



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología
Máster en Investigación Biomédica

Efecto de agentes antiproliferativos sobre la formación de neoíntima en vasos humanos.

Memoria para optar al Título de Master en Investigación Biomédica presentada por:

Marycarmen Arévalo Martínez

Directora de trabajo
Dra. Pilar Ciudad Velasco

Valladolid, Septiembre de 2015

Índice

Índice	2
Abreviaturas.....	3
1. Introducción	4
1.1. El sistema cardiovascular	4
1.2. Remodelado vascular	4
1.3. Hiperplasia de la íntima	5
1.4. Células de musculo liso vascular. (VSMC).....	6
1.5. Papel de los canales de potasio en la modulación fenotípica.....	7
2. Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos	9
3.1. Muestras vasculares	9
3.2. Fármacos.....	9
3.3. Cirugía	10
3.4. Cultivo de órganos.....	10
3.5. Técnicas histológicas.....	11
3.6. Análisis de imágenes	14
3.7. Análisis estadístico	15
4. Resultados.....	16
4.1. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la vena safena en cultivo de órgano.....	16
4.2. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la arteria mamaria en cultivo de órgano.....	20
5. Discusión	23
5.1. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la vena safena en cultivo de órgano.....	23
5.2. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la arteria mamaria en cultivo de órgano.....	26
6. Conclusiones	28
Perspectivas Futuras	28
Bibliografía.....	29

Abreviaturas

VSMC células de músculo liso vascular (vascular smooth muscle cells)

Kv canal de potasio dependiente de voltaje

MEM medio esencial mínimo (minimal essential media)

FBS suero fetal bovino (fetal bovine serum)

PBS tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)

PAP-1 5- (4- phenoxybutoxy)psoralen

DAB Diaminobencidina

mTor diana de rapamicina en mamíferos (mammalian Target Of Rapamycin)

HRP peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)

SM músculo liso (smooth muscle)

1. Introducción

1.1. El sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular está formado por el corazón, los vasos sanguíneos y la sangre. Su función es distribuir el oxígeno y nutrientes a los tejidos, transportar los desechos metabólicos hacia los órganos excretores, transportar agua, electrolitos y hormonas. Además funciona como infraestructura para el sistema inmune y es termorregulador.¹

Los vasos sanguíneos forman una red en todo el organismo para irrigar todos los tejidos del organismo. Según el flujo sanguíneo, los vasos comienzan en la arteria aorta (circulación mayor) o arteria pulmonar (circulación menor). Estas arterias son elásticas y comienzan a ramificarse en arterias musculares que a su vez se dividen en vasos más pequeños llamados arteriolas que continúan dividiéndose hasta formar los capilares caracterizados por ser los vasos más pequeños y carecer de células de músculo liso vascular (VSMC). Luego los capilares convergen para formar vénulas que a su vez se van uniendo para formar venas y terminar en la vena Cava (circulación mayor) y vena Pulmonar (circulación menor) llevando de regreso la sangre al corazón.¹

La pared vascular de los vasos sanguíneos está formada por tres capas: la túnica íntima, la túnica media, y la túnica adventicia. Aunque sus características varían según el tipo de vaso, tienen una estructura general conservada. De dentro afuera nos encontramos:

La **túnica íntima**, formada por tres partes el endotelio, la lámina basal de las células endoteliales y la capa subendotelial. El endotelio es una monocapa de células epiteliales escamosas. La capa subendotelial consiste en tejido conectivo laxo, puede contener VSMC. La capa subendotelial presenta la membrana elástica interna que separa la túnica íntima de la túnica media.

La **túnica media** se encuentra en la zona central y consiste en capas de VSMCs dispuestos en circunferencia. Se puede encontrar fibras de elastina, reticulares y proteoglicanos entre las VSMCs. Esta capa es más gruesa en arterias que en venas. La membrana elástica externa separa la túnica media de la túnica adventicia.

