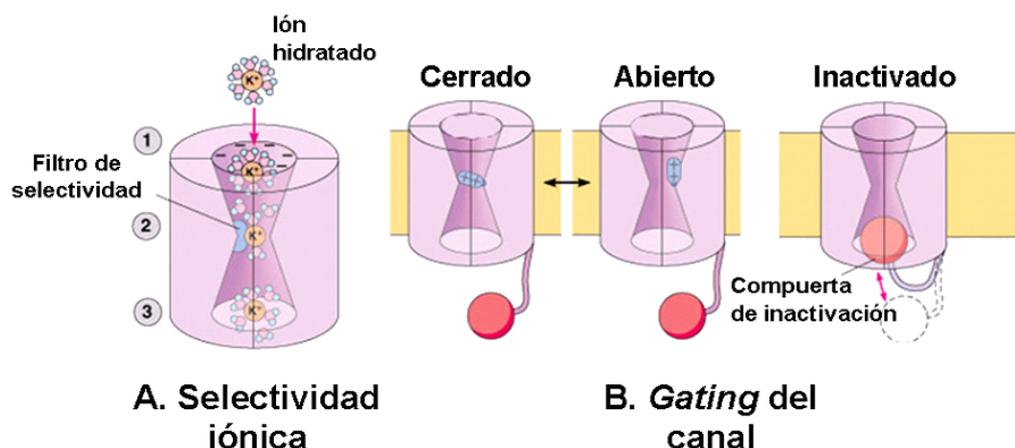
- *Factores mecánicos y/o hemodinámicas.* Los factores mecánicos o fuerzas hemodinámicas como el *shear stress* y la tensión tangencial juegan un papel importante en el desarrollo del sistema vascular, aunque el estímulo preciso y las vías de señalización que provocan el desarrollo y maduración de las VSMC aun no se conocen. A su vez el cese del flujo sanguíneo y la disminución de la presión hidrostática se asocian con la atrofia y el remodelado de las arterias.

- *Papel de la matriz extracelular.* La matriz extracelular tiene profundos efectos sobre el comportamiento celular, como la migración, la proliferación y la diferenciación jugando un papel clave en la vasculogénesis. De hecho, existen evidencias de un aumento de la presencia de componentes de la matriz en determinadas regiones de vasculogénesis, así las VSMC en cultivo producen gran cantidad de componentes de la matriz, entre las que se incluyen varias colagenasas, elastinas, laminina, fibronectina y glicosaminoglicanos.

## 1.4. CANALES IÓNICOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR

### 1.4.1. Estructura de los canales iónicos

Los canales iónicos son una clase ubicua de proteínas integrales de membrana que forman poros hidrófilos a través de los cuales se produce el flujo de iones a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos participan en un gran número de procesos fisiológicos fundamentales, ya que permiten cambios rápidos y selectivos en la permeabilidad de la membrana, como los que se producen, por ejemplo, durante la transducción sensorial, la generación y propagación del potencial de acción, la contracción muscular o la transmisión sináptica. Las alteraciones en su función o su distribución (“*canalopatías*”), pueden tener profundas consecuencias fisiopatológicas en un gran número de enfermedades. Los canales iónicos están presentes en todas las células y tienen una distribución y densidad variable según el tipo celular. Son proteínas dinámicas que pueden oscilar de forma rápida entre distintos estados conformacionales, un fenómeno conocido como *gating* del canal (Figura 9). Cuando el canal está en una conformación que permite el flujo de iones, decimos que está abierto, mientras que un canal está cerrado cuando no permite que los iones fluyan de un lado a otro de la membrana. Existe un equilibrio entre estos estados abiertos y cerrados, que determina la cantidad de corriente que fluye a través de la membrana en función del tiempo, y este

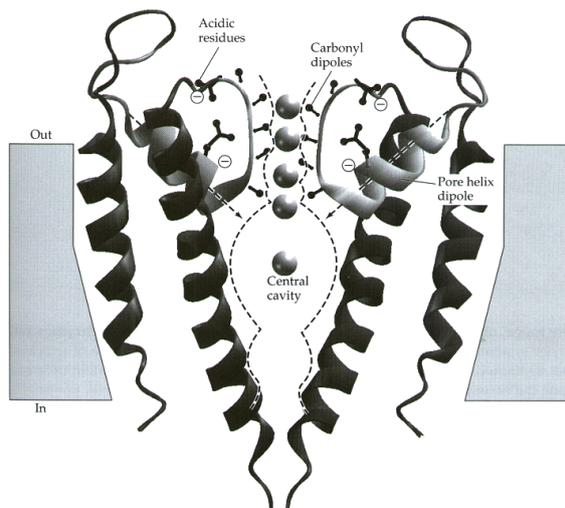


**Figura 9.** Representación de un canal iónico. A: El ión entra en la boca del poro e interactúa con el filtro de selectividad cuando el canal se encuentra en el estado abierto. B: Diferentes estados conformacionales de un canal iónico: cerrado, abierto o inactivado.

## Introducción

equilibrio puede verse influenciado por factores como el gradiente eléctrico transmembrana, la unión de ligandos (extracelulares como los neurotransmisores o intracelulares como el  $\text{Ca}^{2+}$ , los nucleótidos cíclicos o los derivados del inositol fosfato), o modificaciones covalentes del canal por fosforilación u otros mecanismos. En líneas generales, y en función del mecanismo que determina la transición de abierto a cerrado de los canales, se pueden clasificar en dos grandes grupos, los canales regulados por ligando y los canales regulados por cambios en el potencial de membrana.

Todos los canales son fundamentalmente permeables al ión que les da nombre, pero ninguno es absolutamente específico. El canal es permeable en función de cual sea el tamaño y las propiedades físico-químicas del ión de tal manera que la estructura del poro está adaptada para la conducción de un determinado ión. Dentro de la familia de los canales dependientes de voltaje, todos ellos tienen una estructura general conservada en la que se pueden



**Figura 10.** Representación esquemática de dos subunidades del canal de  $\text{K}^+$  bacteriano KcsA. Cada subunidad del canal está formada por dos hélices  $\alpha$  transmembrana conectadas por un segmento que forma la parte externa del poro. Se puede observar la cavidad central y el filtro de selectividad donde los oxígenos de los carbonilos sustituyen a la capa de hidratación de los iones  $\text{K}^+$ .

distinguir una serie de elementos, como el filtro de selectividad, el sensor de voltaje, las compuertas de *gating* y los lugares de unión a moduladores.

La cristalización del canal de  $\text{K}^+$  bacteriano KcsA proporcionó mucha información sobre las bases moleculares de la selectividad y la conducción del poro de los canales iónicos (Doyle et al., 1998). Este canal presenta una estructura elemental, con una secuencia

similar a todos los demás canales de  $\text{K}^+$  conocidos. Cada subunidad del canal está formada por dos hélices  $\alpha$  transmembrana conectadas por un segmento que conforma la parte externa del poro.

El poro está compuesto, desde el interior al exterior celular, por un túnel seguido de una cavidad rellena de agua donde los iones pueden mantener su capa de hidratación (Figura 10). Después, el canal se estrecha conformando el filtro de selectividad, donde se introducen los iones sin moléculas de agua. Los átomos de oxígeno del esqueleto peptídico en el filtro de selectividad reemplazan las moléculas de la capa de hidratación del  $K^+$ , formando una serie de capas de coordinación perfectas a través de las cuales se mueve el  $K^+$ . Esta interacción favorable con el filtro de selectividad no es posible con el  $Na^+$ , ya que es demasiado pequeño para hacer los contactos con los oxígenos de los carbonilos y por lo tanto su deshidratación no es energéticamente favorable. La estabilización diferencial del  $K^+$  es la base de la selectividad del filtro por el ión, y mutaciones que cambian residuos en esta parte de la proteína eliminan la selectividad del canal por el ión.

Como su propio nombre indica, en los canales dependientes de voltaje la apertura o el cierre están determinados por cambios en el potencial transmembrana. Esta dependencia se debe a la presencia de un sensor de voltaje que detecta los cambios que se producen en el potencial de la membrana y los traduce en un cambio conformacional que afecta al paso de iones a través del poro. Además, muchos canales presentan sitios de unión, intra o extracelulares para toxinas, fármacos u otros iones, de modo que la unión del ligando adecuado modifica las propiedades del canal.

En el caso de los canales dependientes de voltaje, a potenciales hiperpolarizados, los canales se encuentran preferentemente en el estado cerrado. Al despolarizarse la membrana, el equilibrio se desplaza hacia el estado abierto, de forma que los canales pasan más tiempo abiertos, aumentando el flujo de iones a su través. En algunos casos, aún cuando la membrana permanezca despolarizada, los canales están en un estado conformacional inactivo, distinto del cerrado, pero indistinguible desde el punto de vista de la permisividad al paso de iones. En el estado inactivado el canal no conduce porque la compuerta de inactivación se ha cerrado. Una vez que el canal alcanza el estado inactivado es necesaria su deinactivación para que pueda volver al estado abierto de nuevo (Figura 9).

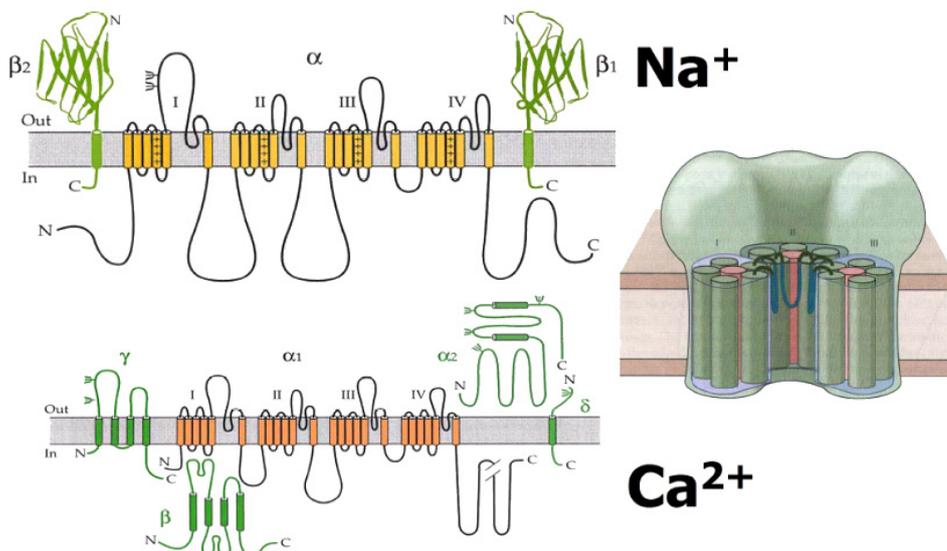
## Introducción

La clasificación más sencilla de los canales iónicos se basa en su selectividad iónica, de modo que hablamos de canales de uno u otro ión en función de cuál es el ión para el cual el canal es más selectivo. Como ya se ha mencionado la selectividad iónica depende de la estructura del poro, y más específicamente del filtro de selectividad. A continuación se presenta una breve revisión de las propiedades moleculares de los canales dependientes de potencial, haciendo especial hincapié en los canales de  $K^+$ .

### 1.4.2. Tipos de canales iónicos operados por voltaje

#### 1.4.2.1. Canales de $Na^+$ y $Ca^{2+}$

La estructura de los canales de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  es bastante similar: ambos son grandes monómeros que se ciclan en la membrana para formar un poro a través del cual pasa el ión al que son permeables (Figura 11). Están formados por una subunidad principal, la subunidad  $\alpha$ , y un número variable de subunidades accesorias que influyen en las propiedades de la subunidad principal. La subunidad  $\alpha$  es la más importante porque es la que tiene los dominios que forman el poro del canal y está implicada en la conductancia iónica. De hecho, puede funcionar como un canal activado por voltaje cuando



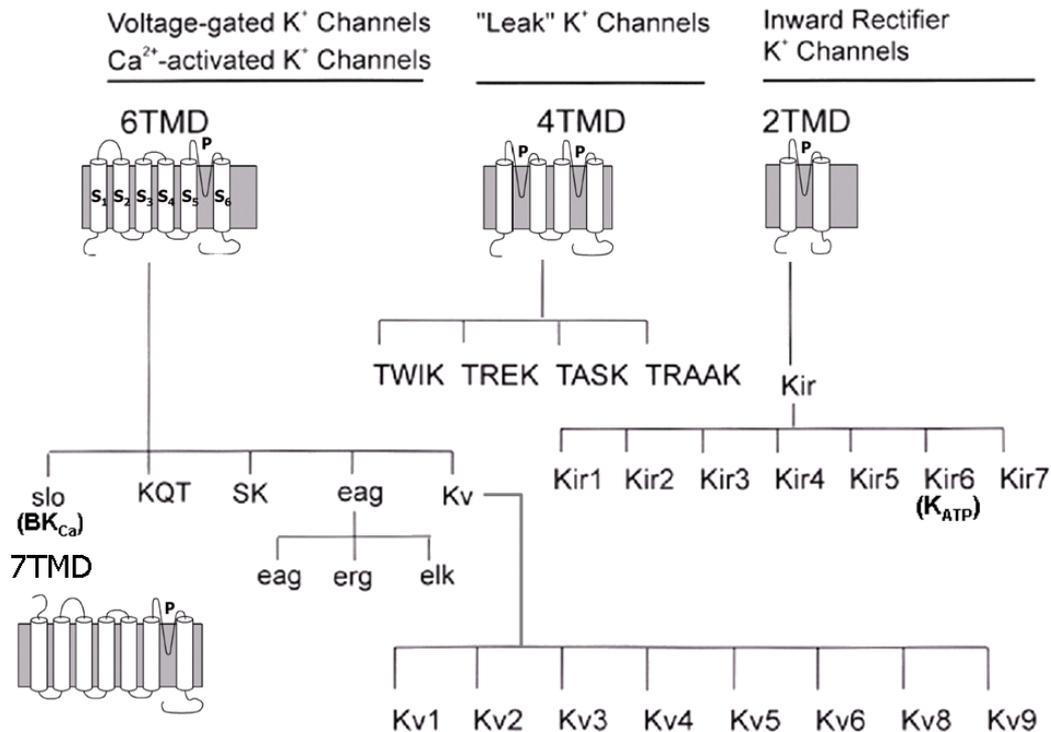
**Figura 11.** Estructura molecular de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ . Ambos canales están formados por una subunidad principal y varias subunidades accesorias. La subunidad principal presenta en ambos casos 4 dominios, cada uno de los cuales está constituido por 6 segmentos transmembrana. La estructura tridimensional de los canales insertados en la membrana se muestra en el diagrama de la derecha.

se expresa sola (Mikami et al., 1989). No hay una única subunidad  $\alpha$ , existen varios tipos diferentes dependiendo de la especie y el tipo celular. Sin embargo, todas conservan la misma estructura. Poseen 4 dominios (dominios I, II, III y IV), y cada uno de ellos está formado por 6 segmentos transmembrana, los segmentos S1, S2, S3, S4, S5 y S6. Tanto dominios como segmentos se unen entre sí mediante bucles intra o extracelulares, y su organización topológica para dar lugar a un canal se muestra en la figura 11.

#### 1.4.2.2. Canales de $K^+$

Los canales de  $K^+$  son los canales iónicos más variados y ubicuos de la membrana plasmática de las células, donde llevan a cabo un gran número de funciones esenciales. La diversidad funcional de estas proteínas es el reflejo de una gran diversidad estructural, ya que se han descrito más de 60 genes distintos que codifican para canales de  $K^+$ , agrupados en distintas subfamilias (Figura 12, Coetzee *et al.*, 1999). Su gran diversidad junto con su expresión ubicua les confieren un papel fisiológico clave, ya que contribuyen a un gran número de funciones esenciales en distintos tipos celulares: los canales de  $K^+$  determinan el potencial de membrana y la excitabilidad celular, contribuyen al equilibrio osmótico, regulan la actividad de diversas vías metabólicas intracelulares y participan en los procesos de proliferación y muerte celular. Además los canales de  $K^+$  son las dianas terapéuticas de numerosos fármacos, conduciendo a alteraciones en la función celular con efectos beneficiosos o tóxicos. Al igual que los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , los canales de  $K^+$  están formados por subunidades principales, las subunidades  $\alpha$ , y por subunidades  $\beta$  accesorias. Sin embargo, los canales de  $K^+$  presentan una diferencia muy importante con respecto a los de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ : la subunidad  $\alpha$  es una proteína multimérica. Esta subunidad no es un monómero constituido por cuatro dominios, ni cada dominio contiene siempre 6 segmentos transmembrana. En los canales de  $K^+$  cada subunidad proteica es producto de un gen. Un gen codifica una subunidad  $\alpha$  constituida por un número variable de segmentos transmembrana, pero una subunidad  $\alpha$  no es suficiente para formar un poro a través del cual pasen los iones, por lo que deben asociarse 4 subunidades para que el canal sea funcional.

## Introducción



**Figura 12.** Diversidad molecular de los canales de  $K^+$ . En función de su homología en los diversos organismos y sistemas se encuentran divididos en 4 grandes grupos: 6TM/1P, 4TM/2P, 7TM/1P y 2TM/1P. (Modificado de (Lopez-Lopez & Perez-Garcia, 2007) y ((Coetzee *et al.*, 1999))

La estructura básica y compartida por todos los canales de  $K^+$  está formada por dos dominios transmembrana (2TM) conectados por una región bucle que entra y sale de la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática. Este bucle, llamado dominio P, forma parte esencial del poro del canal. Los dominios P de los canales de  $K^+$  tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada: TTXGYGD. Esta secuencia constituye una parte esencial del filtro de selectividad del canal. Una manera de clasificar los canales de  $K^+$  es en función de la topología de sus subunidades  $\alpha$ , ya que pueden presentar estructuras muy diversas. De acuerdo con ella se puede hablar de 4 grupos de canales de  $K^+$  (Figura 12).

El primer grupo, representado por los canales de  $K^+$  activados por voltaje, tiene 6 segmentos transmembrana y 1 dominio P (6TM/1P). El segundo grupo tiene 7 segmentos transmembrana y 1 dominio P (7TM/1P). El tercer grupo, representado por los canales *leak*, tiene 4 segmentos transmembrana y 2 dominios P (4TM/2P). Funcionalmente, a diferencia de los otros grupos, estos canales forman dímeros. Finalmente, los rectificadores de entrada (*inward*

*rectifiers*) son los más simples estructuralmente, ya que están únicamente constituidos por 2 segmentos transmembrana y 1 dominio formador de poro (2TM/1P).

Cada uno de estos grupos comprende una familia discreta de proteínas, en base a la identidad de secuencia, y cada una de estas familias a su vez se divide en subfamilias. Así, en base al análisis de la secuencia de nucleótidos es obvia la existencia de muchos canales de  $K^+$  diferentes, con distintas propiedades funcionales. Esta diversidad aumenta si tenemos en cuenta su capacidad de formar estructuras heterotetraméricas funcionales y de asociarse con subunidades accesorias. A continuación se hace una pequeña descripción de las propiedades de cada una de las familias.

- *Subunidades  $\alpha$  con dos segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (2TM/1P)*. Los canales de  $K^+$  que presentan esta estructura carecen de sensor de voltaje, pero conservan los segmentos S5, S6 y el bucle que los une. Por lo tanto, mantienen la estructura necesaria para la formación del poro y la selectividad para el  $K^+$ . En realidad actúan como poros de membrana selectivos para el  $K^+$  que están abiertos independientemente del potencial de membrana. Son rectificadores de entrada (*inward rectifiers*), es decir, conducen mucha más corriente hacia el interior de la célula que hacia el exterior, debido a que la corriente de salida es bloqueada por  $Mg^{2+}$  y poliaminas (Shioya et al., 1993; Ficker et al., 1994). Los canales con esta forma estructural se denominan canales  $K_{IR}$  y son codificados por la familia de genes  $K_{IR}$ , que a su vez están constituidas por varias subfamilias de genes. Los genes de la familia  $K_{IR}$  pueden dar lugar a canales heterotetraméricos responsables de algunas corrientes nativas. Por ejemplo, la corriente rectificadora anómala o  $IK_1$  (Zobel et al., 2003), la corriente de  $K^+$  activada por acetilcolina  $IK_{ACh}$  (Krapivinsky et al., 1995) o, junto con el receptor de sulfonilurea, la corriente de  $K^+$  bloqueada por ATP o  $IK_{ATP}$  (Inagaki et al., 1995).

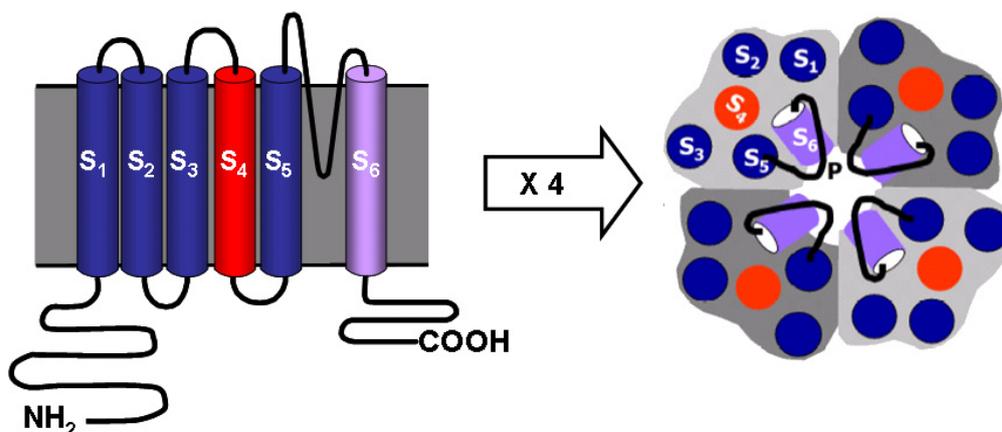
- *Subunidades  $\alpha$  con cuatro segmentos transmembrana y dos dominios formadores de poro (4TM2P)*. Las principales características estructurales de estas subunidades formadoras de canales de  $K^+$  de doble poro ( $K_{2P}$ ) son: 4 segmentos transmembrana (S1, S2, S3 y S4); el extremo amino terminal corto y el extremo carboxilo más largo, ambos intracelulares. Además, las regiones

## Introducción

que forman los poros están en los bucles que unen los segmentos S1 con S2 y S3 con S4 (Lesage et al., 1996b; Lesage & Lazdunski, 2000). Estos canales tampoco son dependientes de voltaje, al igual que los  $K_{IR}$ , y son rectificadores débiles. Conducen corrientes de activación casi instantánea y no presentan inactivación. Además no son sensibles a los bloqueantes clásicos de los canales de  $K^+$ . Todas estas propiedades han hecho que se les designe como canales de fondo (*background channels* o *leak channels*) y su actividad se asocia al mantenimiento del potencial de reposo de la célula (Lesage et al., 1996a; Lesage et al., 2000).

- *Subunidades  $\alpha$  con siete segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (7TM1P)*. El principal canal de esta clase estructural es el canal maxiK ( $BK_{Ca}$ ). El canal maxiK es un canal de  $K^+$  activado por voltaje y por ligando, el  $Ca^{2+}$ . Al igual que los otros miembros de la familia de los canales de  $K^+$  activados por voltaje (ver más adelante), deben formarse tetrámeros de subunidades  $\alpha$  del canal maxiK para constituir un canal activo, y se puede asociar también con subunidades accesorias  $\beta$  (Kaczorowski et al., 1996; Knaus et al., 1994a).

- *Subunidades  $\alpha$  con seis segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (6TM1P)*. Es la estructura más parecida a la de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. La subunidad  $\alpha$  está constituida por 6 segmentos transmembrana S1, S2, S3, S4, S5 y S6 con unos extremos N y C terminal



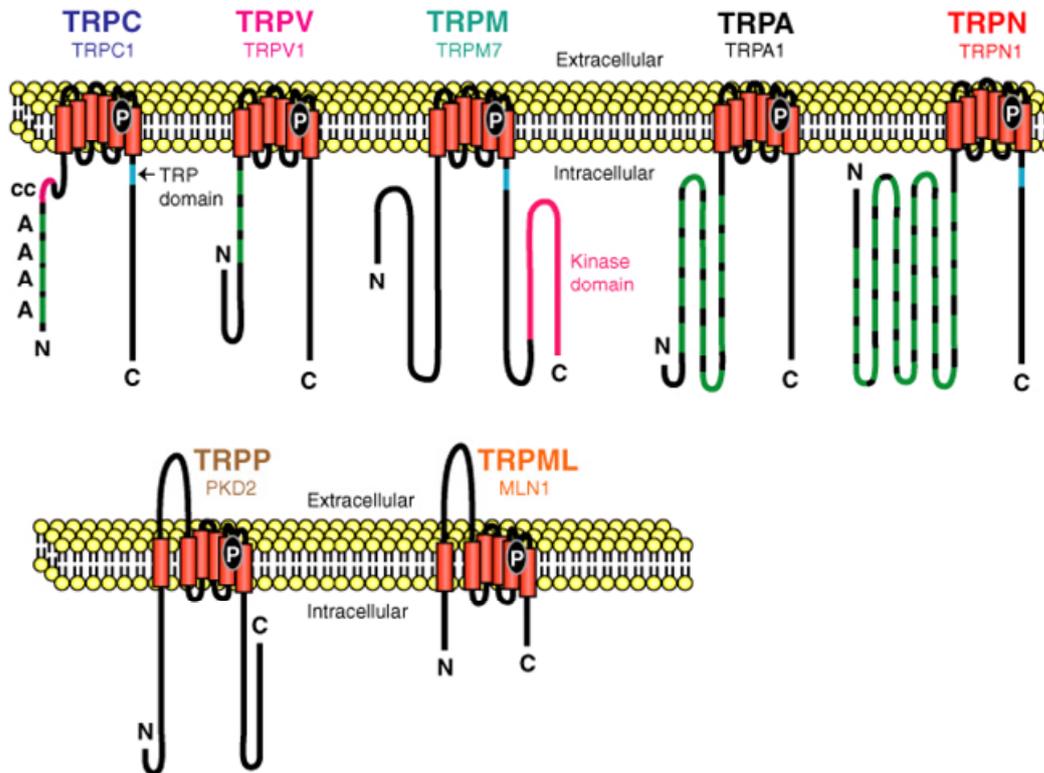
**Figura 13.** Estructura molecular de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (Kv). Estos canales están formados por 4 subunidades  $\alpha$ . Cada subunidad  $\alpha$  está constituida por 6 segmentos transmembrana. El canal funcional es un tetrámero de subunidades  $\alpha$ .

citoplasmáticos (Figura 13). Dentro de esta estructura hay dos regiones muy conservadas, que son el sensor de voltaje y el poro del canal. Un gran número de evidencias indican que el segmento S4 es el sensor de voltaje del canal. Esta región de la proteína contiene residuos cargados positivamente, arginina o lisina, cada tres posiciones y es el único dominio transmembrana que está cargado (Horn, 2000). La despolarización de la membrana causa un movimiento de los residuos cargados positivamente del S4, y este movimiento de cargas a través del campo eléctrico de la membrana media la apertura del canal. Por otra parte, el bucle que une los segmentos S5-S6 constituye la vía de permeación de iones, que contiene el filtro de selectividad del canal. Como ya se ha comentado, una única subunidad  $\alpha$  no es suficiente para constituir un poro, por lo que, para formar un canal de  $K^+$  funcional tienen que agruparse cuatro subunidades  $\alpha$  (Coetzee et al., 1999). Cuando las subunidades  $\alpha$  son todas iguales el canal es un homotetrámero, pero la mayoría de los canales de  $K^+$  de las células excitables están formados por el ensamblaje de subunidades  $\alpha$  diferentes y son por tanto heterotetrámeros (Duprat et al., 1995). Los canales de  $K^+$  pertenecientes a esta clase estructural se clasifican en varias subfamilias dependiendo de sus características funcionales: Kv, KCNQ, EAG, KcGMP, SK (Hille, 2001). La familia más diversa es la familia Kv, cuyos miembros se agrupan en 8 subfamilias distintas: Kv1-Kv6, Kv8 y Kv9 (figura 12). Una peculiaridad de estos canales Kv es que los miembros de algunas subfamilias, en concreto las subfamilias Kv5-6 y Kv8-9, son incapaces de formar homotetrámeros funcionales aun cuando codifican proteínas con una estructura de subunidades  $\alpha$  formadoras de poro, por lo que se denominan subunidades Kv silenciosas. En los tejidos nativos, estas subunidades (que se conocen como subunidades  $\gamma$  para diferenciarlas de las subunidades accesorias  $\beta$ , que son estructuralmente diferentes) se encuentran formando heterotetrámeros con los miembros de la subfamilia Kv2, y su asociación modula la conductancia y la cinética de las corrientes (Coetzee et al., 1999).

#### 1.4.2.3. Canales TRP

Hasta el momento se han identificado algo más de 30 miembros de canales TRP (*Transient Receptor Potential Channels*) en mamíferos, clasificados en siete subfamilias basándose en su homología de secuencia y en sus similitudes

## Introducción



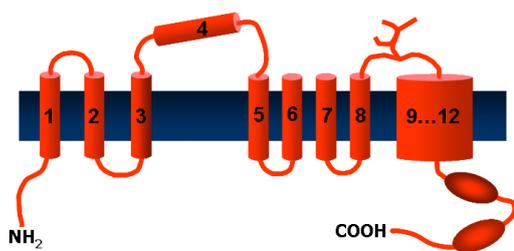
**Figura 14.** Subunidades representativas de cada una de las subfamilias TRP. Los canales TRPA, TRPC, TRPV y TRPN presentan repeticiones de ankirina (A) en su extremo N-terminal. Los canales TRPC, TRPM y TRPN tienen un dominio TRP (23-25 aa) situado inmediatamente después del segmento TM 6. Los canales TRPP y TRPML presentan un lazo extracelular muy largo entre DMT1 y DMT2. Los canales TRPM, exclusivamente, poseen dominios con actividad enzimática en su extremo C-terminal (dominio quinasa).

funcionales: TRPC (canónica o clásica), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPA (ankirina) y TRPN (NOMPC). Todos los TRPs son canales catiónicos, permitiendo el flujo de entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  principalmente, aunque la permeabilidad para cationes mono- o divalentes es muy variable entre las diferentes isoformas (Pedersen et al., 2005). Los canales TRP se componen de 6 segmentos transmembrana S1-S6 flanqueados por extremos N- y C-terminal citoplasmáticos. Las distintas subunidades TRP se ensamblan formando homo o heterotetrámeros, y la presencia de un lazo hidrofóbico delimitado entre los segmentos S5 y S6 de cada subunidad da lugar a la formación del poro del canal (Dietrich et al., 2006). Estos dominios transmembrana son las zonas más conservadas a lo largo de toda la familia, existiendo mayor variabilidad en los extremos N- y C-terminal donde existen dominios característicos para cada subfamilia (Figura 14) (Montell, 2005). Aunque la actividad de los canales TRP se ha considerado por

mucho tiempo independiente al voltaje, cada vez existen más evidencias de que varios de estos canales están operados por voltaje, presentando una curva de activación que se extiende principalmente en el rango de voltajes no fisiológicos, pero que estímulos mecánicos como la temperatura (TRPV1, TRPM8, TRPV3), o la unión a diversos ligandos (TRPV1, TRPV3, TRPM8, TRPM4), desplazan hacia potenciales fisiológicos relevantes (Nilius *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.4. Canales de Cl<sup>-</sup>

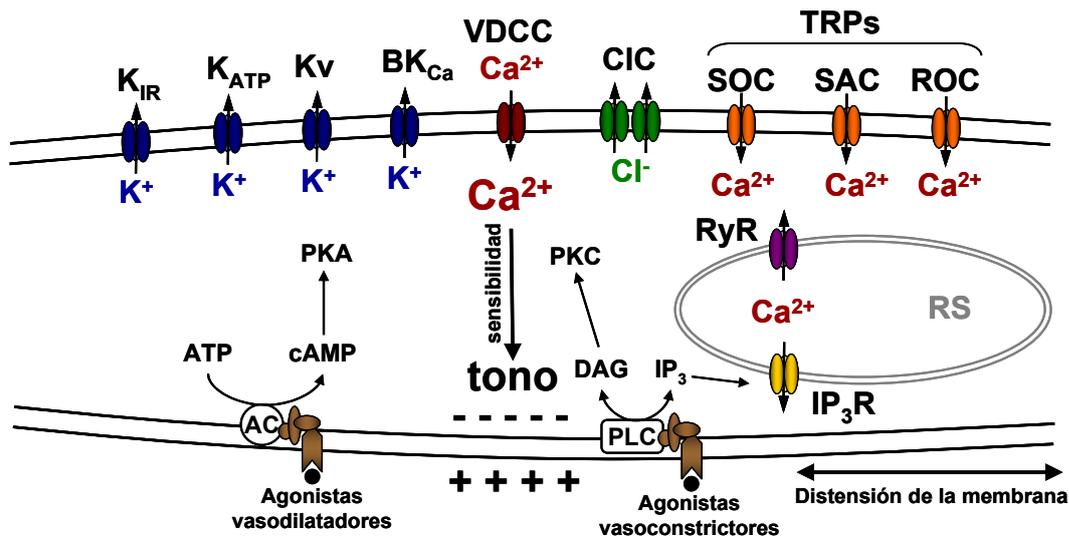
Los canales de Cl<sup>-</sup> son una superfamilia de canales iónicos que permiten la difusión pasiva de iones cargados negativamente a favor de gradientes electroquímicos. Además de Cl<sup>-</sup> pueden conducir también el flujo de otros aniones como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Estos canales se pueden subdividir en



**Figura 15.** Modelo de un canal ClC, donde los cilindros representan las diferentes hélices transmembrana. El número y la disposición de la hélices transmembrana más cercanas al extremo C-terminal, permanece aun sin determinar, de ahí que el cilindro de mayor tamaño represente entre dos y cuatro hélices transmembrana.

tres grupos basándose en su identidad de secuencia: canales de Cl<sup>-</sup> operados por ligando, canales CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) y canales CLC operados por voltaje (algunos de estos canales además de estar operados por voltaje también pueden activarse en respuesta a cambios en el pH, volumen celular, [Ca<sup>2+</sup>]...). Los

canales CLC están implicados en una gran variedad de funciones celulares relevantes como son la regulación del pH, la homeostasis del volumen celular, el transporte de solutos orgánicos, la estabilización del potencial de membrana, así como en la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Su estructura varía entre 10 y 12 hélices transmembrana (Figura 15), cada proteína forma un único poro y se ha demostrado que algunos miembros de esta familia pueden formar homodímeros. Su activación puede ser a través de voltaje, Ca<sup>2+</sup>, ligandos extracelulares o pH entre otros moduladores, dependiendo del tipo de canal (Suzuki *et al.*, 2006).



**Figura 16.** Canales iónicos de VSMC. En la parte superior se muestran distintos canales de K<sup>+</sup>, canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje (VDCC), canales de Cl<sup>-</sup>, Canales SOC (Store-Operated Channels), SAC (Stretch-Activated Channels) y ROC (Receptor-Operated Channels). En la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) se muestran receptores de rianodina (RyR) y de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R). Debajo se muestran algunas de las señales que modulan la función de estos canales en el control del tono vascular. (Jackson, 2000).

## 1.5. FUNCIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR

Los canales iónicos controlan el potencial de membrana y los flujos de Ca<sup>2+</sup> en las VSMC, por lo que están involucrados en todos los aspectos funcionales dependientes de estos parámetros, especialmente el tono vascular y el control de la proliferación y la modulación fenotípica. Existen evidencias recientes indicando que estas células expresan al menos cuatro tipos diferentes de canales de K<sup>+</sup>, uno o dos tipos de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, dos tipos de canales de Cl<sup>-</sup> y varios tipos de canales TRP (Figura 16). El potencial de membrana de estas células se mantiene por el balance entre los flujos de entrada (fundamentalmente de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, que tienden a despolarizar la célula) y los flujos de salida (fundamentalmente de K<sup>+</sup>, que tiende a hiperpolarizar, con una mínima contribución despolarizante del Cl<sup>-</sup>)<sup>3</sup>. Puesto que las células en

<sup>3</sup> Las VSMC mantienen una concentración inusualmente alta de Cl<sup>-</sup> intracelular (~54 mM), en parte debido a la actividad del cotrasportador Na/K/2Cl. El potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> tiene un valor aproximado de -23 mV, por lo que la apertura de los canales de Cl<sup>-</sup> favorece la salida de iones Cl<sup>-</sup>.

reposo presentan una elevada permeabilidad para el  $K^+$ , los canales de  $K^+$  van a contribuir de forma muy importante a determinar el potencial de membrana de las células, por lo cual parece lógico postular que alteraciones en la expresión y/o regulación de estos canales produzcan cambios en el potencial de membrana, y en última instancia, en el tono vascular o en el fenotipo celular.

### 1.5.1. Papel de los canales de $K^+$ en el control del tono

Las VSMC expresan un gran repertorio de canales iónicos y receptores de membrana que varía mucho entre diferentes lechos vasculares y son determinantes en las respuestas eléctricas y contráctiles de las células. Como se ha comentado anteriormente, tras la distensión del vaso sanguíneo se produce una despolarización de la membrana de los miocitos vasculares. Esta despolarización aumenta la probabilidad de apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L incrementando la  $[Ca^{2+}]$  citosólico, activando el mecanismo de contracción. El principal factor implicado en la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  es el potencial de membrana; por tanto, los canales iónicos implicados en su regulación tienen un papel muy relevante en la respuesta miogénica. Existen evidencias de que al menos cuatro tipos de canales de  $K^+$  contribuyen al control del potencial de membrana de las VSMC: los rectificadores hacia dentro,  $K_{IR}$ , los operados por voltaje,  $K_v$ , los operados por ATP,  $K_{ATP}$ , y los operados por  $Ca^{2+}$ ,  $BK_{Ca}$ , (Nelson & Quayle, 1995; Jackson, 2000). La expresión de estos cuatro tipos de canales de  $K^+$  puede variar según el lecho vascular y el tamaño del vaso (Michelakis *et al.*, 1997; Archer, 1996). No obstante, los canales  $K_v$  y  $BK_{Ca}$  están presentes en prácticamente todos los miocitos vasculares y tienen una gran influencia en las respuestas contráctiles (Nelson and Quayle, 1995).

La activación de los canales  $K_v$  actúa en paralelo con la activación de los  $BK_{Ca}$  regulando la respuesta miogénica en las VSMC (Figura 17). Los canales  $K_v$  actúan como un “freno” de voltaje que limita la despolarización miogénica, mientras que los canales  $BK_{Ca}$  limitan la extensión de la entrada de  $Ca^{2+}$  durante dicha respuesta, ya que su activación por aumentos locales en la  $[Ca^{2+}]_i$  (*calcium sparks*) por la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo (Ledoux *et al.*, 2006), genera corrientes transitorias espontáneas de salida de  $K^+$  (STOCs)

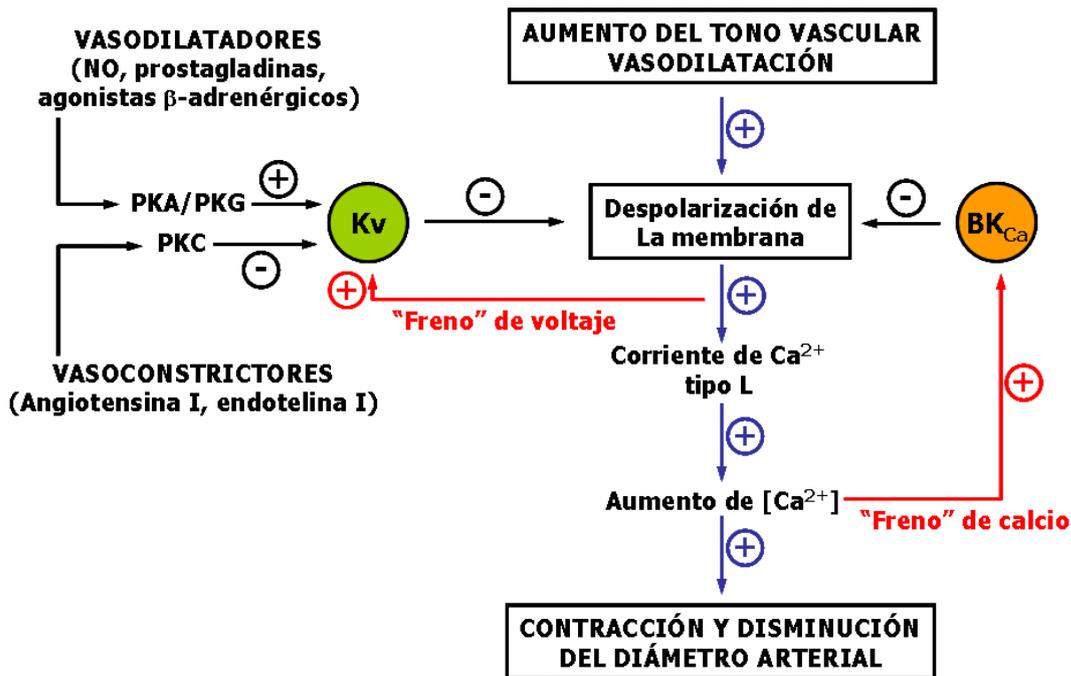


Figura 17. Modelo del papel de los canales iónicos en el control del tono vascular y el diámetro arterial.

que hiperpolarizan la célula, actuando como un sistema de retroalimentación negativo. Los flujos de  $K^+$  dominantes en condiciones basales en las VSMC de arterias sistémicas (a falta de estudios sobre los canales TASK u otros miembros de la familia de canales con “doble poro”, (Cox & Aldrich, 2000), parecen ocurrir a través de los Kv. En primer lugar, los Kv se activan a valores de potencial de membrana próximos al potencial de reposo, mientras que en las células musculares lisas de muchos vasos los canales  $BK_{Ca}$  necesitan potenciales más positivos para su activación y los  $K_{ATP}$  están normalmente cerrados (Liu *et al.*, 1997; Knot & Nelson, 1995). Además, los Kv normalmente se inhiben en presencia de concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelulares ( $[Ca^{2+}]_i$ ) por encima de los valores basales, mientras que los canales  $BK_{Ca}$  en estas condiciones se activan (Cheong *et al.*, 2001). Por todo ello, parece razonable especular que los Kv contribuyen de forma importante al control del tono vascular en condiciones fisiológicas, existiendo un cambio hacia una dominancia del  $BK_{Ca}$  cuando la  $[Ca^{2+}]_i$  se mantiene elevada en respuesta a agentes vasoconstrictores o en situaciones patológicas que conducen a un aumento del tono vascular. Puesto que la conductancia de  $K^+$  determina el potencial de membrana de la célula, los cambios de esta conductancia en reposo por alteraciones en la expresión o en la regulación de los canales de  $K^+$

van a llevar a cambios en el potencial de reposo de las células del músculo liso; los cuales, se traducirán en última instancia en una alteración del tono vascular. En este sentido, las evidencias acumuladas en los últimos años demuestran que las corrientes a través de los Kv en las células de músculo liso arterial proporcionan un sistema de retroalimentación negativo tónico en respuesta a las pequeñas despolarizaciones inducidas por aumentos en la presión arterial (Jones, 1973), y que los canales Kv contribuyen a determinar en condiciones fisiológicas el tono vascular y la perfusión tisular (Smith & Jones, 1990) .

### **Implicación de los canales de K<sup>+</sup> en la hipertensión esencial**

La hipertensión arterial se define como una elevación crónica de la presión sanguínea con valores por encima de los 140/90 mmHg en adultos, constituyendo un grave problema de salud en la mayoría de los países occidentales que afecta en torno a un 30% de la población entre 25 y 74 años, y a un porcentaje aún mayor en edades más avanzadas. Además de ser uno de los principales factores de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, representa en muchos casos el principal síntoma para su diagnóstico precoz. En determinados casos, la hipertensión es secundaria a patologías como hiperaldosteronismo (síndrome de Conn), feocromocitoma o estenosis de la arteria renal (que produce activación del sistema renina-angiotensina), pero un 90% de los pacientes presentan hipertensión esencial. Sin embargo, a pesar de que éste es un área de investigación enormemente activo, la etiopatogenia de la hipertensión esencial aún no se conoce. Los factores genéticos son determinantes en su desarrollo, con una herencia poligénica compleja. Existe también una fuerte asociación epidemiológica con factores dietéticos (ingesta rica en sal) y de estilo de vida, y se han propuesto diversas hipótesis causales que permiten explicar algunos casos de hipertensión esencial (Harrison, 2002).

La presión sanguínea depende del balance entre el gasto cardíaco y las resistencias periféricas. En las fases tempranas de la alteración, cuando la hipertensión es ligera y lábil, el gasto cardíaco se encuentra aumentado y las resistencias periféricas están sólo ligeramente aumentadas. Sin embargo, cuando la enfermedad está bien establecida, lo que se observa es un gasto cardíaco normal o ligeramente reducido, y un aumento de las resistencias periféricas. Este aumento afecta a todos los órganos, y se debe en parte a una

## *Introducción*

disminución en el número de vasos y en parte a un estrechamiento de las pequeñas arterias. El estrechamiento es a su vez consecuencia de un aumento del tono vascular, que en las fases tempranas de la enfermedad puede revertirse mediante el uso de agentes vasodilatadores. Sin embargo, con el tiempo, el músculo liso de las paredes de los vasos responde al aumento de presión mantenido con una hipertrofia que lleva a un estrechamiento constitutivo de la luz del vaso, y en esta fase no hay respuesta al tratamiento con agentes vasodilatadores.