La **túnica adventicia**, compuesta de fibras de colágeno longitudinales y algunas fibras elásticas. En arterias es más delgada y en venas más gruesa. En los vasos grandes contiene el vaso vasorum.²

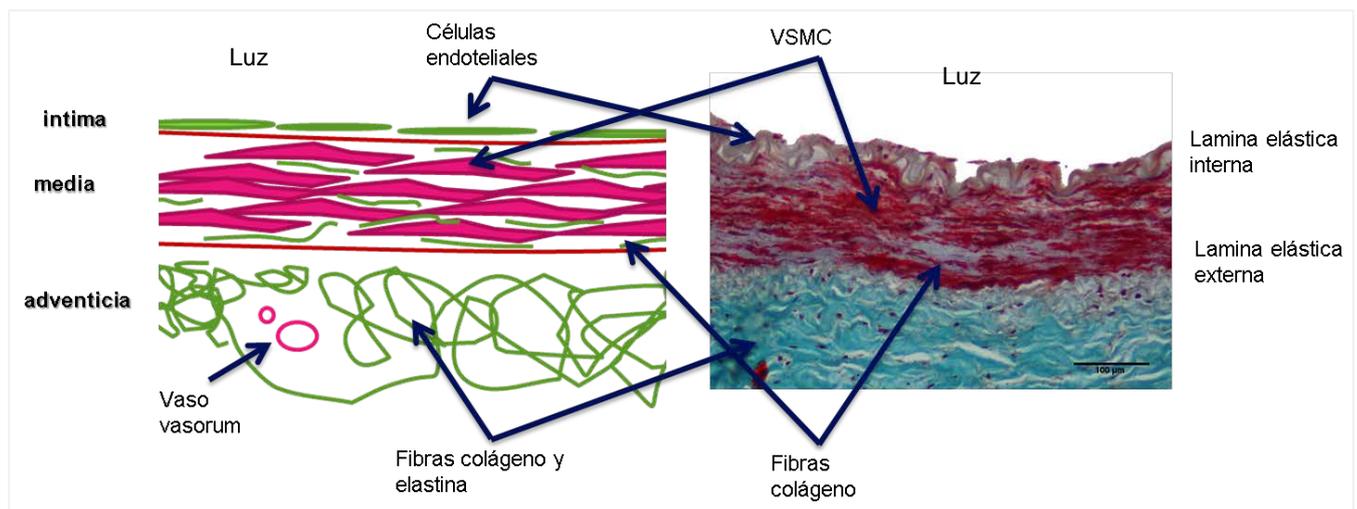


Figura 1 Esquema capas de pared vascular. Se muestran la túnica íntima, media y adventicia con sus estructuras. A su derecha microfotografía de arteria mamaria humana 10x, donde se pueden apreciar las capas de la pared vascular.

1.2. Remodelado vascular

La pared vascular es una estructura en constante adaptación en respuesta a los distintos estímulos: mecánicos, hemodinámicos y humorales. Estos estímulos modulan la estructura, la función y las propiedades de la pared a lo largo del tiempo. En condiciones fisiológicas estos cambios contribuyen

al control activo del flujo sanguíneo en los órganos y tejidos pero en situaciones patológicas en respuesta a una enfermedad, lesión o a la edad se producen una serie de cambios estructurales conocidos como remodelado vascular.

El remodelado vascular supone el reordenamiento, proliferación o migración de las VSMCs y la alteración de la matriz extracelular. Los tipos de remodelado vascular se clasifican de acuerdo a la masa de la pared vascular (pudiéndose ser hipotrófico, hipertrófico o eutrófico) y de acuerdo al tamaño del vaso (clasificándose en este caso como inward u outward). El remodelado hipotrófico supone una disminución del área de la pared vascular, el remodelado hipertrófico un aumento del área de la pared muscular, y el remodelado eutrófico consiste en un reordenamiento del número y tamaño de células alrededor del lumen, sin cambio en el área de pared del vaso. El remodelado inward (IR) implica una disminución del tamaño del vaso y el remodelado outward (OR) un aumento del tamaño del vaso, esto supone que la proliferación y/o migración y/o reordenamiento es hacia dentro o hacia fuera respectivamente^{3 4 5}, ver Figura 2.

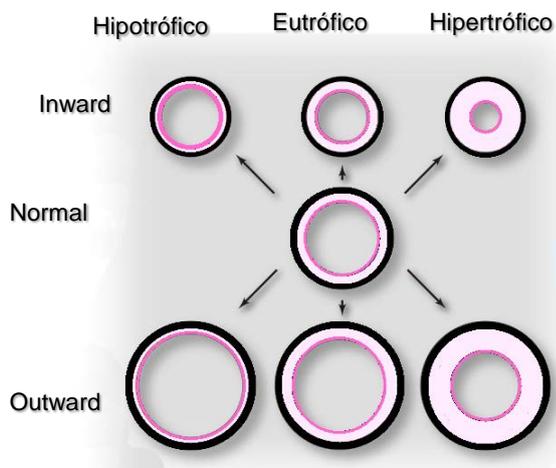


Figura 2. Tipos de remodelado vascular.³ En rosa se representa la túnica íntima, en blanco la túnica.

1.3. Hiperplasia de la íntima

La hiperplasia de la íntima es un cambio en la estructura del vaso que se produce como 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.⁶ Las situaciones patológicas asociadas a hiperplasia de la íntima son diversas y, en general, los factores desencadenantes pueden agruparse como lesiones físicas (en muchos casos yatrogénicas por la cirugía vascular) inflamatorias (como en las lesiones ateroscleróticas) o por aumento de la tensión de la pared (como en el caso de la hipertensión pulmonar o la utilización de injertos venosos en la cirugía de bypass). Entre las enfermedades más frecuentemente asociadas a la hiperplasia de la íntima se encuentran:

-La **vasculopatía post-transplante**, que es el principal factor limitante de la supervivencia a largo plazo después de un transplante de órgano sólido. Se origina por la combinación de factores físicos, químicos e inmunológicos que producen una lesión endotelial que desencadena la proliferación de VSMC y la hiperplasia de la íntima. El engrosamiento de la íntima lleva a la obstrucción de vaso lo que produce el fallo del injerto^{7:8}.

-La **reestenosis post-procedimientos de revascularización percutánea coronaria y vascular periférica**. La angioplastia es una intervención percutánea empleada para el tratamiento de la enfermedad coronaria y de la arteriopatía periférica, que consiste en introducir un balón (con o sin stent) para restablecer el flujo sanguíneo en un vaso ocluido. La incidencia de reestenosis tras los procedimientos de revascularización es elevada a pesar de los tratamientos posteriores. La lesión mecánica originada durante la angioplastia determina el desarrollo de hiperplasia de íntima y la progresiva estenosis luminal. Para prevenir la reestenosis se utilizan stents recubiertos de fármacos

que permiten la administración local (intravascular) de un agente antiproliferativo. Se emplean los inhibidores de la vía mTOR (del inglés mamalian target of rapamicina) o agentes antitrombóticos. Ambos son potentes agentes proliferativos que no son específicos de las VSMC lo que no permite la correcta reendotelización y curación de la superficie vascular.

El desarrollo de stents recubiertos de fármacos con efectos antiproliferativos más específicos de VSMC tendría un importante impacto en el contexto clínico del tratamiento y prevención de la hiperplasia de la íntima dada la gran relevancia de esta patología por su elevado impacto socio-económico.

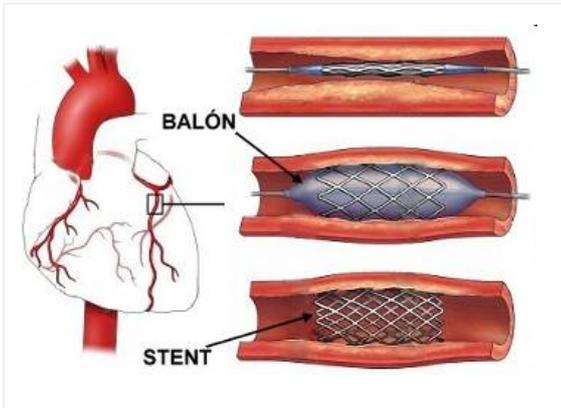


Figura 3. Angioplastia coronaria con stent: con ayuda de un catéter se introduce un balón en el vaso afectado hasta el lugar de la oclusión, se dilata el balón, posteriormente se desinfla y se coloca un stent, que va a mantener el vaso abierto

-La **oclusión tardía del by-pass**, la revascularización con injertos venosos es la terapia estándar para enfermedades arteriales oclusivas cuando el segmento ocluido es grande y no se puede practicar una angioplastia. La técnica más utilizada es el trasplante autogénico de un segmento de vena safena. A pesar que el resultado inmediato es satisfactorio, a largo plazo, el injerto venoso sufre una respuesta crónica mal adaptativa a un entorno arterial cuyo componente primario es la proliferación descontrolada de VSMC dando lugar a una hiperplasia de la íntima que puede complicarse posteriormente por el desarrollo de aterosclerosis y trombosis⁹. La posibilidad de manipular los trasplantes venosos ex vivo de forma previa a su implantación utilizando métodos farmacológicos, terapia génica o la aplicación de recubrimientos sintéticos es una alternativa que se ha intentado explorar para prevenir el fallo del injerto y que en algunos casos ha demostrado ser efectiva en animales de experimentación.¹⁰

El desarrollo de la hiperplasia de la íntima supone por tanto un importante factor limitante del éxito a largo plazo de los procedimientos de revascularización miocárdica o vascular periférica y de trasplante de órganos. Los mecanismos que intervienen en el desarrollo de la hiperplasia de la íntima se agrupan en varias fases: trombosis e inflamación, migración y proliferación de las VSMCs y síntesis de matriz extracelular.¹¹ En todo este complejo proceso **las VSMCs juegan un destacado papel** por lo que conocer en detalle su participación es de gran utilidad.