Al aumento del tono vascular definitorio de la hipertensión contribuye de forma importante la despolarización de las células del músculo liso de las paredes arteriales, la cual conduce a un aumento de los niveles de calcio intracelulares por activación de canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana de las células. Sin embargo, a pesar de que esta despolarización es un hecho demostrado, los mecanismos moleculares responsables del control del tono muscular alterados en las células de músculo liso hipertenso están empezando a ser conocidos (Jackson, 2000). Numerosos estudios han documentado alteraciones en la función contráctil y en el flujo de iones a través de la membrana plasmática en las VSMC de individuos hipertensos, tanto en modelos humanos como animales. Sabemos, por ejemplo, que la activación de canales de  $K^+$  tiene un efecto vasodilatador y su inhibición un efecto vasoconstrictor. En este sentido se ha observado vasodilatación en respuesta a drogas que activan los canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) (Mayhan & Faraci, 1993), así como vasoconstricción en respuesta al bloqueo de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ) con iberotoxina (Brayden & Nelson, 1992) o al bloqueo de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje ( $K_v$ ) con 4-aminopiridinas (Cox, 1996).

La existencia de anomalías en la función de los canales de  $K^+$  en la hipertensión fue sugerida por primera vez por el laboratorio de Alan W. Jones (Jones, 1973), al observar un aumento en la salida de  $K^+$  desde tejidos arteriales de modelos genéticos o experimentales de hipertensión. En estos modelos de hipertensión este flujo de  $K^+$  disminuía en presencia de bloqueantes de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $CaL$ ), lo cual llevó a sugerir que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  era el evento inicial que producía el aumento del tono

muscular y la salida de  $K^+$  (Smith & Jones, 1990). En el caso concreto de la hipertensión arterial, ésta parece estar determinada a nivel molecular por la existencia de un patrón característico de expresión de canales de  $Ca^{2+}$  y de  $K^+$  que favorece la despolarización de la membrana, el aumento en la entrada de  $Ca^{2+}$  a las VSMC y en consecuencia el aumento basal del tono vascular. Una hipótesis bastante difundida para explicar esta vasoconstricción anómala postula un aumento en la expresión de los canales de  $Ca^{2+}$  junto con una disminución en la expresión de los canales  $K_v$  y un aumento compensatorio en la expresión de canales  $BK_{Ca}$ .

### **1.5.2. Papel de los canales de $K^+$ en la modulación fenotípica.**

Existen cada vez más evidencias de que los canales de  $K^+$ , debido a su función clave en el control del potencial de membrana, puedan tener además un importante papel en los procesos de desdiferenciación y proliferación en las VSMC. Al modular el potencial de membrana los canales de  $K^+$  pueden afectar no solo al flujo de  $Ca^{2+}$ , el cual está bien establecido que favorece la proliferación celular, sino también a la fuerza electromotriz del transporte de nutrientes dependiente de  $Na^+$ , al pH intracelular y junto con la actividad de los canales de  $Cl^-$ , a la regulación del volumen celular. Todos estos factores también participan en los procesos de apoptosis y proliferación. También está cada vez más claro, que el papel de la expresión y la actividad de los canales de  $K^+$  sobre la proliferación celular, supone una compleja actividad moduladora que únicamente algunos canales de potasio (de la gran diversidad de corrientes funcionales de  $K^+$  en los distintos lechos vasculares) son capaces de desarrollar en determinados momentos y lugares.

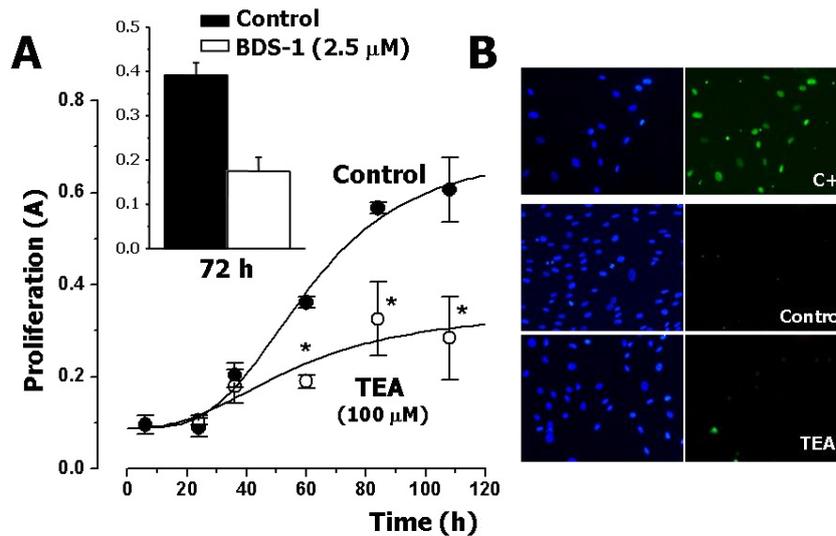
En relación con la contribución de los canales de  $K^+$  al proceso de proliferación celular, existen evidencias sólidas en las células tumorales de que estos canales juegan un papel fundamental en la regulación de la proliferación y la apoptosis celular. Se sabe que en muchos casos la transformación tumoral conlleva un cambio en la expresión de los canales de  $K^+$  presentes en la célula, lo cual permite utilizar estos canales como marcadores tumorales (Pardo *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 1999) y que estos cambios son fundamentales para la proliferación tumoral (Fraser *et al.*, 2000; Abdul & Hoosein, 2002a; Abdul &

## Introducción

Hoosein, 2002b; Wang, 2004). Sin embargo, el mecanismo celular por el cual el nivel de actividad de uno o más tipos de canales de  $K^+$  promueve el crecimiento celular no se conoce, y quizá la cuestión clave a responder es si los cambios en el patrón de expresión de estos canales en las células tumorales son un epifenómeno, o por el contrario existe una relación causal entre la presencia de determinados canales de  $K^+$  y la proliferación celular. En este sentido, se ha propuesto que la actividad de los canales de  $K^+$  podría ser un prerrequisito para que la célula progrese hacia la fase G1 del ciclo celular. En la célula tumoral se produce cambios en el patrón de expresión de los canales de  $K^+$  (cualitativos y/o cuantitativos) de tal forma que el tipo de canales presentes y su actividad en una ventana de tiempo precisa durante G1, desencadenan cambios específicos que llevan a la pérdida de control de la proliferación (Wonderlin & Strobl, 1996).

Un factor común en la respuesta proliferativa a diversos mitógenos es la inducción rápida de una hiperpolarización del potencial de membrana, que se bloquea por antagonistas de los canales de  $K^+$  (Czarnecki et al., 2000). Esta hiperpolarización es esencial para la proliferación, ya que los antagonistas de los canales de  $K^+$ , o la reducción en los niveles de mRNA de canales de  $K^+$ , inhiben el crecimiento de muchos tipos celulares (MacFarlane & Sontheimer, 2000). La importancia de esta hiperpolarización se demuestra también por la observación de que hay cambios en la densidad de la corriente de  $K^+$  en las distintas fases de la división celular y en respuesta a la transformación celular, como ya se ha comentado (Pardo et al., 1998), indicando que los canales de  $K^+$  modifican su actividad en función del ciclo celular y que su activación es esencial para el crecimiento celular. De estos estudios se puede concluir que hay “programas” específicos de canales de  $K^+$  cuya expresión contribuye a definir el fenotipo proliferativo.

Datos de nuestro grupo, obtenidos en una preparación de arteria uterina humana, demuestran que existe una disminución marcada de la expresión de la mayor parte de los canales Kv1 durante la proliferación celular, siendo el cambio más llamativo la disminución en la expresión de los canales Kv1.5, que son el componente mayoritario de la corriente Kv1 (Miguel-Velado *et al.*, 2005). También se ha constatado una disminución en la expresión de los canales Kv2



**Figura 18.** Actividad de los canales Kv3.4 en la proliferación celular. Ensayo de proliferación celular en células en cultivo. **A.** Incremento de la absorbancia con respecto al tiempo en cultivos control y en cultivos tratados con TEA. En la parte superior, se muestra un diagrama de barras representando los valores de absorbancia del cultivo control y del cultivo tratado con BDS. **B.** Detección de apoptosis en cultivos celulares a por el método TUNEL. En la columna izda., marcaje con DAPI de los núcleos celulares; en la columna dcha., marcaje en verde de las células en apoptosis. Tomado de (Miguel-Velado *et al.*, 2005).

en las VSMC proliferativas, una observación que ha sido previamente descrita en miocitos inmaduros de aorta de rata (Belevych *et al.*, 2002). Es interesante resaltar que algunos de los cambios funcionales observados en las VSMC, como la disminución de la contribución de los canales  $BK_{Ca}$  a la corriente total de salida y el aumento en el componente inactivante de la corriente Kv, también han sido descritos por estos autores en miocitos neonatales; sugiriendo una relación entre el fenotipo proliferativo y las VSMC inmaduras. Sin embargo, el dato más llamativo aportado en el estudio de Miguel-Velado *et al.*, fue la modificación en el fenotipo proliferativo de la expresión y la contribución funcional de un canal que no se había asociado previamente con la proliferación, el Kv3.4. Se ha comprobado la regulación positiva de estos canales con el cambio fenotípico, que se asocia a un aumento de su expresión (a nivel de mRNA mensajero y de proteína) y a un aumento de su contribución a las corrientes totales de las células. Además, existe una correlación entre la expresión funcional de los canales Kv3.4 y la proliferación de las células de arteria uterina humana en cultivo, ya que el bloqueo selectivo de estos canales disminuye la velocidad de proliferación celular (Figura 18). Así pues, parece que la expresión y la función de estos canales es necesaria para la

## Introducción

proliferación de las VSMC, aunque no se sabe cuáles son los mecanismos que median esta regulación.

El abordaje del estudio detallado de los procesos por los cuales el cambio en la expresión de los canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  lleva al cambio fenotípico en las VSMC es complejo; en primer lugar, por la gran variedad de tipos de músculo liso existentes y en segundo lugar, por las dificultades que entraña el establecer una relación causal entre la expresión de un determinado canal y la proliferación celular, ya que las vías de señalización que controlan las fases del ciclo celular son enormemente complejas. En relación con la heterogeneidad del músculo liso vascular, se sabe que una gran parte de las diferencias en las propiedades eléctricas y la reactividad contráctil frente a sustancias vasoactivas entre distintos lechos vasculares, distintos segmentos del mismo vaso o diferentes estados (fisiológicos y patológicos) se puede explicar por cambios en la actividad y/o en la expresión de canales iónicos en las VSMC. Por lo tanto, la gran variedad de canales de  $K^+$  existentes y la heterogeneidad de su expresión en los distintos lechos vasculares, hace necesaria una caracterización funcional y molecular previa para determinar tanto los niveles de expresión de los distintos tipos de canales como su contribución relativa a las propiedades eléctricas (potencial de membrana) de las células.

### **Implicación de los canales de $K^+$ en la proliferación de la íntima**

La hiperplasia de la íntima es un cambio en la estructura vascular que se produce a consecuencia de los mecanismos biológicos de reparación tras una lesión vascular, ya sea de tipo mecánico, quirúrgico o inmunológico. El hallazgo más característico de este cambio estructural es el engrosamiento de la capa íntima, debido a un incremento en el número de células, así como a un aumento de la síntesis de matriz extracelular en que se hallan inmersas las células. En última instancia, este proceso deriva en una estenosis progresiva de la luz vascular (Davies & Hagen, 1994). El desarrollo de hiperplasia de la íntima es el factor limitante, del éxito a largo plazo, de los procedimientos de revascularización miocárdica y vascular periférica. Este proceso, conocido también como aterosclerosis acelerada, afecta las arterias coronarias sometidas a angioplastia, implantación de *stent* o *by-pass* de derivación aorto-coronarios, al árbol arterial en situaciones de hipertensión arterial crónica

severa y a la vascularización secundaria al trasplante de órganos sólidos. De acuerdo con la secuencia de eventos que tiene lugar durante el desarrollo de hiperplasia de la íntima, los mecanismos que intervienen se agrupan en varias fases bien diferenciadas: 1) trombosis e inflamación; 2) migración y proliferación celular; 3) síntesis de matriz extracelular.

Tal y como se ha mencionado, la proliferación de las VSMC es también responsable de numerosas patologías cardiovasculares como la hipertensión esencial, la arterioesclerosis, la restenosis tras angioplastia y la neovascularización en procesos neoplásicos. Todas estas situaciones (normales y patológicas) inducen cambios en el fenotipo de las VSMC y estimulan su capacidad proliferativa, llevando a cambios en la composición celular de la pared vascular. La naturaleza plástica del músculo liso subyace a su capacidad para desarrollarse entre otros tejidos circundantes y a sobrevivir en condiciones adversas, mediante una rápida modulación fenotípica, que involucra la expresión de genes que codifican para proteínas que regulan el crecimiento celular.

Los cambios coordinados en la expresión de canales iónicos son un componente integral de esta plasticidad, ya que redirigen la actividad bioquímica de la célula hacia nuevas respuestas funcionales (Neylon, 2002; Beech, 2007). Uno de los elementos clave en este programa genético que lleva a la proliferación es la expresión coordinada de distintos genes de los canales de  $K^+$ . Así pues, los cambios en la expresión de los canales de  $K^+$  se asocian con alteraciones en las propiedades funcionales de las VSMC, porque producen cambios en las propiedades eléctricas de las células que en último extremo inducen el crecimiento celular. Aunque no se conocen con precisión los mecanismos moleculares involucrados, se sabe que el cambio en las propiedades eléctricas de las células, debido a la modulación de los canales de  $K^+$ , se asocia con diferencias en la organización temporal y espacial de las señales de  $Ca^{2+}$ , pudiendo ser estos cambios los responsables de la activación y/o represión de genes que promueven la proliferación vascular.

De todo lo expuesto hasta aquí, resulta evidente que los canales iónicos de las células del músculo liso vascular parecen jugar un papel fundamental tanto en la regulación del tono, como en el control de la proliferación celular y el

## *Introducción*

remodelado arterial. Por ello, el estudio en profundidad de la posible implicación de los canales iónicos en la fisiopatología de la hipertensión arterial y la hiperplasia de la íntima, tiene gran interés, no solo por lo que pueda aportar a nuestro conocimiento de la fisiología del músculo liso vascular, sino también por sus posibles implicaciones en el desarrollo de estrategias terapéuticas para estas patologías tan prevalentes.

# 2 **Objetivos**



A tenor de los antecedentes expuestos en la introducción, el propósito de este trabajo de tesis doctoral, se centra en determinar el posible papel de los canales iónicos de las células de músculo liso en el control del tono vascular y el remodelado arterial. Para ello, fijamos dos objetivos concretos que se desglosarían del siguiente modo:

1. Estudio de la caracterización molecular y funcional de los canales de  $K^+$  de las VSMC en el control del tono vascular y su regulación en la hipertensión esencial, utilizando arterias de resistencia de un modelo de ratón con hipertensión esencial (BPH) y de sus respectivos controles normotensos (BPN).
2. Estudio del papel modulador de los canales de  $K^+$  en el cambio fenotípico de las VSMC de arteria femoral de ratón, utilizando dos modelos proliferativos: un modelo *in vivo*, en el cual se induce la hiperplasia de la íntima mediante una lesión endoluminal y un modelo *in vitro*, donde se obtienen VSMC en cultivo a partir de explantes de arterias.



# **3** **Material y Métodos**



### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Animales

En este trabajo se han utilizado ratones macho adultos (de 6 meses a 1 año de edad) hipertensos, de la cepa BPH (*Blood Pressure High*) y sus correspondientes controles normotensos, cepa BPN (*Blood Pressure Normal*). Estas cepas se han obtenido por selección fenotípica, a partir de variantes naturales que se mantienen mediante cruces endogámicos: A partir de cruces de 8 cepas de distintos ratones se seleccionaron las líneas de los ratones BPH y BPN, que tienen un fondo genético comparable (Schlager & Sides, 1997; Schlager, 1981). La supervivencia media de los ratones BPH es de aproximadamente 20 meses, mientras que la de los ratones BPN es de 28 meses (Schlager, 1981). Estas líneas están disponibles a través de *The Jackson Laboratory* (Maine, USA) para su uso en experimentación. Los ejemplares se mantuvieron a través de cruces endogámicos, en el animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid, a 18–23°C con un ciclo normal de 12 h. de alternancia luz-oscuridad y sin limitaciones de alimentación. Los animales se sacrificaron por eutanasia utilizando un flujo continuo de CO<sub>2</sub> al 50%.

#### 3.1.2. Aparatos

Los registros electrofisiológicos se realizaron en un equipo compuesto por los siguientes elementos:

##### 3.1.2.1. Amplificadores Axopatch-200 y Axopatch-4A (Axon Instruments)

Con el amplificador se fija el potencial de membrana a un valor determinado (ya sea en célula entera o en un parche de membrana aislado) y se registra la corriente generada en la membrana. El amplificador dispone además de circuitos electrónicos que permiten compensar tanto las capacidad de la pipeta como de la célula, así como las resistencias en serie cuando se trabaja en la modalidad de célula entera (*whole cell*).

##### 3.1.2.2. Interfase Digidata 1200 A/D (Axon Instruments)

Los pulsos de potencial se generan en un ordenador y son convertidos en analógicos con el convertidor digital-analógico de la interfase. Del mismo modo,

las corrientes generadas por las células, convertidas en potencial por el amplificador, son digitalizadas con el conversor analógico-digital.

### **3.1.2.3. Microscopio invertido OLYMPUS IX70 y Micromanipulador piezoeléctrico burleigh**

Estos elementos forman el equipamiento necesario para controlar el acercamiento visual de la punta de la pipeta de registro a la célula seleccionada. Tras posicionar la pipeta de registro en los alrededores de la célula mediante un macromanipulador, se utiliza el micromanipulador piezoeléctrico con el que se realizan los movimientos de ajuste fino en los tres ejes del espacio hasta conseguir el contacto entre la punta de la pipeta y la célula, necesario para establecer un sello de alta resistencia.

### **3.1.2.4. Mesa antivibratoria TMC**

Su empleo es necesario para evitar vibraciones en la punta de la pipeta, evitando que la célula se desprenda o sea aplastada por ésta contra el fondo de la cámara.

### **3.1.2.5. Sistema de perfusión**

El cubreobjetos con las células cultivadas o la suspensión de células disociadas en su caso, se colocan sobre una cámara de registro rectangular. Las células se perfunden por gravedad a una velocidad entre 1-2 ml/min y el nivel de la cámara se mantiene constante mediante una aguja hipodérmica conectada a un sistema de succión formado por una bomba de vacío y un Kitasato. El cambio de solución de perfusión se realiza mediante un sistema de electroválvulas que permite seleccionar entre 6 soluciones distintas. Los reservorios que contienen las soluciones se comunican con la cámara de registro a través de tubos de plástico flexible que convergen en una única vía muy cerca de la cámara de registro, lo cuál permite cambios rápidos de solución con un mínimo volumen de espacio muerto. Los reservorios funcionan como frascos de Mariotte, lo que permite mantener una velocidad de perfusión constante independiente del contenido de solución en el reservorio.

### 3.1.2.6. Ordenador PC

Se utiliza para controlar los protocolos de estimulación y para almacenar los registros procedentes de las células. Los protocolos de estimulación y adquisición fueron generados con el *software* CLAMPEX 8.0 (Axon Instruments). Este programa define los protocolos de estimulación que posteriormente envía el amplificador a la célula, y muestra en la pantalla del ordenador tanto los protocolos como las corrientes generadas por la membrana celular.

### 3.1.2.7. Vidrio

Para la fabricación de las micropipetas utilizamos vidrio de borosilicato de 2 mm de diámetro externo y 1.12 mm de diámetro interno (World Precision Instruments inc.). El estirado del vidrio se consigue mediante un estirador de pipetas vertical (Narishige PP-83), calentando el capilar en dos etapas sucesivas. En la primera se estira la parte central del capilar para reducir su diámetro, y en la segunda se vuelve a centrar el capilar y se divide en dos por la zona previamente estrechada. La corriente que fluye por la resistencia en ambos estiramientos se controla de forma independiente mediante dos potenciómetros. Tanto para los registros electrofisiológicos en las células disociadas de arteria mesentérica como en las de arteria femoral, utilizamos pipetas con un rango de resistencia entre 7 y 10 M $\Omega$  cuando están llenas con solución interna. En el caso de las células HEK la resistencia de las micropipetas usadas varía entre 2 y 4 M $\Omega$ .

## 3.1.3. Soluciones

### 3.1.3.1. Soluciones para la dispersión de VSMC de arteria mesentérica y femoral

SMDS (Smooth Muscle Dissociation Solution) La solución SMDS se emplea para la cirugía, disección y limpieza de las arterias, y también como base de la solución enzimática para la disociación de las células de músculo liso vascular. (Tabla 1).

Solución enzimática. Estas soluciones se emplean en el proceso de disociación de las VSMC de arterias mesentéricas y femorales. Las soluciones

**Tabla 1.** Solución SMDS y soluciones enzimáticas para la disociación de las arterias mesentérica y femoral.

(mM)	SMDS	Mesentérica		Femoral	
		A	B	A	B
NaCl	145	145	145	145	145
KCl	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
Ca <sub>2</sub> Cl	0.01	-	0.01	-	0.01
Mg <sub>2</sub> Cl	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Kh <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
HEPES	10	10	10	10	10
Glucosa	11	11	11	11	11
Colagenasa tipo F (Sigma)	-	-	0.56 mg/ml	-	0.28 mg/ml
Colagenasa tipo H (Sigma)	-	-	0.24 mg/m	-	0.12 mg/ml
Papaina (Worthington)	-	0.8 mg/ml	-	0.4 mg/ml	-
Albúmina bovina (Sigma)	-	1 mg/ml	-	1 mg/ml	-
DTT (Sigma)	-	1 mg/ml	-	1 mg/m	-

El pH de estas soluciones se ajusta a 7.4 con NaOH.

se preparan inmediatamente antes de proceder a la disociación y una vez constituidas se mantienen a 4°C hasta el comienzo del proceso. La disociación de las VSMC (descrita en la sección 3.2.3.2.) se realiza en dos fases, utilizando secuencialmente las soluciones A y B (Tabla 1).

### 3.1.3.2. Medios de cultivo para las VSMC y células HEK293

Para el arranque y establecimiento de cultivos de VSMC a partir de explantes de arteria mesentérica y femoral, se usa un medio de cultivo M-VSMC con 20% de suero fetal bovino (SFB), utilizando como base un medio estándar DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, Gibco) suplementado con la mezcla de antibióticos: Penicilina 100 U/m / Streptomycin 100 U/m / Fungizona 5 µg/ml (Lonza), que será común para todas las soluciones. Una vez alcanzan la confluencia, las células se mantienen en un medio de proliferación M-STIM (5% SFB). Para la los estudios de migración y proliferación de las

**Tabla 2.** Medios de cultivo para VSMC y células HEK.

	M-VSMC	M-HEK	M-STIM	M-REST
bFGF (Gibco)	-	-	2 ng/ml	-
EGF (Gibco)			5 ng/ml	-
Insulina (Gibco)	-	-	5 µg/ml	0.5 µg/ml
SFB (Lonza)	20%	10%	5 %	-
Transferrina (Sigma)	-		-	5 µg/ml
L-glutamina (Lonza)	2 mM	2 mM	2 mM	

VSMC en cultivo se utiliza el medio M-REST (sin SFB), con el objetivo de sincronizar las células en la fase G0 del ciclo celular.

Para el mantenimiento de las células HEK se usa el medio de cultivo M-HEK suplementado de la misma manera que el medio M-VSMC, a excepción del suero fetal bovino que en este caso constituye un 10% del medio.

### 3.1.3.3. Soluciones para realizar registros electrofisiológicos

Para registrar las corrientes iónicas se han empleado soluciones de diferente composición en el interior de la pipeta y en el baño de las células. Las soluciones que llenan la pipeta reciben el nombre “Soluciones Internas”, y las que bañan a las células mientras se realizan los registros electrofisiológicos se llaman “Soluciones Externas”.

Soluciones Internas. La solución interna tiene una composición iónica que reproduce la del medio celular citoplasmático. La solución se prepara añadiendo todos los componentes excepto el ATP y ajustando el pH a 7.0 antes de enrasar el volumen. A continuación, se pone en hielo y se añade la cantidad indicada de ATP, se vuelve a ajustar el pH a 7.2 con KOH y se enrasa el volumen. Finalmente, se preparan alícuotas de 1 ml que se guardan en tubos eppendorf congeladas a -80°C, para evitar la degradación del ATP. Cuando se va a usar la solución se descongela una alícuota, que se filtra y se mantiene siempre en hielo (Tabla 3). Para las medidas de potencial de membrana de las VSMC utilizamos la solución de parche perforado (*perforated-patch*) que varía

**Tabla 3.** Soluciones para los registros electrofisiológicos.

	Solución Interna (mM)	Solución interna parche perforado (mM)	Solución Externa (mM)	Solución externa (alto K <sup>+</sup> ) (mM)
KCl	125	40	4.7	125
NaCl	-	-	141	20.7
MgCl <sub>2</sub>	4	-	1.2	1.2
CaCl <sub>2</sub>	-	8	1.8	1.8
EGTA	10	-	-	-
HEPES	10	10	10	10
MgATP	5	-	-	-
Glucosa	-	-	10	10
Glutamato potásico	-	95	-	-
Anfotericina B	-	300 µg/ml	-	-
pH	7.2		7.4	

en su composición con respecto a la solución interna normal, y se utiliza para evitar la diálisis de medio intracelular (Tabla 3).

Soluciones Externas. Es la solución que baña las células y por lo tanto tiene una composición iónica similar al medio extracelular (Tabla 3). Para estudiar la deactivación de las corrientes Kv2 utilizamos una solución externa con alto K<sup>+</sup>, obteniendo una composición de K<sup>+</sup> simétrica dentro y fuera de la célula (Tabla 3). El pH de estas soluciones se ajusta a 7.4 con NaOH.

### 3.1.3.4. Soluciones para las técnicas de detección de proteínas

Buffer de lisis: Tris pH 7.5 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Tritón-X-100 1%, EGTA 1 mM, EDTA 2 mM, Benzamidina 1 mM, Aprotinina 5 µg/ml, Leupeptina 5 µg/ml, Pepstatina A 5 µg/ml, PMSF 1 mM, DTT 1 mM.

Los inhibidores de proteasas deben ser añadidos justo antes de su uso. El resto se puede tener preparado y congelado a -20°C.

Buffer de electroforesis: Trizma base 25 mM pH=8.3, glicina 192 mM, SDS 0.1%.

TGM (Buffer de transferencia): Trizma base 25 mM pH=8.3, glicina 192 mM, metanol 20%.

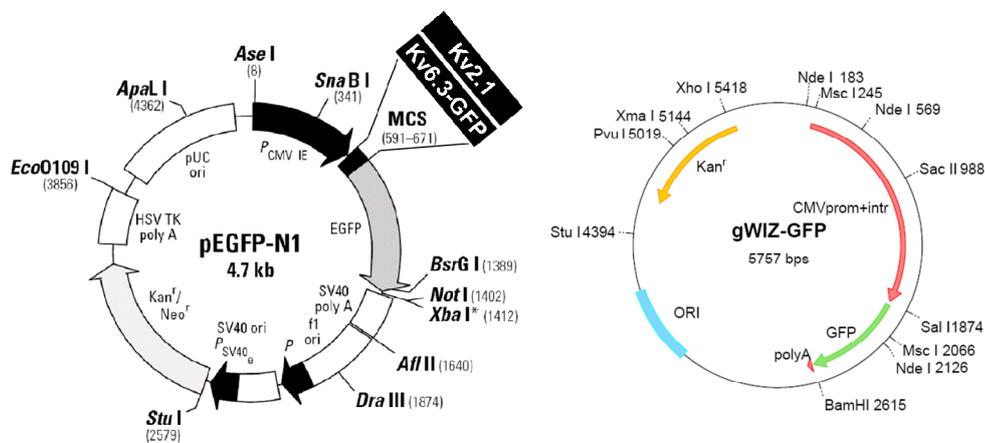
TBS (Buffer tris clorhídrico): Trizma base 10 mM pH=7.5, NaCl 150 mM.

Tampón de muestra 2X: Tris HCl 62.5 mM pH=6.8, glicerol 10%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.05%.

Buffer de homogenización de miocitos: Tris HCl 20 mM pH=7.4, EDTA 1 mM, 2.5  $\mu$ l/ml del cocktail inhibidor de proteasas de Sigma (AEBSF 104 mM, aprotinina 80  $\mu$ M, leupeptina 2.1 mM, bestatina 3.6 mM, pepstatina A 1.5 mM y E-64 1.4 mM).

### 3.1.4. Constructos (plásmidos)

El Dr. D. J. Snyders nos proporcionó un plásmido que contiene la secuencia codificante completa del Kv6.3 de humano (KCNG3) clonado en el vector pEGFP-N1, lo que permite a la GFP (proteína fluorescente verde) estar en el mismo marco de lectura que el canal, generando así una proteína de fusión en la que el canal tiene unido la GFP en su extremo C-terminal (Ottshytsch *et al.*, 2002).



Clonado en el mismo vector de expresión, pEGFP-N1, también nos proporcionó el plásmido con la secuencia completa del canal Kv2.1 (KCNB1), pero sin fusionar con la GFP, con lo que en este caso en nuestros experimentos hemos coexpresado el canal Kv2.1 con la GFP sola, o con la proteína de fusión Kv6.3-GFP para determinar la eficiencia de la transfección y poder identificar las células transfectadas. El vector de expresión para la GFP que se ha utilizado es el gWIZ-GFP, obtenido comercialmente de Gene Therapy Systems Inc. Este vector contiene una versión modificada y mucho más brillante de la GFP original (Cheng *et al.*, 1996).

### 3.1.5. Drogas

- Apamina (Alomone labs): Bloqueante de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de baja conductancia (SK).
- Correolide (MSD): Bloqueante de canales Kv1.
- rEstromatoxina (rScTx-1) (Alomone labs): Bloqueante de canales Kv2.
- Guangxitoxina-1 (GxTX-1) (MSD): Bloqueante de canales Kv2.
- Margatoxina (Alomone labs): Bloqueante específico del canal Kv1.3.
- 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1) (Sigma): Bloqueante específico del canal Kv1.3.
- Paxillina (Alomone labs): Bloqueante de canales MaxiK.
- Tetraetilamonio (TEA) (Sigma): Bloqueante de determinados canales de  $K^+$ .
- BDS-I (Alomone labs): Bloqueante específico del canal Kv3.4.

### 3.1.6. Anticuerpos

Anticuerpos primarios: Los anticuerpos primarios utilizados, con indicación de su procedencia y de las concentraciones en las que se han utilizado para las distintas aplicaciones, se muestran en la Tabla 4.

Anticuerpos secundarios: Para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica: Anti-rabbit / mouse conjugados con Alexa 488/597 (Molecular Probes).

Para Western-blot: Anti-rabbit / mouse conjugados con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology).

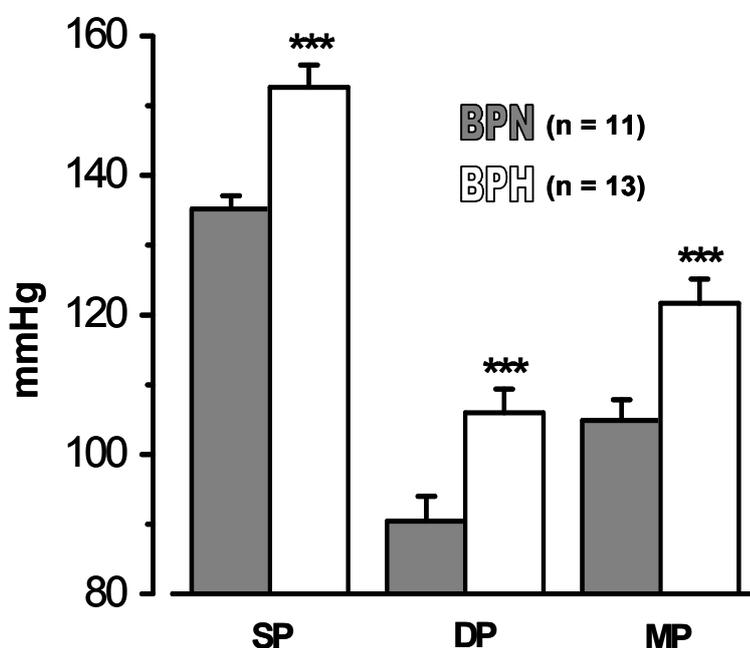
**Tabla 4.** Relación de anticuerpos primarios utilizados. Se especifica la dilución utilizada en los experimentos de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, western-blot, inmunoprecipitación y electrofisiología.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	PROCEDENCIA	DILUCIÓN			
		IH	IC	WB	EF
Mouse anti-Kv $\beta$ 2. Monoclonal.	Neuromab/ Antibodies Inc.	1:100	-	-	-
Mouse anti-Kv1.3. Monoclonal	Neuromab/ Antibodies Inc.	1:50	1:33	-	-
Mouse anti-Kv1.5. Monoclonal.	Neuromab/ Antibodies Inc.	1:100	-	-	-
Rabbit anti-Kv1.5. Policlonal.	Sigma	-	1:50	-	-
Mouse anti-Kv6.3. Policlonal.	Abnova	-	-	1:1000	1:2500
Rabbit anti-Kv3.1. Monoclonal.	Alomone labs.	-	-	-	1:1500
Mouse anti- $\beta$ -actina. Monoclonal.	Abcam	-	-	1:1000	-

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Medida de presión Arterial

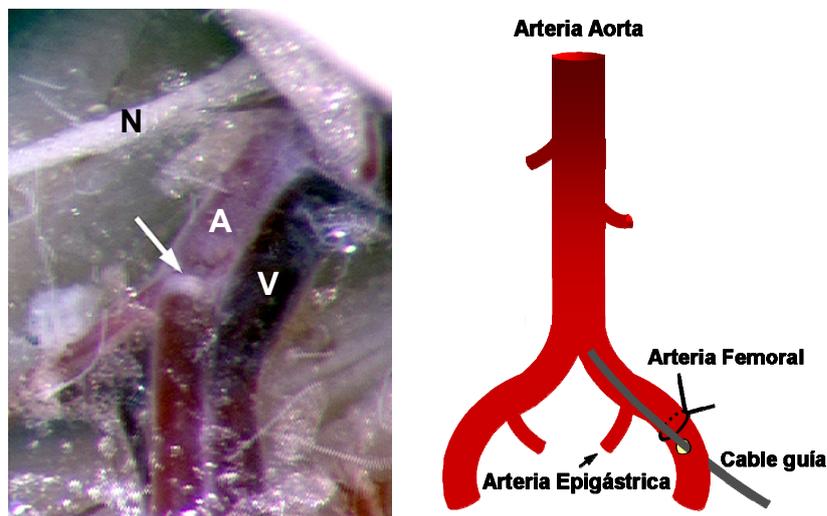
Se realizaron medidas de presión arterial en los animales para verificar que, efectivamente, entre ambas cepas se observan diferencias consistentes y significativas en los valores de tensión arterial. La presión arterial se midió con un esfigmomanómetro (LE 5002 Pressure Meter, LSI Letica Scientific Instruments, Barcelona, España). Este sistema presenta un manguito para la cola del ratón que ocluye el paso de la sangre y un transductor que captura el pulso sanguíneo. Antes de cada medida los ratones se colocaron en una jaula termostatazada y se calentaron durante 20-30 minutos a 37°C. El ritmo cardíaco se registró con el transductor de pulso para asegurar que el animal está tranquilo (ritmo cardíaco <600 latidos/min). Cada medida comprende la presión sistólica o presión máxima (SP), la presión diastólica o presión mínima (DP) y la presión media (MP) calculada según la siguiente ecuación (Ciba Geigy Scientific Tables, Ed. C. Lenther, 1990:  $MP=DP+0.33(SP-DP)$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Valores de presión arterial sistólica, diastólica y media en ratones hipertensos (BPH) y normotensos (BPN) de edades comprendidas entre 6 y 12 meses. \*\*\*P<0.001.

### 3.2.2. Lesión vascular de la arteria femoral

Para el modelo de proliferación *in vivo* los ratones BPN se someten a una lesión transluminal unilateral de la arteria femoral, a la edad de 12-16 semanas. Para realizar el procedimiento quirúrgico, se anestesia a los animales con isofluorano inhalado. Se realiza una arteriotomía a nivel de la arteria femoral común, a través de la cual se avanza una guía de 0.25 mm de diámetro hasta el nivel de la bifurcación aórtica. La guía se avanza y se retira 3 veces, y al final se extrae y se liga el vaso distal, siguiendo el protocolo previamente descrito (Roque *et al.*, 2000). La arteria epigástrica, asegura la circulación colateral a la extremidad inferior. La eutanasia de los animales se lleva a cabo a las 48 horas, 1 semana o 4 semanas tras el procedimiento.

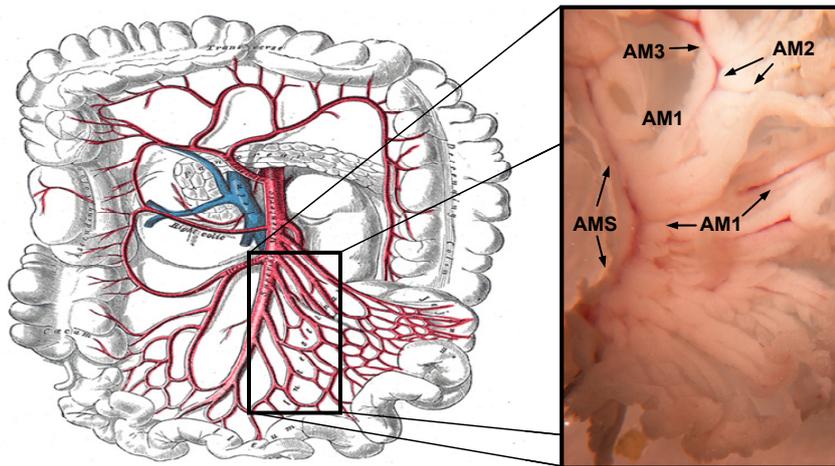


**Figura 20.** En la imagen se muestran la arteria (A), vena (V) y nervio (N) femoral de ratón, la flecha indica el lugar de incisión de la arteriotomía. A la izquierda se muestra un esquema representativo del proceso de lesión vascular de la arteria femoral.

### 3.2.3. Aislamiento de las VSMC de arteria mesentérica y femoral

#### 3.2.3.1. Cirugía

La eutanasia de los ratones se lleva a cabo utilizando un flujo continuo de CO<sub>2</sub> al 50%, a continuación se practica una incisión longitudinal en la zona abdominal del animal, se extrae el intestino y se introduce en una placa de cirugía con solución SMDS entre 0 y 4°C (Tabla 1) donde se separa el mesenterio del resto del tejido intestinal. Posteriormente, bajo una lupa de



**Figura 21.** En la imagen se muestra el plexo arterial mesentérico de ratón, indicando mediante flechas la arteria mesentérica superior (AMS), y las arterias derivadas de la misma de primer (AM1), segundo (AM2) y tercer orden (AM3).

disección, se procede a la localización y limpieza de las arterias mesentéricas de 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> orden, eliminando para ello el tejido conectivo y adiposo adyacente.

Para la cirugía de arteria femoral, se practica una incisión longitudinal en la cara anterior de cada una de las extremidades posteriores del animal, retirándose las arterias femorales para su posterior disección (al igual que en arteria mesentérica).

Una vez realizada la disección, se procede de distintas maneras según el uso que se le vaya a dar a las arterias: se conservan a -80°C para la extracción de RNA, se utilizan directamente para obtener VSMC disociadas en agudo (en ambas situaciones hemos eliminado la capa endotelial de la arteria), se utilizan para hacer cortes histológicos o se trocean y se siembran explantes en placas de cultivo (como se indica en la figura 22).

### 3.2.3.2. Disociación

Para obtener VSMC disociadas en agudo, se introducen las arterias en la solución A (Tabla 1) que ha sido precalentada durante 15 minutos a 37°C y se incuban a la misma temperatura durante un periodo de 12-15 minutos en el caso de las arterias mesentéricas y durante 20 minutos en el caso de las femorales. Al término de esta primera incubación, lavamos las arterias dos veces con SMDS y las incubamos de nuevo con la solución B (Tabla 1) (calentada previamente también durante 15 minutos) durante 12-15 minutos en el caso de las arterias mesentéricas y durante 25 minutos en el caso de las

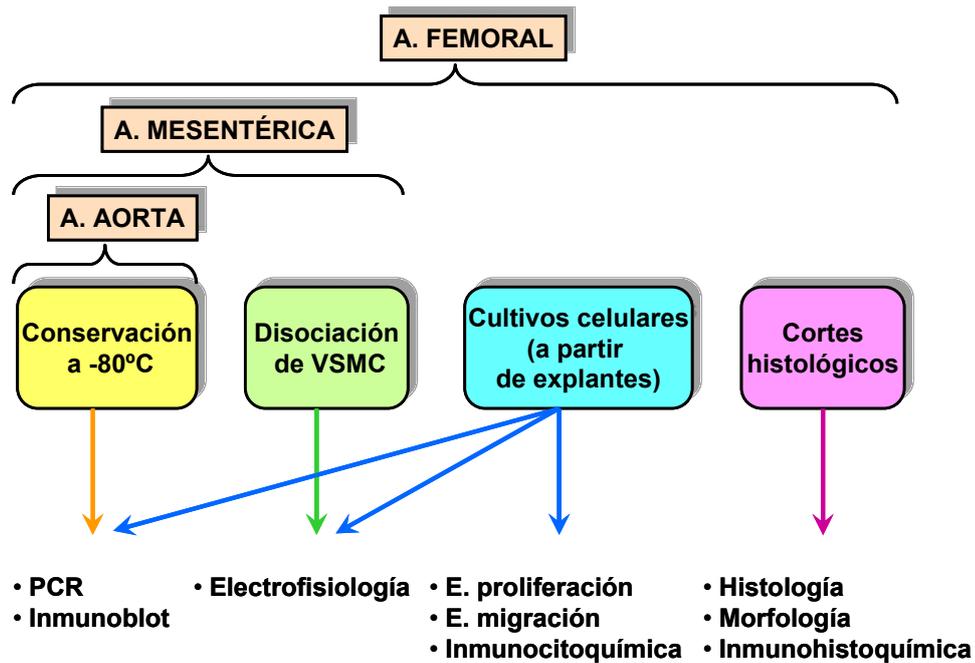


Figura 22. Esquema del procesamiento de las distintas muestras arteriales.

femorales, a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavan las arterias cuatro o cinco veces con SMDS y se procede a la trituración del tejido con una pipeta de vidrio pulida para la obtención de células aisladas, que se conservan a 4°C para hacer registros electrofisiológicos en el mismo día.

### 3.2.4. Mantenimiento, migración y proliferación de las VSMC de arteria femoral en cultivo

#### 3.2.4.1. Establecimiento y mantenimiento de cultivos de VSMC

Para obtener VSMC en cultivo (modelo de fenotipo proliferativo *in vitro*), se colocan pequeños fragmentos (0.5 mm) de arterias femorales limpias de endotelio y conectivo, en placas de cultivo Petri de 35 mm cubiertas de 2% gelatina (Tipo B, Sigma), con un medio de cultivo de establecimiento M-VSMC (Tabla 2), y se mantienen a 37°C en un incubador humidificado con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. La migración y proliferación de las VSMC a partir de estos explantes es evidente a los 6-10 días, pero los explantes se mantienen hasta que la monocapa de VSMC se hace confluyente. En este momento, mediante raspado mecánico con una espátula de goma, las células se sueltan, se siembran en una nueva placa a una densidad celular de 1/3 de su capacidad, y se mantienen en un medio de proliferación M-STIM (5% SFB)

## Material y Métodos

(Tabla 2). Las VSMC se someten de esta forma a varios pases (3-4) sin mostrar cambios morfológicos aparentes. En este trabajo de tesis se han utilizado las VSMC en cultivo para hacer estudios de migración y proliferación, para la obtención de RNA, así como para la realización de estudios de inmunocitiquímica o registros electrofisiológicos.

### 3.2.4.2. Tratamiento de los cristales de soporte de las células en cultivo

Los cubreobjetos circulares donde se siembran las células y que se utilizan bien para realizar ensayos de proliferación o inmunocitiquímica (12 mm), o bien para realizar registros electrofisiológicos (6 mm), son tratados con poli-L-lisina (Sigma) para facilitar que un mayor número de células se adhieran a su superficie. La poli-L-lisina se prepara con agua destilada y en condiciones de esterilidad a una concentración de 0.10 mg/ml. Los cubreobjetos se lavan con etanol puro (Merck) y se flamean para su esterilización. Después se mantienen entre 15 y 30 minutos en la solución de poli-L-lisina; pasado este tiempo se retira la poli-L-lisina y se lavan los cubreobjetos con agua destilada estéril, se dejan secar en la cámara de flujo laminar y se guardan hasta su utilización. Todo este procedimiento se lleva a cabo en una campana de flujo laminar para garantizar la esterilidad.