1.4. Células de músculo liso vascular. (VSMC)

Las VSMC son células fusiformes cuya principal función es la contracción que permite regular el diámetro de los vasos y determinar la perfusión de los tejidos. Las VSMC maduras (fenotipo contráctil) se encuentran en un estado quiescente presentan capacidad contráctil, poco retículo endoplasmático rugoso y baja capacidad de proliferación y migración. Expresan proteínas contráctiles importantes para su función y características de músculo liso (SM) como: α -actina de SM, cadena pesada de miosina de SM, proteína SM22 α , h1-calponina, miocardina entre otros.¹² Estas proteínas permiten identificar a las VSMC maduras del resto de tipos de células musculares. Sin embargo Las VSMC maduras mantiene su plasticidad y en respuesta a determinadas señales son capaces de cambiar de forma reversible a un fenotipo proliferativo.¹³ Las VSMC con fenotipo proliferativo presentan más retículo endoplasmático rugoso y una alta capacidad proliferativa y de migración. A este cambio fenotípico se le conoce como **modulación fenotípica**. Esta transformación implica modificaciones en la expresión de proteínas de tal forma que en el fenotipo proliferativo disminuye la expresión de proteínas contráctiles y aumenta la de proteínas involucradas en proliferación, migración y secreción de matriz extracelular. Asimismo se han descrito cambios en la expresión de proteínas transportadoras de membrana y canales iónicos.

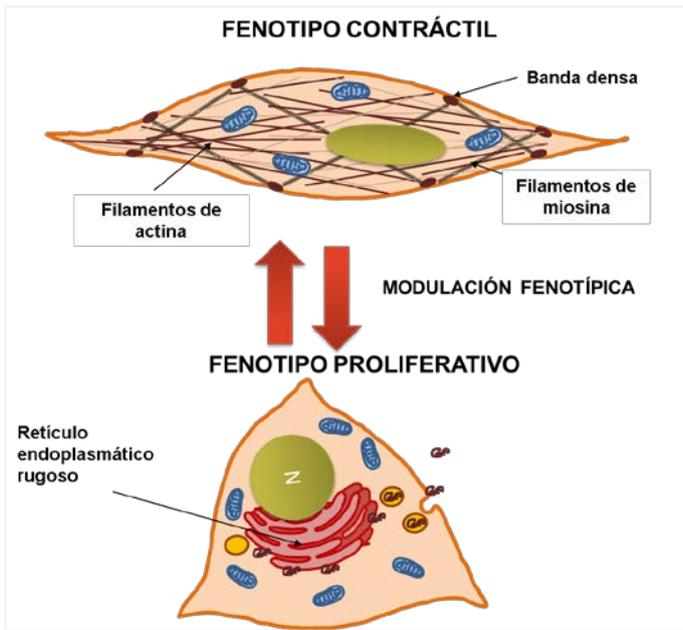


Figura 4. Esquema de modulación fenotípica que ocurre en las VSMC. El fenotipo contráctil es una célula diferenciada caracterizada por ser fusiforme y presentar proteínas contráctiles. El fenotipo proliferativo tiene abundante retículo endoplasmático rugoso que permite la síntesis de matriz extracelular y proteínas para llevar a cabo funciones proliferativas y de migración.