### 3.2.4.3. Estudio de migración

Para los estudios de migración se utilizan cultivos de células de músculo liso confluentes obtenidas a partir de explantes de arterias femorales, sembradas en placas de cuatro pocillos (1.8 cm<sup>2</sup>/pocillo) y mantenidas en medio de proliferación M-STIM. En estos cultivos, mediante la punta de una pipeta P10 estéril, se rasca una pequeña superficie de la monocapa creando un espacio sin células y se lava la placa tres veces con PBS para eliminar las células no adheridas al fondo (Grifoni *et al.*, 2008). A continuación se retira el medio M-STIM y se incuban las células en el medio M-REST (Tabla 2) libre de suero durante 24 horas, con el objetivo de sincronizar las células en la fase G0 del ciclo celular y bloquear así su proliferación. El área de la superficie sin células creada por la punta de la pipeta se cuantifica mediante el *software* de análisis de imagen del programa *Image J*, midiéndolo a tiempo 0 ( $A_0$ ) y tras 24 ( $A_{24}$ ) horas. La migración de las células se cuantifica comparando del área libre de

células a tiempo 0 ( $A_0$ ) con el área libre de células a 24 horas ( $A_{24}$ ), de forma que el % de  $A_0$  invadida tras 24 h ( $A_i$ ) se considera proporcional a la migración celular<sup>4</sup>. Se estudia la migración de estos cultivos en situación control y en presencia de bloqueantes del canal Kv1.3 como margatoxina (10 nM) y PAP-1 (10 nM). También se han realizado experimentos control adicionales utilizando bloqueantes de otros canales Kv, como TEA (100  $\mu$ M) y BDS 2.5  $\mu$ M para bloquear canales Kv3 y Estromatoxina 50nM para bloquear canales Kv2.

#### **3.2.4.4. Estudio de proliferación**

Para los estudios de proliferación hemos determinado la fracción de células que incorporan 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de la timidina que puede ser incorporado en su lugar durante la fase de síntesis del ciclo celular. Las células que han incorporado BrdU pueden ser detectadas mediante observación al microscopio de fluorescencia al utilizar un anticuerpo monoclonal frente a esta molécula y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. El ensayo se realizó con un kit comercial (5-Bromo-2'-deoxyuridine labeling and Detection Kit I; Roche Applied Science, Germany). Las células de músculo liso confluentes se mantienen 72 horas en el medio libre de suero M-REST con el fin de sincronizarlas en la fase G0 del ciclo celular. En este momento, las células se tratan durante 24 horas con el medio de proliferación M-STIM, sólo (control) o en presencia de los bloqueantes de los canales Kv, tras lo cual se realiza el ensayo de incorporación de BrdU siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los cubres se montan sobre un portaobjetos con una gota de Vectashield H-1000 con DAPI (Vector Laboratories, INC., Burlingame, CA), y la incorporación de la BrdU se representa como el porcentaje de las células positivas para BrdU del número total de células teñidas con DAPI.

Estos estudios de migración y proliferación también se han realizado en células en cultivo de arteria uterina humana, utilizando los mismos protocolos que se acaban de detallar.

---

$$^4 A_i = \frac{100(A_0 - A_{24})}{A_0}$$

### **3.2.5. Mantenimiento y transfección de los cultivos de células HEK293**

#### **3.2.5.1. Mantenimiento**

La línea celular HEK293 son células inmortalizadas obtenidas a partir de células embrionarias de riñón humano. Esta línea celular ha sido y es ampliamente utilizada en el estudio de la expresión heteróloga de canales iónicos, ya que apenas expresan de forma endógena dichos canales, con lo cual se permite la caracterización de los canales transfectados minimizando la posible contribución de corrientes contaminantes.

Las células HEK se mantienen en un medio M-HEK (Tabla 2). Cuando las células crecen hasta alcanzar en torno a un 90% de confluencia, necesitan ser tripsinizadas y resemebradas a menor densidad, normalmente a una dilución 1/10. Para ello se aspira el medio de cultivo y se realizan dos lavados de las células con un volumen de PBS 1X (Gibco) suficiente para cubrir el fondo del frasco (~7-8 ml/25 cm<sup>2</sup>). De esta forma intentamos retirar todos los restos de medio de cultivo que puedan quedar en el frasco, ya que el suero fetal bovino inhibe la acción de la tripsina. A continuación se incuban las células con 1-2 ml de Tripsina/EDTA (Lonza) durante 1-2 min a 37°C, hasta que las células comienzan a redondearse y despegarse del fondo del frasco de cultivo. Posteriormente se despegan las células mediante un golpe seco, asegurándose bajo microscopio de que se despegan la mayoría. Tras despegarlas, se diluye la solución Tripsina/EDTA con 4 ml de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. Se transfieren las células a un vial cónico y se centrifugan durante 3 minutos a 1000 rpm. Se aspira el medio y se resuspende el pellet con las células en 5 ml de medio de cultivo. Se transfiere 0.5-1 ml a un nuevo frasco de cultivo añadiendo 7 ml de medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino. En el caso de que las células se vayan a transfectar, se siembran en cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina dispuestos en el fondo de una placa de Petri de 35 mm. Las células se mantienen en el incubador en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y se cambia el medio de cultivo cada 3-4 días. Este procedimiento se realiza normalmente una vez por semana, ya que es el tiempo que tardan las células HEK en volver a alcanzar la confluencia en presencia de 10% de suero fetal bovino.

### **3.2.5.2. Transfección**

Un día antes de la transfección, se tripsinizan las células HEK, se cuentan y se siembran sobre los cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina, de manera que cuando se transfecten, estén entre un 50-90% de confluencia. Durante el proceso se evita el uso de antibióticos en el medio de cultivo para facilitar la transfección. Junto con los plásmidos que expresan los canales Kv, las células se cotransfectaron con un plásmido, que expresa la proteína fluorescente verde GFP, para poder estimar la eficiencia de transfección e identificar las células transfectadas (mediante estimulación con una fuente de iluminación halógena o con lámpara de fluorescencia) al objeto de seleccionar las células a estudiar mediante registro electrofisiológico.

En el proceso de transfección se ha utilizado el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El protocolo que se ha seguido es en líneas generales el recomendado por el fabricante:

- 1) Se diluye 1  $\mu\text{g}$  del cDNA del canal y 0.2  $\mu\text{g}$  del cDNA de GFP en 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo sin suero y sin antibióticos en un tubo eppendorf (tubo A) y se mezcla.
- 2) En otro tubo eppendorf (tubo B) se diluyen 4  $\mu\text{l}$  de Lipofectamina 2000 en 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo sin suero y sin antibióticos y se mezcla. Se incuban ambos eppendorfs a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3) Se diluye gota a gota el contenido del tubo A sobre el tubo B, se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 4) Mientras tanto, se retira el medio de cultivo de las células HEK, sustituyéndolo por un 1 ml de medio de cultivo sin antibióticos.
- 5) Se añaden los aproximadamente 200 $\mu\text{l}$  de la mezcla de transfección a las células.
- 6) Se mantienen las células en el incubador a 37°C durante 4-6 horas.
- 7) Transcurrido este tiempo se retira el medio de cultivo con la mezcla de transfección de la placa de Petri y se reemplaza por medio de cultivo con antibióticos.

## Material y Métodos

Para que se expresen los canales se incuban las células durante al menos 24h desde la transfección. La eficiencia de transfección obtenida estuvo en todos los casos por encima del 40%.

### 3.2.6. Técnicas electrofisiológicas de registro

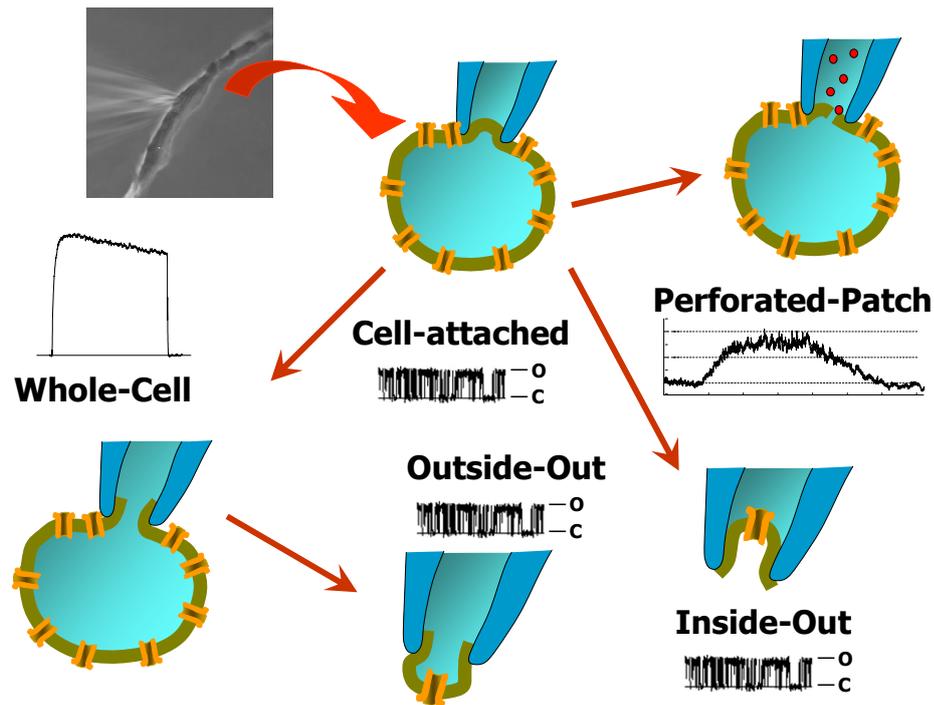
#### 3.2.6.1. La técnica de patch-clamp

A menudo los avances en la investigación científica vienen producidos por el desarrollo de nuevas técnicas. En el caso del potencial de acción, fue la invención de la técnica de “fijación de voltaje” la que permitió su descripción y comprensión. Esta técnica se denomina así por que permite controlar o fijar el potencial de membrana de una célula al voltaje deseado. El método inicialmente combinaba el uso de dos electrodos intracelulares. Uno de ellos mide el potencial de membrana y el otro inyecta corriente en la célula. Un amplificador compara el potencial que se mide con el voltaje al cual se quiere mantener la célula. El circuito introduce la corriente necesaria en la célula para llevar el potencial de membrana al nivel deseado. Esta corriente es exactamente igual (y de sentido contrario) a la cantidad de corriente que se mueve a través de la membrana de la célula. De esta manera, la técnica de fijación de voltaje, nos indica cómo el potencial de membrana influye en las corrientes iónicas a través de la membrana, e indirectamente como las corrientes que fluyen a través de la membrana determinan el potencial. Esta técnica permitió a Hodgkin y Huxley realizar un modelo de la generación del potencial de acción (Hodgkin *et al.*, 1952; Hodgkin & Huxley, 1952c; Hodgkin & Huxley, 1952d; Hodgkin & Huxley, 1952b; Hodgkin & Huxley, 1952a), que les valió el premio Nobel de Medicina en 1963.

La versión contemporánea más popular de esta aproximación es la técnica de “fijación de voltaje en parches de membrana”, “pinzamiento de membrana” o “*patch-clamp*”, desarrollada en la década de los 70. El desarrollo de esta técnica por Neher y Sakmann (Neher & Sakmann, 1976; Neher *et al.*, 1978; Hamill *et al.*, 1981) les valió a su vez el Premio Nobel en 1991.

Esta técnica utiliza un único electrodo y se basa en poner en contacto una micropipeta de vidrio con un diámetro de punta muy pequeño con la membrana de la célula. Después de la aplicación de una pequeña succión en la pipeta se

forma un sello de alta resistencia (del orden de  $G\Omega$ ) entre la pipeta y la membrana. A través de la pipeta que lleva un electrodo en su interior, se inyecta a la célula la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana fijado en el nivel deseado, se aplican los diferentes protocolos de estimulación y se registran las corrientes iónicas resultantes a través de un amplificador electrónico conectado a la pipeta.



**Figura 23.** Esquema en el que se representan las posibles modalidades de la técnica de *patch-clamp*: *cell-attached*, *whole-cell*, *outside-out*, *inside-out* y *perforated-patch*. En todos los casos podemos medir corrientes iónicas (en toda la célula o en un parche de membrana) fijando el voltaje a ambos lados de la membrana, y de hecho la corriente que medimos es la corriente necesaria para mantener el valor de potencial prefijado.

Existen cuatro modalidades de esta técnica dependiendo del área de membrana a través de la cual se controla el potencial: *cell-attached*, *inside-out*, *whole-cell* y *outside-out* (Figura 23). Cuando la punta de la pipeta se adhiere a la membrana plasmática de la célula, obteniéndose un sello de alta resistencia, estamos en la configuración de *cell-attached*. Si se separa el parche de membrana del resto de la célula, se obtiene la configuración de *inside-out*, que permite modificar el medio al cual la cara interna de la membrana se encuentra expuesta. Otra posibilidad es que partiendo de la configuración de *cell-attached*, se aplique una ligera succión y se consiga que el parche de

## *Material y Métodos*

membrana comprendido en la punta de la pipeta se rompa, estableciéndose un contacto entre la solución de la pipeta y el medio intracelular. Esta modalidad se conoce como *whole-cell* (célula entera). La configuración de *outside-out* se obtiene a partir de la configuración de *whole-cell*. Para ello se separa la pipeta de la célula, con lo cual nos quedamos con un parche de membrana en el cual la cara externa de la membrana está hacia el baño y la cara interna hacia la solución de la pipeta.

### **3.2.6.2. Procedimiento experimental**

Antes de comenzar, se prepara todo el equipo de registro. Para ello, se comienza por clorurar los electrodos de plata, dejándolos durante toda la noche en una solución de hipoclorito sódico. Se utilizan dos electrodos, uno en la pipeta y el otro en la cámara de registro (electrodo de referencia). Se rellenan los reservorios con cada una de las soluciones y se purgan las vías para quitar todas las burbujas de las vías de perfusión. Estos reservorios se encuentran situados a una altura superior al de la cámara de registro donde posteriormente se colocarán las células, de tal manera que regulando la altura a la cual se sitúa el reservorio se puede controlar la velocidad de perfusión.

Posteriormente se fabrican las micropipetas utilizando el estirador y se rellenan con la solución interna correspondiente, utilizando una jeringa de insulina, cuyo extremo se ha estirado previamente mediante calor para obtener un conducto muy fino. En este proceso no debe quedar ninguna burbuja de aire ya que impediría el contacto eléctrico entre el electrodo y la solución.

A continuación se transfieren alícuotas de la suspensión de VSMC o cubreobjetos con las células HEK, a la cámara de registro; se sitúa la micropipeta en el soporte del electrodo y se asegura de que haya contacto entre la solución y el electrodo. A través de la pipeta se aplican pulsos de -10 mV, que se registran en la pantalla del ordenador como una deflexión negativa de la línea de corriente. Midiendo la amplitud de esta deflexión de corriente y sabiendo que la diferencia de potencial que hemos aplicado es de -10 mV, el programa de registro calcula automáticamente la resistencia de la pipeta mediante la ley de Ohm ( $V=I \cdot R$ , donde V es voltaje, I es corriente y R es resistencia).

La aproximación de la pipeta a la célula se realiza primeramente con un macromanipulador, y una vez situada la punta de la pipeta en las inmediaciones de la célula elegida, se hace uso del micromanipulador. El control de esta última operación se realiza visualmente bajo microscopio. Cuando la punta de la pipeta se acerca a la membrana de la célula, la resistencia aumenta entre un 10 y un 50%. En ese momento se aplica una ligera succión (presión negativa) en el interior de la pipeta, con lo que se forma un sello de alta resistencia (del orden de  $G\Omega$ ) entre la punta de la pipeta y la membrana celular. Al formarse el sello, la deflexión de corriente registrada se reduce en relación directa al aumento de la resistencia del microelectrodo, en este momento sólo se registra la corriente capacitativa de la pipeta en respuesta a los pulsos de voltaje. Esta corriente capacitativa es compensada con el amplificador.

En este punto nos encontramos en la configuración de *cell-attached*, donde se puede controlar el potencial del lado de membrana que queda dentro de la micropipeta y la célula controla el potencial en el lado intracelular. Desde la configuración de *cell-attached*, se aplica un potencial negativo para aproximarnos a las condiciones de potencial de la célula en reposo, -80 mV, y se aplica una suave succión en la pipeta, consiguiendo que el parche de membrana se rompa, estableciéndose un acceso de baja resistencia (más conocida como resistencia de acceso o resistencia “en serie”) al interior de la célula, que permite estudiar las propiedades eléctricas de toda la membrana celular. Estaríamos ahora en la configuración de *whole-cell*. Se sabe que el parche de membrana se ha roto porque surgen unos cambios transitorios en el registro de corriente que son debidos a la carga y descarga de la capacidad de la membrana en respuesta a los pulsos de voltaje. Antes de comenzar los experimentos en *whole-cell*, se compensa la capacidad de la membrana y la resistencia en serie.

Al realizar las medidas de potencial de membrana se utiliza la técnica de parche perforado (*perforated-patch*, Figura 23), evitando así la diálisis del medio intracelular. La punta de la pipeta se sumerge muy brevemente en la solución parche perforado (Tabla 3), y se rellena con la misma solución conteniendo además anfotericina B, que producirá pequeñas perforaciones o

## Material y Métodos

poros en el parche de membrana unido al electrodo. Desde la configuración de *cell-attached* se comprueba el acceso eléctrico al citoplasma de la célula mediante la monitorización del aumento de la capacitancia celular. En este punto, se cambia el amplificador al modo de *current-clamp* (fijación de corriente) y se registra el potencial de membrana de forma continuada.

La gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la solución de la pipeta asegura el correcto desarrollo de esta técnica, ya que la ruptura accidental del parche (que provocaría el cambio a la configuración de *whole-cell*) daría lugar a un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la consiguiente muerte celular.

### 3.2.6.3. Adquisición y análisis de los datos

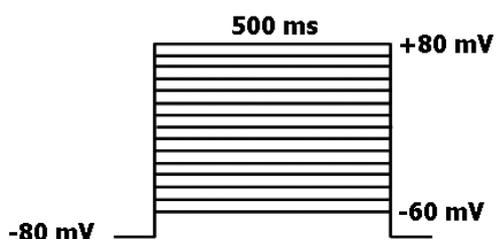
La adquisición de datos, y parte del análisis, se ha realizado con el programa pCLAMP 8.0 (Axon Instruments). Los protocolos de estimulación eléctrica fueron controlados por la subrutina CLAMPEX 8.0, que permite definir los protocolos de estimulación. La subrutina CLAMPFIT, incluida en el mismo *software*, se ha utilizado para analizar los registros electrofisiológicos.

La representación gráfica de los datos, así como parte del análisis se realizó con el programa ORIGIN 7.0 (Microcal Inc.).

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el test t de Student. Se aplicó el test para datos apareados o no apareados en función del diseño experimental en cada caso. Se consideró como estadísticamente significativos valores de  $p < 0.05$ . A lo largo de toda la sección de resultados, los datos se expresan como Media  $\pm$  Error Estándar (EEM).

### 3.2.7. Protocolos utilizados en el registro de corriente

#### 3.2.7.1. Amplitud de corriente



Para registrar la corriente de salida de  $\text{K}^+$  en VSMC y células HEK, se perfunde las células con la solución externa (Tabla 3). Una vez establecida la configuración de *whole-cell*, se fija el potencial de reposo a  $-80$  mV. Se obtienen relaciones corriente-voltaje ( $I/V$ ) para las

corrientes de  $K^+$  cada 2 minutos, aplicando grupos de pulsos despolarizantes de 10 mV durante 500 ms desde -60 mV hasta +80 mV.

Después de medir el valor de la amplitud de la corriente lo expresamos como densidad de corriente corrigiéndolo por la capacidad de la célula. La capacidad se mide integrando la corriente capacitativa, que se produce al hiperpolarizar 10 mV la membrana desde el potencial de mantenimiento. La integral de esta corriente es la cantidad de carga necesaria para cargar la membrana, lo que nos permite calcular la capacidad de la célula dividiendo la carga eléctrica entre la amplitud del pulso hiperpolarizante (10 mV).

Nos referimos al cociente entre la amplitud de la corriente y la capacidad de la célula como “densidad de corriente” y lo expresamos en picoamperios por picofaradio ( $pA/pF$ ). Esta normalización de la amplitud a la capacidad nos permite comparar amplitudes de células que tienen diferentes tamaños.

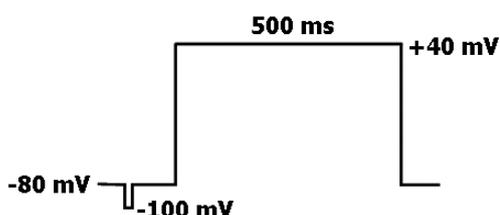
### 3.2.7.2. Deactivación

Este protocolo de registro permite calcular cuanto tiempo es necesario para que los canales pasen del estado abierto al cerrado sin pasar por el inactivo, es decir, medir el curso temporal de la deactivación.

Para su estudio se utilizan soluciones de potasio simétricas (solución externa con alto  $K^+$ , Tabla 3), desplazando el potencial de equilibrio para  $K^+$  hasta 0 mV con lo que se pueden observar corrientes de salida y entrada de  $K^+$  de mayor amplitud. Se obtienen corrientes de cola tras repolarizar a -80 mV utilizando pulsos despolarizantes de 500 ms desde -60mV hasta +80 mV, así el curso temporal de la deactivación se analiza ajustando la corriente repolarizante a -80 mV a la suma de dos exponenciales.

### 3.2.7.3. Bloqueo con anticuerpos

Para el bloqueo funcional de las corrientes de  $K^+$  con anticuerpos de los canales Kv, se registran las corrientes iónicas utilizando pulsos despolarizantes de 500 ms de duración a +40mV con un intervalo de 10s entre cada pulso, fijando el potencial de reposo a -80mV. La punta de la pipeta se sumerge en la



## *Material y Métodos*

solución interna (Tabla3) y se rellena con la misma solución conteniendo además el anticuerpo de interés (0.2 µg/ml).

Para eliminar posibles artefactos debidos a cambios en el sello, se aplica un prepulso de 10 ms a -100 mV (sin compensación de la resistencia de acceso ni de la capacitancia de la célula) 100 ms antes del pulso a +40mV, comprobando así que no se ha producido un deterioro en el acceso durante el registro, ya que en estos experimentos, a diferencia del resto, no podemos realizar el lavado del bloqueo para verificar el efecto. El componente transitorio de la corriente producida en respuesta a este prepulso se utiliza para computar la resistencia de acceso a lo largo del experimento, tal y como se detalla en el anexo I. Los experimentos en los que se produjo un cambio significativo en el valor de la resistencia de acceso fueron descartados en el análisis.

### **3.2.8. Histología y morfometría**

#### **3.2.8.1. Arteria mesentérica**

Se fijan las arterias mesentéricas enteras (con el tejido conectivo y endotelial) en paraformaldehído al 4%. Una vez fijadas se aclaran, se incluyen en parafina y se obtienen secciones transversales de 6 µm de grosor. Estas secciones se rehidratan y se tiñen con hematoxilina-eosina siguiendo el procedimiento estándar. Finalmente las muestras son de nuevo deshidratadas, aclaradas y montadas para su observación y fotografía.

Los parámetros morfométricos a estudio son: el área total de la sección del vaso, el área luminal, el área de la media y el número de núcleos celulares presentes en la media, los cuales se obtienen utilizando el *software* NIS-Elements (Nikon) donde cada valor se corresponde a las medidas por triplicado de cada arteria mesentérica de segundo orden, de al menos ocho ratones para cada condición.

#### **3.2.8.2. Arteria Femoral**

Los animales se sacrifican a las 48 horas, 1 y 4 semanas después de la lesión arterial, bajo anestesia profunda con pentobarbital, la fijación por perfusión se realiza con paraformaldehído al 4% en PBS a 100 mmHg durante 15 minutos, seguida de la escisión en bloque de ambas extremidades

posteriores. Las muestras se fijan durante la noche en paraformaldehído al 4% en PBS y se descalcifican en ácido fórmico al 1%. Se cortan segmentos transversales de 2 mm de grosor a la altura de la lesión de cada arteria femoral común y se procesan para su posterior inclusión en parafina.

Finalmente se hacen cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  procedentes de ambos segmentos, que se corresponden a la porción media de cada bloque de parafina, y se realiza la tinción de hematoxilina-eosina y del tricrómico de Masson modificado para tejido elástico.

Las muestras arteriales se analizan mediante morfometría computerizada utilizando el software NIH Image 1.60 y se obtienen los valores medios para los siguientes parámetros: área luminal, área de la media, área de la íntima, área total del vaso, y las longitudes de la lámina elástica externa e interna, a partir de los cuales se calcula la relación íntima-media (I/M) y el porcentaje de estenosis (Gallo *et al.*, 1998).

### **3.2.9. Técnicas de detección de proteínas**

#### **3.2.9.1. Inmunohistoquímica**

Para el análisis inmunohistoquímico las secciones de parafina de arterias femorales inicialmente deben ser desparafinizadas, lavadas en xilol, tratadas con ácido cítrico al 1% para la recuperación de los antígenos, y rehidratadas. Se bloquean con peróxido de hidrógeno al 3% (DakoCytomatation), se lavan con agua destilada y se tratan con ovoalbúmina al 2 % en PBS. A continuación, se incuban con los anticuerpos primarios a 37 grados durante 2 horas. El anticuerpo primario se detecta mediante el empleo de una IgG anti-ratón (DakoCytomatation) conjugada con peroxidasa y se desarrolla una reacción de color con 3,3-diaminobencidina (DAB, DakoCytomatation). Se realiza una tinción nuclear con hematoxilina para identificar las células. Los controles negativos se preparan mediante substitución del anticuerpo primario con un anticuerpo inespecífico o PBS.

Los anticuerpos primarios usados fueron: mouse anti-Kv $\beta$ 2, mouse anti-Kv1.3 y mouse anti-Kv1.5.

### **3.2.9.2. Inmunocitoquímica**

Las células de arteria femoral, sembradas en los cubreobjetos de cristal tratados con poli-L-lisina, se lavan con PBS, se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS durante diez minutos, se permeabilizan y bloquean con solución de bloqueo (PBS 0.1% Tritón-X-100 más 2% de suero en el que se ha generado el anticuerpo secundario a usar) durante 15 minutos. Seguidamente, las células se incuban con la solución de bloqueo en presencia de los anticuerpos primarios durante una hora. A continuación, las células se lavan tres veces con PBS 0.2% Tritón-X-100 y se incuban con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante una hora. Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente. Finalmente los cubreobjetos se lavan con PBS y se montan sobre portaobjetos con una gota de Vectashield H-1000 con DAPI (Vector Labs). Las células se examinaron con el filtro apropiado en un microscopio de fluorescencia.

### **3.2.9.3. Inmunoblot**

Para la purificación de proteínas, las arterias mesentéricas se tratan con buffer de lisis (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS), inhibidores de proteasas (1mM benzamidina, 1mM fenilmetil-sulfonil fluoruro, 1mM dithiothreitol, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina, y 5 µg/ml pepstatina A) y se homogenizan en un homogenizador Precellys 24 (Bertin Technologies) usando bolas de cerámica (CK14). A continuación se calientan 25 µg de proteínas de la muestra del tejido junto con agente reductor XT (BIO-RAD) y tampón de carga XT (BIO-RAD) a 95 °C durante 5 minutos.

Las proteínas se separan con SDS-PAGE (Criterion™ Precast Gel 10% Bis-Tris, BIO-RAD) y se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF).

La membrana se incuba con la solución de bloqueo [5% de leche desnatada en polvo diluida en TBST (TBS-Tween20, 0.1%)] durante una hora. Los anticuerpos primarios se diluyen en esta misma solución y se incuban durante una hora. Después, la membrana se lava tres veces con TBST y se incuba con anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano picante durante otra hora.

Todas las incubaciones se llevan a cabo en agitación y a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo la membrana, las bandas proteicas se detectaron en un sistema de detección de imagen VersaDoc™ 4000 (Biorad) mediante sustratos quimioluminiscentes (Super Signal® West Pico y West Femto Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology).

### **3.2.10. Técnica de detección de RNA**

#### **3.2.10.1. Extracción del RNA, RT y PCR**

Para llevar a cabo la extracción del RNA total se utilizan de 4 a 6 ratones por experimento de los que se extraen de 5 a 6 arterias mesentéricas de 3<sup>er</sup> orden, la aorta torácica y las dos arterias femorales. El RNA total se extrae, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el kit MELT™ Total RNA Isolation System (Ambion), que está especialmente diseñado para obtener RNA a partir de pequeñas muestras de tejido. En el caso de las células en cultivo se parte de una placa de 35 mm de diámetro con células a confluencia (aprox.  $2 \times 10^6$ ) y la extracción se lleva a cabo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen). El RNA total resultante se trata con DNasa I (Ambion) para eliminar totalmente la posible contaminación por DNA. La calidad del RNA se comprueba mediante medidas de DO a 260 y 280 nm, y electroforesis en geles de agarosa. A partir de 500-750 ng de RNA total se obtiene cDNA (RT+) mediante una reacción de retrotranscripción inversa, con la enzima MuLVRT (5000 u/ml) en presencia de inhibidor de RNasa (20 u/ml), Random Hexamers (50 mM), tampón de PCR (10X), MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y mezcla de dNTPs (10 mM) a 42°C durante 60 minutos. Todos los reactivos empleados pertenecen a Applied Biosystems. Con las mismas muestras, se lleva a cabo un control de la presencia de DNA genómico mediante una reacción de retrotranscripción inversa en la que la enzima MuLVRT y el inhibidor de RNasa están ausentes, a 42°C durante 60 minutos (RT-). Una pequeña fracción del cDNA se usa para realizar amplificaciones a tiempo real de los genes seleccionados como control (GAPDH, Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y Gusb, β-Glucuronidasa) en un termociclador Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research) para comprobar la calidad e integridad de las muestras. Los Primers y las pruebas TaqMan utilizados para estos genes se fueron:

## Material y Métodos

*mGAPDH* 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTG-3'  
5'- GATGCCTGCTTCACCACCTT-3  
5'-FAM-TGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACATCA-BHQ2-3

*mGus*: 5'-CAATGGTACCGGCAGCC-3'  
5'-AAGCTAGAAGGGACAGGCATGT-3'  
5'-FAM-TACGGGAGTCGGGCCAGTCTTG-BHQ2-3

Las amplificaciones se realizan en un volumen final de 20 µl, usando 10 µl de Absolute QPCR mix (ABgene), 1 µl de cada primer, 1 µl de la sonda y 1 µl de cDNA. Las condiciones utilizadas para la PCR son: 15 minutos a 95°C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C , seguidos de un periodo de 1 minuto a 60°C. Estas amplificaciones permiten comparar las diferentes muestras, y a su vez, dado que el gen *mGAPDH* es un único exón, permiten comprobar la eficiencia del tratamiento con la DNAsa, comparando los niveles de expresión entre la muestras RT+ y RT-.

### 3.2.10.2. PCR a tiempo real con Arrays de Baja Densidad con sondas Taqman.

Los Arrays de Baja Densidad con sondas TaqMan (*TaqMan Low Density Arrays*: TLDA) de Applied Biosystems son una tarjetas que permiten analizar mediante PCR cuantitativa a tiempo real la expresión de varias decenas de genes previamente seleccionados. Las tarjetas contienen 384 pocillos (Figura 26) en los que se carga, previo encargo, las sondas TaqMan y los oligos de 96 x 4 genes, de tal forma que en cada tarjeta se pueden cargar dos muestras, obteniendo duplicados de cada gen para cada condición. Para las arterias mesentéricas y aortas se utilizaron 5 tarjetas para cada lecho en las que se cargó una muestra de normotensos y otra de hipertensos, lo que supone tener en total 10 valores de Ct para cada gen en cada condición (n=10). Para las arterias femorales se utilizaron 3 tarjetas en las que se cargó una muestra de tejido y una muestra de cultivo en un caso, y una muestra de tejido control y una muestra de tejido dañado en el otro caso (n=6).

	95 unique assays + 1 mandatory control, 2 replicate per biological sample, 2 unique port set																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	PORT	SAMPLE
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	1	1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		1
C	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	2	1
D	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		1
E	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	3	1
F	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71		1
G	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	4	1
H	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		1
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	5	2
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		2
K	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	6	2
L	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		2
M	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	7	2
N	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71		2
O	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	8	2
P	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		2

Figura 26. Esquema representativo de la distribución de las tarjetas TLDA.

Las sondas se marcan con el fluorocromo donador 6-carboxifluoresceína (FAM, Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA) en el extremo 5', y con un aceptor o *quencher* en el extremo 3'. Los genes seleccionados han sido los canales de  $K^+$ , y sus subunidades accesorias, canales de  $Ca^{2+}$ , de  $Cl^-$ , y los canales TRP. Se ha incluido además un control endógeno (rRNA 18s), un gen marcador de músculo liso (Calponina) y un marcador de células endoteliales (eNos). La lista de los genes se adjunta en la sección de resultados (Tabla 5).

Las tarjetas son procesadas por el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), utilizando el sistema de detección ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). El cDNA se combina con la mezcla de reacción, 1X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación utilizadas se detallan a continuación: 2 minutos a 50°C, seguido de 10 minutos a 95°C, posteriormente 40 ciclos de 30 segundos a 97°C más 1 minuto a 59.7°C. Los datos se adquieren con el software de Applied Biosystems SDS 2.1 y se analizan usando el método ( $\Delta\Delta C_t$ ) de cuantificación relativa (Livak & Schmittgen, 2001). El gen del RNA ribosomal de 18s (rRNA 18s), se emplea como estándar interno para corregir las variaciones en la cantidad total de mRNA de las muestras debidas a su procesamiento. La media de los valores de cada gen normalizados frente al estándar interno rRNA 18s se utiliza para calcular la expresión relativa de los distintos genes que se representa como el valor de  $2^{-\Delta C_t}$  (abundancia relativa), donde

## Material y Métodos

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema(Canal)}} - Ct_{\text{estándar interno(18s)}}.$$

Para comparar la expresión de un mismo gen en diferentes condiciones se utiliza el método de cuantificación relativa de  $\Delta\Delta Ct$ , donde

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{muestra})} - \Delta Ct_{(\text{calibrador})}.$$

Con lo que el número de veces que cambia la expresión de un gen normalizado en una condición con respecto a la otra se expresa como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para la arterias aorta y mesentérica las diferencias entre VSMC de ratones hipertensos y normotensos se calculan a partir de esta misma formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{BPH})} - \Delta Ct_{(\text{BPN})}.$$

En el caso de la arteria femoral las diferencias entre VSMC contráctiles (tejido) y proliferativas (cultivo), se obtienen del mismo modo,

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{cultivo})} - \Delta Ct_{(\text{tejido})}.$$

Al igual que las diferencias entre el tejido dañado y tejido sano,

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{tejido dañado})} - \Delta Ct_{(\text{tejido sano})}.$$

Para las comparaciones se designa como calibrador al  $\Delta Ct_{(\text{BPN})}$  en arterias aorta y mesentérica y al  $\Delta Ct_{(\text{tejido})}$  (o al  $\Delta Ct_{(\text{tejido sano})}$  en su lugar) en el caso de las femorales, y los datos de las muestras BPH, de las muestras de VSMC en cultivo o de las muestras del tejido dañado, se presentan como cambios en la expresión de los genes. Para hacer las comparaciones estadísticas, los valores de  $\Delta Ct$  obtenidos en cada muestra,  $(Ct_{\text{Canal}} - Ct_{18s})$ , se substraen del  $\Delta Ct$  promedio del calibrador para proporcionar el ES. Cada punto de los datos se obtiene de duplicados de al menos 5 ensayos diferentes. En aquellos casos en los que no se detecta expresión del gen en alguna de las condiciones, se asigna un valor Ct de 40 para hacer las comparaciones.

### 3.2.10.3. Análisis de los datos

Los datos de los arrays TaqMan de baja densidad se analizan mediante varios métodos independientes. Se aplica un análisis de conglomerado jerárquico (*hierarchical cluster analysis*) de dos variables, que se basa en agrupar simultáneamente la matriz genes y las distintas condiciones estudiadas

(*biclustering*). Se analizan aquellos genes cuya expresión sea significativa en al menos una de las condiciones experimentales. Los valores introducidos para cada gen son los  $\Delta\text{Ct}$  de cada experimento. Se usa el software Cluster (Eisen *et al.*, 1998) y se aplica como algoritmo de agrupación, la distancia promedio (*average linkage clustering*), con un coeficiente de correlación asimétrico (*uncentered correlation*), después de la normalización del array. Los *clusters* se visualizan utilizando el software Treeview. Las relaciones entre genes se representan mediante un árbol donde la longitud de las ramas refleja su grado de similitud calculada mediante una función de similitud por parejas (*pairwise similarity function*). Los árboles se usan para ordenar los genes en la tabla de datos original, así los grupos de genes cuyo patrón de expresión es parecido son adyacentes. Cuando la tabla ya ordenada se dispone gráficamente, se puede identificar rápidamente la presencia de parches de color situados contiguamente.

Un segundo método de análisis es la determinación, en cada condición experimental, de la expresión relativa de cada gen para obtener su valor de  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ . Los valores promedio de  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  (media  $\pm$  EEM) para cada gen en control frente a las condiciones de proliferación, se usan para obtener las diferencias de expresión entre ambas condiciones como se ha indicado anteriormente, y las diferencias estadísticas se calculan con el student t-test. Finalmente, se comparan los valores de  $\Delta\text{Ct}$  de todos los genes de cada array en las diferentes situaciones con un análisis de varianza (en el caso de la lesión endoluminal) o con el t-test (en el caso de las VSMC de arteria femoral en cultivo) para analizar las diferencias promedio entre los grupos. Los p-values obtenidos se ajustan a diversos análisis con el control de la proporción de resultados falsos positivos (*false discovery rate*, FDR, Gusnanto *et al.*, 2007) utilizando las herramientas del programas GEPAS para estudiar la expresión diferencial de genes (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>).



# **4 Resultados**



En este trabajo se presenta por primera vez un análisis global del perfil de expresión de los canales iónicos presentes en las VSMC de tres lechos vasculares distintos (arterias aorta, femoral y mesentérica) en un modelo de ratón de la cepa BPN. Para ello se han empleado *arrays de baja densidad* con sondas TaqMan que permiten analizar mediante PCR cuantitativa decenas de genes de forma simultánea.

Es bien conocido que las células de músculo liso vascular presentan una marcada heterogeneidad dependiente del lecho vascular de donde procedan, presentando propiedades específicas que les permiten cumplir con los requerimientos funcionales de las diferentes circulaciones regionales. Por este motivo, se han puesto a punto preparaciones de tres lechos arteriales bien diferenciados, *arterias aortas* (arterias de conducción), *mesentéricas* (arterias de resistencia) y *femorales*, para caracterizar la naturaleza molecular de los canales de iónicos presentes en VSMC y así tener una perspectiva general de los canales que son importantes en cada uno de los lechos. Las arterias femorales se han utilizado también en este trabajo como modelo de proliferación *in vivo* tras la práctica de una lesión endoluminal.

A partir de mRNA de arterias aortas, mesentéricas y femorales de ratones normotensos se sintetiza el cDNA y se estudian los niveles de expresión transcripcional de 96 genes que codifican subunidades de canales iónicos (Tabla 5). Los genes estudiados incluyen subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de canales de  $K^+$ , subunidades  $\alpha$  de canales de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  dependientes de voltaje, canales de  $Cl^-$  y canales TRP. También se han estudiado los niveles de expresión de la calponina (Cnn), como marcador de las VSMC, y la óxido nítrico sintasa endotelial (Nos3), para detectar la posible contaminación endotelial de las muestras, así como otros controles endógenos como la Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh), la beta-2 microglobulina (B2m), la hipoxantina fosforibosil transferasa 1 (Hprt-1), el factor Von Willebrand (Vwf), el factor Kruppel-like 5 (Klf5) y el RNA ribosomal 18S.

## Resultados

**Tabla 5.** Lista de los genes estudiados en arteria mesentérica, aorta y femoral.

Nombre común del Canal	Nombre del Gen	ID del ensayo	Referencia NCBI	Categoría
Kv1.1	Kcna1	Mm00439977_s1	NM_010595	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv1.2	Kcna2	Mm00434584_s1/ Mm01546131_g1	NM_008417/ AK044342	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv1.3	Kcna3	Mm00434599_s1	NM_008418	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv1.4	Kcna4	Mm00445241_s1/ Mn01336166_m1	NM_021275/ AK036112	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv1.5	Kcna5	Mm00524346_s1	NM_145983	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv1.6	Kcna6	Mm00496625_s1	NM_013568	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv2.1	Kcna1	Mm00492791_m1	NM_008420	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv3.1	Kcnc1	Mm00657708_m1	NM_008421	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv3.3	Kcnc3	Mm00434614_m1	NM_008422	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv3.4	Kcnc4	Mm00521443_m1	NM_145922	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv4.1	Kcnd1	Mm00492796_m1	NM_008423	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv4.2	Kcnd2	Mm00498065_m1	NM_019697	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv4.3	Kcnd3	Mm00498260_m1	NM_019931	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv6.3	Kcng3	Mm00463328_m1	NM_153512	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\gamma$ )
Kv9.1	Kcns1	Mm00492824_m1	NM_008435	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\gamma$ )
Kv9.2	Kcns2	Mm00492825_g1	NM_008436	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\gamma$ )
Kv9.3	Kcns3	Mm00557826_m1	NM_173417	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\gamma$ )
Kv10.1(eag-1)	Kcna1	Mm00495110_m1	NM_010600	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv11.1(erg-1)	Kcna2	Mm00465370_m1	NM_013569	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv11.3(erg-3)	Kcna7	Mm00713030_m1	NM_133207	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\alpha$ )
Kv $\beta$ 1	Kcna1	Mm00440018_m1	NM_010597	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
Kv $\beta$ 2	Kcna2	Mm00440022_m1	NM_010598	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
Kv $\beta$ 3	Kcna3	Mm00440034_g1	NM_010599	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
KChAP	Pias3	Mm00450739_m1	NM_018812/ NM_146135	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
KChIP1	Kcna1	Mm00471928_m1	NM_027398	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
KChIP2	Kcna2	Mm00518914_m1	NM_030716	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
KChIP3	Csen	Mm00490739_m1/ Mm490739_m1	NM_019789	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
KChIP4	Kcna4	Mm00518835_m1	NM_030265.2	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
Mink	Kcna1	Mm00434615_m1	X60457	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
MiRP1	Kcna2	Mm00506492_m1	NM_134110	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
MiRP2	Kcna3	Mm00445119_m1	NM_020574	Canal de K <sup>+</sup> (Kv $\beta$ )
Kir1.1	Kcna1	Mm00444727_s1	NM_019659	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir2.1	Kcna2	Mm00434616_m1	NM_008425	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir2.2	Kcna12	Mm00440058_s1/ Mm01237201_m1	NM_010603	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir3.1	Kcna3	Mm00434618_m1	NM_008426	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir3.2	Kcna6	Mm00440070_m1	NM_010606	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir3.3	Kcna9	Mm00434622_m1	NM_008429	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir4.1	Kcna10	Mm00445028_m1	NM_020269	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir6.1	Kcna8	Mm00434620_m1	NM_008428	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
Kir6.2	Kcna11	Mm00440050_s1	NM_010602	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>IR</sub> )
SUR2	Abcc9	Mm00441638_m1	NM_011511.1	Receptor de sulfonilurea
TWIK1	Kcna1	Mm00434624_m1	NM_008430	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>2P</sub> )
TREK1	Kcna2	Mm00440072_m1	NM_010607	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>2P</sub> )
TASK(1)	Kcna3	Mm00807036_m1	NM_010608	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>2P</sub> )
TRAAK	Kcna4	Mm00434626_m1	NM_008431	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>2P</sub> )
TASK2	Kcna5	Mm00498900_m1	NM_021542	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>2P</sub> )
BK	Kcna1	Mm00516078_m1	NM_010610	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>Ca</sub> $\alpha$ )
BK $\beta$ 1	Kcna1	Mm00466621_m1	NM_031169	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>Ca</sub> $\beta$ )
BK $\beta$ 2	Kcna2	Mm00511481_m1	NM_028231	Canal de K <sup>+</sup> (K <sub>Ca</sub> $\beta$ )

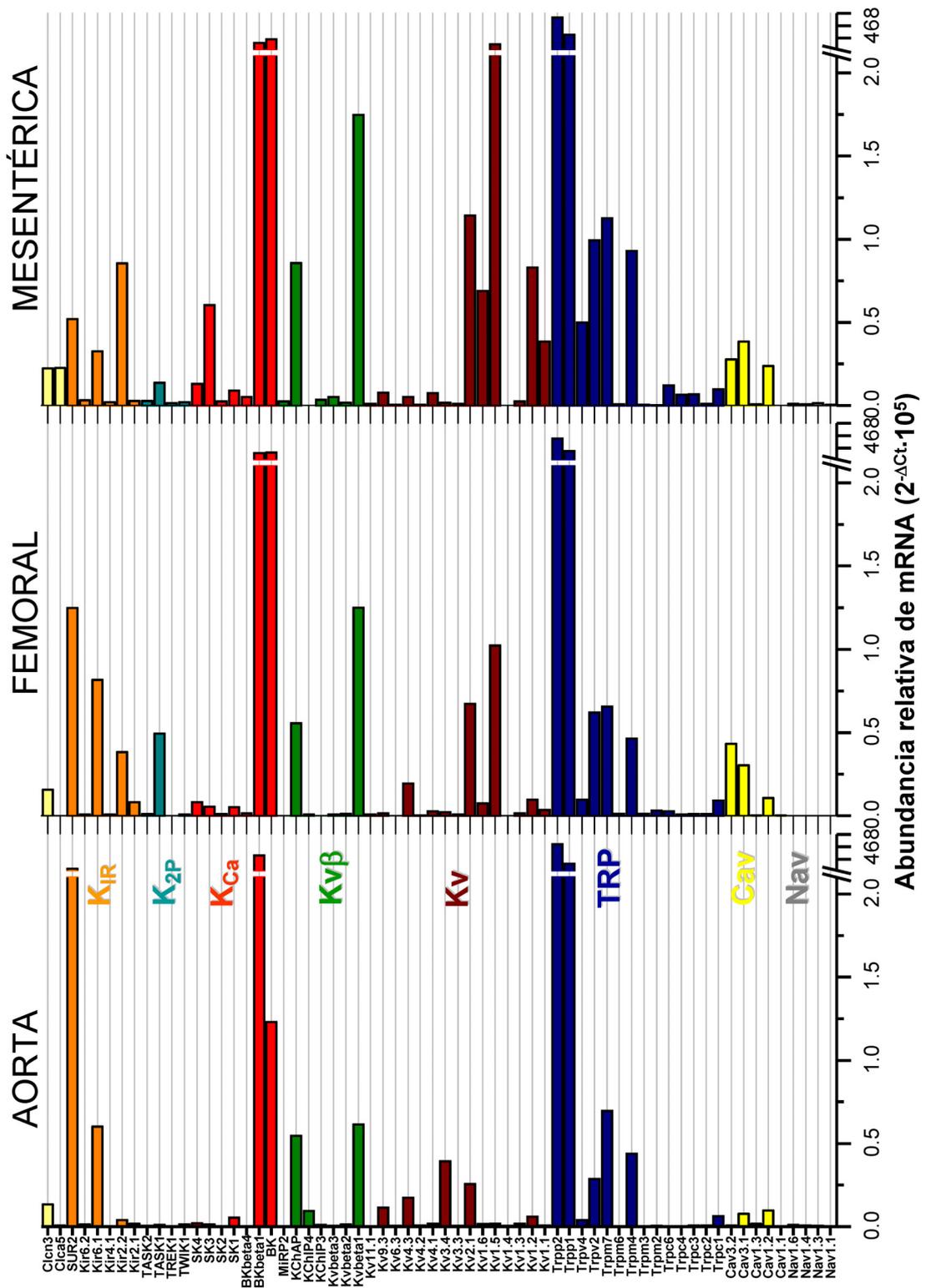
## Resultados

BK $\beta$ 4	Kcnmb4	Mm00465684_m1	NM_021452	Canal de $K^+$ ( $K_{Ca\beta}$ )
SK1	Kcnn1	Mm00446259_m1	NM_032397	Canal de $K^+$ ( $K_{Ca\alpha}$ )
SK2	Kcnn2	Mm00446514_m1	NM_080465	Canal de $K^+$ ( $K_{Ca\alpha}$ )
SK3	Kcnn3	Mm00446516_m1	NM_080466	Canal de $K^+$ ( $K_{Ca\alpha}$ )
SK4(IK1)	Kcnn4	Mm00464586_m1	NM_008433	Canal de $K^+$ ( $K_{Ca\alpha}$ )
Cav1.1	Cacna1s	Mm00489257_m1	L06234/ AW493108	Canal de $Ca^{2+}$ (Tipo L)
Cav1.2	Cacna1c	Mm00437917_m1	NM_009781	Canal de $Ca^{2+}$ (Tipo L)
Cav1.3	Cacna1d	Mm00551384_m1	NM_028981	Canal de $Ca^{2+}$ (Tipo L)
Cav3.1	Cacna1g	Mm00486549_m1	NM_009783	Canal de $Ca^{2+}$ (Tipo T)
Cav3.2	Cacna1h	Mm00445369_m1	NM_021415	Canal de $Ca^{2+}$ (Tipo T)
Trpc1	Trpc1	Mm00441975_m1	NM_011643.11	Canal TRP
Trpc2	Trpc2	Mm00441984_m1	NM_011644	Canal TRP
Trpc3	Trpc3	Mm00444690_m1	NM_019510	Canal TRP
Trpc4	Trpc4	Mm00444284_m1	NM_016984	Canal TRP
Trpc5	Trpc5	Mm00437183_m1	NM_009428	Canal TRP
Trpc6	Trpc6	Mm00443441_m1	NM_013838	Canal TRP
Trpc7	Trpc7	Mm00442606_m1	NM_012035	Canal TRP
Trpm1	Trpm1	Mm00450619_m1	AK076406	Canal TRP
Trpm2	Trpm2	Mm00663098_m1	NM_138301	Canal TRP
Trpm3	Trpm3	Mm00616485_m1	AK051867	Canal TRP
Trpm4	Trpm4	Mm00613173_m1	NM_175130	Canal TRP
Trpm5	Trpm5	Mm00498453_m1	NM_020277	Canal TRP
Trpm6	Trpm6	Mm00463112_m1	NM_153417	Canal TRP
Trpm7	Trpm7	Mm00457998_m1	NM_021450	Canal TRP
Trpm8	Trpm8	Mm00454566_m1	NM_134252	Canal TRP
Trpv2	Trpv2	Mm00449223_m1	NM_011706	Canal TRP
Trpv3	Trpv3	Mm00454996_m1	NM_145099	Canal TRP
Trpv4	Trpv4	Mm00499025_m1	NM_022017	Canal TRP
Trpv6	Trpv6	Mm00499069_m1	NM_022413	Canal TRP
Trpp2	Pkd2	Mm00435829_m1	NM_008861	Canal TRP
Trpp5	Pkd2l2	Mm00450423_m1	NM_016927	Canal TRP
Trpp1	Pkd1	Mm00465434_m1	NM_013630	Canal TRP
Nav1.1	Scn1a	Mm00450580_m1	L42339	Canal de $Na^+$ (Nav)
Nav1.3	Scn3a	Mm00658167_m1	L42337	Canal de $Na^+$ (Nav)
Nav1.4	Scn4a	Mm00500103_m1	NM_133199	Canal de $Na^+$ (Nav)
Nav1.6	Scn8a	Mm00488110_m1	NM_011323	Canal de $Na^+$ (Nav)
Nav1.7	Scn9a	Mm00450762_s1	L42338	Canal de $Na^+$ (Nav)
Clcn3	Clcn3	Mm00432566_m1	NM_007711	Canal de $Cl^-$ (Clc)
Clca1	Clca1	Mm00777368_m1	NM_009899	Canal de $Cl^-$ ( $Cl_{ca}$ )
Clca2	Clca2	Mm00661630_m1	NM_030601	Canal de $Cl^-$ ( $Cl_{ca}$ )
Clca3	Clca3	Mm00489959_m1	NM_017474	Canal de $Cl^-$ ( $Cl_{ca}$ )
Clca4	Clca4	Mm00519742_m1	NM_139148	Canal de $Cl^-$ ( $Cl_{ca}$ )
Clca5	Clca5	Mm00724513_m1	NM_178697	Canal de $Cl^-$ ( $Cl_{ca}$ )
eNOS	NOS3	Mm00435204_m1	NM_008713	Marcador endotelial
SM (h1) calponina	Cnn1	Mm00487032_m1	NM_009922	Proteína del citoesqueleto
Factor Kruppel-like 5	Klf5	Mm00456521_m1	NM_009769.2	Marcador de proliferación
Factor Von Willebrand	Vwf	Mm00550376_m1	NM_011708.2	Marcador endotelial
Gapdh	Gapdh	Mm99999915_g1	NM_001001303.1	Control endógeno
Hprt1	Hprt1	Mm00446968_m1	NM_013556.2	Control endógeno
Beta-2 microglubulina	B2m	Mm00437762_m1	NM_009735.2	Control endógeno
18S RNA	18SRNA	Hs99999901_s1	X03205.1	Control endógeno

## Resultados

En la figura 25 se muestra la expresión de cada uno de los genes estudiados en los tres lechos arteriales, normalizada respecto al control interno rRNA 18s (Los genes que no aparecen representados no se expresan o no detectamos sus niveles de expresión). Los genes están agrupados por familias de canales iónicos y cada una de las familias se representa con un color diferente. En este estudio detectamos la expresión dos **canales de Cl<sup>-</sup>** (Clcn3 y Clca5), aunque sólo se expresan conjuntamente en la arteria mesentérica. Respecto a los **canales de K<sup>+</sup> rectificadores de entrada (K<sub>IR</sub>)**, mientras en la aorta y femoral destaca la expresión del K<sub>IR</sub>6.1 (y su subunidad asociada SUR2), en las mesentéricas predomina la expresión del K<sub>IR</sub>2.2. De los **canales de K<sup>+</sup> de doble poro (K<sub>2P</sub>)**, destaca la expresión de los canales TASK1 en femoral y mesentérica. Los miembros de la familia de los **canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>** se expresan en los tres lechos vasculares, con la excepción de la subunidad BKβ2. La subunidad BKα está altamente expresada en los tres lechos estudiados y se asocia a una alta expresión de la subunidad β1 en femorales y mesentéricas. Respecto a los **canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Kv)**, se observa una clara gradación en su expresión entre las arterias de conducción y las de resistencia, aumentando su representación en las arterias mesentéricas. En los tres lechos estudiados se detectó expresión de un gran número de **canales TRP** de las subfamilias TRPC, TRPV, TRPM y TRPP. Los canales TRPP1 y TRPP2 son los más abundantes en los tres lechos arteriales. Los **canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje** están representados por miembros de las subfamilias Cav1 (fundamentalmente Cav1.2) y Cav3, y se expresan en mayor cantidad en las arterias de resistencia. Finalmente, apenas se encontró expresión de **canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje** en ninguno de los lechos estudiados.

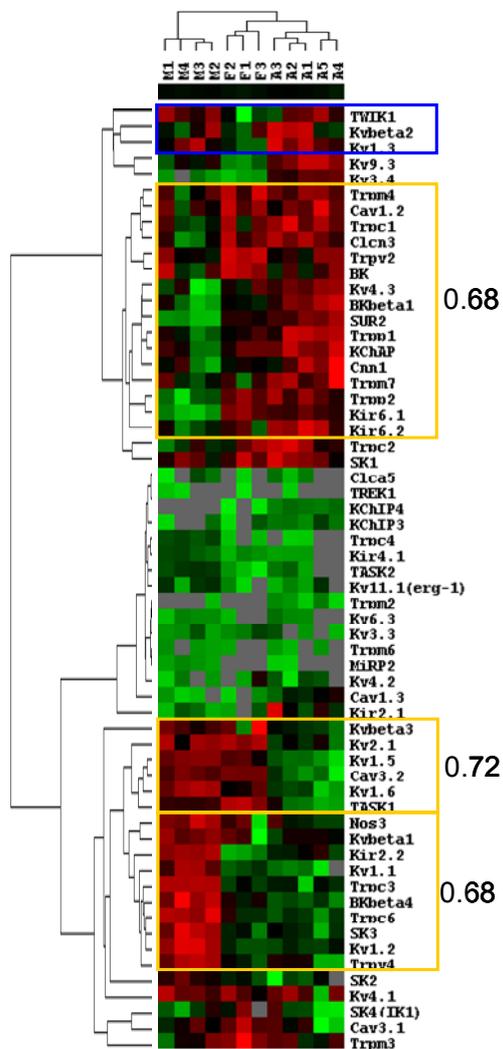
Los resultados muestran que la expresión de canales iónicos es mayor en las arterias de resistencia. Además, los niveles de expresión de los Kv1 y Kv2, y de los Cav1.2 muestran un patrón creciente (aorta<femoral<mesentérica) que correlaciona con la contribución de estos lechos vasculares al tono miogénico (Cole *et al.*, 2005;Plane *et al.*, 2005).



**Figura 25.** Abundancia relativa de los canales iónicos en VSMC de arterias aorta, femoral y mesentérica. Los niveles de expresión están normalizados con respecto a RP18s. La abundancia relativa se expresó como  $2^{-\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{\text{canal}} - Ct_{18s}$ .

## Resultados

Para obtener una visión global de las diferencias en la expresión de los genes de los distintos canales en los tres lechos vasculares se realizó un análisis de *cluster* de los genes y los lechos vasculares (Figura 26). Este análisis muestra que existe una gradación de la expresión de los genes según el tamaño del vaso, como es el caso de los canales Kv, que se expresan mucho más en arterias de resistencia que en las de conducción. También pone de manifiesto que el patrón de expresión de las VSMC de arteria femoral representa una situación intermedia entre la expresión en VSMC de arteria aorta y mesentérica, aunque hay un grupo de genes que muestran menos expresión en arterias femorales (marcado en azul en la figura), que incluye los genes de los canales de doble poro TWIK y de las subunidades Kv1.3 y Kvβ2.



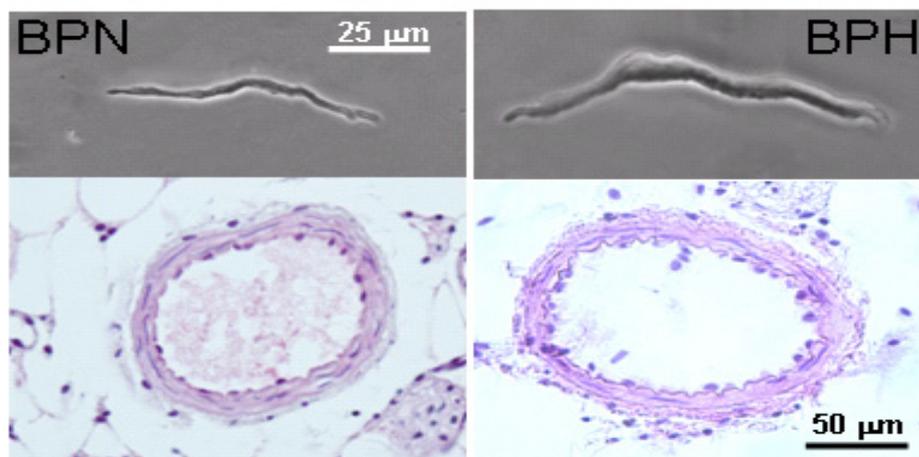
**Figura 26.** Análisis *cluster* de la expresión de los canales iónicos en VSMC de arteria aorta, mesentérica y femoral. El análisis se aplica a 59 genes (dispuestos horizontalmente) y a las muestras de VSMC obtenidas de arterias mesentéricas (M1-M4), femorales (F1-F3) y aortas (A1-A5) (dispuestas verticalmente). La expresión se calcula como  $2^{-\Delta Ct}$  para cada gen. Los genes se agrupan según patrones de expresión siguiendo un código de color, el color rojo representa un aumento de la expresión de los genes y el color verde una disminución de la expresión. La longitud de las ramas del diagrama de árbol es proporcional a la correlación del patrón de expresión de los genes. Los recuadros amarillos agrupan los genes con un mismo comportamiento de acuerdo a un coeficiente de correlación, representando (de arriba abajo), los genes que son más abundantes en arterias de conducción (femoral y aorta) que en arterias de resistencia (mesentérica), los genes más abundantes en arterias mesentéricas y femorales al comparar con aorta y los genes más abundantes en arterias de resistencia (mesentérica). En el recuadro azul se muestra un grupo de genes con niveles de expresión más bajos en arterias femorales que en los otros dos lechos vasculares.

#### 4.1. REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS EN LA HIPERTENSIÓN ESENCIAL. IMPLICACIONES EN EL CONTROL DEL TONO VASCULAR

El primer objetivo de esta tesis ha sido determinar el papel de los canales de iónicos de las VSMC en el control del tono vascular utilizando un modelo de animal de hipertensión esencial. Para ello, se han estudiado las diferencias en los niveles de expresión de los diferentes canales iónicos en arterias de conducción (aortas) frente a vasos de resistencia (mesentéricas). El modelo utilizado ha sido una cepa de ratones con hipertensión esencial (BPH) y sus respectivos controles normotensos (BPN).

##### 4.1.1. Cambios morfológicos de las arterias mesentéricas en el modelo de hipertensión

Cuando comparamos las características morfológicas en secciones de arterias BPN y BPH observamos una hipertrofia evidente de las VSMC de los animales hipertensos (Figura 27). Los datos de la tabla 6 indican que a pesar de que el peso de los animales BPH es significativamente menor (28.4 g frente a 31.5 g) las arterias mesentéricas del mismo orden (2º) tienen un área mayor, tanto total como de la luz y de la túnica media, pero el número de de VSMC no cambia (20.08).



**Figura 27.** Estudio morfométrico de arterias BPN y BPH. VSMC de arterias mesentéricas disociadas en agudo de ratones BPN y BPH, y secciones histológicas de bloques de parafina teñidos con hematoxilina-eosina.

## Resultados

**Tabla 6.** Parámetros morfométricos obtenidos a partir de arterias mesentéricas de 2º orden embebidas en parafina

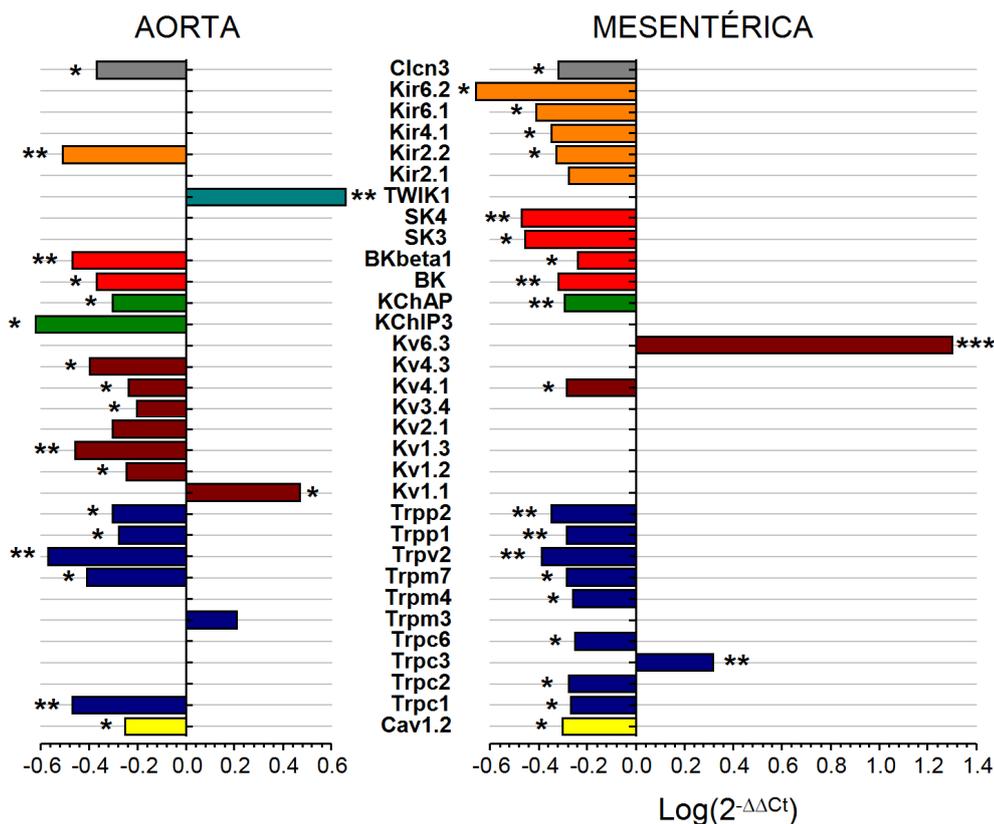
	<b>BPN</b> (n=22)	<b>BPH</b> (n=22)
Peso del animal (g)	31.5±0.6	28.4±0.5***
Área del vaso ( $\mu\text{m}^2$ )	11006.5±628.8	13270.3±481.7**
Área del Lumen ( $\mu\text{m}^2$ )	6871.3±435.8	8813.5±403.2**
Área de la media ( $\mu\text{m}^2$ )	4021.6±204.4	4604.6±176.4*
Número de núcleos celulares en la media	20.08±0.9	20.8±0.8

Puesto que el cambio vascular asociado a la hipertensión se describe como un remodelado “eutrófico” de la arteria (Mulvany, 2002), la hipertrofia de las VSMC observada en animales BPH podría reflejar una fase inicial en el desarrollo de la hipertensión junto con una respuesta de los vasos de tamaño medio a cambios distales en la presión arterial.

### **4.1.2. Expresión relativa del mRNA de los canales Kv de arterias de resistencia y conductoras, y sus cambios en el modelo de hipertensión.**

Los cambios de expresión de los diferentes canales iónicos obtenidos en arterias aorta y mesentérica en los ratones BPH, respecto a los controles BPN, se muestran en la figura 28. La comparación se representa como  $\text{Log}(2^{-\Delta\Delta\text{Ct}})$ , de forma que una disminución en la expresión en los ratones BPH respecto a los BPN tiene un valor negativo, y un aumento un valor positivo. En términos absolutos, un valor de  $\text{Log}(2^{-\Delta\Delta\text{Ct}})$  de 0.3 representa un aumento en la expresión al doble y un valor de -0.3 una disminución a la mitad. En la figura sólo se muestran aquellos genes en los que se obtuvo diferente expresión entre hipertensos y normotensos.

Tal y como muestra la figura 28, el número de genes que varía en ambos lechos es similar (21 en aorta y 23 en mesentérica), y 12 coinciden en ambos lechos. Es especialmente reseñable que los cambios de expresión que se observan en ambos lechos son fundamentalmente en el sentido de una disminución de la expresión en las arterias procedentes de los animales hipertensos. En este contexto, destacan especialmente aquellos genes cuya

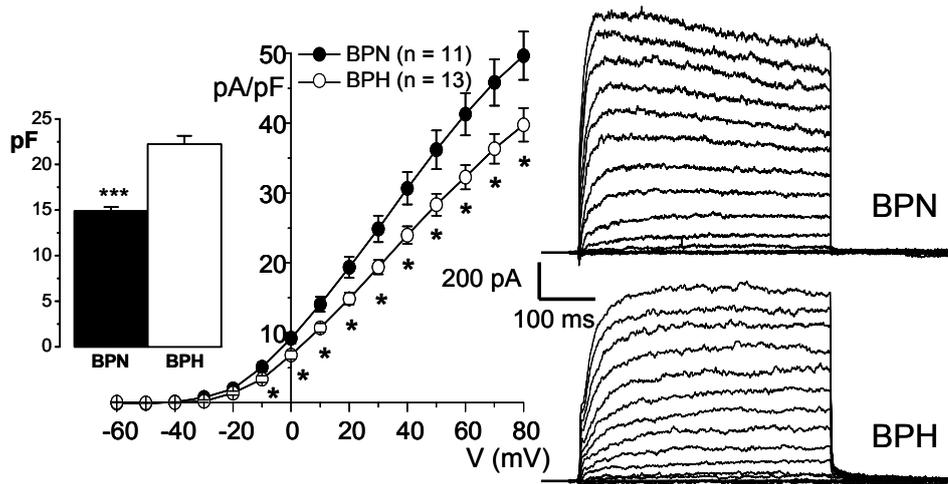


**Figura 28.** Cambios en la expresión de canales iónicos en arterias aorta y mesentérica de ratones BPH. Los cambios se calcularon como  $\log(2^{-\Delta\Delta Ct})$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(BPH)} - \Delta Ct_{(BPN)}$ . Los valores negativos representan una disminución de la expresión y los valores positivos un aumento de la misma, (usando los niveles de expresión BPN como calibrador). En todas la figuras, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

expresión es mayor en hipertensión: Trpc3 y Kv6.3 en mesentéricas y Trpm3, Kv1.1 y TWIK1 en aortas. En arterias mesentéricas se produce una disminución de todos los canales de la familia  $K_{IR}$ ,  $K_{Ca}$ , y TRP (con la excepción del Trpc3), pero lo más destacado es la expresión “*de novo*” del Kv6.3 (Kcng3), ya que no se detectó en ninguna de las muestras BPN y estaba presente en todas las BPH.

Para estudiar en mayor profundidad las repercusiones funcionales de estos cambios en el control del tono muscular, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en los canales de  $K^+$  (Kv y  $KCa$ ), porque como ya se ha comentado anteriormente, estos canales contribuyen de forma muy importante a determinar y establecer el potencial de membrana de las VSMC y por lo tanto el tono vascular. De los 39 genes de canales de  $K^+$  analizados, 10 de ellos no se detectaron en ninguno de los dos lechos vasculares, entre los que se

## Resultados



**Figura 29.** Expresión funcional de la corriente de salida de  $K^+$  en células BPN y BPH. Relaciones densidad de corriente-voltaje obtenidas de 12 células distintas de cada grupo, BPN (●) y BPH (○) (media $\pm$ EEM). Las columnas muestran la media ( $\pm$ EEM) de las capacitancias de las células obtenidas en ambos grupos; n=34. A la izquierda se muestran trazos representativos de corrientes de salida de  $K^+$  obtenidas aplicando pulsos despolarizantes de 10 mV desde -60 hasta +80 mV en una VSMC mesentérica BPN y otra BPH. El potencial de reposo se fijó a -80 mV y los valores de capacidad de cada célula fueron 21.0 pF (BPH) y 15.5 pF (BPN). Después de cada pulso el potencial de membrana se fijó a -50 mV durante 200 ms.

incluyen las subunidades Kv3.1, Kv9.1, Kv9.2, Kv10.1, Kv11.3, BK $\beta$ 2, MinK, MiRP1, KCHIP1 y KCHIP2. Además las arterias mesentéricas de los animales BPN tampoco expresaban mRNA de los canales Kv1.4, Kv6.3 y KCHIP4, mientras que en las VSMC de aorta no se detectó mRNA para el MiRP2.

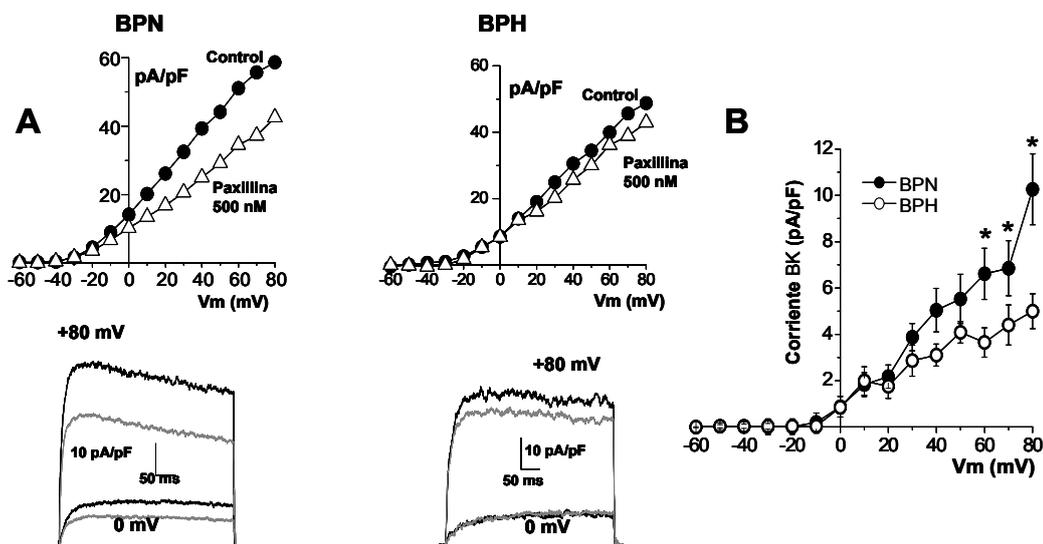
### 4.1.3. Caracterización funcional de las corrientes de $K^+$ activadas por voltaje y por calcio en VSMC de arteria mesentérica.

Usando VSMC de arterias de resistencia (ramas de 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> orden de arterias mesentéricas), hemos estudiado la correlación entre los cambios de expresión de los canales Kv y K<sub>Ca</sub> y los cambios en las propiedades electrofisiológicas de las corrientes de  $K^+$ , así como su contribución a la excitabilidad de las VSMC. Esta caracterización se enfocó en las VSMC de arteria mesentérica, ya que se espera que tengan mayor contribución al tono vascular que las arterias de conducción como la aorta. Las corrientes de salida de  $K^+$  de las VSMC disociadas en agudo se estudiaron mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de *whole cell*. La figura 29 muestra trazos representativos obtenidos en una célula BPH y otra BPN. La densidad de corriente total de

salida de  $K^+$  fue significativamente mayor a todos los voltajes en las células BPN. Este hecho se debe en parte al mayor tamaño de las células BPH al compararlas con las BPN, como indican los valores de capacidad obtenidos en ambas preparaciones (Figura 29, barras), y como ya se ha comprobado anteriormente en el estudio morfológico (Figura 27).

#### 4.1.3.1. Corrientes de $K^+$ activadas por $Ca^{2+}$

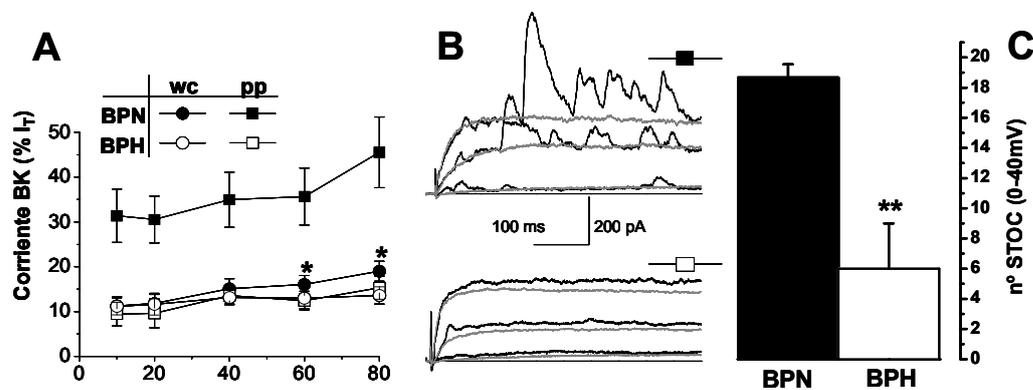
Hemos estudiado la contribución de las corrientes  $K_{Ca}$  a la corriente total de salida de  $K^+$  mediante registros de *whole cell*. Las corrientes  $BK_{Ca}$  se definieron como la fracción de corriente de salida sensible a paxillina 500 nM (Li & Cheung, 1999). La figura 30A muestra curvas I/V representativas, y trazos de los registros a dos potenciales distintos, obtenidos en VSMC de arterias mesentéricas BPN y BPH, antes y después de la aplicación de paxillina. La paxillina disminuyó la amplitud de corriente a potenciales positivos, siendo este efecto mucho más evidente en VSMC de ratones BPN que en las de BPH. La corriente  $BK_{Ca}$  representó un  $19.0 \pm 2.2$  % de la densidad de corriente a +80 mV en las células BPN y un  $12.74 \pm 1.9$  % en las BPH (círculos blancos, en la figura 32B). En las condiciones de registro utilizadas en estos experimentos (VSMC dializadas con la solución de pipeta conteniendo 10 mM EGTA) la interacción



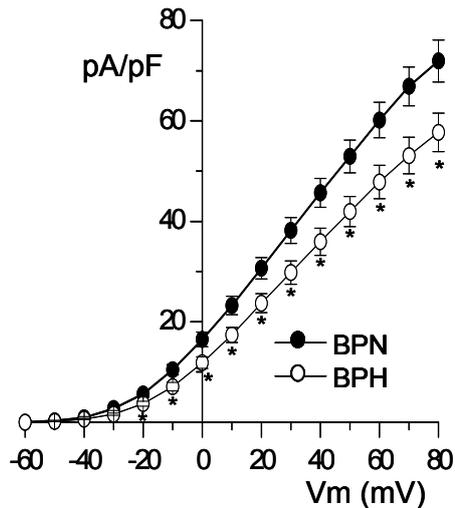
**Figura 30. A.** Relaciones corriente-voltaje representativas obtenidas en condiciones control y en la presencia de paxillina 500 nM de células BPN y BPH en experimentos de *whole-cell*. Debajo se muestran trazos de corriente después de despolarizar a +80 mV y 0 mV. Los trazos grises se corresponden a registros realizados en presencia de paxillina. **B.** Promedio de curvas I/V sensibles a paxillina obtenidas en registros de *whole cell* de células BPN (●) y BPH (○); n = 16.

## Resultados

de la despolarización y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares se ve minimizada, ya que el  $\text{Ca}_i^{2+}$  está fuertemente tamponado. Por esta razón también exploramos la contribución de las corrientes  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  mediante registros de parche perforado, donde las concentraciones de  $\text{Ca}_i^{2+}$  se mantienen en condiciones fisiológicas. La figura 31 muestra la contribución normalizada de las corrientes  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  a la corriente total de salida a diferentes voltajes en *whole-cell* (*wc*) y *perforated-patch* (*pp*) y en las dos preparaciones (BPN y BPH). En las células BPN hay un aumento significativo de la proporción de la corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  cuando los registros se hacen en *perforated-patch* ( $\text{Ca}_i^{2+}$  fisiológico), tanto en términos absolutos como en frecuencia de transitorios de corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  espontáneos (STOCs). Los trazos representativos y los diagramas de barras de la figura 31 muestran que bajo condiciones de *perforated-patch* los STOCs ocurrieron con más frecuencia en las células BPN y tuvieron mayor amplitud. Sin embargo no encontramos diferencias entre los registros de *whole cell* y *perforated-patch* en las células BPH. Estos resultados sugieren que tanto la expresión funcional de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  como su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  se ven reducidas en las VSMC de arteria mesentérica BPH. De hecho, la disminución de la sensibilidad a calcio en las células de las arterias BPH correlaciona con la disminución en la



**Figura 31.** Contribución funcional de las corrientes  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en células BPN y BPH. **A.** Contribución de las corrientes, expresadas como porcentaje de la corriente total de salida, en células BPN (círculos negros) y BPH (círculos blancos). Las corrientes  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  se calcularon como la diferencia en la amplitud de corriente, a los voltajes indicados, entre los trazos control y de los registrados en presencia de paxillina, ambos en *whole-cell* (círculos) y en *perforated-patch* (cuadrados). Los datos son la media  $\pm$  EEM de 7-15 ensayos en cada grupo. \*  $p < 0.05$  al comparar con los datos de *whole-cell* BPH. **B.** También se muestran trazos representativos de una célula BPN y otra BPH obtenidas en registros de *perforated-patch* al despolarizar a +60 mV, antes y después de la aplicación de paxillina. **C.** Número de picos de corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  espontáneos (STOC) registrados entre 0 y 40 mV en varias células de cada condición.



**Figura 32.** Curvas de densidad de corriente Kv-voltaje obtenidas tras el bloqueo de la corriente  $BK_{Ca}$  con paxillina 500nM en VSMC BPN (●) y BPH (○); n=22 células en cada grupo, \*p<0.05.

expresión de las subunidades  $BK\beta 1$  en esta preparación (Figura 28).

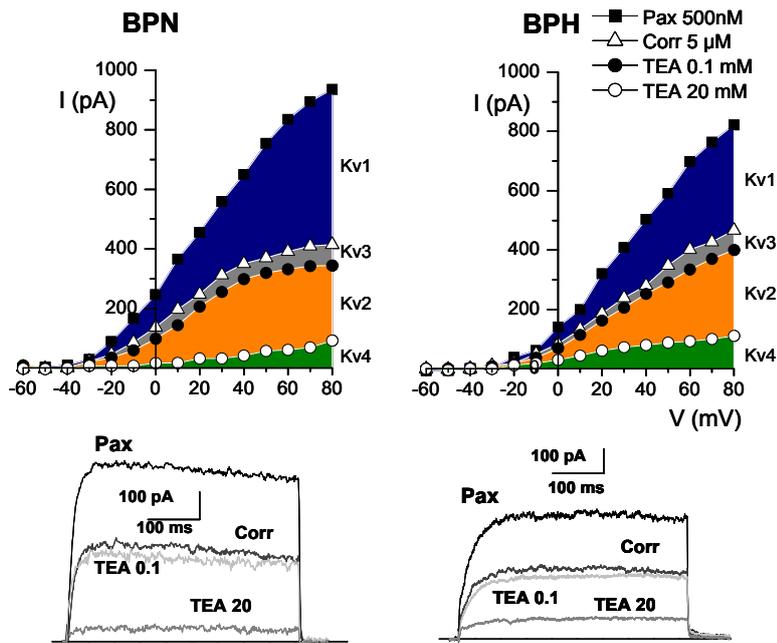
Aunque el perfil de expresión de mRNA de las VSMC de arteria mesentérica indica la presencia de otros miembros de la familia de los canales  $K_{Ca}$  como los canales  $K_{Ca}$  de baja conductancia (SK) y los canales  $K_{Ca}$  de intermedia conductancia (IK1, SK4), la aplicación de apamina (500 nM) no tuvo efecto sobre las corrientes de salida de

$K^+$ . De hecho, los bajos niveles de expresión de estos otros genes de canales  $K_{Ca}$  podría reflejar alguna contaminación endotelial, ya que la expresión de SK y IK1 ha sido descrita en células endoteliales, pero no en VSMC (Kohler *et al.*, 2003; Jackson, 2005).

#### 4.1.3.2. Corrientes de $K^+$ dependientes de voltaje

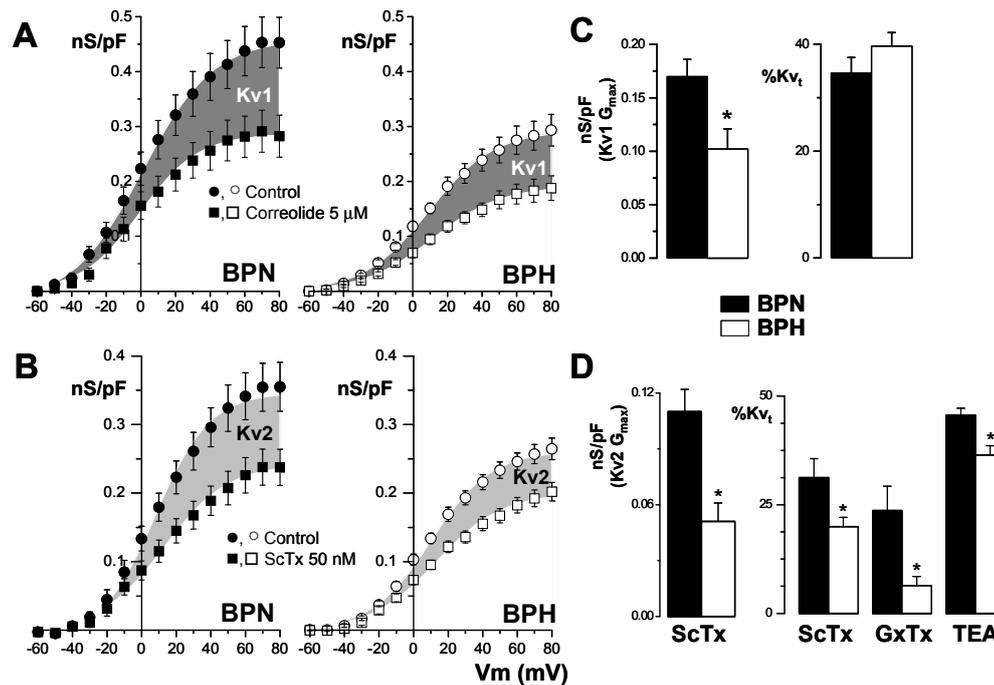
Después del bloqueo de las corrientes  $BK_{Ca}$  con paxillina, caracterizamos farmacológicamente las corrientes Kv de ambas preparaciones. Como en el caso de las corrientes  $BK_{Ca}$ , las corrientes Kv fueron significativamente mayores a todos los voltajes en las células BPN (Figura 32). El perfil de expresión de los genes de los canales Kv en arteria mesentérica (Figura 25), junto con los datos previamente descritos en la literatura (Amberg & Santana, 2006; Albarwani *et al.*, 2003; Fountain *et al.*, 2004; Plane *et al.*, 2005) apuntan a una contribución predominante de los canales Kv1 y Kv2 a la corriente total Kv en arterias de resistencia.

## Resultados



**Figura 33.** Caracterización farmacológica de las corrientes Kv en células BPN y BPH. Las gráficas muestran curvas I/V en presencia de paxilina 500nM (corriente Kv total), después de la aplicación de correolide 5  $\mu$ M, y en la presencia de dos concentraciones de TEA. La contribución de cada componente (Kv1-Kv4) se representa mediante las áreas coloreadas. Los trazos muestran las corrientes obtenidas al despolarizar a +40mV con cada uno de los bloqueantes. Debajo se muestran ejemplos representativos del protocolo de disección farmacológica de las corrientes Kv de una célula BPN y otra BPH.

Un análisis farmacológico preliminar dirigido a determinar la proporción de corriente de salida Kv atribuible a los miembros de las subfamilias Kv1-Kv4 confirmó esta hipótesis. El correolide se utilizó para bloquear selectivamente las corrientes Kv1 (Hanner *et al.*, 1999), y la diferente sensibilidad a TEA nos permitió la identificación de las corrientes Kv2 y Kv3 después de la aplicación de correolide (Miguel-Velado *et al.*, 2005). La corriente insensible a TEA y correolide podría atribuirse a las corrientes Kv4 (Coetzee *et al.*, 1999). La figura 33 muestra que en ambas preparaciones, BPN y BPH, la corriente Kv1 (la corriente sensible a correolide) y Kv2 (la corriente sensible a TEA 20 mM) representan conjuntamente un 86% de las corrientes totales Kv en las células BPN y un 83% en las células BPH. La contribución de las corrientes Kv3 (la corriente bloqueada por TEA 100 $\mu$ M) y las corrientes Kv4 (la corriente residual tras aplicar TEA 20 mM) fue mínima. Este último componente estaría posiblemente sobreestimado, ya que no se registraron corrientes rápidamente inactivantes “tipo-A” en estas células.



**Figura 34.** Cuantificación de la contribución de las corrientes Kv1 y Kv2 a la corriente Kv total. Se obtuvieron relaciones conductancia-voltaje (nS/pF) en células BPN (●,■) y BPH (○,□) en presencia de paxillina 500 nM (control) y después de la aplicación de correolide 5  $\mu$ M (A) o ScTx 50 nM (B). Los datos son la media $\pm$ EEM; n=8-12 en cada grupo. Las áreas sombreadas están delimitadas por ajustes tipo Boltzmann de dos curvas y representan las fracciones sensible a correolide (Kv1) y sensible a ScTx (Kv2) de la conductancia total. Los valores de G<sub>max</sub> para los componentes Kv1 (C) y Kv2 (D) se obtuvieron substrayendo la G<sub>max</sub> de la curva G/V resistente a la droga de la G<sub>max</sub> del control, en cada célula. Las barras de la gráfica de la derecha muestran la contribución porcentual de los componentes Kv1 (C) y Kv2 (D) calculado como el % de la conductancia total Kv (Kv<sub>t</sub>) a +40 mV. La proporción del componente Kv2 también se estudió usando GxTx 20 nM y TEA 20 mM (después del correolide). Media $\pm$ EEM de 7-12 datos.