1.5. Papel de los canales de potasio en la modulación fenotípica.

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) constituyen una de las familias más diversas de proteínas de membrana ubicuas presentes en células excitables y no excitables. En las no excitables regulan el potencial de membrana en funciones como la migración y proliferación.¹⁵

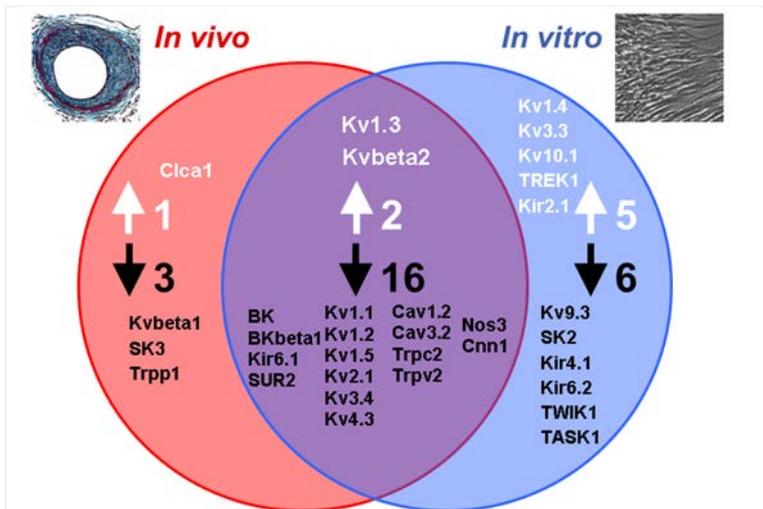


Figura 5: Cambios en la expresión de canales iónicos en dos modelos proliferativos de VSMC de ratón. La esfera roja muestra cambios de expresión en el modelo *in vivo*, y la esfera azul presenta los cambios *in vitro*. La intersección de ambas muestra los cambios comunes para ambos modelos. Modificado de ¹⁴.

Un trabajo previo del grupo analizó la expresión de hasta 87 genes de canales iónicos en VSMC con fenotipo contráctil y en dos modelos de proliferación: un modelo *in vivo* (mediante lesión endoluminal, que genera una hiperplasia de la íntima) y un modelo *in vitro* (a partir de VSMC en cultivo celular estimuladas con suero fetal bovino (FBS)). El análisis de la expresión génica de canales iónicos mostró un aumento de la expresión de dos genes en ambos modelos: el gen que codifica el Kv1.3, y el gen que codifica para la subunidad accesoria Kvβ2, que actúa como chaperona facilitando la expresión en membrana.¹⁴

Entre los Kv, el canal Kv1.3 fue el primer canal que apareció en la literatura implicado la proliferación, en linfocitos T¹⁶. Desde entonces esta observación se

ha extendido a otros tipos celulares como células progenitoras de oligodendrocitos, glioma, y algunas líneas de cáncer.¹⁵ y a otros canales de la familia Kv¹⁷. En las VSMCs se ha demostrado que la expresión KV1.3 tiene relación con la proliferación celular ya que en presencia de bloqueantes selectivos como 5-(4-phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1) o margatoxina (MgTx), dicha proliferación disminuye tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*.¹⁸ En los modelos *in vitro* este se ha observado en diferentes lechos vasculares, incluyendo células humanas (arterias uterinas, coronarias, renales y venas safenas)^{14 19}.

En este trabajo se pretende reproducir mediante el cultivo de órgano, la estenosis que tiene lugar en las patologías mencionadas en la introducción en dos modelos vasculares: la vena safena y la arteria mamaria. Se han utilizado estas dos preparaciones porque se utilizan de rutina en la cirugía de revascularización coronaria, por lo que la disponibilidad de muestra es relativamente sencilla y porque supone el empleo de un modelo humano, de aplicación clínica.

Los anillos de vena safena y arteria mamaria se mantendrán en cultivo entre 2 y 3 semanas en diferentes condiciones, sin suero fetal (control negativo), con suero fetal (control positivo) para recrear la estenosis y en presencia de un inhibidor del canal Kv1.3, del everolimus, el inhibidor empleado actualmente para bloquear la restenosis de los stents, o de la combinación de ambos. Los resultados que se obtengan podrían ayudar en el diseño nuevas estrategias de tratamiento para evitar y reducir la restenosis que supone el fracaso en muchas de las actuales intervenciones de revascularización.

2. Objetivos

Como se ha explicado en la introducción, en este trabajo se pretende estudiar el remodelado que sufren los vasos que se emplean de forma rutinaria en intervenciones de revascularización miocárdica: la vena safena y arteria mamaria. Estos vasos se mantienen en cultivo de órgano durante tres semanas en distintas condiciones para caracterizar en el remodelado que tiene lugar en estos tejidos que usualmente suele terminar a medio plazo en estenosis del injerto. Más específicamente se pretende explorar la eficacia del tratamiento de los tejidos vasculares con un inhibidor de Kv1.3 en comparación con el tratamiento más habitual en la clínica.