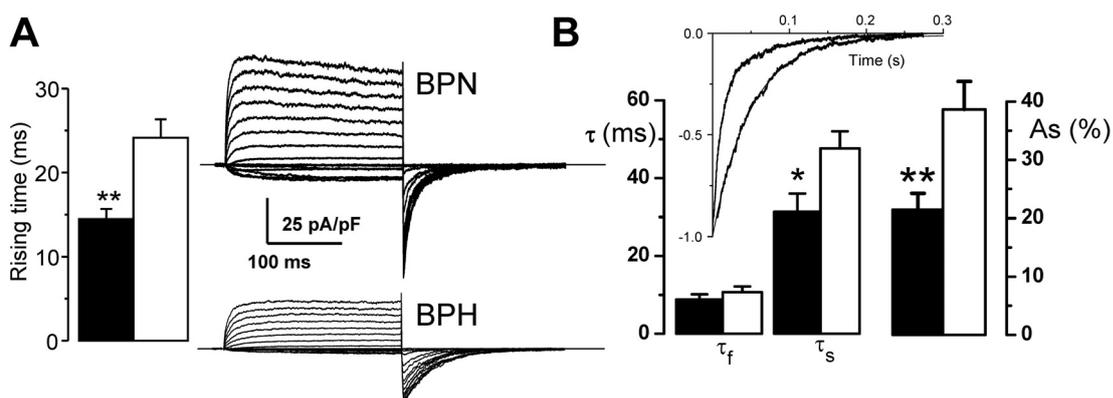
El uso selectivo de los bloqueantes de los canales Kv2, como la estromatoxina (ScTx) o la guangxitoxina (GxTx) (Amberg & Santana, 2006; Herrington *et al.*, 2006), nos permitieron explorar en más detalle la contribución relativa de los canales Kv1 y Kv2 en ambas preparaciones. La figura 34 muestra curvas conductancia-voltaje medias obtenidas en ambos grupos (BPN y BPH) en la presencia de paxillina (control) y después de la de la aplicación de los bloqueantes para Kv1 o Kv2. La conductancia Kv1 media en BPN fue  $0.17\pm 0.01$ , y  $0.10\pm 0.02$  nS/pF en BPH. Aunque la disminución de la conductancia Kv1 fue significativa en células BPH, su contribución porcentual a la corriente total Kv fue la misma en células BPN y BPH, ya que no hubo diferencias significativas en el efecto del correolide al expresarlo como

## Resultados

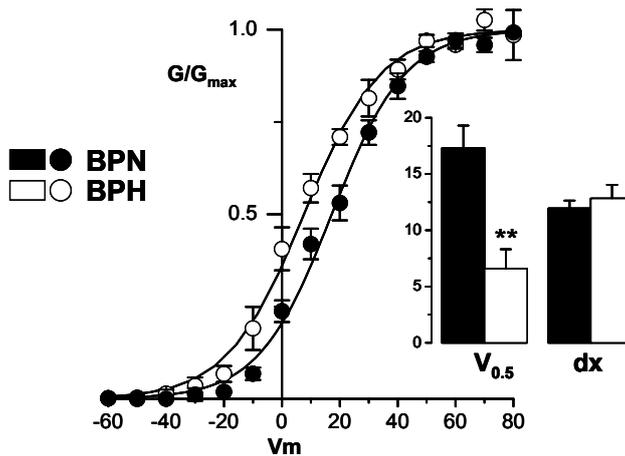
porcentaje de inhibición (Figura 34C). En cambio, tanto la conductancia como la contribución porcentual de las corrientes Kv2 (definida como la sensible a ScTx), fue significativamente menor en las células BPH (Figura 34B y D). Se obtuvieron los mismos resultados al comparar la inhibición inducida por GxTx 20 nM o TEA 20 mM (en este último caso después de la aplicación de correolide). Sin embargo, mientras que el efecto de GxTx 20 nM fue similar al de ScTx 50 nM en las corrientes BPN, fue significativamente menor en las corrientes BPH, sugiriendo una menor afinidad de GxTx por los canales Kv2 en las células BPH.

### 4.1.3.2.1. Caracterización cinética de las corrientes Kv2

Además de la disminución en la amplitud del componente Kv2 en las células BPH, observamos una activación y desactivación más lentas de las corrientes totales BPH (Figuras 29 y 33) que podría atribuirse a un cambio en la cinética de las corrientes mediadas por canales Kv2. Para explorar estos parámetros en mas detalle, diseñamos una serie de experimentos para estudiar la fracción resistente a correolide de estas corrientes (debida principalmente a los canales Kv2) en concentraciones simétricas de alto  $K^+$ . En la Figura 35A se muestran trazos representativos en ambas preparaciones. Bajo estas condiciones, el curso temporal de activación se analizó midiendo el incremento del tiempo de



**Figura 35.** Caracterización cinética de las corrientes Kv2 en VSMC de arteria mesentérica. Los parámetros de activación y desactivación (**A** y **B**) se estudiaron en soluciones de  $K^+$  simétricas y en presencia de paxilina 500 nM y correolide 5  $\mu$ M. Se muestran trazos representativos de una familia de corrientes de una célula BPN y BPH (**A**). Se estudió el curso temporal de activación midiendo el tiempo empleado en despolarizar desde -80 hasta +40 mV. **B**. El curso temporal de desactivación se obtuvo ajustando las corrientes cola una función biexponencial. La gráfica muestra las corrientes cola normalizadas de los ejemplos mostrados en **A** y sus correspondientes ajustes; n=8.



**Figura 36.** Curvas de conductancia normalizadas obtenidas a partir del componente sensible a ScTx de las corrientes BPN y BPH. Las líneas continuas son los ajustes Boltzmann de los datos. La gráfica de columnas muestra la media de las pendientes (dx) y de los voltajes ( $V_{0.5}$ ) para la mitad de la activación, obtenidas realizando los ajustes Boltzmann para cada célula individual; n=7.

activación (definido como el tiempo en alcanzar el 75% de la amplitud de la corriente pico durante un pulso despolarizante de +40 mV). Nuestros datos muestran un aumento significativo de este parámetro en las corrientes BPH. El curso temporal de deactivación se estudió ajustando las corrientes cola obtenidas en la repolarización, a una función biexponencial<sup>5</sup>.

El claro enlentecimiento observado en las corrientes BPH se debe al aumento en la amplitud del componente lento del ajuste ( $A_s$ ) junto con el aumento de la constante lenta de deactivación ( $\tau_s$ ), (Figura 35B).

Finalmente, también el análisis de las curvas de conductancia en las dos preparaciones reveló un desplazamiento de la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más hiperpolarizados en las corrientes BPH (Figura 36).

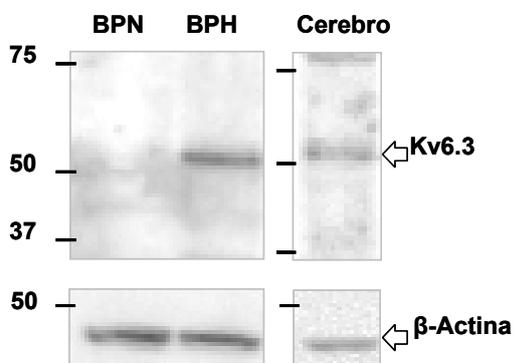
---


$$^5 I_T = A_f \cdot e^{-t/\tau_f} + A_s \cdot e^{-t/\tau_s}$$

## Resultados

### 4.1.3.2.2. Expresión y contribución funcional de los canales Kv6.3 en VSMC de BPN y BPH

Puesto que uno de los cambios más llamativos en las arterias mesentéricas de los ratones BPH es la expresión “*de novo*” de las subunidades Kv6.3, hipotetizamos que estas subunidades son las responsables de los cambios cinéticos en las corrientes mediadas por los canales Kv2. De hecho, tal y como se muestra en la figura 37, los inmunoblots obtenidos con el anticuerpo anti-Kv6.3 a partir de extractos proteicos de arterias mesentéricas muestran la expresión de esta proteína en arterias BPH pero no en las BPN. Estas

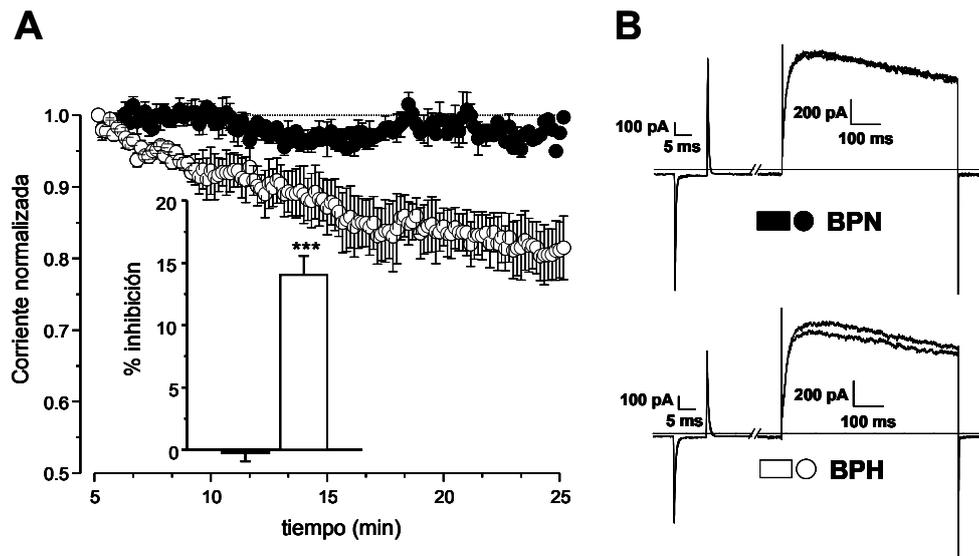


**Figura 37.** Caracterización de la expresión de la proteína Kv6.3 en VSMC BPN y BPH de arteria mesentérica. La presencia de subunidades Kv6.3 en arterias mesentéricas BPN y BPH se analizó mediante western blot. El cerebro de ratón se utilizó como control positivo y el inmunoblot con  $\beta$ -actina sirvió como control de carga.

diferencias no se observan cuando comparamos extractos proteicos de arterias aorta BPN y BPH.

Para obtener una evidencia más directa de la posible asociación entre los canales Kv6.3 y los Kv2.1 en los animales BPH, se estudió el efecto de la aplicación intracelular de anticuerpo anti-Kv6.3 en las corrientes Kv mediante un protocolo de voltage-clamp descrito en la sección de métodos (Archer *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2002). Una vez obtenida la configuración de *whole*

*cell*, se aplicaron pulsos despolarizantes cada 10 segundos. Inicialmente se observó un aumento de la corriente durante los primeros minutos de registro. (4-5 min) en todas las células estudiadas, por lo que en el análisis se tomó como control la corriente obtenida a los 5 minutos de iniciar la configuración de *whole-cell*. A los 15 minutos de registro, la diálisis del anticuerpo anti-Kv6.3 no cambió la amplitud de la corriente en células BPN (Figura 38B trazos superiores), mientras que en todas las células BPH estudiadas se produjo una disminución irreversible de la amplitud de la corriente inicial (trazos inferiores). En los registros en los que se pudo llegar a 35 minutos, la inhibición observada no fue significativamente mayor a la obtenida a los 15 minutos. Los efectos



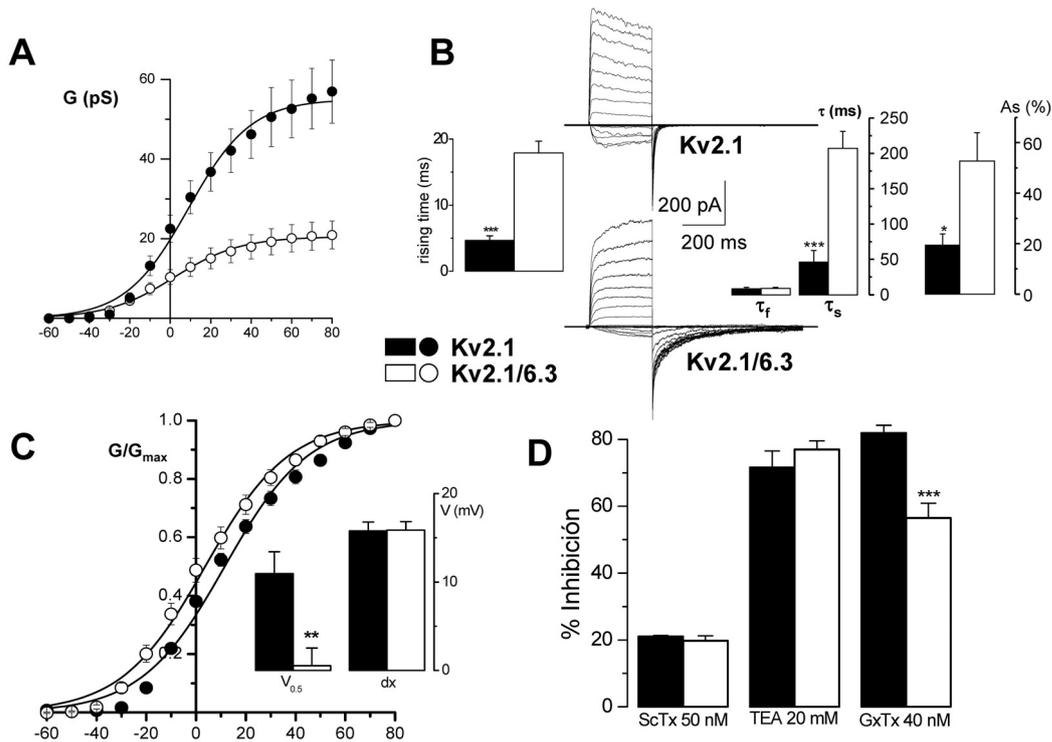
**Figura 38.** Contribución funcional de las subunidades Kv6.3 a las corrientes Kv. Esta contribución se estudió analizando el efecto de la aplicación intracelular de los anticuerpos anti-Kv6.3 sobre la amplitud de corriente. **A.** La gráfica muestra el curso temporal normalizado de la amplitud de corriente en células BPN y BPH durante 25 minutos, después del establecimiento de la configuración de *whole-cell*. Los datos son la media $\pm$ EEM de 5-7 células. Las barras representan la inhibición promedio inducida a los 20 min en células BPN (barra negra) y BPH (barra blanca). **B.** También se muestran trazos representativos de una célula BPN y BPH a dos tiempos diferentes (5 y 20 minutos).

promedio de los anticuerpos utilizados en este estudio se muestran en la figura 38A. El anticuerpo anti-Kv6.3 produjo una reducción significativa de las corrientes Kv sólo en el caso de las células BPH ( $14.03\pm 1.5$ ), mientras que no se observaron cambios en las células BPN ( $-0.28\pm 0.6$ ). Como control adicional, se registraron corrientes Kv de células BPH en presencia de anti-Kv3.1 en la pipeta, ya que no se detectó mRNA del Kv3.1 en el rastreo inicial. Bajo estas condiciones tampoco se observaron cambios significativos en la amplitud de corriente después de 15-20 minutos de registro (el porcentaje de inhibición promedio en seis células fue de  $-0.35\pm 0.5$ ).

#### 4.1.3.2.3. Modulación por Kv6.3 de las corrientes Kv2 en sistemas heterólogos.

Estos datos demuestran que hay expresión funcional del canal Kv6.3 en arterias mesentéricas BPH, y hacen muy plausible que los cambios en la cinética y en la amplitud de las corrientes Kv2 en estas células estén determinados por la asociación de Kv6.3 con Kv2.1. Para comprobar esta hipótesis, estudiamos el efecto modulador de la coexpresión del Kv6.3 sobre

## Resultados



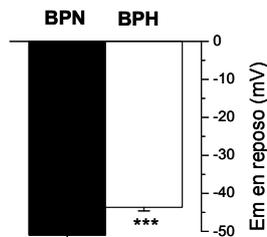
**Figura 39.** Caracterización de las corrientes Kv2.1 y Kv2.1/Kv6.3 en células HEK. **A.** Las curvas de conductancia se obtuvieron en células HEK transfectadas con Kv2.1 solo (●) o Kv2.1+Kv6.3 (○). Las líneas muestran el ajuste de los datos a funciones tipo Boltzmann; n=10-11 células. **B.** Se usaron soluciones simétricas de K<sup>+</sup> para estudiar la cinética de la corriente. La figura muestra trazos representativos obtenidos mediante pulsos despolarizantes desde -60 hasta +80 mV y el análisis de la activación y la deactivación en 10 células de cada grupo. **C.** Las curvas de conductancia normalizadas de las corrientes Kv2.1 y Kv2.1/Kv6.3 se obtuvieron mediante el mismo análisis realizado en la figura 33. **D.** Efecto de los distintos bloqueantes de las corrientes Kv2, que se expresa como el porcentaje de inhibición a +40 mV. Media±EEM de 5-7 células.

las corrientes Kv2.1 usando la expresión heteróloga de estas dos proteínas en células HEK293. En estas células se observó una disminución significativa en la amplitud de corriente de los heteromultímeros Kv6.3/Kv2.1, así como un enlentecimiento del curso temporal de activación y deactivación y un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación en el estado estacionario (Figura 39 A-C).

Además, cuando estudiamos la sensibilidad de los canales Kv2.1 y Kv2.1/Kv6.3 a los diferentes bloqueantes de Kv2, observamos que había una sensibilidad menor a la GxTx en presencia del Kv6.3, mientras que el efecto de la ScTx y el TEA era comparable en los dos grupos (Figura 39D).

#### 4.1.4. Papel de las corrientes $K_{CA}$ y $K_v$ en la excitabilidad de las VSMC.

Para determinar la contribución relativa de los canales  $K_v$  al potencial de membrana en reposo y por lo tanto su contribución a la excitabilidad celular, se realizaron experimentos de *current-clamp* en células dissociadas en agudo de

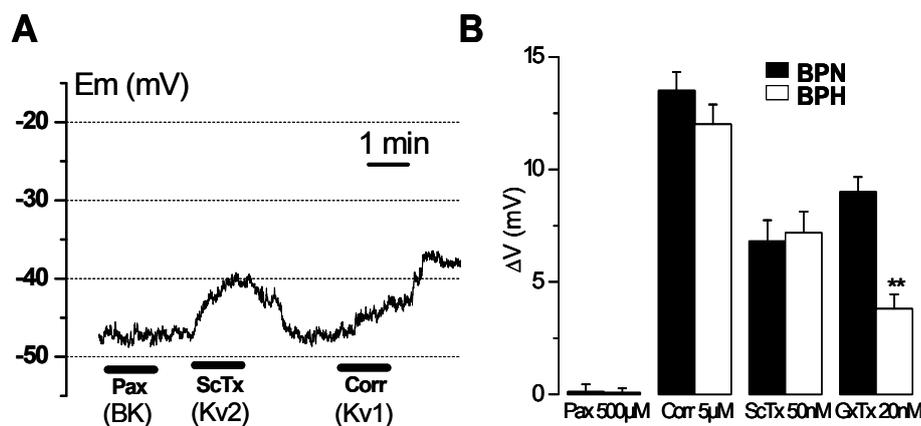


arterias mesentéricas de ratones BPN y BPH (Figura 40). Los valores de potencial de membrana en reposo obtenidos en células BPH fueron significativamente menores en valor absoluto que los obtenidos en células BPN ( $-43.63 \pm 0.97$  frente a  $-51.00 \pm 1.43$  mV).

**Figura 40.** Potencial de membrana en reposo de VSMC BPH y BPN. *Current-clamp* en la configuración de *perforated-patch*. BPH y BPN de arteria mesentérica; n=39.

También estudiamos los cambios en el potencial de membrana inducidos por el bloqueo de los canales BK (usando paxillina 500  $\mu$ M), de los canales  $K_v1$  (aplicando correolide 5  $\mu$ M) y de

los canales  $K_v2$  (usando bien ScTx 50 nM o GxTx 20 nM, Figura 41). Mientras que la paxillina no tuvo ningún efecto sobre el potencial de membrana, el resto de las drogas produjeron despolarizaciones en ambas preparaciones. Sorprendentemente, no se observaron diferencias en estos efectos entre células BPN y BPH, con la excepción de una disminución significativa en la despolarización producida por GxTx en las células BPH.



**Figura 41. A.** La gráfica muestra los valores de potencial de membrana en una célula BPN durante la aplicación de paxillina 500 nM, ScTx 50 nM y correolide 5  $\mu$ M como se indica en las barras. **B.** La despolarización promedio (media  $\pm$  EEM) obtenida en 9-15 células BPN y BPH con las distintas drogas se representa como  $\Delta V_m$ .

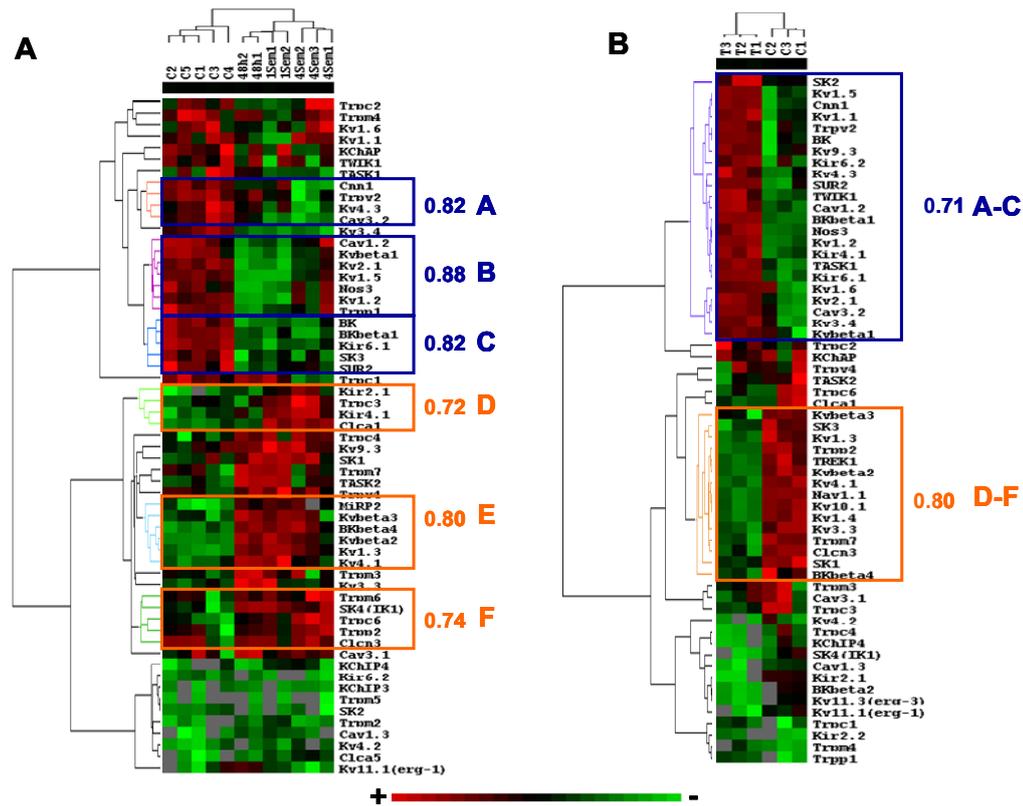
## **4.2. REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS Y SUS IMPLICACIONES PARA LA PROLIFERACIÓN DEL MÚSCULO LISO ARTERIAL**

Para abordar el posible papel modulador de los canales iónicos en el cambio fenotípico de las VSMC, se estudiaron los cambios en el perfil de expresión de estos canales tras el cambio fenotípico en dos modelos proliferativos distintos: un modelo *in vivo*, en el cual se induce la hiperplasia de la íntima mediante una lesión endoluminal (Roque *et al.*, 2000) y un modelo *in vitro*, donde se obtienen VSMC en cultivo a partir de explantes de arterias femorales. A partir de las células obtenidas se estudió la función y expresión de proteínas de aquellos genes cuyo cambio en la expresión fue similar en ambos modelos de proliferación.

### **4.2.1. Cambios en la expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación *in vivo* e *in vitro***

El perfil de expresión de canales iónicos en VSMC con fenotipo proliferativo se estudió en VSMC procedentes de arterias femorales tras una hiperplasia de la íntima, inducida por la lesión endoluminal del endotelio, y en VSMC en cultivo, procedentes de explantes de arterias femorales libres de endotelio. En ambos casos se compararon los perfiles de expresión con el perfil descrito en la figura 25, obtenido a partir de VSMC con fenotipo contráctil. Los cambios producidos en las lesiones proliferativas *in vivo* se estudiaron a tres tiempos distintos, 48 horas, 1 semana y 4 semanas. A cada tiempo se utilizaron las arterias femorales de 4-6 animales, donde se había inducido la lesión endoluminal unilateralmente, para estudiar los niveles de expresión transcripcional de las subunidades de los canales iónicos. Las arterias femorales contralaterales se utilizaron como control.

Se utilizaron distintos métodos para analizar los cambios en la expresión como consecuencia de la lesiones proliferativas. El análisis de *cluster* (análisis de conglomerado jerárquico) de los genes y las diferentes condiciones experimentales proporcionó una visión general de los cambios en la expresión (Eisen *et al.*, 1998), que se visualizan con el *software* Treeview. La figura 42 muestra este tipo de análisis para los dos modelos de proliferación estudiados:



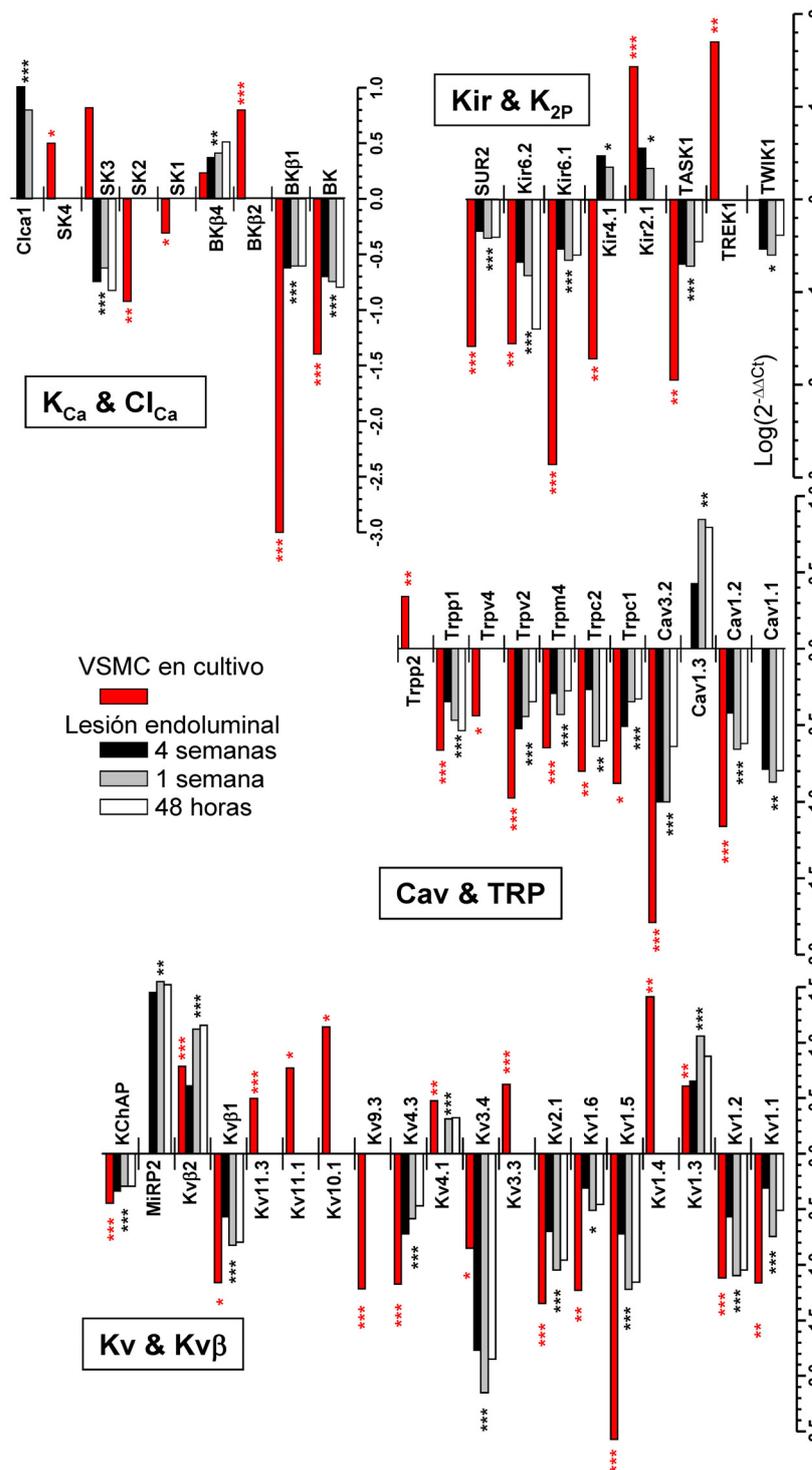
**Figura 42.** Análisis *cluster* de la expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación *in vivo* (A) e *in vitro* (B). El análisis se aplica a 59 genes (dispuestos horizontalmente) y a 5 muestras de VSMC contráctiles (C1-C5), 2 muestras a 48h tras la lesión endoluminal, 2 muestras tras una semana y 3 muestras tras 4 semanas (dispuestas verticalmente). La expresión se calcula como  $2^{-\Delta Ct}$  para cada gen. Los genes se agrupan según patrones de expresión siguiendo un código de color, el color rojo representa un aumento de la expresión de los genes con la proliferación y el color verde una disminución de la expresión. La longitud de las ramas del diagrama de árbol es proporcional a la correlación del patrón de expresión de los genes. Los recuadros agrupan los genes con un mismo comportamiento de acuerdo a un coeficiente de correlación. **A.** En el modelo *in vivo* se utilizaron arterias sanas (células contráctiles) como controles frente a las arterias con daño, a diferentes tiempos. **B.** En el modelo *in vitro* se utilizaron como controles arterias sanas (sin endotelio) frente a las VSMC en cultivo.

tejidos control frente al tiempo tras la lesión endoluminal (Figura 42A) o tejidos control frente a VSMC en cultivo (Figura 42B). Se detectó la expresión de 57 genes de canales iónicos, además de los genes control *Cnn* y *Nos3*. En nuestras condiciones experimentales, este análisis reveló una clara división de los genes, según sus respuestas al cambio fenotípico, en dos grupos: aquellos genes cuya expresión aumentó con la proliferación de las VSMC y aquellos cuya expresión disminuyó, proporcionando una primera aproximación hacia la identificación de los genes de canales iónicos asociados con el fenotipo proliferativo y contráctil. En el caso de la lesión endoluminal (Figura 42A), el

## Resultados

análisis *cluster* también reveló una subclasificación dentro de cada grupo según el curso temporal de los cambios observados. En la figura se destaca la similitud en el patrón de expresión de diversos grupos de genes, indicando el coeficiente de correlación del grupo. Dentro de los genes cuya expresión disminuye durante la proliferación tras la lesión endoluminal, podemos identificar agrupamientos de genes que muestran una disminución de la expresión proporcional al tiempo de lesión (A), una disminución temprana de la expresión seguida de una recuperación parcial a tiempos mayores (B) o una disminución mantenida independiente del tiempo tras la lesión (C). De la misma manera, aquellos genes cuya expresión aumenta con la proliferación pueden mostrar un aumento tardío (D), un aumento temprano con una recuperación parcial a tiempos mayores (E) o un aumento mantenido (F). Siguiendo este mismo criterio, el análisis *cluster* de los genes cuya expresión se modifica en las VSMC en cultivo (Figura 42B) también permite identificar dos grupos de genes cuya expresión disminuye (A-C) o aumenta (D-F) con la proliferación.

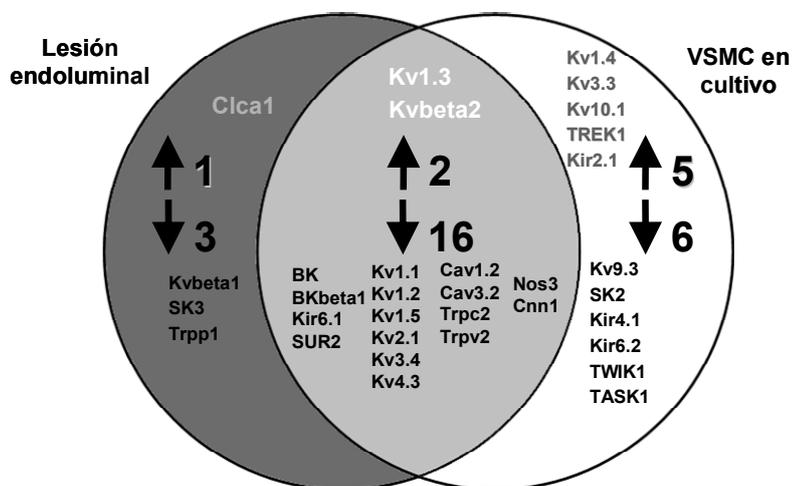
Un segundo método de análisis de los cambios en el perfil de expresión de los genes, inducidos por la proliferación, consiste en estudiar las diferencias para cada gen, entre el control (fenotipo contráctil) y la proliferación en los dos modelos usando el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Los resultados de esta comparación se muestran en la figura 43, donde los niveles de expresión, en cultivo (barras rojas) o tras la lesión endoluminal (barras blancas, grises y negras), se expresan respecto a la expresión en el fenotipo contráctil como  $\text{Log}(2^{-\Delta\Delta Ct})$ . Los aumentos en la expresión aparecen como valores positivos, y la disminución de expresión se refleja con valores negativos, mientras que la ausencia de cambios se corresponde con valores cercanos a 0. Este tipo de análisis también pone de manifiesto la existencia de un gran grupo de genes cuya expresión se modifica de forma similar en los dos modelos de proliferación. En el modelo de proliferación *in vivo* encontramos cambios en 34 genes de canales, 27 de los cuales mostraron la misma variación en las VSMC en cultivo.



**Figura 43.** Diferencia en la expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación *in vivo* e *in vitro*. Cambios en el perfil de expresión de los canales iónicos en las VSMC en cultivo (barras rojas) y en la lesión endoluminal a diferentes tiempos (barras blancas, grises y negras). Los cambios se calcularon como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(cultivo)} - \Delta Ct_{(tejido)}$ , y se representaron a escala logarítmica, así los valores negativos representan una disminución de la expresión y los valores positivos un aumento de la misma, (usando los niveles de expresión en tejido sano con endotelio como calibrador del modelo *in vivo*, y los de tejido sin endotelio para el *in vitro*). En todas la figuras, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

## Resultados

Para discernir si estos patrones de expresión son simplemente fenómenos arbitrarios o más bien reflejan una asociación fisiológicamente significativa, realizamos un análisis estadístico de los datos con el programa GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>). Con este análisis, obtenemos una variación significativa en la expresión de 22 genes en los modelos de proliferación *in vivo* y 29 genes en el modelo *in vitro*. La lesión endoluminal induce un aumento significativo en los niveles de expresión del canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> (ClCa1), del canal Kv1.3 y de una subunidad accesoria de los canales Kv (Kvβ2), así como una disminución significativa en 17 genes de canales más los

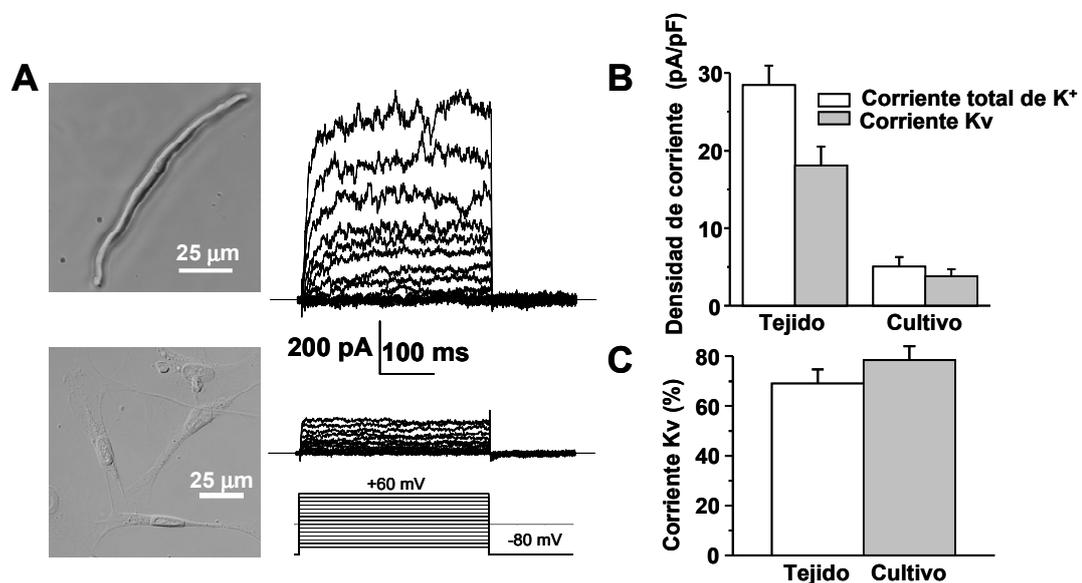


**Figura 44.** Cambios significativos en la expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación *in vivo* (círculo blanco) e *in vitro* (círculo gris). Estos cambios se representan mediante un diagrama de Venn en cuya zona de intersección se muestran los cambios comunes a ambas condiciones. Los resultados se han obtenido, mediante el análisis de los datos con las herramientas T-REX del conjunto de programas GEPAS.

genes control Cnn y Nos3 (Figura 44). Los análisis de las variaciones en VSMC en cultivo indican que 18 de los 29 genes con cambios significativos en su perfil de expresión son comunes de ambos modelos de proliferación. La lista completa de los genes estudiados en ambos modelos de proliferación, así como su correspondiente grado de significación, se muestran en las tablas 7 y 8 del anexo II.

#### 4.2.2. Expresión y contribución funcional de los canales Kv y BK<sub>Ca</sub> en VSMC de arteria femoral

A continuación, intentamos correlacionar la expresión de mRNA con la expresión funcional de proteína en los dos modelos de proliferación. Nos hemos centrado en el grupo de genes que muestran variaciones significativas en los dos modelos proliferativos, *in vivo* e *in vitro* (la intersección en los diagramas de la figura 44), y especialmente en aquellos cuya expresión aumenta, ya que son más susceptibles de constituir dianas terapéuticas para el control del remodelado patológico de las VSMC. Hemos usado diferentes enfoques para estudiar los niveles de expresión de proteína en los dos modelos de proliferación. En VSMC en cultivo, hemos confirmado la expresión de proteína (mediante inmunocitoquímica) y su contribución funcional (mediante técnicas electrofisiológicas). En la lesión endoluminal, hemos analizado su presencia y distribución mediante inmunohistoquímica en secciones de tejido de arteria femoral control y lesionada a los diferentes tiempos usados para los estudios de expresión de mRNA. La aplicación de técnicas electrofisiológicas

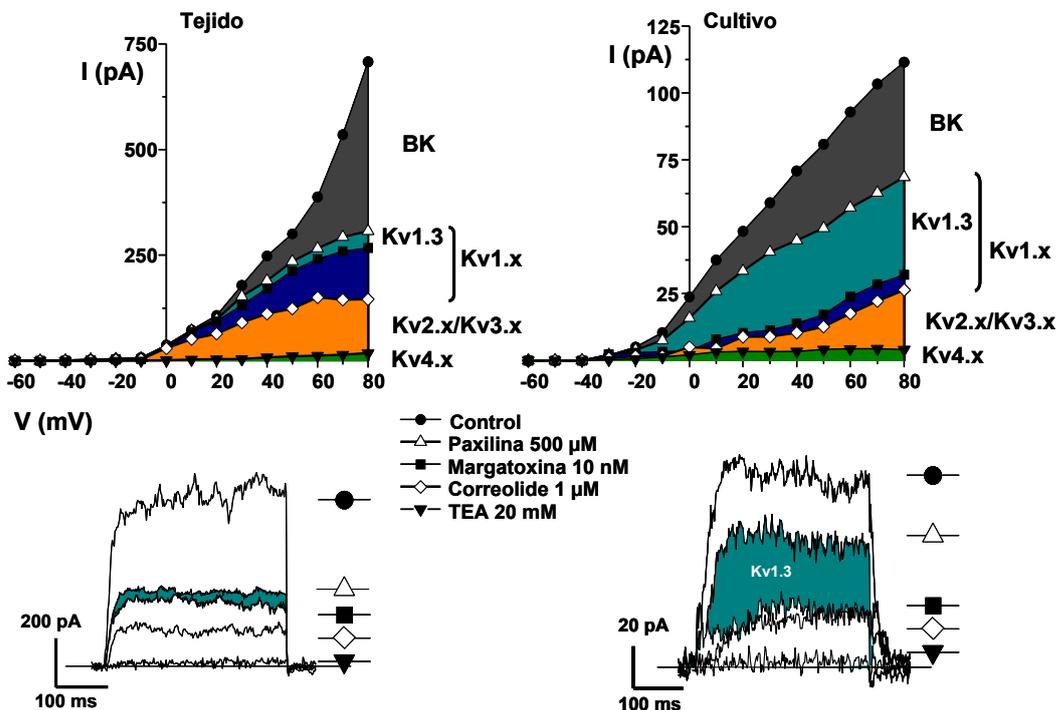


**Figura 45.** Expresión funcional de los canales Kv y BK<sub>Ca</sub> en VSMC disociadas en agudo y en cultivo. **A.** Corrientes representativas de salida de K<sup>+</sup> obtenidas aplicando pulsos despolarizantes de 10 mV desde -60 hasta +80 mV en una VSMC de arteria femoral disociada en agudo (trazos superiores) y en otra en cultivo (trazos inferiores). El potencial de reposo se fijó a -80 mV. **B.** Densidad de corriente obtenida al despolarizar a +40 mV en las dos preparaciones. La densidad de la corriente Kv se obtuvo tras la aplicación de paxillina 500 nM para bloquear el componente BK<sub>Ca</sub>, cada barra representa la media±EEM de 14-18 células. **C.** Contribución porcentual del componente Kv a la corriente total de K<sup>+</sup> para cada condición.

## Resultados

en esta preparación ha sido imposible, dada la enorme dificultad de obtener células disociadas viables a partir de las arterias con hiperplasia de la íntima.

Las corrientes de salida de  $K^+$  se estudiaron mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de *whole-cell* en VSMC disociadas en agudo y en VSMC en cultivo de arterias femorales. La Figura 45A muestra trazos representativos obtenidos en una VSMC disociada en agudo y de una en cultivo. La densidad de corriente total fue significativamente mayor a todos los voltajes en las VSMC con fenotipo contráctil (Figura 45B). La amplitud del componente Kv de esta corriente de salida de  $K^+$  se evaluó utilizando paxillina (500 nM) para bloquear el componente  $BK_{Ca}$  (Li & Cheung, 1999), y se observó que era al menos seis veces mayor en las VSMC disociadas en agudo que en las de cultivo. Para determinar la contribución de los distintos genes de canales Kv a la corriente total de salida, realizamos una disección farmacológica de las corrientes de salida de  $K^+$ , ilustrada con un ejemplo en la figura 46. La aplicación de bloqueantes selectivos del canal Kv1.3, como la margatoxina (10

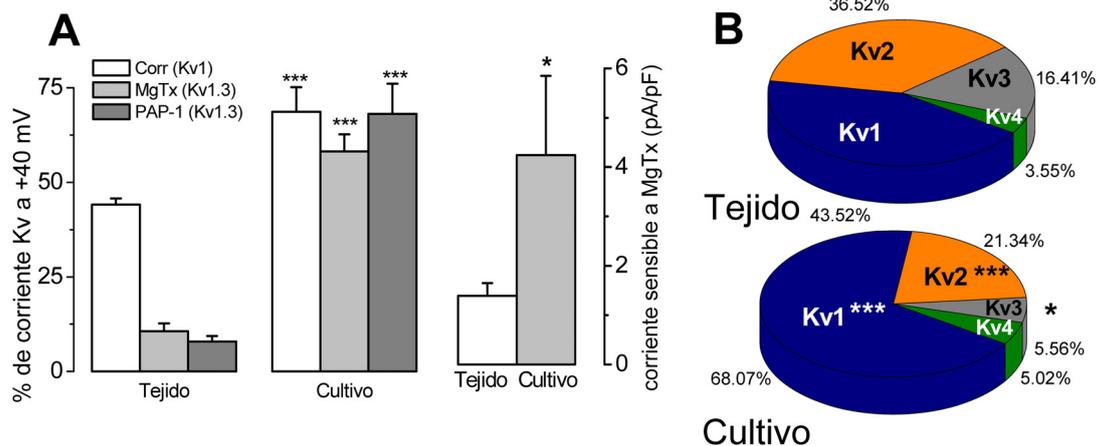


**Figura 46.** Caracterización farmacológica de las corrientes Kv en VSMC disociadas en agudo y en cultivo. Las gráficas muestran curvas I/V en presencia de paxilina 500nM (corriente Kv total), después de la aplicación de margatoxina 10nM ,correolide 5 μM, y en la presencia TEA 20mM, para cada condición. La contribución de cada componente (Kv1-Kv4) se representa mediante las áreas coloreadas. Debajo se muestran ejemplos representativos del protocolo de disección farmacológica de las corrientes Kv de una célula VSMC disociada en agudo y otra en cultivo.

nM) o PAP-1(10 nM) (Schmitz *et al.*, 2005; Beeton *et al.*, 2006) permitió cuantificar la proporción de este componente, todo ello en presencia de paxillina para bloquear las corrientes BK<sub>Ca</sub>. Después del bloqueo de la corriente Kv1.3, se usó correolide (5  $\mu$ M) para bloquear selectivamente las corrientes Kv1 restantes. Finalmente, se aplicó TEA 20 mM para identificar la amplitud de la suma de los componentes Kv2 y Kv3 (definida como la corriente sensible a TEA tras la aplicación de correolide). De nuevo, la corriente residual insensible tanto a correolide como a TEA se atribuyó a la contribución de canales Kv4. La figura 46 muestra que además de la gran disminución en la amplitud total de la corriente, hubo claras diferencias en la contribución de los diferentes canales Kv a la corriente total, cuando comparamos las corrientes de las VSMC de arteria femoral contráctiles (tejido) frente a las proliferativas (cultivo).

No observamos diferencias en la proporción de corriente BK<sub>Ca</sub> (el componente sensible a paxillina) ni de la corriente Kv (el componente insensible a paxillina) con respecto a la corriente total, al comparar ambas condiciones (Figura 45C). Sin embargo, la proporción de corrientes Kv1 (la corriente bloqueada por correolide 5  $\mu$ M) fue significativamente mayor en las células en cultivo (de un 44.12 $\pm$ 1.6% en tejido a un 68.69 $\pm$ 6.5% en cultivo). Este aumento de la proporción de la corriente Kv1 es debido al incremento de la contribución funcional de los canales Kv1.3, ya que la fracción de la corriente sensible a margatoxina representó un 58.15 $\pm$ 4.54% de la corriente Kv en VSMC en cultivo, en contraste con el 10.66 $\pm$ 2.03% de las VSMC disociadas en agudo. Se obtuvieron resultados similares con PAP-1 (10 nM), otro bloqueante selectivo de los canales Kv1.3. Así, la fracción de la corriente sensible a PAP-1 representó un 68.1  $\pm$  8% de la corriente Kv en células en cultivo y un 7.89 $\pm$  1.53% en las disociadas en agudo. El incremento en la proporción de la corriente Kv1.3 no se debe únicamente a una disminución de la contribución funcional de otros canales Kv, ya que observamos también un aumento significativo en la magnitud absoluta de las corrientes Kv1.3, como se muestra en el panel derecho de la figura 47A. La composición molecular de las corrientes Kv en ambas preparaciones se ilustra en los diagramas de la figura 47B. Además del incremento significativo en la proporción de las corrientes Kv1, las VSMC en cultivo muestran un descenso significativo en los

## Resultados

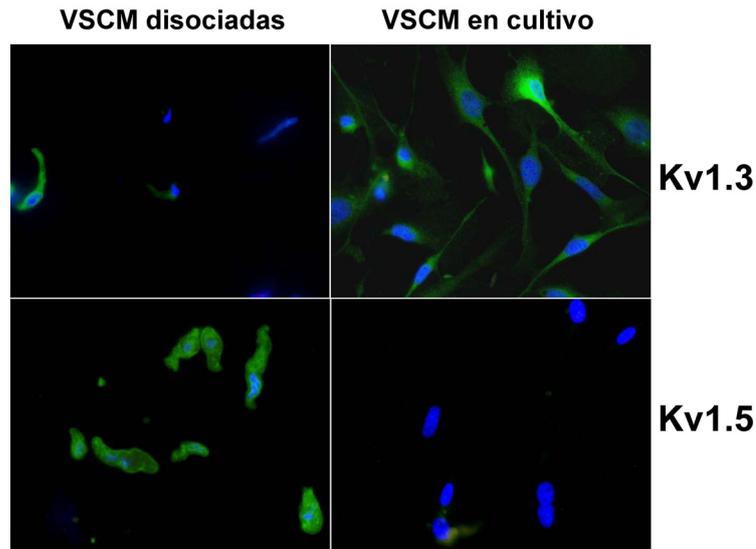


**Figura 47. A.** Distribución porcentual de los componentes Kv1-Kv4 en cada condición (Media±EEM de 6-15 células). **B.** Contribución de los componentes Kv1.x (sensible a correolide) y Kv1.3 (sensible a margatoxina y PAP-1) calculado como el % de la corriente total Kv ( $Kv_t$ ) a +40 mV en cada preparación. En la barras de la derecha se muestra la densidad de corriente sensible a margatoxina en células disociadas en agudo y en cultivo. Los datos son la media±EEM de 11-14 células.

componentes Kv2 y Kv3 de la corriente (de un  $36.52 \pm 2.97\%$  en tejido a un  $21.34 \pm 3.71\%$  en cultivo para las corrientes Kv2 y de un  $16.4 \pm 2.74\%$  en tejido a un  $5.56 \pm 0.97\%$  en cultivo para las corrientes Kv3). El componente Kv3 se estimó como la fracción de la corriente bloqueada por  $100 \mu\text{M}$  TEA después de aplicar correolide, y el componente Kv2 se calculó como la diferencia entre la corriente sensible a TEA  $20 \text{ mM}$  y la sensible a TEA  $100 \mu\text{M}$ .

### 4.2.3. Inmunocitoquímica de VSMC en cultivo y de arteria femoral con hiperplasia intimal.

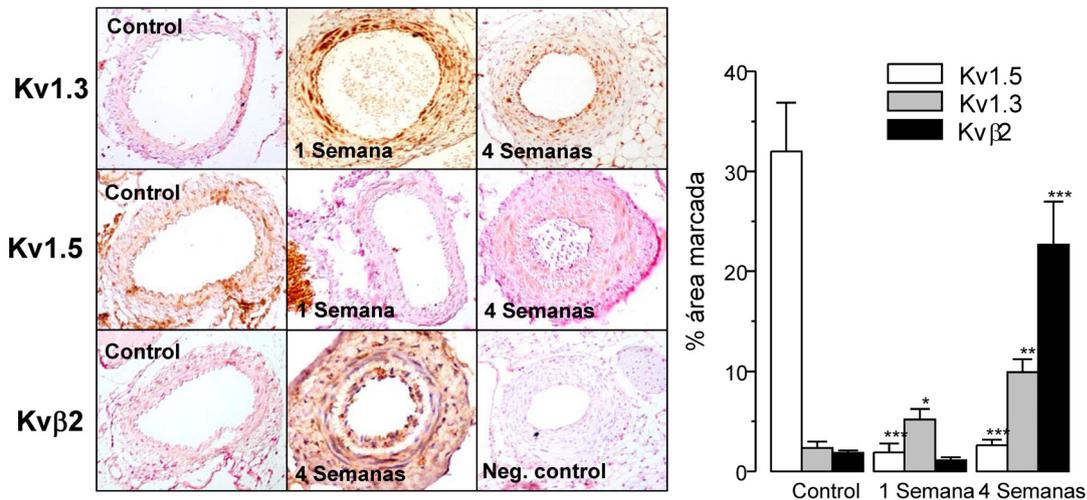
Además de la caracterización electrofisiológica, se estudió la expresión de proteína de una selección de canales con cambios en la expresión en los dos modelos de proliferación, mediante marcaje con anticuerpos fluorescentes. Los ensayos de inmunocitoquímica se llevaron a cabo en VSMC disociadas en agudo y en VSMC mantenidas en cultivo (Figura 48). Los Kvs estudiados en ambos casos fueron los canales Kv1.3 y los Kv1.5. La elección de los Kv1.5 se basó en el comportamiento opuesto de estos canales en cuanto al cambio de expresión en el fenotipo proliferativo. Los resultados muestran que mientras el marcaje con el anticuerpo anti-Kv1.5 sólo es positivo en células recién disociadas, el marcaje con el anticuerpo anti-Kv1.3 está prácticamente restringido a células en cultivo (Figura 48).



**Figura 48.** Expresión de proteína de los canales Kv1.3 y Kv1.5 en VSMC disociadas y en cultivo. Mediante inmunocitoquímica, las VSMC se incuban con los anticuerpos anti-Kv1.3 o anti-Kv1.5 (verde), y los núcleos celulares se marcan con DAPI.

También se realizaron ensayos de inmunohistoquímica de secciones de arterias femorales en condiciones control y después de la lesión endoluminal, con anticuerpos anti-Kv1.3, anti-Kv $\beta$ 2 y anti-Kv1.5 (Figura 49). Los datos inmunocitoquímicos muestran un claro aumento en el marcaje del anticuerpo frente al Kv1.3 en las VSMC en cultivo cuando las comparamos con las disociadas en agudo, produciéndose el efecto opuesto para la expresión del Kv1.5. Los datos obtenidos de las secciones de arteria femoral muestran que el marcaje frente al Kv1.3 está prácticamente ausente en las muestras control, pero hay un aumento significativo en el área marcada con el tiempo tras la lesión (particularmente después de 1 y 4 semanas), que está principalmente localizada en la íntima. Un patrón similar se observa para el caso del Kv $\beta$ 2, alrededor de un 10% de las células tras 1 y 4 semanas de la lesión están marcadas, mientras que las muestras control son negativas. En contraste, el marcaje con el anticuerpo frente al Kv1.5 se detectó en la capa muscular de al menos la mitad de las células de las arterias control, disminuyendo o prácticamente desapareciendo en las lesionadas.

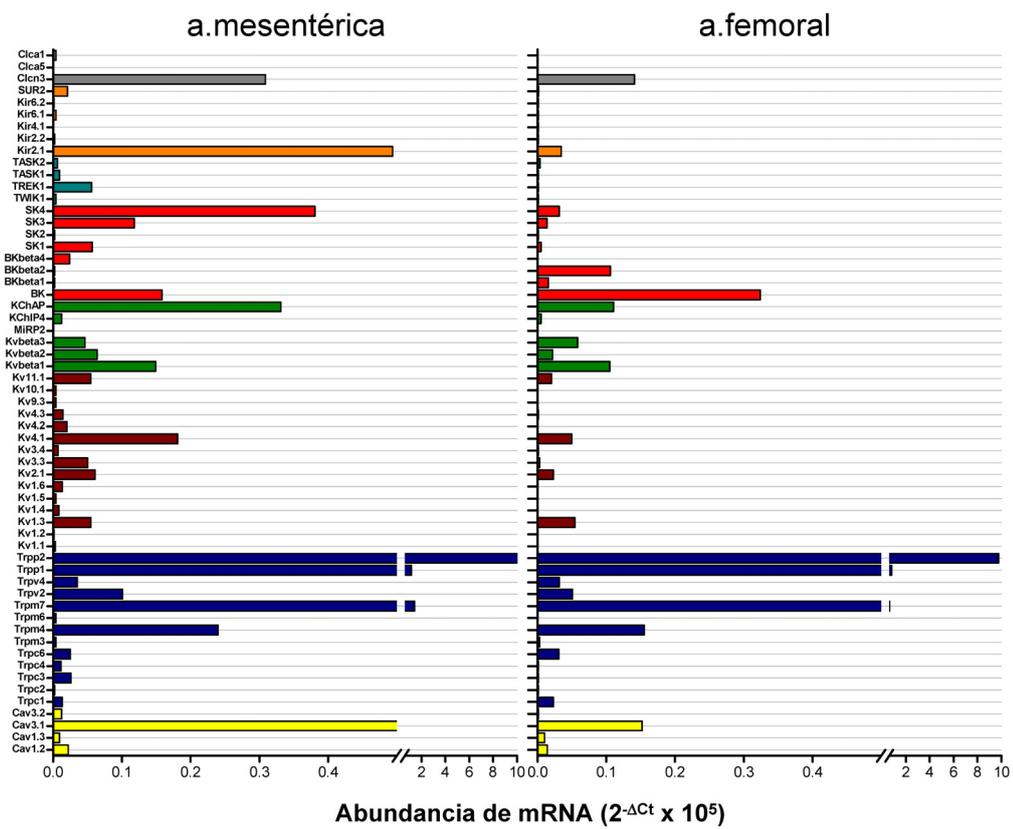
## Resultados



**Figura 49.** Expresión de proteína de los canales Kv1.3, Kv1.5 y Kvβ2 en cortes histológicos de arteria femoral tras la lesión endoluminal. Mediante inmunohistoquímica, las secciones de parafina de arterias control y lesionadas se incuban con los anticuerpos para cada uno de los canales (marrón), y los núcleos celulares se contratiñen con hematoxilina (azul). En las barras de la derecha se muestra el porcentaje de las células marcadas con cada anticuerpo a los distintos tiempos indicados. Los datos son la media  $\pm$ EEM de 10-25 secciones obtenidas de 6-13 animales distintos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  comparando con el grupo control.

### 4.2.4. Estudio del cambio fenotípico en arterias mesentéricas.

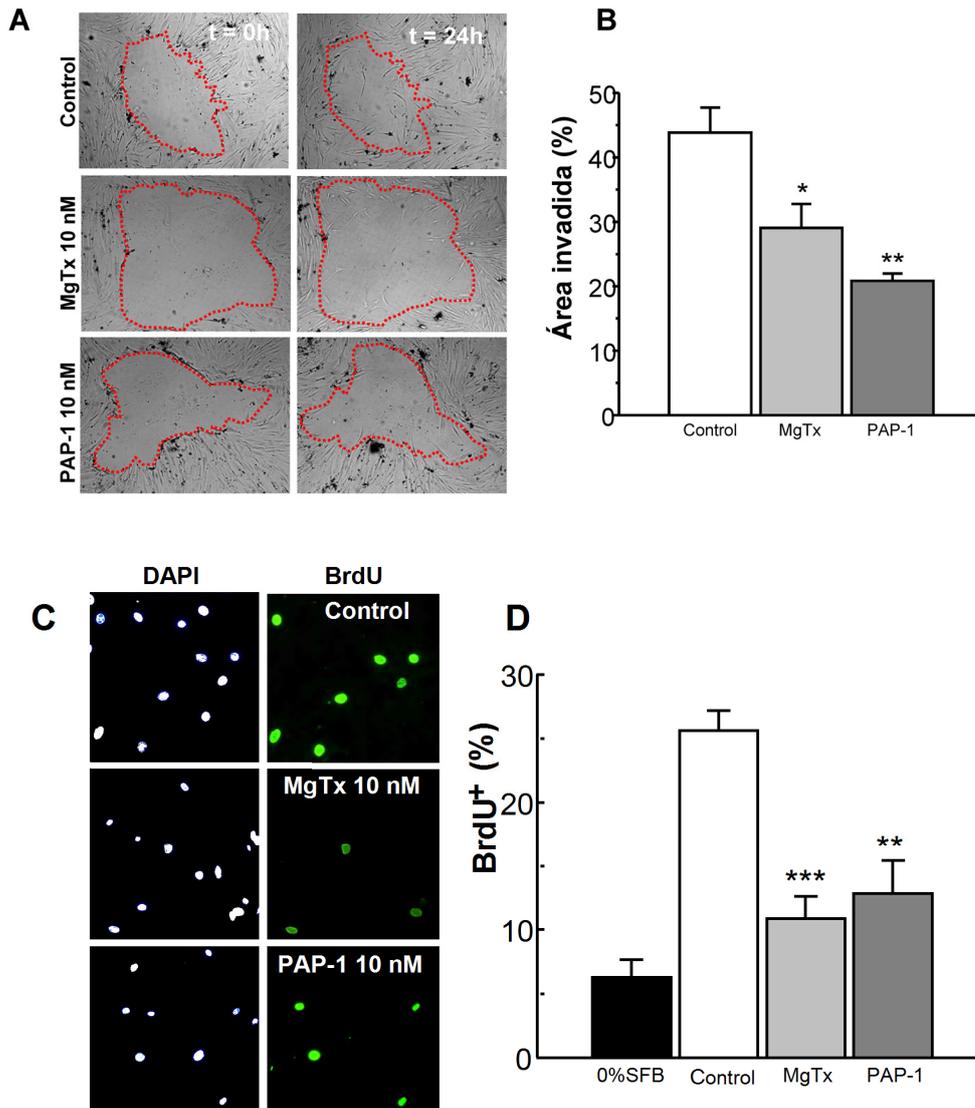
Para explorar si los cambios observados con la proliferación son específicos de lecho vascular estudiado (arteria femoral) o pueden ser extrapolados a otros vasos, hemos estudiado los cambios en el patrón de expresión de los canales iónicos de las VSMC con fenotipo contráctil o proliferativo en otro lecho vascular como es el mesentérico. Cuando se analizaron las diferencias individuales de los genes entre las VSMC contráctiles y proliferativas de arterias mesentéricas (datos no mostrados), los cambios en la expresión obtenidos eran similares a los observados en arterias femorales, aunque ninguno de los incrementos en la expresión de los genes fue significativo. No obstante, en la figura 50 se muestran los perfiles de expresión de VSMC en cultivo procedentes de arterias femorales y arterias mesentéricas. Es evidente que el patrón de expresión de los diferentes canales iónicos es muy similar en ambos lechos vasculares.



**Figura 50.** Abundancia relativa de los canales iónicos en VSMC de arteria mesentérica y arteria femoral en cultivo. Los niveles de expresión están normalizados con respecto a RP18s. La abundancia relativa se expresó como  $2^{-\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{\text{canal}} - Ct_{18s}$ . Cada barra es la media de 3-5 ensayos realizados por duplicado.

#### 4.2.5. Efecto del bloqueo del canal KV1.3 sobre la proliferación y la migración de las VSMC.

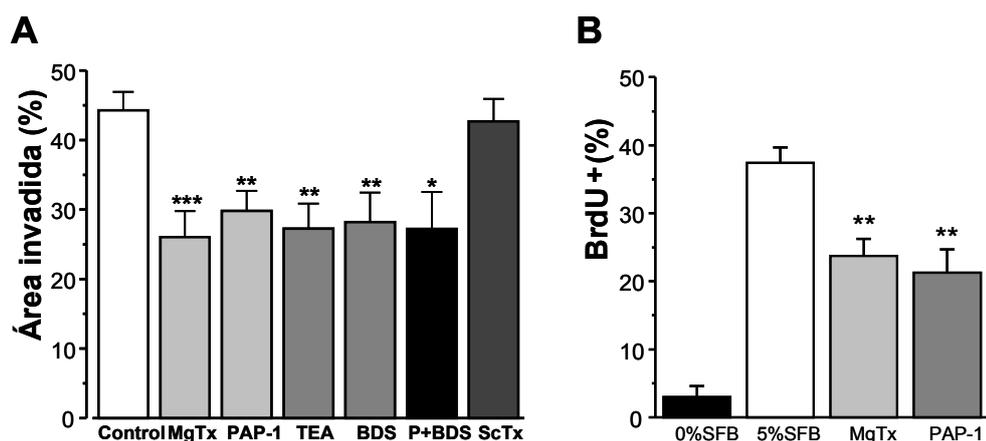
El aumento de la expresión funcional del canal Kv1.3 puede reflejar una conexión del canal con la estabilización y el mantenimiento del fenotipo proliferativo. Para investigar esta posibilidad, estudiamos el efecto de la



**Figura 51.** Estudio de la capacidad de migración y del índice de proliferación de las VSMC de arteria femoral en cultivo. **A.** Ensayo de migración en VSMC de arteria femoral en cultivo. Las imágenes muestran el área de la placa con células a tiempo 0 y a 24 horas tras el raspado. Se presentan ejemplos en condiciones control y con bloqueantes del Kv1.3. **B.** las barras representan el porcentaje de área invadida en las diferentes condiciones experimentales. **C.** Ensayo de incorporación de BrdU. En la columna izquierda, marcaje con DAPI de los núcleos celulares; en la columna derecha, marcaje en verde de las células que han incorporado BrdU en condiciones control y en presencia de distintos bloqueantes del Kv1.3. **D.** Las barras representan el porcentaje de células BrdU positivas en las diferentes condiciones estudiadas.

supresión farmacológica selectiva de esta corriente sobre la capacidad de migración y proliferación de las VSMC en cultivo. La migración se examinó en células musculares obtenidas de arteria femoral y mantenidas en cultivo, mediante un ensayo de rascado (descrito en la sección de métodos). Las células se mantuvieron 24 horas tras el rascado en un medio libre de suero para minimizar la proliferación, con o sin los bloqueantes específicos de los canales Kv1.3 (PAP-1 10 nM o margatoxina 10 nM). El área invadida tras el rascado fue significativamente mayor en las células control que en las tratadas con los bloqueantes del Kv1.3, tal y como se muestra en la figura 51(A yB). De modo similar, el índice de proliferación, determinado por el número células que incorporan BrdU, se vio significativamente disminuido en los cultivos tratados con margatoxina o PAP-1 al compararlos con los cultivos control (Figura 51C y D). Estos datos indican que el aumento en la expresión de los canales Kv1.3 contribuye a la capacidad migratoria y proliferativa de las VSMC de arteria femoral.

Estos resultados son similares a los que nuestro grupo ha descrito previamente en VSMC de arteria uterina humana para los canales Kv3.4 (Miguel-Velado *et al.*, 2005). Sin embargo, en esa preparación también se ha descrito un aumento en la expresión del canal Kv1.3 en el fenotipo proliferativo, por lo que también hemos estudiado si los canales Kv1.3 pueden modular la



**Figura 52.** Estudios migración y proliferación en VSMC de arteria uterina humana. **A.** Ensayo de migración donde las barras representan el porcentaje de arrea invadida en las diferentes condiciones experimentales. **B.** Ensayo de proliferación donde las barras representan el porcentaje de células BrdU positivas en las diferentes condiciones estudiadas.

## *Resultados*

migración y la proliferación de las VSMC de arteria uterina humana. Los datos que se muestran en la figura 52 indican que la aplicación de PAP-1 o margatoxina también reduce la migración y la proliferación de las VSMC de las arterias uterinas humanas, sugiriendo que la asociación entre el aumento de la expresión de los canales Kv1.3 y la proliferación de las VSMC puede constituir un mecanismo general, presente en distintas especies y lechos vasculares.

# 5 **Discusión**



## 5.1. REMODELADO DE CANALES DE K<sup>+</sup> Y SUS IMPLICACIONES PARA EL CAMBIO DEL TONO VASCULAR EN UN MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ESENCIAL.

En este trabajo hemos empleado preparaciones de tres lechos vasculares con diferentes características: arteria aorta (arteria de conducción), arteria mesentérica (arteria de resistencia) y arteria femoral, que presenta propiedades intermedias. La aorta es una arteria elástica cuya misión es distribuir la sangre a todo el sistema vascular y amortiguar los cambios de presión producidos por el impulso ventricular intermitente. Las grandes arterias, como la aorta y también la femoral, aunque tienen capacidad para la contracción y dilatación no están implicadas en la regulación de la presión y el flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo las arterias mesentéricas son arterias de resistencia y están involucradas tanto en la regulación de la presión arterial como en el aporte y distribución del flujo sanguíneo al intestino.

Valiéndonos de VSMC de los dos tipos arteriales extremos, arterias aortas y mesentéricas, de un modelo de ratones con hipertensión esencial (BPH: *Blood Pressure High*) y de sus respectivos controles normotensos (BPN: *Blood Pressure Normal*), hemos realizado un análisis global del perfil de expresión de los canales iónicos presentes en estos tipos celulares para tratar de conocer el conjunto de canales característicos de la hipertensión en ambos lechos, así como su implicación en el control del tono vascular. Este ambicioso estudio aporta datos de enorme valor para la comprensión de las bases moleculares de alteraciones vasculares como la hipertensión. Asimismo, es de esperar que la identificación del perfil de expresión de canales iónicos específico de la hipertensión esencial, proporcione nuevas dianas moleculares para la prevención y el tratamiento farmacológico de la hipertensión esencial.

Nuestros resultados reflejan una mayor complejidad en el perfil de expresión de los canales iónicos en las arterias mesentéricas (Figuras 25 y 28). Éstas expresan con una abundancia media-alta un mayor abanico de canales iónicos, entre los que encuentran los canales K<sub>v</sub> y K<sub>Ca</sub>. Sin embargo en las arterias aortas, el repertorio de canales con una expresión media-alta es menor. En el caso concreto de los canales K<sub>v</sub> existen diferencias muy significativas en los niveles de expresión, siendo muy bajo en arterias de conducción (en aortas), y

## Discusión

medio-alto en arterias de resistencia (mesentéricas) lo cual está de acuerdo con su contribución al tono miogénico (Cole *et al.*, 2005;Plane *et al.*, 2005). Asimismo, en lo que se refiere a las variaciones en sus niveles de expresión en condiciones de hipertensión, también son muy diferentes en ambos lechos vasculares: observamos una reducción generalizada de todos ellos en aorta y sólo dos cambios (la reducción de Kv4.1 y la aparición *de novo* de la subunidad accesoria Kv6.3) en las arterias mesentéricas.

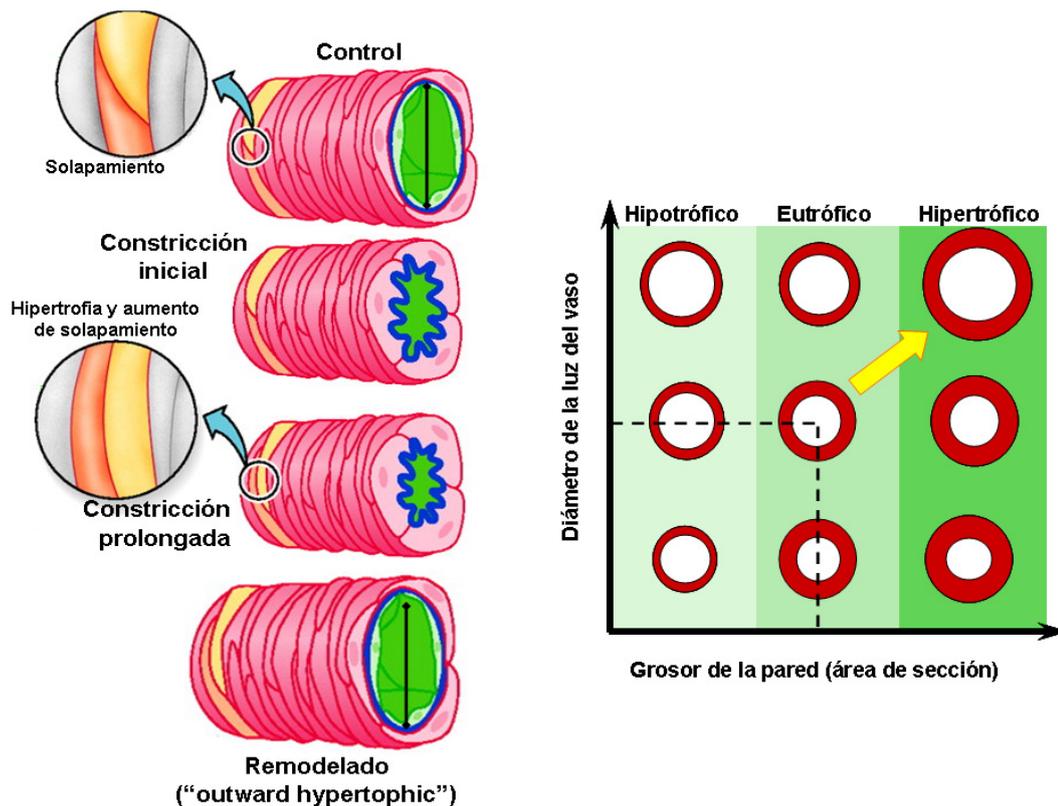
### **5.1.1. Cambios morfológicos de las arterias mesentéricas en el modelo de hipertensión.**

La hipertensión esencial se caracteriza por un aumento de las resistencias periféricas. La parte más distal de la vasculatura arterial, formada por pequeños vasos (con un diámetro menor de 500 micras en humanos) y arteriolas (arterias que finalizan en los capilares) contribuye de forma determinante al valor global de la resistencia arterial. El aumento de la resistencia periférica es debido en parte al estrechamiento de las arterias de resistencia, y en parte a la reducción de número de arteriolas. Existen numerosas evidencias que describen un cambio en la estructura de los vasos en la hipertensión (Mulvany, 2002;Briones *et al.*, 2006). Este proceso, que se denomina remodelado vascular, resulta, en el caso de las arterias de resistencia, en un aumento de la relación pared-luz del vaso (un engrosamiento de la pared con disminución de la luz). Sin embargo, en las grandes arterias de conducción, se produce una hipertrofia de la pared del vaso hacia el exterior sin disminución de la luz (Prewitt *et al.*, 2002). Al aumento de las resistencias periféricas debido al estrechamiento de las arterias de resistencia, contribuye también el aumento de tono vascular definitorio de la hipertensión.

Cuando comparamos las características morfológicas de arterias mesentéricas de los animales BPN y BPH, observamos una hipertrofia evidente de las VSMC de los animales hipertensos (Figura 27). A pesar de que el peso de los animales BPH es significativamente menor, las arterias mesentéricas del mismo orden (2º) tienen un área mayor, tanto total, como de la luz y de la túnica media, sin que varíe el número de VSMC. Estas modificaciones estructurales se han descrito como remodelado “hipertrófico expansivo” (“*outward hypertrophic*”) de la arteria (Mulvany, 2002) y se representan

gráficamente en el esquema de la figura 53. El aumento mantenido de la vasoconstricción en una arteria de resistencia da lugar a una reordenación de las células musculares de su pared, produciéndose una hipertrofia que se asocia a un elongamiento y un aumento del solapamiento entre células. Este remodelado permite que las VSMC se adapten al aumento mantenido de tensión y se mantengan funcionales, para responder con constricción o relajación a estímulos superpuestos a esta nueva situación basal.

La hipertrofia de las VSMC observada en animales BPH reflejaría una fase inicial en el desarrollo de la hipertensión, en la que el aumento del tamaño de las células musculares representa la respuesta de los vasos de tamaño medio a cambios distales en la presión arterial. En fases más avanzadas, o en respuesta a hipertensiones más severas, se ha descrito en diversos modelos animales la existencia de una disminución de la luz del vaso con un aumento



**Figura 53.** Esquema del proceso de remodelado observado en las arterias mesentéricas de los animales BPH (parte izquierda) y de la nomenclatura utilizada para definir las distintas situaciones (derecha). La luz del vaso puede aumentar o disminuir y esto se puede asociar a cambios en la masa de la pared muscular (su grosor), que puede aumentar (hipertrofia), disminuir (hipotrofia) o permanecer sin cambios (eutrofia). La flecha indica el cambio observado en nuestro modelo de arterias mesentéricas de animales BPH

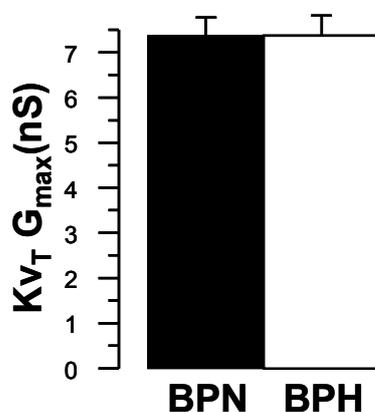
## Discusión

de grosor de la pared vascular (remodelado eutrófico hacia adentro) en las arterias musculares.

En contraste con los cambios producidos en el fenotipo diferenciado de las VSMC en aterosclerosis y lesión vascular, la hipertensión arterial, al menos en sus fases tempranas no esta asociada con alteraciones del estado diferenciado de las VSMC. De hecho se ha sugerido que el aumento del tamaño de las arterias hipertensas puede representar un mecanismo adaptativo para normalizar el incremento en la tensión de la pared vascular, como resultado de elevaciones en la presión arterial. Por ello, mientras que el aumento de las VSMC en modelos experimentales de aterosclerosis y de lesión vascular se debe principalmente a la migración y proliferación de las VSMC, la hipertrofia de las arterias de animales con hipertensión crónica se debe casi exclusivamente a un aumento del tamaño de las VSMC preexistentes en el vaso (hipertrofia celular, (Owens, 1995).

### 5.1.2. Contribución funcional de las corrientes Kv en VSMC de arteria mesentérica.

Cuando estudiamos la contribución funcional de las corrientes Kv en las

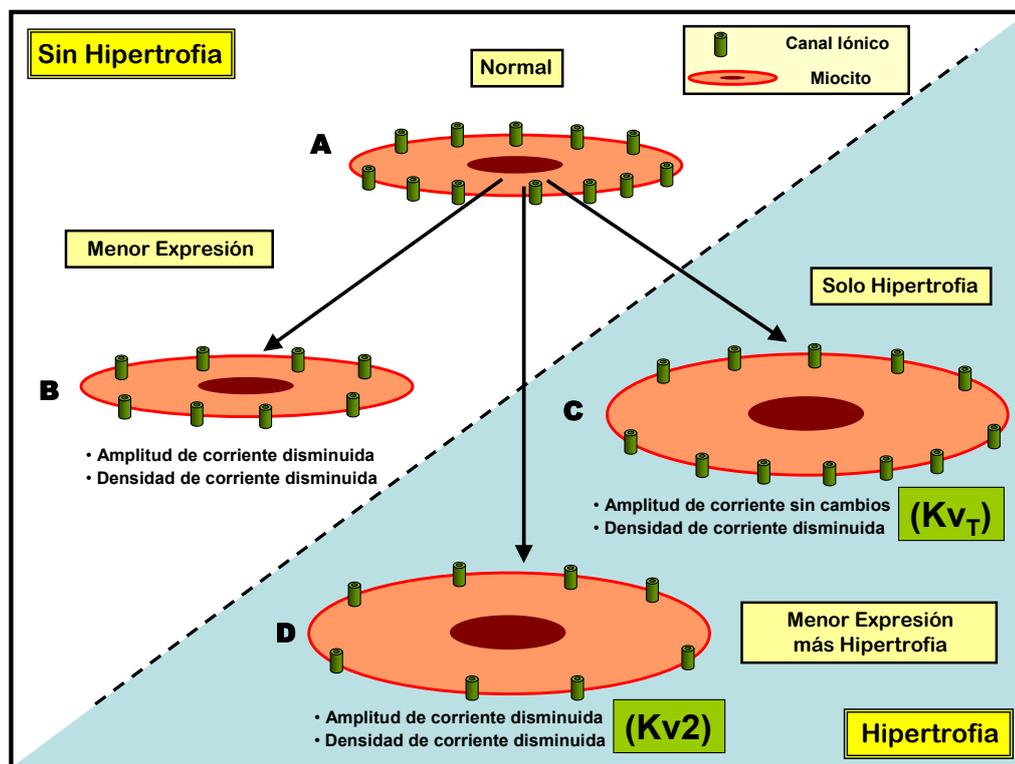


**Figura 54.** Conductancia máxima  $G_{max}$  de la corriente Kv total a +80mV calculada a partir de 22 células BPN y 22 células BPH.

VSMC de arteria mesentérica observamos una disminución significativa de la densidad de corriente total de salida de  $K^+$  en las células BPH, a todos los voltajes estudiados. Este hecho se debe en parte al mayor tamaño de las células BPH al compararlas con las BPN, ya que al normalizar la corriente por la capacidad de cada célula, ésta disminuye significativamente en el caso de los animales hipertensos. Sin embargo la

amplitud total de esta corriente (sin normalizar por la capacidad) se mantiene igual en ambas preparaciones (Figura 54).

A su vez, esta disminución de la densidad de corriente Kv de las VSMC de ratones BPH puede ser atribuida a la menor amplitud de los componentes Kv1 y Kv2 de la corriente en estas células. Sin embargo, aunque la contribución porcentual de la corriente Kv1 a la Kv total es parecida en las VSMC BPN y BPH, tanto la densidad de corriente como la contribución porcentual de las corrientes Kv2, fueron significativamente menores en las células BPH (Figura 33). Se han sugerido (Nattel, 2008) dos procesos distintos involucrados en los cambios de las corrientes iónicas; uno celular, que supondría el aumento de tamaño o hipertrofia de las VSMC y otro molecular, en el que se producirían alteraciones en la cantidad de las subunidades de los canales iónicos (Figura 55). La amplitud de la corriente total está definida por el número total de canales iónicos por célula, mientras que la densidad de corriente está definida por el número de canales por unidad de superficie de membrana. En la figura 55 observamos distintos ejemplos donde varían la amplitud o la densidad de la corriente en función de la expresión de los canales iónicos y del tamaño celular.



**Figura 55.** Mecanismos que conducen a una disminución de la densidad de corriente de la membrana. **A.** célula normal. **B.** Célula con menor expresión de canales, en ausencia de hipertrofia. **C.** Célula con hipertrofia pero sin cambios en la expresión de canales. **D.** Célula, tanto con hipertrofia como con reducción en la expresión de canales. Modificado de (Nattel, 2008)

## *Discusión*

Por ejemplo en la situación B hay un menor número de canales sin cambios en el volumen celular, con lo cual observamos una disminución tanto la amplitud como la densidad de corriente. En la situación C el número total de canales no cambia por lo que la amplitud de corriente permanece inalterada, sin embargo a causa de la hipertrofia celular la relación canal-unidad de superficie es menor, disminuyendo así la densidad de corriente. Este ejemplo se correspondería con el caso de la corriente Kv total en nuestra preparación donde la amplitud de corriente es igual en BPN y BPH, pero la densidad de corriente disminuye en las VSMC hipertensas debido al mayor tamaño celular. En la situación D se muestra una célula con hipertrofia en la que a su vez sufre una reducción la expresión de los canales iónicos, causando tanto una disminución de la amplitud como de la densidad de corriente, y esta situación refleja muy bien el comportamiento del componente Kv2 de la corriente en nuestro modelo de hipertensión.

Sin embargo al permanecer inalterada la corriente Kv total en ambas preparaciones (BPN y BPH), la disminución de la contribución funcional del componente Kv2 debería de venir acompañada del remodelado positivo de otros canales Kv que nivelara esta descompensación de la corriente. Esta compensación se podría explicar gracias a la tendencia al aumento que se observa en la contribución porcentual de la corriente Kv1 a la  $Kv_T$  en las células BPH, pese a no ser significativa (Figura 34C), junto a un aumento del componente residual de la corriente en estas células.

El concepto clave detrás de este matiz es que el remodelado de los canales ha de ser estudiado en el contexto de los cambios globales en el tamaño celular. No es necesario que haya una regulación a la baja de la expresión de un gen para que se produzca una disminución en su función, ya que es suficiente con que el producto de este gen no aumente en la misma proporción que el tamaño celular. De esta forma, la reducción en la densidad de corriente a través de un canal puede ser consecuencia de que la transcripción del canal no se modifique en la misma medida en la que lo hacen la transcripción de las proteínas que determinan el tamaño y el volumen celular. Un corolario adicional de esta línea de argumentación, es que para comprender los mecanismos reguladores que determinan el remodelado de los canales iónicos en la

hipertensión, debemos considerar las **alteraciones en la densidad de corriente**, ya que nos proporcionan una medida del cambio en la expresión de las proteínas de los canales en relación con los cambios en la expresión de otras proteínas que determinan la hipertrofia celular.

### **5.1.3. Modulación de las corrientes Kv2 por las subunidades reguladoras Kv6.3.**

La disminución de la densidad de corriente Kv2 en las VSMC BPH puede explicarse en base al aumento de tamaño de las células causado por la hipertrofia. Sin embargo, hay además una disminución en la amplitud de la corriente Kv2 que no correlaciona con los niveles de expresión del mRNA del canal Kv2, puesto que no se observan diferencias entre normotensos e hipertensos en la expresión del canal Kv2.1. Puesto que hay otro miembro de esta familia, el Kv2.2, que no estaba incluido en los arrays, estudiamos sus niveles de expresión mediante una sonda Taqman en muestras de arterias mesentéricas BPH y PBN, y no detectamos su expresión en ningún caso (datos no mostrados). Sin embargo la expresión de “*de novo*” del Kv6.3 en células BPH podría dar respuesta a este fenómeno, ya que está descrito que estas subunidades se asocian con canales Kv2 disminuyendo su amplitud de corriente y modificando a su vez otras propiedades cinéticas del canal. Por lo tanto, la disminución de la densidad de corriente Kv2 en células BPH no se debería a una disminución de la expresión del canal, sino a la modulación funcional negativa de la proteína del canal por su asociación con subunidades Kv6.3.

La subunidad Kv6.3 pertenece a una de las subfamilias de subunidades  $Kv\alpha$  *eléctricamente silenciosas* (subunidades  $\gamma$ ), que comprende todos los miembros de las familias Kv5-Kv6 y Kv8-Kv9. Estas subunidades no forman canales funcionales cuando se expresan por si solos, pero coensamblan con subunidades Kv2.1 y Kv2.2 para conformar canales heterotetraméricos (Salinas *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Post *et al.*, 1996; Ottschytch *et al.*, 2002). Se han descrito cambios en las propiedades electrofisiológicas de los canales Kv2 al asociarse con subunidades  $\gamma$ , entre los que se incluyen, una disminución de la amplitud de corriente, cambios en la voltaje dependencia de la activación e inactivación, en el curso temporal de la activación, inactivación y deactivación,

## Discusión

y en la sensibilidad a drogas de los canales heteromultiméricos. En el caso del Kv6.3, se han publicado únicamente unos pocos estudios (Sano *et al.*, 2002; Vega-Saenz de Miera EC, 2004; Ottschytsch *et al.*, 2002) en los cuales las modificaciones descritas no coinciden en su totalidad, razón por la cual diseñamos el estudio comparativo (corrientes Kv2.1 frente a Kv2.1/Kv6.3) en células HEK transfectadas. Observamos una disminución de la amplitud de corriente en heterotetrámeros Kv2.1/Kv6.3 que ha sido previamente descrita en uno de los estudios mencionados con anterioridad (Vega-Saenz de Miera EC, 2004). En lo que respecta a los cambios cinéticos, observamos un enlentecimiento de la activación (de acuerdo con los datos de Vega-Saenz de Miera y de la deactivación (descrito por (Sano *et al.*, 2002). Finalmente, apreciamos un desplazamiento hacia la izquierda en la curva de activación en el estado estacionario en presencia de los canales Kv6.3 como ha sido descrito por Ottschytsch *et al.*

Nuestros datos indican que todas las diferencias entre las corrientes nativas Kv2 de las preparaciones BPN y BPH se pueden explicar con facilidad, asumiendo que mientras que en las VSMC de ratones BPN estas corrientes están producidas por homomultímeros Kv2.1, en las células BPH están mediadas principalmente por heterocomplejos Kv2.1/Kv6.3. Las ligeras diferencias en la cinética de las corrientes al comparar los complejos Kv2.1/Kv6.3 de células HEK y las corrientes Kv2 de células BPH se pueden explicar por la mayor proporción Kv6.3:Kv2.1 existente en las células HEK, donde los efectos de la expresión de Kv6.3 estarían exagerados al máximo. Esta estrategia se utiliza para maximizar la probabilidad de canales heteromultiméricos y poder establecer una comparación más fiable entre las células expresando sólo el canal Kv2.1 y las células que mayoritariamente expresan heteromultímeros Kv2.1/Kv6.3. Representa por tanto un caso extremo que puede no ser la situación “in vivo” en las VSMCs de animales BPH, que probablemente expresen una mezcla de homo- y heteromultímeros de Kv2.1. Otra alternativa posible, que en el caso de esta subunidad no se ha estudiado en detalle, es que todas las corrientes Kv2 nativas de los animales BPH sean heteromultímeros Kv2.1/Kv6.3, pero que exista una gradación en los

cambios en función del número de subunidades Kv6.3 presentes en cada canal individual.

Nuestra conclusión con respecto a los componentes moleculares de las corrientes Kv2 se ve también reforzada por los datos de expresión de mRNA y de proteína, y por el bloqueo funcional de las corrientes con el anticuerpo anti-Kv6.3. El bloqueo inmunológico de los canales Kv, es una herramienta muy convincente para analizar el papel de una subunidad particular bajo condiciones fisiológicas distintas y ha sido ampliamente utilizado (Archer *et al.*, 2004; Archer *et al.*, 1998; Conforti *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2002). Aunque la ausencia de una estimación de la afinidad del anticuerpo nos impide extraer resultados concluyentes acerca de la contribución cuantitativa de los canales que contienen subunidades Kv6.3 a las corrientes Kv2 en las células BPH, el hecho de observar una disminución de la corriente en todas las células BPH y ninguna en el caso de las BPN, nos permite concluir que la proteína Kv6.3 no se expresa funcionalmente en estas células BPN. Finalmente, nuestra observación de los cambios en el perfil farmacológico de las corrientes mediadas por heteromultímeros Kv2.1/Kv6.3 es también consistente con esta interpretación. De hecho, nuestras observaciones nos permiten proponer que el estudio de la sensibilidad relativa a ScTx y GxTx de las corrientes Kv2 puede ser una herramienta muy útil para investigar su correlato molecular, ya que mientras que la sensibilidad a ScTx de los homo o heteromultímeros es la misma, la eficacia como bloqueante de GxTx disminuye notablemente en presencia de subunidad accesoria Kv6.3.

También se ha demostrado que la actividad deficiente de los canales Kv2 contribuye a la disfunción arterial durante la hipertensión dependiente de angiotensina-II (Amberg & Santana, 2006). Sin embargo, hay cuantiosas discrepancias en la literatura en cuanto a la contribución de los distintos canales iónicos a la alteración del tono vascular durante la hipertensión, debido a diferencias en el diseño experimental, en el modelo de hipertensión a estudio, y probablemente lo más importante, en los tipos de preparación vascular utilizados. Como los cambios inducidos por la hipertensión en el perfil de expresión de los canales son específicos del lecho vascular, la caracterización

## Discusión

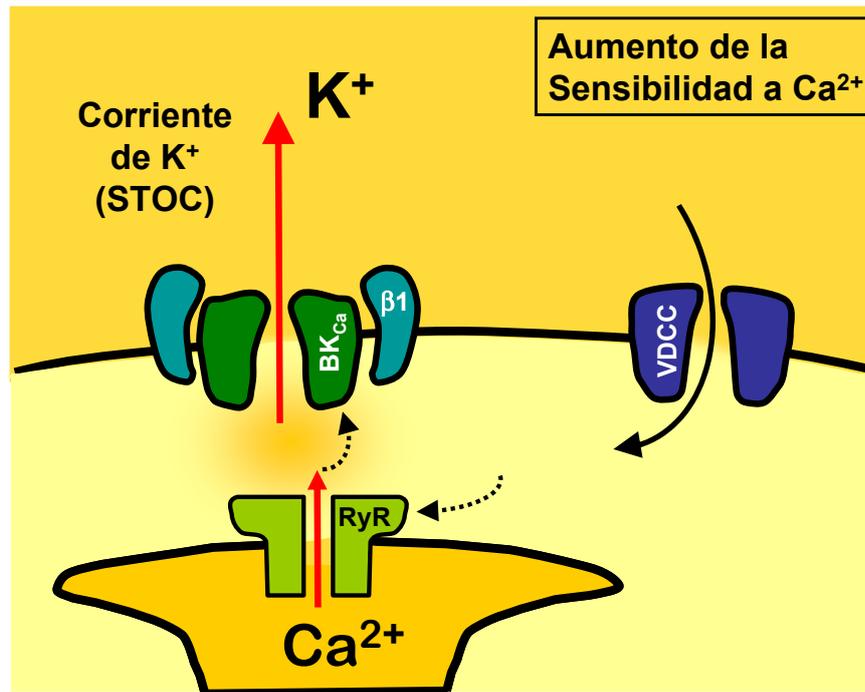
del perfil de expresión es un prerrequisito para determinar el impacto funcional de los cambios inducidos por la hipertensión en una preparación.