Para esto se llevaron a cabo los siguientes objetivos:

- Poner a punto el cultivo de órganos de anillos de vena safena y arteria mamaria.
- Caracterizar el remodelado que sufren la vena safena y arteria mamaria sometidas a cultivo de órgano en ausencia de suero (0%FBS o control negativo) y en presencia de suero (20%FBS o control positivo).
- Estudiar y comparar el efecto de los inhibidores PAP-1 y Everolimus, sobre el remodelado de los vasos.
- Analizar si el uso combinado de PAP-1 y Everolimus ofrece mejores resultados.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras vasculares

Para realizar este trabajo se emplearon muestras de vena safena y arteria mamaria proporcionadas por el Hospital Clínico Universitario de Valladolid de pacientes sometidos a cirugía de bypass coronario.

Los vasos llegaban al laboratorio en medio de cultivo a 4°C en las 24 horas posteriores a la extracción. Con estas muestras se procedía siguiendo el esquema de trabajo que muestra la Figura 6. Tras la recepción de la muestra se realizó la cirugía y preparación de los anillos vasculares. Posteriormente se procedió al cultivo de órgano. Los vasos se incubaron entre 2 y 3 semanas con los tratamientos correspondientes en una estufa de cultivo. A continuación se procesaron las muestras para su inclusión en parafina para obtener cortes histológicos. Luego se realizaron tinciones histológicas o inmunohistoquímicas que permitieron estudiar los cambios en la estructura y la expresión de proteínas marcadoras de VSMC.

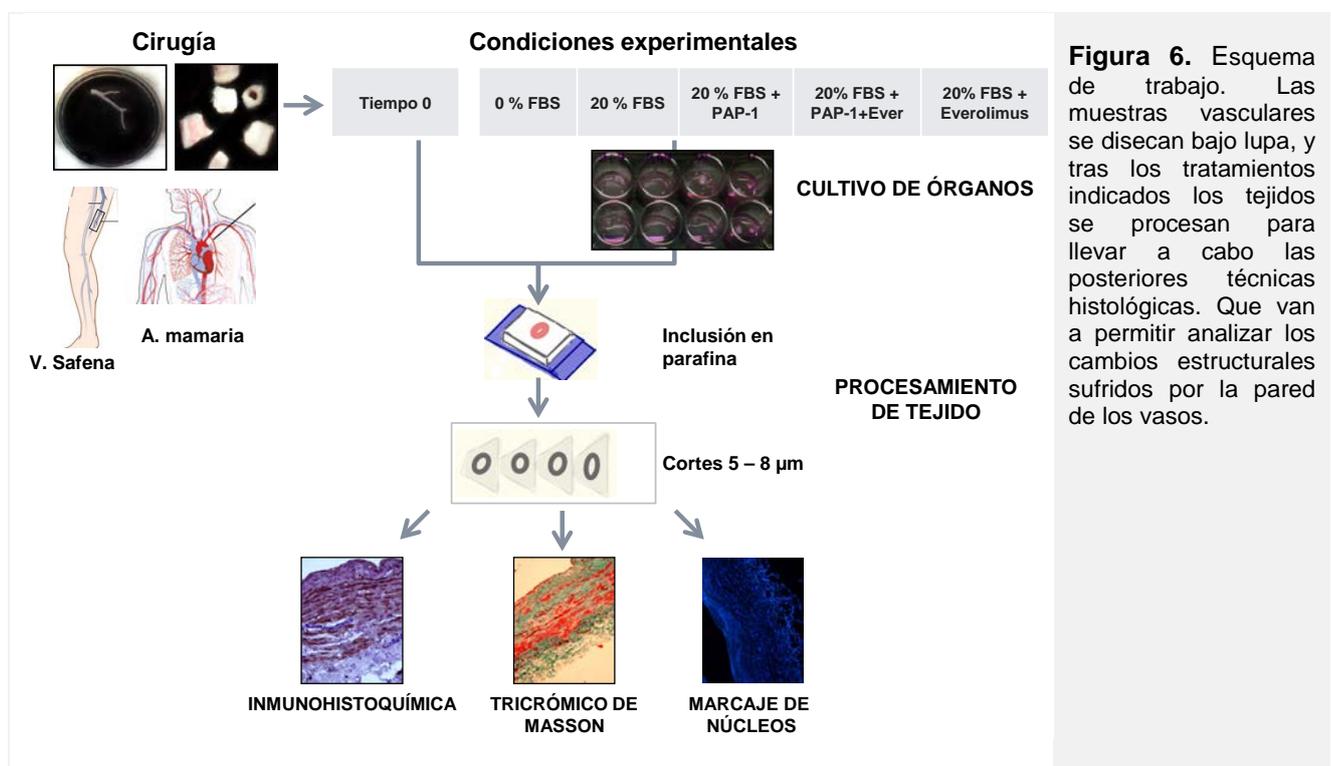


Figura 6. Esquema de trabajo. Las muestras vasculares se disecan bajo lupa, y tras los tratamientos indicados los tejidos se procesan para llevar a cabo las posteriores técnicas histológicas. Que van a permitir analizar los cambios estructurales sufridos por la pared de los vasos.

3.2. Fármacos

3.2.1. 5- (4- phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1)

El PAP-1 es un bloqueante selectivo del canal de potasio Kv1.3, es una molécula pequeña sintética derivada del 5-methoxypsoralen (5-MOP). Este compuesto empezó a investigarse porque se tuvo conocimiento de que infusiones de la planta *Ruta graveolens*, comúnmente conocida como ruda, aliviaban los síntomas de pacientes con esclerosis múltiple, tras investigar la planta se encontró que el principio activo responsable era el 5-MOP por lo que a partir de éste mediante síntesis química se obtuvieron otros compuestos entre los que está el PAP-1. El PAP-1 ha mostrado ser de 23 a 125 veces más selectivo para Kv1.3 que para otros miembros de la familia de los Kv1 con una IC₅₀ para el Kv1.3 de 2nM. Se necesitan dos moléculas de PAP-1 para inhibir un canal.^{20 21}

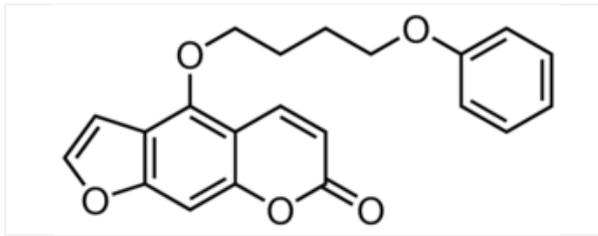


Figura 7 Estructura molecular del compuesto PAP-1 tomado de ²⁰

3.2.2. Everolimus

El everolimus es una lactona macrocíclica sintética derivada del Sirolimus, que se aisló originalmente de *Streptomyces hygroscopicus*. Es un potente inhibidor de la proliferación inducida por factores de crecimiento en linfocitos y otras células hematopoyéticas y en células no hematopoyéticas de origen mesénquimal. Se une al complejo del mTOR (del inglés mammalian Target Of Rapamycin) interrumpiendo el ciclo celular en la fase tardía de G1 e impidiendo la transición a la fase S.²²

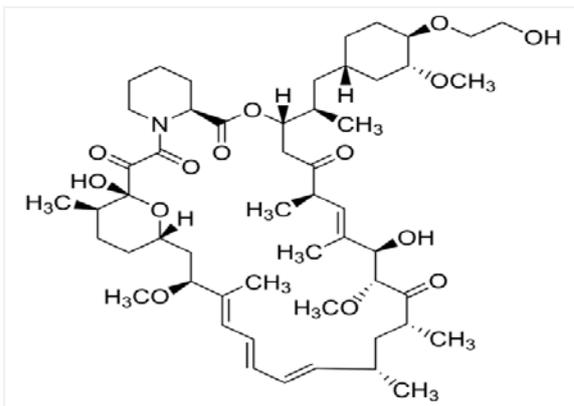


Figura 8. Estructura molecular del everolimus.

3.3. Cirugía

La cirugía de las muestras vasculares se realizó en solución Tyrode cuya composición es 140 mM NaCl, 5mM KCl, 2 mM Ca₂Cl, 1.1 mM Mg₂Cl, 10 mM HEPES y 5 mM glucosa con pH 7,4. La muestra se colocó en solución Tyrode en una placa de Petri con una base de elastómero de silicona (Sylgard®), que sirve como soporte para clavar los pines de cirugía, lo que permiten inmovilizar las muestras para su disección como se muestra en Figura 7. La placa se rodea de hielo para realizar la cirugía en frío y bajo una lupa de disección. En estas condiciones se procedió a limpieza y aislamiento de los anillos vasculares. Se elimina el tejido adiposo y se conserva la adventicia. El tejido se prepara y corta en anillos de entre 0,25 y 0,5 cm de longitud.