Nuestros hallazgos proporcionan evidencias moleculares y funcionales que apoyan las hipótesis de que la expresión “*de novo*” de la subunidad accesoria Kv6.3 (que conduce a la modulación de las corrientes Kv2) puede ser un componente activo en el desarrollo natural de la hipertensión. La gran diferencia en la expresión del gen *Kcng3* que se manifestó en las VSMC de arteria mesentérica, y que no se reprodujo en el caso de las de aorta, la detección de la proteína Kv6.3 en VSMC de arteria mesentérica de BPH (y no en las de BPN), y la caracterización funcional de las corrientes Kv en células de arteria mesentérica muestran cambios que concuerdan con la presencia de canales heterotetraméricos Kv2.1./Kv6.3. Finalmente, los experimentos de bloqueo con el anticuerpo anti-Kv6.3 ponen de manifiesto un papel funcional de esta subunidad únicamente en las VSMC de animales hipertensos.

### 5.1.4. Modulación de los canales BK<sub>Ca</sub> por las subunidades reguladoras β1.

Los canales BK<sub>Ca</sub> juegan un papel central en la regulación del tono vascular debido a su activación por aumentos locales de la  $[Ca^{2+}]_i$  (*calcium sparks*) por la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo (Ledoux *et al.*, 2006). Estos aumentos locales de  $Ca^{2+}$  generan corrientes transitorias espontáneas de salida de  $K^+$  (STOCs) producidas por los canales BK<sub>Ca</sub> que hiperpolarizan la célula, actuando como un sistema de retroalimentación negativo que tiende a autolimitar la vasoconstricción e impedir el vasoespasmo. En el músculo liso vascular estos canales se asocian con subunidades accesorias (BK<sub>Ca</sub>β1) que modulan la afinidad por  $Ca^{2+}$  de los canales BK<sub>Ca</sub>, propiciando el acoplamiento entre los sparks de  $Ca^{2+}$  y las corrientes espontáneas de salida de  $K^+$  (Figura 56).

Como se ha comentado en la introducción, todas las células musculares utilizan el  $Ca^{2+}$  como señal para la contracción. Cuando el detonante de la contracción es la despolarización de la membrana, este  $Ca^{2+}$  entra en las células a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VDCC) tipo L situados en la membrana celular. El aumento subsiguiente de la  $[Ca^{2+}]_i$  global



**Figura 56.** Papel fisiológico propuesto para la subunidades  $\beta 1$  de los canales  $BK_{Ca}$  de músculo liso, confiriendo la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  requerida para el acoplamiento efectivo entre los *sparks* de  $Ca^{2+}$  y los STOCs. Las elevaciones locales en la  $[Ca^{2+}]_i$ , se producen en microdominios donde los canales de  $Ca^{2+}$  (VDCC), los canales  $BK_{Ca}$ , e incluso los receptores de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico están estrechamente colocalizados. (Orio *et al.*, 2002)

induce la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los compartimentos intracelulares, fundamentalmente desde el retículo endoplásmico (liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release) a través de la activación de receptores de rianodina. Las VSMCs son especiales en el sentido de que la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo además de contribuir a la contracción inicia un proceso de retroalimentación negativo para inducir la relajación, lo cual implica la existencia de un proceso fuertemente regulado en el que intervienen cambios dinámicos sutiles que tienen en cuenta las diferencias entre los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ . La localización de los canales  $BK_{Ca}$  en la proximidad de los receptores de rianodina del retículo les va a permitir participar de forma esencial en el proceso de relajación y su composición molecular es determinante para definir el rango de  $[Ca^{2+}]_i$  en el que se activan. En condiciones normales, la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo genera aumentos locales del  $Ca^{2+}$  que activan a los canales BK, con lo cual se produce la hiperpolarización de la membrana, el cese de la entrada de  $Ca^{2+}$  por los VDCC y la relajación. Este sistema regula

## Discusión

de forma dinámica el equilibrio entre contracción y relajación y contribuye de forma esencial al mantenimiento del tono basal (Knot *et al.*, 1998).

Por este motivo, aunque los canales BK<sub>Ca</sub> son ubicuos, su expresión en VSMCs es particularmente elevada. Las cuatro subunidades accesorias de estos canales identificadas hasta la fecha ( $\beta$ 1- $\beta$ 4) tienen por el contrario un patrón de distribución más específico en los tejidos, y efectos diferentes en la cinética y la farmacología de los canales BK<sub>Ca</sub>. De ellas, la subunidad  $\beta$ 1 es especialmente prevalente en el músculo liso (Knaus *et al.*, 1994b; Tanaka *et al.*, 1997), donde su asociación contribuye a cambios en la cinética de los canales heteromultiméricos y al aumento de su sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (McManus *et al.*, 1995). De hecho el canal BK<sub>Ca</sub> de músculo liso es mucho más sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  que el canal BK<sub>Ca</sub> del cerebro o del músculo esquelético debido a la expresión específica de esta subunidad  $\beta$ , que aumenta de forma dramática la potencia y la eficacia del  $\text{Ca}^{2+}$  promoviendo la apertura del canal (Sweet & Cox, 2009). Este papel de la subunidad  $\beta$ 1, junto con los estudios que demuestran que los canales BK<sub>Ca</sub> de VSMC son predominantemente heteromultímeros en los que esta subunidad está siempre presente (Tanaka *et al.*, 1997), sugieren un papel importante de esta subunidad regulando la función de los canales y en consecuencia el tono vascular. En este sentido, se ha descrito que la hipertensión inducida por Angiotensina-II en ratas se asocia con una menor expresión de la subunidad  $\beta$ 1 de los canales BK<sub>Ca</sub> en VSMC de arteria cerebral (Amberg *et al.*, 2003b). También se han descrito los mismos cambios en hipertensión genética de ratas SHR (Amberg & Santana, 2003) y concuerdan con los resultados obtenidos en ratones knockout para la  $\beta$ 1, en los que la ausencia de esta subunidad reguladora produce una desensibilización de los canales BK<sub>Ca</sub> por el  $\text{Ca}^{2+}$  y una disminución de la eficiencia del acoplamiento *spark*-STOC, promoviendo un incremento del tono vascular y de la presión arterial (Brenner *et al.*, 2000b).

Los datos de expresión en nuestro sistema son consistentes con este modelo. En primer lugar, observamos que, con la excepción de los canales *trpp2*, cuyo papel funcional se desconoce, la expresión relativa del mRNA mensajero de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ 1 de los canales BK<sub>Ca</sub> es la más elevada de todos los genes de canales en todos los lechos vasculares estudiados.

Además, mostramos que existe una disminución en los niveles de expresión del mRNA de las subunidades BK<sub>Ca</sub>β1 y BK<sub>Ca</sub>α de las VSMC de BPH (Figura 28) y el estudio funcional revela una disminución de la amplitud de las corrientes BK<sub>Ca</sub> y lo que es más importante, una disminución en la sensibilidad a la modulación por Ca<sup>2+</sup> de las corrientes en esta preparación (Figuras 30 y 31). En el momento actual estamos diseñando y realizando estudios más detallados para confirmar el papel fisiológico de los canales BK<sub>Ca</sub> en nuestro modelo, así como su contribución al desarrollo de la hipertensión. Sin embargo, los datos preliminares obtenidos que presentamos en este trabajo son consistentes con los datos previos existentes en la literatura (Amberg *et al.*, 2003a; Brenner *et al.*, 2000a; Sausbier *et al.*, 2005), y nos permiten sugerir que la disminución aparente de la sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> de los canales BK<sub>Ca</sub> en los animales hipertensos está asociada a la disminución en la expresión de la subunidad BK<sub>Ca</sub>β1 en las VSMCs de estos ratones BPH y que esta modificación puede contribuir a explicar la hipertensión moderada detectada en estos animales.

#### **5.1.5. Papel de las corrientes Kv en la excitabilidad de las VSMC.**

El patrón de expresión de los canales Kv es fundamental para el correcto funcionamiento de las diferentes células de músculo liso. En las VSMC, existen varios indicios que indican que los canales Kv1 tienen un papel dominante atenuando la excitabilidad, y al regular el potencial de membrana a potenciales fisiológicos relevantes representa un mecanismo de retroalimentación negativa crítico para establecer la amplitud de la contracción miogénica (Plane *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Fountain *et al.*, 2004; Albarwani *et al.*, 2003). El desarrollo de este trabajo ha proporcionado un aval muy convincente a la idea de que la disfunción de los canales Kv1 puede favorecer la aparición de patologías vasculares como la hipertensión. Sin embargo, las diferencias en la contribución funcional de otros canales de K<sup>+</sup> (particularmente los Kv2 y los BK<sub>Ca</sub>, además de otras corrientes de entrada) actúan en sinergia con los canales Kv1 a la hora de establecer el potencial de membrana de las VSMC (Amberg & Santana, 2006; Brayden & Nelson, 1992; Ledoux *et al.*, 2006). En este sentido es interesante recalcar que el cambio en el perfil de expresión de

## Discusión

los canales de  $K^+$  en modelos de hipertensión, ya sean genéticos o inducidos, se deben principalmente a cambios en canales distintos de los Kv1.

Las VSMC de arterias hipertensas están más despolarizadas y muestran una disminución significativa de las corrientes de  $K^+$ , resultados que concuerdan con su estado hipertenso. La mayor despolarización del potencial de membrana puede conducir a un aumento del tono basal de estos vasos, contribuyendo al incremento de la resistencia vascular en hipertensión. Cuando estudiamos la contribución de las corrientes al potencial de membrana en reposo observamos que bajo nuestras condiciones experimentales ( $[Ca^{2+}]$  muy baja), ambas corrientes Kv1 y Kv2, pero no las  $BK_{Ca}$ , contribuyen a establecer el potencial de membrana en reposo. Sorprendentemente, no encontramos diferencias entre las células BPN y BPH en la contribución de los canales Kv1 y Kv2 a fijar el potencial de membrana en reposo. Aunque la amplitud de corriente global del componente Kv2 es menor en las células BPH, el desplazamiento de la voltaje dependencia de la activación hacia potenciales más hiperpolarizados (Figura 36) hace plausible que su contribución a valores cercanos al potencial de membrana en reposo de estas células, no cambie. En este sentido, la aparición *de novo* de la subunidad Kv6.3 representaría un cambio compensatorio en los animales hipertensos, para conseguir mantener una contribución similar de las corrientes Kv a fijar el potencial de membrana en reposo aún cuando disminuye la corriente Kv total. Esta observación implica que además de la disminución de las corrientes  $BK_{Ca}$  y Kv, debe haber cambios en otras conductancias de canales que no son Kv en las VSMC de arterias mesentéricas de BPH, que fueran los responsables de la mayor despolarización del potencial de membrana en reposo. No obstante, cabría esperar que los cambios observados en la contribución de los canales Kv1 y Kv2 a la conductancia total Kv, y especialmente los cambios cinéticos de las corrientes Kv2 mediados por los heteromultímeros Kv2/Kv6.3, determinen cambios significativos en la respuesta contráctil inducida por presión de arterias miogenicamente activas, proporcionando nuevos datos para entender las bases moleculares de la disfunción vascular durante la hipertensión.

En su conjunto, los datos de nuestro trabajo apuntan a cambios en dos de las conductancias caracterizadas funcionalmente como elementos esenciales

en la historia natural de la hipertensión: la disminución de la corriente  $BK_{Ca}$  y en particular la disminución de su sensibilidad a  $Ca^{2+}$  por la menor expresión de la subunidad  $\beta 1$ , y los cambios en las corrientes  $Kv2$  por la expresión de la subunidad reguladora  $Kv6.3$ . Estos dos cambios obedecen a respuestas de signo opuesto, ya que mientras que las alteraciones en las corrientes  $BK_{Ca}$  contribuyen al desarrollo de la hipertensión, los cambios en las corrientes  $Kv2$  representan un mecanismo de compensación desencadenado por el aumento mantenido del tono arterial. Puesto que la cepa BPH se ha obtenido por cruces endogámicos y no existen mutaciones en genes concretos que determinen la aparición del fenotipo hipertenso, cabe pensar que a lo largo del proceso de selección de estos animales se hayan segregado tanto las alteraciones desencadenantes de la hipertensión como los cambios compensatorios secundarios a la misma. En este sentido, los ratones BPH son un modelo complejo, pero probablemente representativo de las modificaciones responsables de la hipertensión esencial en humanos, que se caracteriza también por un patrón poligénico complejo con penetrancia variable y sin alteraciones destacadas en genes concretos.

## **5.2. REMODELADO DE CANALES DE $K^+$ Y SUS IMPLICACIONES PARA LA PROLIFERACIÓN DEL MÚSCULO LISO EN UN MODELO ANIMAL DE HIPERPLASIA DE LA ÍNTIMA.**

Hemos realizado un estudio exhaustivo del perfil de expresión de los canales iónicos en las VSMC de arteria femoral, con el objetivo de averiguar qué canales se asocian con el cambio fenotípico de las VSMC en este lecho vascular. Para ello hemos usado arrays Taqman de baja densidad, con lo que podemos obtener medidas simultáneas de casi un centenar de genes, consiguiendo así una visión global de la expresión de canales iónicos en nuestra preparación. La aproximación inicial ha sido la extracción de la información de estas bases de datos, localizando genes con una expresión diferencial significativa en las condiciones experimentales utilizadas (VSMC contráctiles frente a sintéticas). Esta caracterización se ha realizado mediante un análisis *cluster*, que nos proporciona un punto de vista más global para poder entender mejor el proceso de desdiferenciación. Se aporta un nivel

## Discusión

adicional de filtrado de los datos utilizando dos modelos distintos de fenotipo proliferativo, los modelos *in vivo* e *in vitro*. La comparación de estos dos conjuntos de datos puede ayudar a identificar los cambios conservados en la expresión de genes requeridos para la proliferación de las células.

### 5.2.1. Expresión de los canales iónicos en los modelos de proliferación *in vivo* e *in vitro*.

Las conclusiones de los sucesivos niveles de análisis de la expresión de los canales iónicos en estas preparaciones proporcionan una información muy interesante, que podemos concretar en los siguientes aspectos:

1. Se ha definido la abundancia relativa de los genes de canales iónicos estudiados en VSMC de arteria femoral. La comparación de este perfil de expresión entre diferentes lechos vasculares muestra un patrón continuo que correlaciona con el tamaño de las arterias (Figura 26), y esta en concordancia con los datos previos en la literatura enfocados a las familias de canales iónicos individuales (Jackson, 2000; Michelakis *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2008; Teramoto, 2006; Fountain *et al.*, 2004).
2. Se han caracterizado los cambios en el perfil de expresión de canales iónicos asociados con el fenotipo sintético en dos modelos de estudio. Los datos obtenidos muestran una relativa buena correlación entre los cambios observados en las dos situaciones. Considerando el modelo de proliferación *in vivo*, encontramos cambios en 34 genes de canales, 27 de los cuales mostraron la misma variación en VSMC en cultivo. Cuando realizamos el análisis estadístico con la corrección FDR (Gusnanto *et al.*, 2007), que toma en consideración la variabilidad inherente al estudio de un gran número de datos en medidas repetidas, el número de genes que se modifican con la proliferación de forma estadísticamente significativa se reduce de 34 a 22 en la lesión endoluminal. De estos 22 genes que cambian en la lesión endoluminal, 18 mostraron el mismo cambio en las células en cultivo (Figura 44). Aún así, se siguen observando diferencias entre ambos modelos de proliferación. Por ejemplo, hay un número mayor de genes cuya expresión cambia sólo en las VSMC en cultivo, que podría deberse a la naturaleza más homogénea del modelo de proliferación *in vitro*, ya que provienen de explantes de arterias liberadas previamente del endotelio y del tejido

conectivo adyacente, constituyendo una población uniforme de VSMC sintéticas. Por el contrario, los tejidos de la lesión endoluminal están parcialmente contaminados con células endoteliales, VSMC contráctiles y tejido conectivo. Estas VSMC no proliferativas residuales pueden ser también responsables de algunos de los cambios en el perfil de expresión que se encuentran solo en el modelo *in vivo*, como es seguramente el caso de los canales SK3 (canales  $K_{Ca}$  de baja conductancia), que se ha descrito que se expresan únicamente en células endoteliales y no en las VSMC (Kohler *et al.*, 2003); (Jackson, 2005). Aunque no podemos excluir la presencia de cambios inducidos por las condiciones de cultivo, nuestros análisis nos permiten concluir que el perfil de expresión de canales iónicos producido tras el cambio fenotípico en las VSMC en cultivo reproduce razonablemente bien los cambios en las lesiones proliferativas *in vivo*. Esta observación es importante, ya que el estudio de la contribución funcional de estos cambios a la excitabilidad de las VSMC tiene limitaciones técnicas en los modelos *in vivo*.

3. Las comparaciones entre los dos modelos proliferativos y los análisis estadísticos realizados con las herramientas de la expresión diferencial de genes del programa GEPAS, nos proporcionaron un nivel adicional de confianza a nuestros resultados, ya que se reduce el número de genes de canales que muestran cambios significativos con la proliferación a 16 de los 90 genes de canales incluidos en el estudio.

Solo para algunos de los canales destacados por nuestro estudio se ha descrito previamente un papel en la proliferación de las VSMC en otras preparaciones. De este modo la menor expresión del mRNA de Cav1.2 esta en concordancia con la disminución de la expresión y de la contribución funcional de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L comúnmente asociados con el cambio fenotípico de las VSMC (House *et al.*, 2008; Beech, 2007; Landsberg & Yuan, 2004). Sin embargo, en la mayor parte de estos estudios esa disminución de la contribución funcional de los canales tipo L se asocia a un aumento de la expresión de los genes de las familias TRPC y/o Cav3.x (canales de  $Ca^{2+}$  tipo T) que nosotros no vemos en nuestro estudio. De modo similar, también encontramos una disminución en la expresión de los genes de los canales BK (subunidades  $BK\alpha$  y  $BK\beta 1$ ) que ha sido descrito previamente (Beech,

## Discusión

2007;Kohler *et al.*, 2003;Miguel-Velado *et al.*, 2005), pero no se ha asociado a aumentos en otros canales  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (como los canales IK o SK3) como se describe en algunos de los artículos citados. Nuestros datos también muestran una disminución de la expresión de los genes de canales KATP (Kir6.1 y SUR2) que no coincide con estudios funcionales previos, en los que no se encuentran diferencias en su contribución funcional asociadas al cambio fenotípico (Kleppisch *et al.*, 1996). Finalmente, con respecto a los genes de la familia Kv1 cuya expresión se ve disminuida tras el remodelado, algunos de estos cambios (especialmente para Kv1.5, Kv1.2 y Kv2.1) también se han descrito en otras preparaciones (Miguel-Velado *et al.*, 2005;Moudgil *et al.*, 2006;Mandegar *et al.*, 2004). En conjunto, las discrepancias señaladas no son de extrañar considerando las grandes variaciones en la expresión y contribución funcional de los canales iónicos en los distintos lechos vasculares. Por esta misma razón, el hallazgo de genes conservados en distintas preparaciones es importante y puede reflejar asociaciones obligatorias de algunos genes de canales iónicos con remodelado vascular, pudiendo tener una repercusión clínica importante ya que representarían una diana terapéutica específica para las patologías vasculares asociadas a la proliferación del músculo liso vascular.

### **5.2.2. Contribución funcional de los canales Kv1.3 y su papel en la proliferación de las VSMC.**

Se ha estudiado la expresión funcional y su contribución a la proliferación de las VSMC, de los genes cuya expresión aumenta tras el cambio fenotípico (Kv1.3 y Kv $\beta$ 2). El estudio funcional se ha enfocado principalmente a los canales Kv1.3, ya que las herramientas para determinar la contribución de la subunidad moduladora Kv $\beta$ 2 son más limitadas. Sin embargo, teniendo en cuenta que las subunidades Kv $\beta$ 2 pueden actuar como proteínas chaperonas que promueven y/o estabilizan la expresión en la superficie celular de los canales de  $K^+$  (Fink *et al.*, 1996;Levin *et al.*, 1996;Nagaya & Papazian, 1997;Shi *et al.*, 1996;Trimmer, 1998) y que se asocian preferentemente con miembros de la subfamilia Kv1 (Rhodes *et al.*, 1997), y siendo el Kv1.3 la subunidad Kv1 mas abundante en las VSMC en cultivo (Figura 50), parece plausible considerar que el aumento de la expresión de las subunidades Kv1.3 y Kv $\beta$ 2

esta relacionada con el hecho de que forman heteromultímeros. Esta asociación ya ha sido descrita en la activación de linfocitos T tras la estimulación por mitógenos (McCormack *et al.*, 1999; Beeton *et al.*, 2006). Además en estos estudios se detalla que durante el proceso de activación de los linfocitos T en humanos no se produce un aumento significativo en la expresión de mRNA de Kv1.3, pero sin embargo este sí ocurre en términos de corriente a través del canal, achacando este fenómeno al aumento en la expresión de la subunidad  $\beta 2$  que actuaría como chaperona incrementando la expresión del Kv1.3 en la superficie de la membrana. Además, en los linfocitos T las subunidades  $\beta 2$  accesorias contribuyen al acoplamiento de los canales Kv1.3 con quinasas Lck, permitiendo así la regulación de la conductancia de membrana para el  $K^+$  a través de proteínas quinasas, y este mecanismo se ha relacionado con la participación de los canales Kv1.3 en la formación de la sinapsis inmune y en activación y proliferación de los linfocitos T (Panyi, 2005), como se discute más adelante.

El papel de chaperona de la subunidad  $\beta 2$  representa un mecanismo modulador de la proliferación en los linfocitos T extrapolable a nuestro modelo de VSMC. De hecho, aunque observamos aumentos en los niveles de mRNA del Kv1.3 en ambos modelos de proliferación de forma muy consistente, los cambios en la expresión de la subunidad  $\beta 2$  son aún mayores, por lo cual el efecto conjunto de la regulación positiva de estos dos genes puede contribuir a explicar la gran modificación en la amplitud de las corrientes funcionales a través de los canales Kv1.3, ya que la expresión aumentada de ambas proteínas tendría un efecto potenciador.

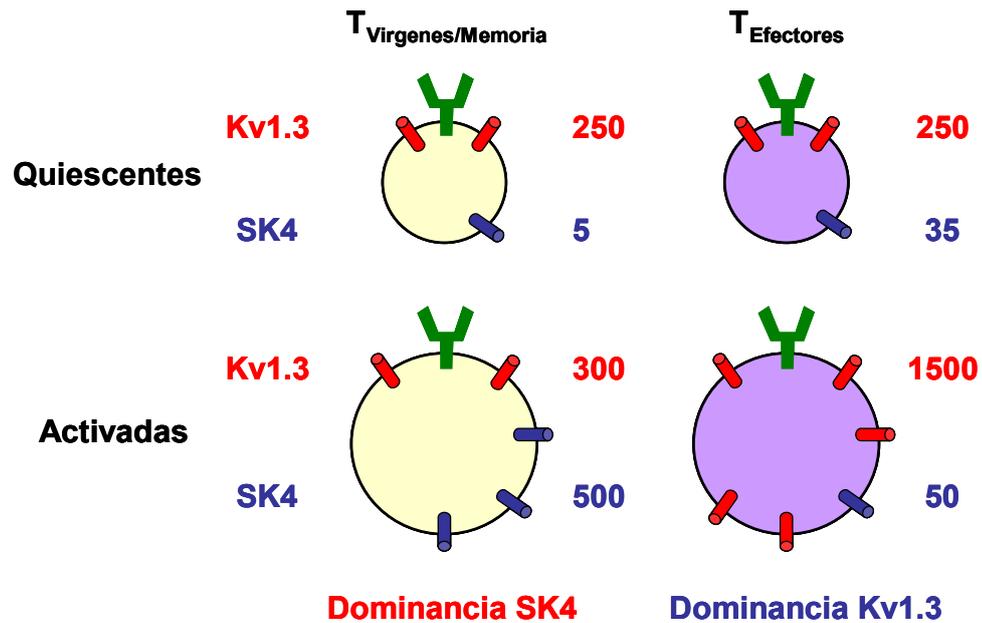
Nuestros datos demuestran un aumento de la expresión de ambas proteínas (Kv1.3 y Kv $\beta 2$ ) en las lesiones proliferativas (Figura 49) y también una mayor contribución de las corrientes Kv1.3 a las corrientes totales de salida en las VSMC en cultivo (Figuras 46 y 47). El aspecto más relevante es que además hemos establecido una conexión entre la expresión funcional de los canales Kv1.3 y el fenotipo sintético, ya que la inhibición de las corrientes Kv1.3 usando bloqueantes selectivos para el canal se traduce en una disminución significativa de la migración y proliferación de las VSMC de arteria femoral en cultivo (Figura 51).

## Discusión

Es interesante hacer notar que estos hallazgos son similares a los que nuestro grupo ha descrito previamente en VSMC de arteria uterina humana con los canales Kv3.4: los canales Kv3.4 muestran una mayor expresión en las VSMC en cultivo y su bloqueo reduce el índice de proliferación (Figura 18). Sin embargo, la aplicación de PAP-1 o margatoxina también reduce la migración y proliferación de las arterias uterinas humanas (Figura 52), y los efectos no son aditivos a los del bloqueo con Kv3.4 (con TEA 100  $\mu$ M o BDS-1 2.5 nM) implicando que la mayor expresión de los canales Kv1.3 también contribuye a la proliferación en este lecho vascular. A la vista de estos resultados, concluimos que mientras que la asociación del fenotipo proliferativo con la sobre-expresión del Kv3.4 es un hallazgo que se circunscribe a las VSMC de la arteria uterina, la asociación entre la proliferación de las VSMC y el aumento de la expresión del Kv1.3 está presente en diferentes especies y distintos lechos vasculares. De hecho, cuando analizamos las diferencias individuales de los genes entre las VSMC contráctiles y en cultivo de arteria mesentérica de ratón, encontramos que los cambios en la expresión fueron similares a los observados en arterias femorales, aunque ninguno de los cambios hacia un aumento en la expresión fue significativo. No obstante, el perfil de expresión de los canales iónicos de las VSMC en cultivo de ambos lechos vasculares muestra una gran semejanza (Figura 50), siendo el Kv1.3 el gen de la familia Kv1 predominante en las células de cultivo.

Esta es la primera vez que se describe un papel de los canales Kv1.3 en la migración y proliferación de las VSMC. Sin embargo, esta no es una función nueva para estos canales, ya que su implicación en la activación filológica y patológica de los linfocitos T es un hecho bien establecido (DeCoursey *et al.*, 1984; Beeton *et al.*, 2005; Chandy *et al.*, 2004). En estos estudios se demuestra que los canales Kv1.3 y SK4 regulan el potencial de membrana de linfocitos T quiescentes (sin estimular) mediante un pequeño número de canales iónicos, y que su activación a través de antígenos específicos induce un remodelado diferencial en la expresión de estos canales (Figura 57).

Así mientras que en los linfocitos T vírgenes o *naïve* (sin diferenciar) y de memoria (retienen la afinidad por el antígeno y son usados para actuar como células efectoras durante una segunda respuesta inmune) aumenta la



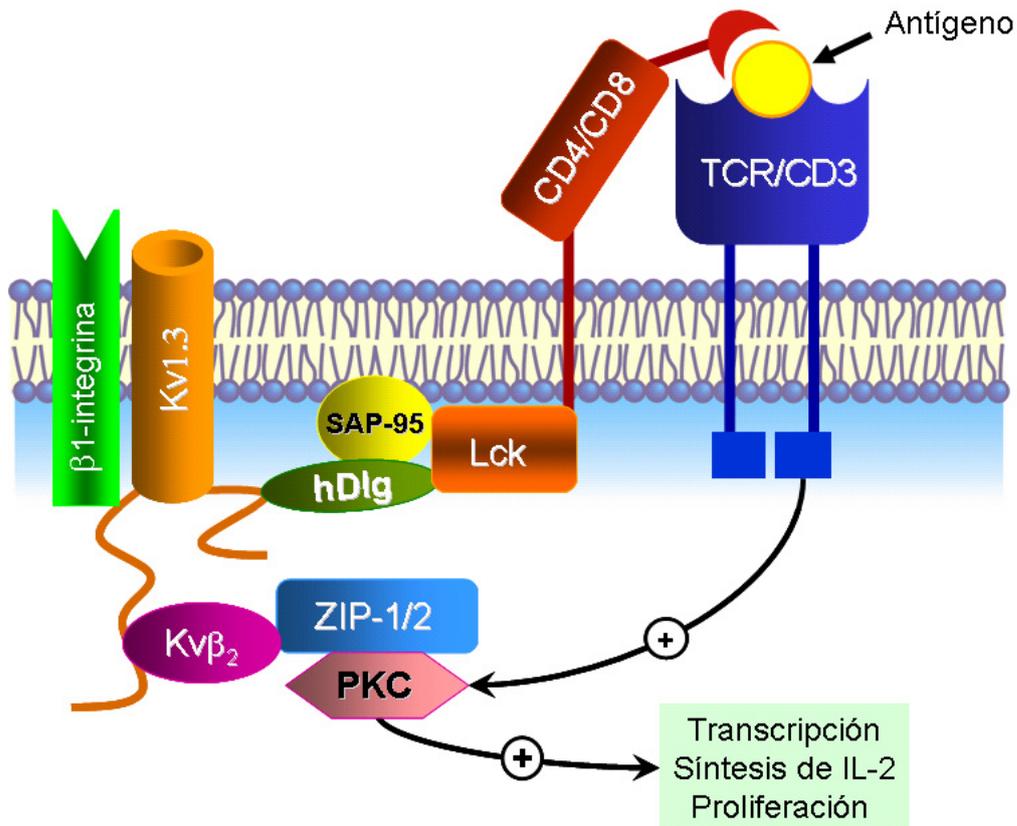
**Figura 57.** Dibujo esquemático que muestra el número promedio de canales Kv1.3 o SK4 por célula, en linfocitos T vírgenes, de memoria y efectores. En los linfocitos T vírgenes y de memoria hay un aumento de canales SK4 tras la activación, mientras que en los linfocitos T efectores se produce un incremento de los canales Kv1.3.

expresión de los canales SK4 , en los linfocitos T efectores (migran a cualquier foco infeccioso o inflamatorio poniendo en marcha la respuesta inmune) es el Kv1.3 quien incrementa su expresión, por lo que su proliferación es exclusivamente dependiente de estos canales.

El proceso de activación de los linfocitos T en la respuesta inmune comienza por la presentación del antígeno unido a las células presentadoras de antígeno o a las proteínas del complejo de inmunohistocompatibilidad. El antígeno interacciona con el complejo receptor TCR-CD3 de los linfocitos T y esta interacción desencadena el agrupamiento de una serie de proteínas asociadas con el complejo TCR-CD3 en la zona de contacto con la célula presentadora del antígeno, formándose una estructura denominada *sinapsis inmunológica* (IS). La redistribución inducida por el antígeno de una serie de receptores y moléculas de señalización en la IS facilita la cascada de transducción de señales que lleva a la activación de los linfocitos T (Chandy *et al.*, 2004). Entre estas moléculas encuentran los canales Kv1.3, que se movilizan a regiones vecinas al complejo TCR-CD3 tras la activación de los linfocitos para formar parte de un complejo de señalización (Figura 58) en el que se encuentran

## Discusión

enzimas (como la tirosina quinasa p56-Lck y la PKC), moléculas adaptadoras (como la subunidad Kv $\beta$ 2y la hDlg) y proteínas de anclaje como la PSD-95 (un miembro de la familia de guanilato quinasas asociadas a membrana o MAGUKs), las proteínas ZIP1 y 2 (proteínas que interaccionan con PKC) y las  $\beta$ 1-integrinas.



**Figura 58.** Integrantes moleculares de la sinapsis inmunológica en los linfocitos T. La presentación del antígeno a los receptores TCR/CD3 recluta a los canales Kv1.3 mediante una serie de proteínas de andamiaje (como SAP-95) y moléculas adaptadoras, lo que permite su modulación por proteínas quinasas (Lck y PKC) en respuesta a la activación de los linfocitos. La modulación por PKC, que contribuye al aumento en la transcripción de genes involucrados en la activación, la migración y la proliferación se realiza a través de la subunidad Kv $\beta$ 2.

Las corrientes a través de los canales Kv1.3 se modulan por fosforilación por la tirosina quinasa p56-Lck, que interacciona con el canal a través de PSD-95. La asociación de los canales Kv1.3 con PSD-95 previene además su internalización, y su acoplamiento funcional con las  $\beta$ 1-integrinas los estabiliza en la IS y determina su participación en los procesos de migración de los linfocitos T activados. Por otro lado, la asociación con la subunidad Kv $\beta$ 2

aumenta la expresión funcional en la membrana de los canales Kv1.3 como ya hemos comentado, pero además a través de la subunidad Kv $\beta$ 2 se produce el acoplamiento entre los canales Kv1.3 y la PKC, por medio de las proteínas adaptadoras ZIP1 y ZIP2 (Cahalan *et al.*, 2001). Puesto que la activación de la PKC es esencial para inducir la activación de factores de transcripción, que van a llevar a la síntesis de interleuquinas y a la activación de la proliferación de los linfocitos, la asociación del canal Kv1.3 con la subunidad Kv $\beta$ 2 contribuye a explicar la relación funcional entre la proliferación de los linfocitos T y las corrientes Kv1.3 descrita en esta preparación (Matko, 2003).

Está ampliamente documentado que el bloqueo selectivo de los canales Kv1.3 inhibe la migración y la proliferación de los linfocitos T efectoros activados. Los linfocitos T efectoros son responsables del daño del sistema nervioso central durante la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes, con lo que la inhibición específica de la proliferación de estos tipos celulares mediante bloqueantes del Kv1.3 presenta un gran potencial terapéutico. De hecho, estos bloqueantes se han utilizado con éxito para el tratamiento en modelos experimentales de esclerosis múltiple (Beeton *et al.*, 2006). Asimismo, también se ha descrito la participación del canal Kv1.3 en los procesos de proliferación de otros tipos celulares, como células progenitoras de oligodendrocitos (Vautier *et al.*, 2004), microglia (Kotecha & Schlichter, 1999), células endoteliales (Erdogan *et al.*, 2005), macrófagos (Vicente *et al.*, 2003) y varios tipos de células tumorales (Pardo, 2004). Con esta perspectiva, nuestros datos proporcionan evidencias de un papel similar de los canales Kv1.3 en el cambio fenotípico de las VSMC, lo que sugiere que este nuevo papel de los canales Kv1.3 puede ser una función conservada en distintos lechos vasculares, aportando una nueva diana terapéutica para la prevención y el tratamiento de la hiperplasia de la íntima.



# **6 Conclusiones**



1. Los niveles de expresión de mRNA de las subunidades Kv formadoras de poro, particularmente los genes de las subfamilias Kv1 y Kv2, muestran un patrón creciente de expresión, de menos en arteria aorta a más en arteria mesentérica de ratones BPN.

2. Las arterias mesentéricas de 2º orden de los ratones BPH tienen un área mayor, tanto total como de la luz y de la túnica media, sin que varíe el número de VSMC. Las VSMC presentan mayores valores de capacidad cuando los comparamos con los ratones BPN. Además se observa una disminución significativa de la densidad de corriente total de salida de  $K^+$  en las células BPH, a todos los voltajes estudiados, a pesar de que la amplitud total de corriente es similar en células BPN y BPH.

3. La densidad de corriente total Kv, Kv1 y Kv2 es menor en ratones BPH, siendo esta disminución más acentuada en el caso de las corrientes Kv2 debido a su modulación funcional por la asociación con subunidades Kv6.3, que se expresa “*de novo*” en las arterias de estos animales.

4. El estudio funcional también revela una disminución de la amplitud de las corrientes  $BK_{Ca}$  y lo que es más importante, una disminución en la sensibilidad a la modulación por  $Ca^{2+}$  de estas corrientes en las VSMC de ratones BPH. Este hecho correlaciona bien con la disminución observada en los niveles de expresión del mRNA de las subunidades  $\beta 1$  y  $BK_{Ca}\alpha$  en esta preparación.

5. Las VSMC de ratones BPH están más despolarizadas que las de los BPN, pero no encontramos diferencias en la contribución de las corrientes Kv1 y Kv2 a fijar el potencial de membrana en reposo de estas células. Así, a pesar de que la corriente global del componente Kv2 es menor en las células BPH, el desplazamiento de la voltaje dependencia de la activación hacia potenciales más hiperpolarizados, hace plausible que su contribución a valores cercanos al potencial de membrana en reposo de estas células no cambie.

6. El perfil de expresión de canales iónicos producido tras el cambio fenotípico en las VSMC en cultivo de arteria femoral de ratones BPN, reproduce razonablemente bien los cambios en las lesiones proliferativas *in*

## *Conclusiones*

*vivo*, siendo estos cambios muy parecidos en uno y otro modelo de proliferación.

7. Del grupo de genes que muestran variaciones significativas en los dos modelos proliferativos, los más destacados son aquellos cuya expresión aumenta, ya que son más fáciles de modular mediante el boqueo de función. Entre ellos se encuentran el canal Kv1.3 y la subunidad reguladora Kv $\beta$ 2 que actuaría como chaperona incrementando la expresión del Kv1.3 en la superficie de la membrana.

8. Nuestros datos demuestran una mayor contribución de las corrientes Kv1.3 a las corrientes totales de salida en las VSMC en cultivo, así como la existencia de una conexión entre la expresión funcional y el fenotipo sintético, ya que la inhibición de las corrientes Kv1.3 usando bloqueantes selectivos para el canal se traduce en una disminución significativa de la migración y proliferación de estas células.

9. La asociación entre la proliferación de las VSMC y el aumento de la expresión del Kv1.3 es una función conservada en diferentes especies y distintos lechos vasculares, por lo que puede constituir una nueva diana terapéutica para la prevención y el tratamiento de la hiperplasia de la íntima.

# **7 Bibliografía**



- Aaronson, P. I. & Ward, J. P. T. (2004). *The Cardiovascular System*, 2nd ed. Oxford.
- Abdul, M. & Hoosein, N. (2002a). Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol.Rep.* **9**, 961-964.
- Abdul, M. & Hoosein, N. (2002b). Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity. *Anticancer Res* **22**, 1727-1730.
- Albarwani, S., Nemetz, L. T., Madden, J. A., Tobin, A. A., England, S. K., Pratt, P. F., & Rusch, N. J. (2003). Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. *Journal of Physiology* **551**, 751-763.
- Amberg, G. C., Bonev, A. D., Rossow, C. F., Nelson, M. T., & Santana, L. F. (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin.Invest* **112**, 717-724.
- Amberg, G. C. & Santana, L. F. (2003). Downregulation of the BK Channel  $\beta$ 1 Subunit in Genetic Hypertension. *Circulation Research* **93**, 965-971.
- Amberg, G. C. & Santana, L. F. (2006). Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries. *AJP - Cell Physiology* **291**, C348-C356.
- Archer, S. L. (1996). Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J.Lab Clin.Med.* **127**, 524-529.
- Archer, S. L., Souil, E., Dinh-Xuan, A. T., Schremmer, B., Mercier, J. C., El Yaagoubi, A., Nguyen-Huu, L., Reeve, H. L., & Hampl, V. (1998). Molecular identification of the role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J.Clin.Invest* **101**, 2319-2330.
- Archer, S. L., Wu, X. C., Thebaud, B., Nsair, A., Bonnet, S., Tyrrell, B., McMurtry, M. S., Hashimoto, K., Harry, G., & Michelakis, E. D. (2004). Preferential expression and function of voltage-gated, O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction: ionic diversity in smooth muscle cells. *Circulation Research* **95**, 308-318.
- Bayliss, W. M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of Physiology* **28**, 220-231.
- Beech, D. J. (2007). Ion channel switching and activation in smooth-muscle cells of occlusive vascular diseases. *Biochemical Society Transactions* **35**, 890-894.
- Beeton, C., Pennington, M. W., Wulff, H., Singh, S., Nugent, D., Crossley, G., Khaytin, I., Calabresi, P. A., Chen, C. Y., Gutman, G. A., & Chandy, K. G. (2005). Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Molecular Pharmacology* **67**, 1369-1381.
- Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N. E., Azam, P., Mullen, K. M., Pennington, M. W., Kolski-Andreaco, A., Wei, E., Grino, A., Counts, D. R., Wang, P. H., LeeHealey, C. J., Andrews, S., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Roeck, W. W., Tehranzadeh, J., Stanhope, K. L., Zimin, P., Havel, P. J., Griffey, S., Knaus, H. G., Nepom, G. T., Gutman, G. A., Calabresi, P. A., & Chandy, K. G. (2006). Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl.Acad.Sci U S.A* **103**, 17414-17419.
- Belevych, A. E., Beck, R., Tammaro, P., Poston, L., & Smirnov, S. V. (2002). Developmental changes in the functional characteristics and expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel currents in rat aortic myocytes. *Cardiovascular Research* **54**, 152-161.
- Brayden, J. E. & Nelson, M. T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* **256**, 532-535.
- Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., & Aldrich, R. W. (2000). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**, 870-876.
- Briones, A. M., Xavier, F. E., Arribas, S. M., Gonzalez, M. C., Rossoni, L. V., Alonso, M. J., & Salaices, M. (2006). Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* **291**, H193-H201.
- Cahalan, M. D., Wulff, H., & Chandy, K. G. (2001). Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin.Immunol.* **21**, 235-252.

## Bibliografía

- Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. A., & Cahalan, M. D. (2004). K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 280-289.
- Chen, T. T., Luykenaar, K. D., Walsh, E. J., Walsh, M. P., & Cole, W. C. (2006). Key Role of Kv1 Channels in Vasoregulation. *Circulation Research* **99**, 53-60.
- Cheng, L., Fu, J., Tsukamoto, A., & Hawley, R. G. (1996). Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **14**, 606-609.
- Cheong, A., Dedman, A. M., & Beech, D. J. (2001). Expression and function of native potassium channel Kvα1 subunits in terminal arterioles of rabbit. *Journal of Physiology* **534**, 691-700.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz, d. M., & Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **868:233-85.**, 233-285.
- Cole, W. C., Chen, T. T., & Clement-Chomienne, O. (2005). Myogenic regulation of arterial diameter: role of potassium channels with a focus on delayed rectifier potassium current. *Can.J Physiol Pharmacol* **83**, 755-765.
- Conforti, L., Bodi, I., Nisbet, J. W., & Millhorn, D. E. (2000). O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels: role of the Kv1.2 -subunit in mediating the hypoxic response. *J.Physiol (Lond)* **524**, 783-793.
- Cox, D. H. & Aldrich, R. W. (2000). Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity. *J.Gen.Physiol* **116**, 411-432.
- Cox, R. H. (1996). Comparison of K<sup>+</sup> Channel Properties in Freshly Isolated Myocytes From Thoracic Aorta of WKY and SHR. *American Journal of Hypertension* **9**, 884-894.
- Czarnecki, A., Vaur, S., Dufy-Barbe, L., Dufy, B., & Bresson-Bepoldin, L. (2000). Cell cycle-related changes in transient K<sup>+</sup> current density in the GH3 pituitary cell line. *AJP - Cell Physiology* **279**, C1819-C1828.
- Davies, M. G. & Hagen, P. O. (1994). Pathobiology of Intimal Hyperplasia. *British Journal of Surgery* **81**, 1254-1269.
- de Wit, C., Boettcher, M., & Schmidt, V. J. (2008). Signaling across myoendothelial gap junctions—fact or fiction? *Cell Commun.Adhes* **15**, 231-245.
- DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., & Cahalan, M. D. (1984). Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels in Human Lymphocyte-T - A Role in Mitogenesis. *Nature* **307**, 465-468.
- Dietrich, A., Chubanov, V., Kalwa, H., Rost, B. R., & Gudermann, T. (2006). Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacology & Therapeutics* **112**, 744-60.
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Duprat, F., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Hugnot, J. P., Bigay, J., Lazdunski, M., Romey, G., & Barhanin, J. (1995). Heterologous multimeric assembly is essential for K<sup>+</sup> channel activity of neuronal and cardiac G-protein-activated inward rectifiers. *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 657-663.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl.Acad.Sci U S.A* **95**, 14863-14868.
- Erdogan, A., Schaefer, C. A., Schaefer, M., Luedders, D. W., Stockhausen, F., Abdallah, Y., Schaefer, C., Most, A. K., Tillmanns, H., Piper, H. M., & Kuhlmann, C. R. (2005). Margatoxin inhibits VEGF-induced hyperpolarization, proliferation and nitric oxide production of human endothelial cells. *J Vasc Res* **42**, 368-376.
- Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M., & Brown, A. M. (1994). Spermine and Spermidine As Gating Molecules for Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channels. *Science* **266**, 1068-1072.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Heurteaux, C., Romey, G., Barhanin, J., & Lazdunski, M. (1996). A new K<sup>+</sup> channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem* **271**, 26341-26348.
- Fountain, S. J., Cheong, A., Flemming, R., Mair, L., Sivaprasadarao, A., & Beech, D. J. (2004). Functional up-regulation of KCNA gene family expression in murine

- mesenteric resistance artery smooth muscle. *The Journal of Physiology* **556**, 29-42.
- Fraser, S. P., Grimes, J. A., & Djamgoz, M. B. (2000). Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate* **44**, 61-76.
- Gabella, G. (1984). Structural apparatus for force transmission in smooth muscles. *Physiological Reviews* **64**, 455-477.
- Gallo, R., Padurean, A., Toschi, V., Bichler, J., Fallon, J. T., Chesebro, J. H., Fuster, V., & Badimon, J. J. (1998). Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* **97**, 581-588.
- Grifoni, S. C., Jernigan, N. L., Hamilton, G., & Drummond, H. A. (2008). ASIC proteins regulate smooth muscle cell migration. *Microvascular Research* **75**, 202-210.
- Gunst, S. J. & Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *AJP - Cell Physiology* **295**, C576-C587.
- Gusnanto, A., Calza, S., & Pawitan, Y. (2007). Identification of differentially expressed genes and false discovery rate in microarray studies. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 187-193.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **391**, 85-100.
- Hanner, M., Schmalhofer, W. A., Green, B., Bordallo, C., Liu, J., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., & Garcia, M. L. (1999). Binding of correolide to Kv1 family potassium channels - Mapping the domains of high affinity interaction. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 25237-25244.
- Herrington, J., Zhou, Y. P., Bugianesi, R. M., Dulski, P. M., Feng, Y., Warren, V. A., Smith, M. M., Kohler, M. G., Garsky, V. M., Sanchez, M., Wagner, M., Raphaelli, K., Banerjee, P., Ahaghotu, C., Wunderler, D., Priest, B. T., Mehl, J. T., Garcia, M. L., McManus, O. B., Kaczorowski, G. J., & Slaughter, R. S. (2006). Blockers of the Delayed-Rectifier Potassium Current in Pancreatic  $\beta$ -Cells Enhance Glucose-Dependent Insulin Secretion. *Diabetes* **55**, 1034-1042.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes*, 3th ed. Sinauer.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J.Physiol.(Lond.)* **117**, 500-544.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952b). Currents Carried by Sodium and Potassium Ions through the Membrane of the Giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.(Lond.)* **116**, 449-472.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952c). The Components of Membrane Conductance in the Giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.(Lond.)* **116**, 473-496.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952d). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the Giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.(Lond.)* **116**, 497-506.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of Current-Voltage Relations in The Membrane of The Giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.(Lond.)* **116**, 424-448.
- Horn, R. (2000). A new twist in the saga of charge movement in voltage-dependent ion channels. *Neuron* **25**, 511-514.
- House, S. J., Potier, M., Bisailon, J., Singer, H. A., & Trebak, M. (2008). The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* **456**, 769-785.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilarbryan, L., Seino, S., & Bryan, J. (1995). Reconstitution of I-Katp - An Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. *Science* **270**, 1166-1170.
- Jackson, W. F. (2005). Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation.* **12**, 113-127.
- Jackson, W. F. (2000). Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension* **35**, 173.
- Jones, A. W. (1973). Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. Influences of aldosterone, norepinephrine, and angiotensin. *Circulation Research* **33**, 563-572.

## Bibliografía

- Kaczorowski, G. J., Knaus, H. G., Leonard, R. J., McManus, O. B., & Garcia, M. L. (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg. Biomembr.* **28**, 255-267.
- Kleppisch, T., Winter, B., & Nelson, M. T. (1996). ATP-sensitive potassium channels in cultured arterial segments. *Am J Physiol* **271**, H2462-H2468.
- Knaus, H. G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J., Smith, M., & Swanson, R. (1994a). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **269**, 17274-17278.
- Knaus, H. G., Garcia Calvo, M., Kaczorowski, G. J., & Garcia, M. L. (1994b). Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *J. Biol. Chem.* **269**, 3921-3924.
- Knot, H. J. & Nelson, M. T. (1995). Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent  $K^+$  channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* **269**, H348-55.
- Knot, H. J., Standen, N. B., & Nelson, M. T. (1998). Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall  $[Ca^{2+}]$  in cerebral arteries of rat via  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels. *Journal of Physiology* **508**, 211-221.
- Kohler, R., Wulff, H., Eichler, I., Kneifel, M., Neumann, D., Knorr, A., Grgic, I., Kampfe, D., Si, H., Wibawa, J., Real, R., Borner, K., Brakemeier, S., Orzechowski, H. D., Reusch, H. P., Paul, M., Chandy, K. G., & Hoyer, J. (2003). Blockade of the Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel as a New Therapeutic Strategy for Restenosis. *Circulation* **108**, 1119-1125.
- Kotecha, S. A. & Schlichter, L. C. (1999). A Kv1.5 to Kv1.3 Switch in Endogenous Hippocampal Microglia and a Role in Proliferation. *Journal of Neuroscience* **19**, 10680-10693.
- Kramer, J. W., Post, M. A., Brown, A. M., & Kirsch, G. E. (1998). Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits. *Am J Physiol* **274**, C1501-C1510.
- Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (1995). The G-Protein-Gated Atrial  $K^+$  Channel I-Kach Is A Heteromultimer of 2 Inwardly Rectifying  $K^+$ -Channel Proteins. *Nature* **374**, 135-141.
- Landsberg, J. W. & Yuan, J. X. J. (2004). Calcium and TRP Channels in Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *News in Physiological Sciences* **19**, 44-50.
- Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E., & Nelson, M. T. (2006). Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* **21**, 69-78.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., & Barhanin, J. (1996a). A pH-sensitive yeast outward rectifier  $K^+$  channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* **271**, 4183-4187.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., & Barhanin, J. (1996b). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying  $K^+$  channel with a novel structure. *EMBO J* **15**, 1004-1011.
- Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *AJP - Renal Physiology* **279**, F793-F801.
- Lesage, F., Maingret, F., & Lazdunski, M. (2000). Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive  $K^+$  channel. *Febs Letters* **471**, 137-140.
- Levick J.R. (2003). *An Introduction to Cardiovascular Physiology.*, Fourth ed.
- Levin, G., Chikvashvili, D., Singer-Lahat, D., Peretz, T., Thornhill, W. B., & Lotan, I. (1996). Phosphorylation of a  $K^+$  channel alpha subunit modulates the inactivation conferred by a beta subunit. Involvement of cytoskeleton. *J Biol Chem.* **271**, 29321-29328.
- Levy, M. N. & Pappano, A. J. (2007). *Cardiovascular Physiology*, 9th ed. Philadelphia.
- Li, G. & Cheung, D. W. (1999). Effects of paxilline on  $K^+$  channels in rat mesenteric arterial cells. *European Journal of Pharmacology* **372**, 103-107.

- Liu, Y., Pleyte, K., Knaus, H. G., & Rusch, N. J. (1997). Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension* **30**, 1403-1409.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lopez-Lopez, J. R. & Perez-Garcia, M. T. (2007). Oxygen sensitive Kv channels in the carotid body. *Respir.Physiol Neurobiol.* **157**, 65-74.
- MacFarlane, S. N. & Sontheimer, H. (2000). Modulation of Kv1.5 Currents by Src Tyrosine Phosphorylation: Potential Role in the Differentiation of Astrocytes. *Journal of Neuroscience* **20**, 5245-5253.
- Mandegar, M., Fung, Y. C., Huang, W., Remillard, C. V., Rubin, L. J., & Yuan, J. X. (2004). Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvascular Research* **68**, 75-103.
- Martinez-Lemus, L. A., Hill, M. A., & Meininger, G. A. (2009). The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda.)* **24**, 45-57.
- Matko, J. (2003). K<sup>+</sup> channels and T-cell synapses: the molecular background for efficient immunomodulation is shaping up. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 385-389.
- Mayhan, W. G. & Faraci, F. M. (1993). Responses of cerebral arterioles in diabetic rats to activation of ATP-sensitive potassium channels. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* **265**, H152-7.
- McCormack, T., McCormack, K., Nadal, M. S., Vieira, E., Ozaita, A., & Rudy, B. (1999). The Effects of Shaker beta -Subunits on the Human Lymphocyte K<sup>+</sup> Channel Kv1.3. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 20123-20126.
- McManus, O. B., Helms, L. M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., & Leonard, R. J. (1995). Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* **14**, 645-650.
- Michelakis, E. D., Reeve, H. L., Huang, J. M., Tolarova, S., Nelson, D. P., Weir, E. K., & Archer, S. L. (1997). Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **75**, 889-897.
- Miguel-Velado, E., Moreno-Dominguez, A., Colinas, O., Ciudad, P., Heras, M., Perez-Garcia, M. T., & López-López, J. R. (2005). Contribution of Kv Channels to Phenotypic Remodeling of Human Uterine Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., & Numa, S. (1989). Primary Structure and Functional Expression of the Cardiac Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel. *Nature* **340**, 230-233.
- Mohrman DE & Heller LJ (2003). *Cardiovascular Physiology*, 5th ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Moudgil, R., Michelakis, E. D., & Archer, S. L. (2006). The role of k<sup>+</sup> channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation* **13**, 615-632.
- Mulvany, M. J. (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* **17**, 105-109.
- Murphy, R. A. & Rembold, C. M. (2005). The latch-bridge hypothesis of smooth muscle contraction. *Can.J Physiol Pharmacol* **83**, 857-864.
- Nagaya, N. & Papazian, D. M. (1997). Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **272**, 3022-3027.
- Nattel, S. (2008). Effects of Heart Disease on Cardiac Ion Current Density Versus Current Amplitude: Important Conceptual Subtleties in the Language of Arrhythmogenic Ion Channel Remodeling. *Circulation Research* **102**, 1298-1300.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Neher, E., Sakmann, B., & Steinbach, J. H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through

## Bibliografía

- individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch.* **375**, 219-228.
- Nelson, M. T. & Quayle, J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *AJP - Cell Physiology* **268**, C799-C822.
- Neylon, C. B. (2002). Potassium channels and vascular proliferation. *Vascular Pharmacology* **38**, 35-41.
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G., & Voets, T. (2005). Gating of TRP channels: a voltage connection? *The Journal of Physiology Online* **567**, 35-44.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., & Latorre, R. (2002). New Disguises for an Old Channel: MaxiK Channel  $\beta$ -Subunits. *News in Physiological Sciences* **17**, 156-161.
- Otschytsch, N., Raes, A., Van Hoorick, D., & Snyders, D. J. (2002). Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel  $\alpha$ -subunits identified in the human genome. *Proc.Natl.Acad.Sci U S.A* **99**, 7986-7991.
- Owens, G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews* **75**, 487-517.
- Owens, G. K. (1998). Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand.* **164**, 623-635.
- Owens, G. K., Kumar, M. S., & Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* **84**, 767-801.
- Panyi, G. (2005). Biophysical and pharmacological aspects of  $K^+$  channels in T lymphocytes. *Eur.Biophys.J* **34**, 515-529.
- Pardo, L. A., Bruggemann, A., Camacho, J., & Stuhmer, W. (1998). Cell cycle-related changes in the conducting properties of  $r$ -eag  $K^+$  channels. *The Journal of Cell Biology* **143**, 767-775.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S., & Stuhmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG  $K^+$  channels. *EMBO J.* **18**, 5540-5547.
- Pardo, L. A. (2004). Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology* **19**, 285-292.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**, 233-252.
- Plane, F., Johnson, R., Kerr, P., Wiehler, W., Thorneloe, K., Ishii, K., Chen, T., & Cole, W. (2005). Heteromultimeric Kv1 Channels Contribute to Myogenic Control of Arterial Diameter. *Circulation Research* **96**, 216-224.
- Post, M. A., Kirsch, G. E., & Brown, A. M. (1996). Kv2.1 and electrically silent Kv6.1 potassium channel subunits combine and express a novel current. *FEBS Lett.* **399**, 177-182.
- Prewitt, R. L., Rice, D. C., & Dobrian, A. D. (2002). Adaptation of resistance arteries to increases in pressure. *Microcirculation.* **9**, 295-304.
- Rhodes, K. J., Strassle, B. W., Monaghan, M. M., Bekele-Arcuri, Z., Matos, M. F., & Trimmer, J. S. (1997). Association and colocalization of the Kv $\beta$ 1 and Kv $\beta$ 2  $\beta$ -subunits with Kv1  $\alpha$ -subunits in mammalian brain  $K^+$  channel complexes. *J.Neurosci.* **17**, 8246-8258.
- Roque, M., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Zhang, W. X., Taubman, M. B., & Reis, E. D. (2000). Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler.Thromb.Vasc Biol.* **20**, 335-342.
- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J. P., & Lazdunski, M. (1997). New modulatory  $\alpha$  subunits for mammalian Shab  $K^+$  channels. *J Biol Chem* **272**, 24371-24379.
- Sanchez, D., López-López, J. R., Perez-Garcia, M. T., Sanz-Alfayate, G., Obeso, A., Ganfornina, M. D., & Gonzalez, C. (2002). Molecular identification of K $\alpha$  subunits that contribute to the oxygen-sensitive  $K^+$  current of chemoreceptor cells of the rabbit carotid body. *J.Physiol* **542**, 369-382.
- Sano, Y., Mochizuki, S., Miyake, A., Kitada, C., Inamura, K., Yokoi, H., Nozawa, K., Matsushime, H., & Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of Kv6.3, a novel modulatory subunit for voltage-gated  $K^+$  channel Kv2.1. *FEBS Lett.* **512**, 230-234.
- Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X. B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C. A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R.,

- Hofmann, F., Knaus, H. G., Kenyon, C., Shipston, M. J., STORM, J. F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M., & Ruth, P. (2005). Elevated Blood Pressure Linked to Primary Hyperaldosteronism and Impaired Vasodilation in BK Channel-Deficient Mice. *Circulation* **112**, 60-68.
- Schlager, G. (1981). Longevity in Spontaneously Hypertensive Mice. *Experimental Gerontology* **16**, 325-330.
- Schlager, G. & Sides, J. (1997). Characterization of hypertensive and hypotensive inbred strains of mice. *Lab Anim Sci* **47**, 288-292.
- Schmitz, A., Sankaranarayanan, A., Azam, P., Schmidt-Lassen, K., Homerick, D., Hansel, W., & Wulff, H. (2005). Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Molecular Pharmacology* **68**, 1254-1270.
- Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M., & Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J* **27**, 3092-3103.
- Schwartz, S. M., Heimark, R. L., & Majesky, M. W. (1990). Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* **70**, 1177-1209.
- Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K. J., Schechter, L. E., & Trimmer, J. S. (1996). Beta subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* **16**, 843-852.
- Shioya, T., Matsuda, H., & Noma, A. (1993). Fast and Slow Blockades of the Inward-Rectifier K<sup>+</sup> Channel by External Divalent-Cations in Guinea-Pig Cardiac Myocytes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **422**, 427-435.
- Siegel, G., Walter, A., Schnalke, F., Schmidt, A., Buddecke, E., Loirand, G., & Stock, G. (1991). Potassium channel activation, hyperpolarization, and vascular relaxation. *Z.Kardiol.* **80 Suppl 7**, 9-24.
- Smith, J. M. & Jones, A. W. (1990). Calcium antagonists inhibit elevated potassium efflux from aorta of aldosterone-salt hypertensive rats. *Hypertension* **15**, 78-83.
- Smith, P. D., Brett, S. E., Luykenaar, K. D., Sandow, S. L., Marrelli, S. P., Vigmond, E. J., & Welsh, D. G. (2008). KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. *Journal of Physiology* **586**, 1147-1160.
- Stenmark, K. R., Fagan, K. A., & Frid, M. G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circulation Research* **99**, 675-691.
- Suzuki, M., Morita, T., & Iwamoto, T. (2006). Diversity of Cl<sup>-</sup> channels. *Cell Mol Life Sci* **63**, 12-24.
- Sweet, T. B. & Cox, D. H. (2009). Measuring the influence of the BKCa  $\beta$ 1 subunit on Ca<sup>2+</sup> binding to the BKCa channel. *J Gen.Physiol* **133**, 139-150.
- Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H. G., & Toro, L. (1997). Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J.Physiol* **502 ( Pt 3)**, 545-557.
- Teramoto, N. (2006). Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. *The Journal of Physiology Online* **572**, 617-624.
- Trimmer, J. S. (1998). Analysis of K<sup>+</sup> channel biosynthesis and assembly in transfected mammalian cells. *Methods Enzymol.* **293**, 32-49.
- Vautier, F., Belachew, S., Chittajallu, R., & Gallo, V. (2004). Shaker-type potassium channel subunits differentially control oligodendrocyte progenitor proliferation. *Glia* **48**, 337-345.
- Vega-Saenz de Miera EC (2004). Modification of Kv2.1 K<sup>+</sup> currents by the silent Kv10 subunits. *Brain Res Mol Brain Res* **123**, 91-103.
- Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sanchez-Tillo, E., Lopez-Iglesias, C., Soler, C., Solsona, C., Celada, A., & Felipe, A. (2003). Differential Voltage-dependent K<sup>+</sup> Channel Responses during Proliferation and Activation in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46307-46320.
- Wang, Z. (2004). Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch.* **448**, 274-286.
- Wonderlin, W. F. & Strobl, J. S. (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *Journal of Membrane Biology* **154**, 91-107.

## *Bibliografía*

Zobel, C., Cho, H. C., Nguyen, T. T., Pekhletski, R., Diaz, R. J., Wilson, G. J., & Backx, P. H. (2003). Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *J.Physiol* **550**, 365-372.

# 8 Anexo I

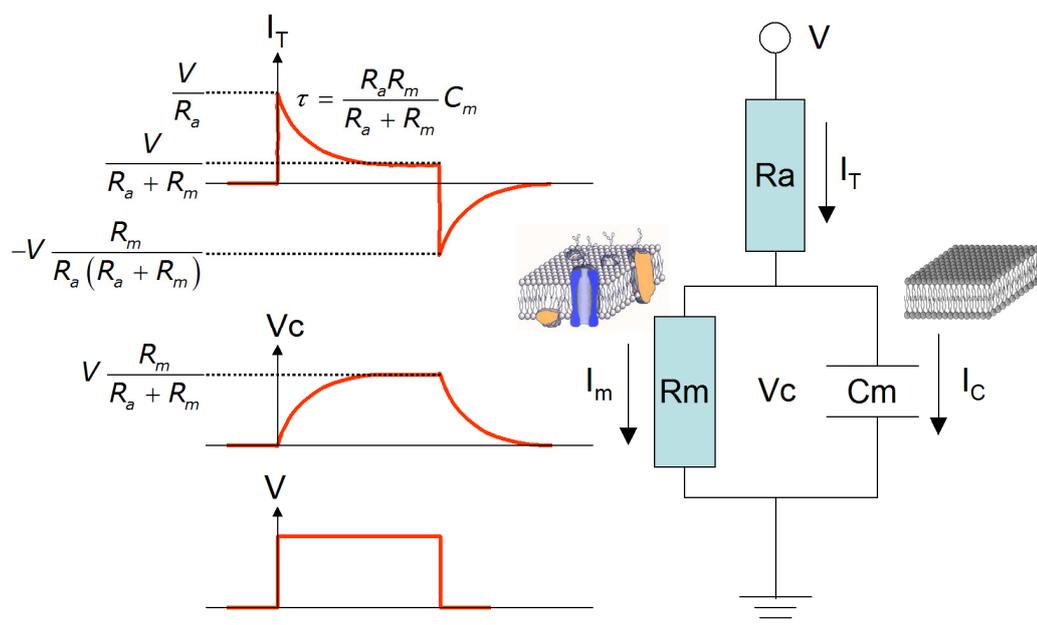


## PATCH-CLAMP EN LA CONFIGURACIÓN DE WHOLE-CELL. ANÁLISIS DEL CIRCUITO RC EQUIVALENTE.

En la configuración de whole-cell la membrana se comporta como un circuito RC en paralelo (Figura 59). Las propiedades eléctricas de la bicapa lipídica se asemejan a las de un condensador ( $C_m$ ), y los canales iónicos se comportan como una resistencia ( $R_m$ ). Además, en serie con este circuito se encuentra la resistencia de la pipeta de registro, dominada por la resistencia de acceso a la célula en la punta de la pipeta. Esta resistencia se denomina habitualmente *resistencia en serie* o *resistencia de acceso* ( $R_a$ ), y puede variar durante el registro como consecuencia del resellado parcial del parche de membrana que se rompió al pasar de cell-attached a la configuración de whole-cell.

Tanto la resistencia de acceso como la capacidad de la membrana condicionan notablemente la fijación de voltaje, tal y como se muestra en la Figura 59. Al aplicar un pulso cuadrado de voltaje, de amplitud  $V$ , el potencial real a través de la membrana ( $V_c$ ) se ve modificado en su amplitud por la  $R_a$  y en su curso temporal tanto por  $R_a$  como por  $C_m$ .

Veamos como varían el potencial de membrana ( $V_c$ ) y la corriente registrada



**Figura 59.** Respuesta del circuito RC equivalente a un pulso cuadrado de potencial.

## Anexo I

en el amplificador de patch ( $I_T$ ) al aplicar un pulso despolarizante de amplitud  $V$ .

El potencial aplicado ( $V$ ) es la suma de los potenciales a través de  $R_a$  ( $V_{Ra}$ ) y de la célula ( $V_C$ ):

$$V = V_{R_a} + V_C$$

$V_{Ra}$  depende de la corriente que fluye a través de  $R_a$  ( $I_T$ ), por lo que aplicando la ley de ohm

$$V = R_a I_T + V_C$$

Teniendo en cuenta que en cualquier instante la corriente que fluye a través de  $R_a$  es la suma de las corrientes que fluyen por  $R_m$  y  $C_m$

$$V = R_a (I_{R_m} + I_C) + V_C = R_a I_{R_m} + R_a I_C + V_C$$

$I_{R_m}$  depende de  $V_C$  y  $R_m$  (ley de Ohm), e  $I_C$  es proporcional a la magnitud de  $C_m$  y a la variación del potencial con el tiempo, por lo que

$$V = R_a \frac{V_C}{R_m} + R_a C_m \frac{dV_C}{dt} + V_C$$

Reordenando términos

$$\frac{dV_C}{dt} + \frac{R_a + R_m}{R_a R_m C_m} V_C = \frac{V}{R_a C_m}$$

Resolviendo la ecuación diferencial con  $V_C=0$  como situación inicial,

$$V_C = V \frac{R_m}{R_a + R_m} \left(1 - e^{-t/\tau}\right)$$

dónde

$$\tau = \frac{R_a R_m}{R_a + R_m} C_m$$

La corriente total a través del circuito será

$$I_T = I_m + I_C = \frac{V_C}{R_m} + C_m \frac{dV_C}{dt}$$

y sustituyendo  $V_C$

$$I_T = \frac{V}{R_a + R_m} \left(1 - e^{-t/\tau}\right) + \frac{V}{R_a} e^{-t/\tau}$$

$$I_T = \frac{V}{R_a + R_m} \left(1 + \frac{R_m}{R_a} e^{-t/\tau}\right)$$

Tal y como describen las ecuaciones que describen  $V_C$  e  $I_T$  en función del tiempo, y tal y como se muestra en la figura 59, cuando  $t=0$

$$V_C(0) = 0$$

$$I_T(0) = \frac{V}{R_a}$$

Con el tiempo el potencial y la corriente alcanza un valor estacionario igual a

$$V_C(\infty) = V \frac{R_m}{R_a + R_m}$$

$$I_T(\infty) = \frac{V}{R_m + R_a}$$

El curso temporal de  $V_C$  e  $I_T$  siguen una exponencial con una constante de tiempo  $\tau$ . De forma análoga, se puede estimar el cambio de  $V_C$  e  $I_T$  en la repolarización, teniendo en cuenta que en este caso la ecuación diferencial debe resolverse con

$$V_C = V \frac{R_m}{R_a + R_m}$$

como situación inicial. En este caso la variación de  $V_C$  e  $I_T$  en el tiempo vendrá descrita por las ecuaciones

$$V_C = V \frac{R_m}{R_a + R_m} e^{-t/\tau}$$

$$I_T = -V \frac{R_m}{R_a (R_a + R_m)} e^{-t/\tau}$$

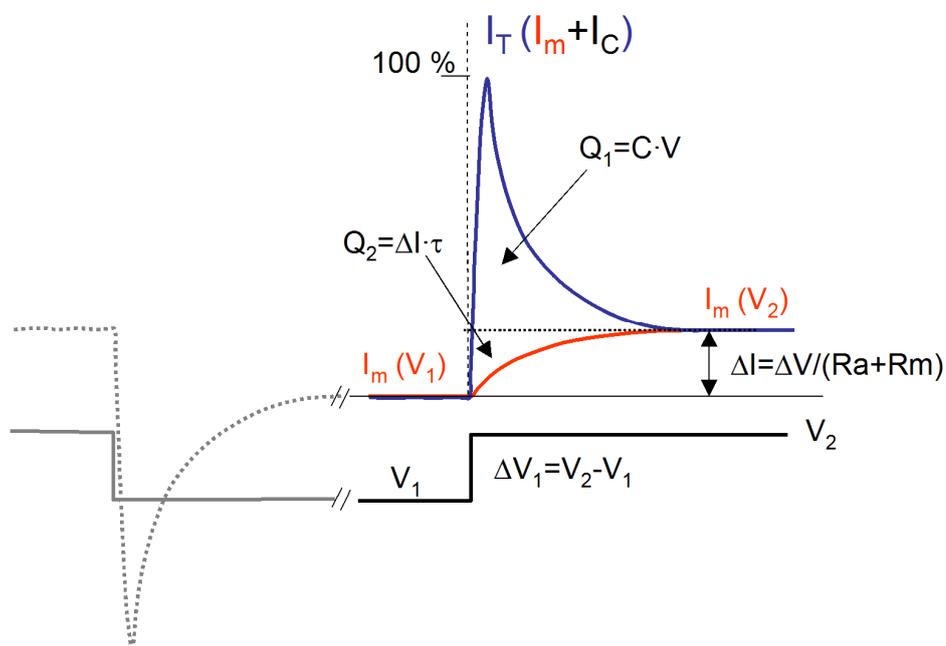
En este caso, tanto  $V_C$  como  $I_T$  tienden a 0 en el estado estacionario, siguiendo un curso temporal exponencial, con idéntica constante de tiempo a la obtenida en la fase despolarizante. En este caso, cuando  $t=0$

$$V_c(0) = V \frac{R_m}{R_a + R_m}$$

$$I_T(0) = -V \frac{R_m}{R_a (R_a + R_m)}$$

## UTILIZACIÓN DE UN PULSO DE POTENCIAL PARA ESTIMAR RA, CM Y RM

Estimar  $R_a$  resulta fundamental en los experimentos en los que se estudia el efecto de la perfusión intracelular con anticuerpos frente a canales iónicos



**Figura 60.** Estimación de  $R_a$  a partir del transitorio de corriente obtenido mediante un pulso de potencial.

responsables de modular el valor de  $R_m$ , ya que de lo dicho hasta ahora resulta evidente que cambios en  $R_a$  a lo largo del experimento producen cambios significativos en  $I_T$ . Aparentemente podría calcularse  $R_a$  a partir del valor de  $I_T$  en el momento  $t=0$ , tal y como se muestra en la figura 1 y en la discusión anterior. Lamentablemente, el ancho de banda del sistema de registro impide aplicar cambios instantáneos en el potencial, por lo que  $I_T(0)$  no es un parámetro directamente medible. No obstante, tal y como se muestra en la Figura 60, el análisis del transitorio de corriente como consecuencia de un

pulso despolarizante permite estimar varios parámetros que pueden utilizarse para computar  $R_a$  de forma indirecta.

1. Una vez alcanzado el estado estacionario, la corriente capacitativa es 0, por lo que la corriente total ( $I_T$ ) es igual a la corriente que fluye por  $R_a$  y  $R_m$ :

$$\Delta I = \frac{\Delta V}{R_m + R_a} = \frac{\Delta V}{R_T}$$

Obviamente, a partir del registro de  $I_T$  en el estado estacionario puede computarse la resistencia total,  $R_T$ .

2. En segundo lugar, la constante de tiempo de carga del condensador ( $\tau$ ) es fácilmente medible ajustando el transitorio de corriente a una función exponencial simple.
3. Finalmente, el último parámetro que puede extraerse fácilmente del registro de corriente es la carga necesaria para cargar el condensador ( $Q_T$ ). Este valor coincide con la integral (el área bajo la curva) de la corriente capacitativa ( $I_C$ ). Como puede verse en la Figura 60, si bien el registro de corriente se corresponde con  $I_T$  ( $I_m + I_C$ ), el curso temporal de  $I_m$  puede inferirse a partir  $I_T$  en el estado estacionario y la constante de tiempo  $\tau$ , por lo que la integral de  $I_C$  ( $Q_T$ ) puede computarse experimentalmente midiendo  $Q_1$  y  $Q_2$  (Figura 2).  $Q_1$  se calcula integrando la corriente transitoria tras sustraer  $\Delta I$ , y  $Q_2$  se obtiene simplemente multiplicando  $\Delta I$  por  $\tau$ <sup>6</sup>:

$$Q_2 = \Delta I \tau$$

Una vez calculados  $Q_1$  y  $Q_2$  podemos calcular fácilmente  $C_m$ , ya que

$$Q_T = Q_1 + Q_2$$

$$C_m = \frac{Q_T}{\Delta V}$$

---

<sup>6</sup> La integral de una exponencial es el producto de su amplitud máxima por la constante de tiempo.

## Anexo I

Finalmente, podemos derivar una ecuación que nos permita calcular  $R_a$  a partir de  $R_T$ ,  $\tau$  y  $C_m$ , teniendo en cuenta que

$$\tau = \frac{R_a R_m}{R_a + R_m} C_m$$

$$R_T = R_a + R_m \rightarrow R_m = R_T - R_a$$

Podemos combinar ambas ecuaciones para despejar  $R_a$  en función de los tres parámetros que podemos computar experimentalmente:

$$\tau = \frac{R_a (R_T - R_a)}{R_a + (R_T - R_a)} C_m$$

$$R_a^2 - R_a R_T + R_T \left( \frac{\tau}{C_m} \right) = 0$$

Esta es una ecuación de segundo grado que puede resolverse fácilmente para computar  $R_a$ <sup>7</sup>:

$$R_a = \frac{1}{2} \left( R_T - \sqrt{R_T^2 - \frac{4R_T\tau}{C_m}} \right)$$

---

<sup>7</sup> En realidad, como en toda ecuación de segundo grado ( $ax^2+bx+c=0$ ), existen dos soluciones

$$x_1 = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}; x_2 = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$x_1 + x_2 = \frac{-b}{a}$$

En este caso se cumple que la suma de ambas soluciones es  $R_T$ , por lo que una solución es  $R_a$  y la otra es en realidad  $R_m$ . Puesto que en la configuración de whole-cell  $R_a < R_m$ , la solución que se corresponde con  $R_a$  es  $x_2$ .

# 9 Anexo II



## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN LOS DOS MODELOS DE PROLIFERACIÓN**

El diagrama mostrado en la figura 44 se ha originado a partir del análisis estadístico de los datos realizado con el conjunto de programas GEPAS. El programa T-Rex (utilizado para analizar la expresión diferencial de los genes) aporta estimaciones estadísticas, p-values y probabilidades que se usan para ordenar los genes según su patrón de expresión diferencial. Cuando es necesario, se aportan los p-values ajustados para múltiples análisis, y en este caso, se han aplicado tres métodos. Uno de ellos, el método propuesto por Holm (fwer.holm) determina el FWER (family-wise error rate). Los otros dos métodos calculan el FDR (false discovery rate), uno usando el algoritmo propuesto por Benjamini & Hochberg (Reiner et al., 2003) (fdrBH) y el otro empleando el método de los q values propuesto por Storey (Storey & Tibshirani, 2003).

Las tablas muestran todos los datos aportados por este análisis en las dos condiciones estudiadas: La expresión diferencial de genes al comparar VSMC de tejido frente a VSMC en cultivo (Tabla 7) y la expresión diferencial de genes en la lesión endoluminal a distintos tiempos, usando la opción multi-class del programa T-Rex (Tabla 8). El primer análisis utiliza un método estadístico basado en el t-test, donde el aumento y la disminución de la expresión se indican con valores positivos y negativos en la columna clasificada como "ESTADISTICA", mientras que en el segundo procedimiento la expresión diferencial de los genes se evalúa mediante un test de Anova y todos los valores estadísticos son positivos independientemente de si reflejan un aumento o disminución de la expresión respecto a los valores control. En los dos análisis, seleccionamos genes (marcados en negrita) que muestran una corrección fdrBH del p-value por debajo de 0.05.

Anexo II

**Tabla 7-** Estadísticas de la expresión diferencial de genes en las VSMC en cultivo.

NOMBRE DEL GEN	ESTADÍSTICA	pvalue	fwer.holm	fdrBH	Q value
<b>Kvβ2</b>	<b>8.17370701</b>	<b>0.00121993</b>	<b>0.0646563</b>	<b>0.00780945</b>	<b>6.57E-05</b>
<b>Kv3.3</b>	<b>7.8563261</b>	<b>0.00141828</b>	<b>0.07233232</b>	<b>0.00780945</b>	<b>6.57E-05</b>
<b>Kv1.4</b>	<b>5.95294952</b>	<b>0.00399612</b>	<b>0.17982556</b>	<b>0.01445634</b>	<b>0.00012155</b>
<b>TREK1</b>	<b>5.57012415</b>	<b>0.00508973</b>	<b>0.21885853</b>	<b>0.01628148</b>	<b>0.0001369</b>
<b>Kv10.1</b>	<b>5.25077105</b>	<b>0.0062939</b>	<b>0.24546191</b>	<b>0.01716517</b>	<b>0.00014433</b>
<b>Kir2.1</b>	<b>3.83103347</b>	<b>0.01860164</b>	<b>0.61385403</b>	<b>0.03986065</b>	<b>0.00033515</b>
<b>Kv1.3</b>	<b>3.64932156</b>	<b>0.02178451</b>	<b>0.69710434</b>	<b>0.0448444</b>	<b>0.00037706</b>
<b>Kv4.1</b>	<b>3.29808426</b>	<b>0.02998722</b>	<b>0.86962937</b>	<b>0.05622604</b>	<b>0.00047276</b>
Trpp2	2.58948827	0.06071666	1	0.10851494	0.00091241
Kv11.1(erg-1)	2.57746506	0.0614918	1	0.10851494	0.00091241
Cav1.3	1.95279861	0.1225629	1	0.18855831	0.00158543
Trpm7	1.79068255	0.14783308	1	0.22174962	0.0018645
Trpc4	1.69386196	0.16554163	1	0.24225605	0.00203692
SK3	1.61822724	0.18092404	1	0.25245215	0.00212265
SK4(IK1)	1.53536665	0.19949053	1	0.27203254	0.00228729
KChIP4	1.3463968	0.24941032	1	0.31839615	0.00267712
Cica1	1.23468828	0.28451884	1	0.34839041	0.00292932
Kvβ3	1.14244211	0.31700847	1	0.38041016	0.00319854
BKβ2	0.99427581	0.37636554	1	0.44278299	0.00372298
Kv4.2	0.90677834	0.41580963	1	0.47978034	0.00403406
Kv11.3(erg-3)	0.67404014	0.53723198	1	0.59692442	0.00501903
BKβ4	0.59900737	0.58144152	1	0.63429984	0.00533328
Clcn3	0.42667291	0.6915791	1	0.71593862	0.00601971
Trpm4	0.42593554	0.692074	1	0.71593862	0.00601971
Trpc6	0.37996328	0.72328609	1	0.73554518	0.00618457
Trpc3	-0.21835274	0.83784199	1	0.83784199	0.00704469
TASK2	-0.45515728	0.67260641	1	0.71593862	0.00601971
Cav3.1	-0.82275116	0.45686874	1	0.51720989	0.00434877
Kir2.2	-1.29922712	0.26369187	1	0.32961484	0.00277145
Trpm3	-1.39990246	0.23412763	1	0.30538386	0.00256771
Trpp1	-1.51286447	0.20486273	1	0.2731503	0.00229669
Trpv4	-1.66192031	0.17186399	1	0.24551998	0.00206437
Trpc1	-2.20678592	0.09195467	1	0.14519159	0.00122079
SK1	-2.2110281	0.0915213	1	0.14519159	0.00122079
Kvβ1	-2.23344564	0.08926876	1	0.14519159	0.00122079
Kv1.6	-2.27333283	0.0854127	1	0.14519159	0.00122079
<b>KChAP</b>	<b>-3.33552337</b>	<b>0.02895622</b>	<b>0.86868664</b>	<b>0.0560443</b>	<b>0.00047123</b>
<b>Cav3.2</b>	<b>-3.61672854</b>	<b>0.0224222</b>	<b>0.69710434</b>	<b>0.0448444</b>	<b>0.00037706</b>
<b>Kir6.2</b>	<b>-3.90818429</b>	<b>0.01742053</b>	<b>0.59229797</b>	<b>0.03871229</b>	<b>0.0003255</b>
<b>SK2</b>	<b>-4.00756454</b>	<b>0.01602898</b>	<b>0.56101442</b>	<b>0.03698996</b>	<b>0.00031102</b>
<b>BK</b>	<b>-4.42333794</b>	<b>0.01148113</b>	<b>0.41332077</b>	<b>0.02755472</b>	<b>0.00023168</b>
<b>SUR2</b>	<b>-4.56965876</b>	<b>0.01026344</b>	<b>0.37974736</b>	<b>0.02565861</b>	<b>0.00021574</b>
Trpv2	-4.8159337	0.00854828	0.32483479	0.02229987	0.0001875
<b>Kv9.3</b>	<b>-5.31708384</b>	<b>0.00601738</b>	<b>0.2406952</b>	<b>0.01716517</b>	<b>0.00014433</b>
<b>Kv2.1</b>	<b>-5.47198963</b>	<b>0.00542716</b>	<b>0.22251359</b>	<b>0.01628148</b>	<b>0.0001369</b>
<b>TASK1</b>	<b>-5.52488279</b>	<b>0.005242</b>	<b>0.22016411</b>	<b>0.01628148</b>	<b>0.0001369</b>
Trpc2	-5.91292953	0.00409596	0.18022234	0.01445634	0.00012155
<b>Kv1.5</b>	<b>-6.12597418</b>	<b>0.00359737</b>	<b>0.16547902</b>	<b>0.01438948</b>	<b>0.00012099</b>
<b>Cnn1</b>	<b>-6.4240303</b>	<b>0.00301876</b>	<b>0.14271396</b>	<b>0.01293754</b>	<b>0.00010878</b>
<b>Kv1.1</b>	<b>-6.45044422</b>	<b>0.00297321</b>	<b>0.14271396</b>	<b>0.01293754</b>	<b>0.00010878</b>

Nos3	-7.83681488	0.00143173	0.07233232	0.00780945	6.57E-05
Cav1.2	-8.04425144	0.0012964	0.06741296	0.00780945	6.57E-05
Kir6.1	-8.41477966	0.00109184	0.05895932	0.00780945	6.57E-05
TWIK1	-8.71250629	0.0009558	0.05256908	0.00780945	6.57E-05
Kir4.1	-9.92673874	0.00057823	0.03238081	0.00693875	5.83E-05
Kv4.3	-10.3333073	0.00049494	0.02821165	0.00693875	5.83E-05
Kv3.4	-11.7948427	0.0002957	0.01715064	0.00591401	4.97E-05
Kv1.2	-14.4185619	0.00013448	0.00793443	0.00403445	3.39E-05
BKβ1	-16.6256809	7.67E-05	0.00460026	0.00403445	3.39E-05

**Tabla 8-** Estadísticas de la expresión diferencial de genes en la lesión endoluminal.

NOMBRE DEL GEN	ESTADÍSTICA	pvalue	fwer.holm	fdrBH	Q value
Clca1	68.422699	4.80E-06	0.00028793	0.00028793	7.85E-05
Kv1.5	37.1956978	4.79E-05	0.00282894	0.00143845	0.00039215
Kv2.1	30.5888004	9.84E-05	0.00570879	0.00196855	0.00053667
BK	25.3422165	0.00019435	0.01107768	0.00291518	0.00079474
Cav3.2	21.952261	0.00032374	0.01812945	0.00294281	0.00080227
Kv1.2	21.7244892	0.00033585	0.01847197	0.00294281	0.00080227
BKβ1	21.5890293	0.00034333	0.01853969	0.00294281	0.00080227
SK3	19.5539131	0.0004853	0.02572096	0.00363976	0.00099227
Kvβ2	13.7762737	0.00158793	0.08257252	0.01058622	0.00288603
Cnn1	13.23421	0.00181115	0.09236887	0.01086693	0.00296255
Kir6.1	12.5870915	0.00213155	0.10657732	0.01162662	0.00316966
Kv1.3	12.2040615	0.00235482	0.11538635	0.01177412	0.00320987
Trpp1	11.5218163	0.00282996	0.1358381	0.01306136	0.0035608
Kv4.3	10.6687174	0.00360594	0.16947934	0.01545404	0.0042131
Nos3	9.76977348	0.00473404	0.21776598	0.01790758	0.00488198
Trpc2	9.74206734	0.00477536	0.21776598	0.01790758	0.00488198
Trpv2	8.39938259	0.00745375	0.32796477	0.02630734	0.00717193
Kv3.4	8.15215778	0.00813634	0.34986264	0.02712114	0.00739379
Kvβ1	7.88136578	0.00897597	0.37699072	0.02834517	0.00772749
SUR2	7.02319241	0.01246042	0.51087703	0.03693151	0.0100683
Kv1.1	6.93146229	0.01292603	0.51704109	0.03693151	0.0100683
Cav1.2	6.61351538	0.01471745	0.57398064	0.04013851	0.0109426
Kv4.1	5.9893527	0.0192319	0.73081201	0.05017016	0.01367744
TASK1	4.7279253	0.03507906	1	0.08769764	0.02390822
Trpc1	4.60135841	0.03745266	1	0.08831916	0.02407766
KChAP	4.55998373	0.03827164	1	0.08831916	0.02407766
Trpm4	3.4096055	0.07343209	1	0.1601327	0.04365553
Kir6.2	3.38111591	0.07472859	1	0.1601327	0.04365553
TWIK1	3.21474314	0.08289243	1	0.17150159	0.04675493
Cav1.1	3.07707214	0.09049527	1	0.1774334	0.04837207
Clca5	3.0570097	0.09167393	1	0.1774334	0.04837207
Kv9.3	2.83338904	0.1061855	1	0.19909782	0.05427824
BKβ4	2.67937636	0.11784747	1	0.21426813	0.05841399
SK2	2.62001395	0.12276015	1	0.21663557	0.0590594
Kir4.1	2.42602682	0.14066966	1	0.24114799	0.065742
Kv1.6	2.35380507	0.14814732	1	0.24691219	0.06731344
Cav1.3	2.29947901	0.15409464	1	0.24988319	0.0681234
MiRP2	2.23147273	0.16195686	1	0.25572136	0.06971501
Kv3.3	2.11620474	0.17643416	1	0.27143717	0.07399947

## Anexo II

Trpc3	1.95648122	0.19919644	1	0.29879467	0.08145769
TASK2	1.49995697	0.28689921	1	0.4198525	0.1144606
KChIP4	1.34342599	0.32717025	1	0.46690215	0.12728732
Trpm3	1.31698978	0.3346132	1	0.46690215	0.12728732
Trpc6	1.2618463	0.35078743	1	0.47662318	0.12993747
Clcn3	1.23993325	0.35746738	1	0.47662318	0.12993747
Kir2.1	1.16011441	0.38308203	1	0.49967222	0.13622113
Trpm2	0.97806233	0.44979873	1	0.56957771	0.15527883
Kvβ3	0.94547039	0.46308008	1	0.56957771	0.15527883
Trpv4	0.92449004	0.4718602	1	0.56957771	0.15527883
KChIP3	0.9179185	0.47464809	1	0.56957771	0.15527883
Cav3.1	0.70583093	0.57490522	1	0.66447521	0.18114988
Trpm7	0.69805956	0.57897627	1	0.66447521	0.18114988
Kv4.2	0.68299091	0.5869531	1	0.66447521	0.18114988
Kv11.1(erg-1)	0.59965718	0.63306356	1	0.70340395	0.19176267
Trpc4	0.55176836	0.66109264	1	0.70965177	0.19346596
Trpm6	0.54967749	0.66234165	1	0.70965177	0.19346596
SK1	0.34422159	0.79438794	1	0.83619783	0.22796507
SK4(IK1)	0.21508649	0.88322306	1	0.91367902	0.24908806
Trpp2	0.17607811	0.90962499	1	0.92504237	0.25218595
Trpm5	0.14045015	0.93293619	1	0.93293619	0.25433797