3.4. Cultivo de órganos

El cultivo de órganos consiste en mantener el tejido vivo en medio de cultivo a 37 °C para poder estudiar como responde el tejido a los diferentes tratamientos. Tras la cirugía los anillos vasculares se lavan repetidas veces en PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) con antibióticos (penicilina (300 U/ml), estreptomina (300 U/ml) y fungizone (15 µg/ml), para mantener el tejido libre de microorganismos y evitar que se contamine el cultivo. Posteriormente los tejidos se incuban en medio de cultivo MEM (Minimal essential medium, Gibco) con 2 mM de L-glutamina y antibióticos (100 U/ml de penicilina y estreptomina y 5µg/ml de fungizona).

Los tratamientos aplicados son el medio de cultivo base en ausencia de FBS (0% FBS), en presencia de un 20% de FBS y en presencia de 20% FBS más 100 nM de PAP-1 o de 0.1 nM de Everolimus o más la combinación de ambos.

Se utilizaron placas de 12, 24 ó 48 pocillos con los diferentes medios de cultivos y tratamientos. Se colocó un anillo vascular por pocillo. Se realizaron cambios de medio cada 48 horas

Todos los procedimientos de cultivos se llevaron a cabo dentro de una campana de flujo laminar (Telstar Biostar) con filtro HEPA que mantiene la esterilidad con eficacia 99.9 % en partículas mayores de 0,2 µg.

Las placas de cultivo con los anillos vasculares se mantuvieron en incubador de CO₂ (Binder CB150). El incubador se mantuvo con CO₂ al 5% y temperatura de 37°C. Las placas se mantuvieron en cultivo por dos a tres semanas.

3.5. Técnicas histológicas

3.5.1. Preparación del tejido para técnicas histológicas

1. Fijación en formaldehído

Los anillos vasculares se lavaron con PBS cuatro veces por 10 minutos a 4°C para eliminar restos de medio y FBS. Luego se dejaron en formaldehído 4% durante toda la noche en cámara fría. El formaldehído se preparó a partir de solución formaldehído 37% (Sigma-Aldrich) y PBS. Los anillos se lavaron nuevamente con PBS cuatro veces durante 10 minutos a 4°C. Después se colocaron en etanol 70 %.

2. Inclusión de parafina

Se utilizó el Procesador de Tejidos STP120 (Microm) para realizar la inclusión en parafina de los anillos de forma automática. La inclusión de parafina consiste en extraer el agua del tejido y sustituirlo por parafina. Los anillos se colocaron en cassettes de inclusión para tejidos rotulados con la identificación de cada anillo. Los cassettes se colocaron en el cestillo del procesador de tejidos. El programa que se utilizó para el procesador de tejidos se inició con la deshidratación de los anillos pasando por los vasos conteniendo etanol 75% (1h), etanol 90% (1h), etanol 96% (1h), tres vasos con etanol 100% (1h en cada vaso). Luego siguió el aclaramiento para sustituir el agua de los anillos por xileno, dos vasos con xileno (1h en cada vaso). Finalmente los anillos pasaron por dos vasos con parafina (2h en cada uno).

A continuación se procedió a realizar los bloques de parafina. Para esto se utilizó el Centro de Inclusión EC350 (Especialidades Médicas Myr, S.L.) formado por la consola dispensadora y la crioconsola. En un molde metálico lleno de parafina se colocó un anillo y se orientó. Luego se colocó sobre la crioconsola para enfriar la parafina y se obtuvo el bloque de parafina sólida con el tejido incluido en la orientación requerida para los cortes posteriores.

3. Cortes en parafina

Los cortes se realizaron con el Microtomo de Rotación HM 340 E (Microm). Se realizaron cortes transversales del anillo con un grosor de 5 – 8 µm. Los cortes se colocaron en el baño termostatzado a 40°C y se recogieron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Thermo Scientific). Los portaobjetos se dejan secar en una estufa durante 24 horas a 37°C.

4. Desparafinación e hidratación de los portaobjetos

Para cualquier técnica histológica posterior es necesario desparafinar e hidratar los tejidos. Este proceso es común tanto para la tinción como la inmunohistoquímica que se describen en apartados posteriores.

Las soluciones se colocaron en cubetas para tinción. Los portaobjetos se colocaron en cestillos para pasarlos por las diferentes soluciones. Los portaobjetos se pasaron dos veces en cubetas con xileno por 5 minutos. Este paso se realizó en campana de flujo de extracción. Luego se procedió a la hidratación de portaobjetos con etanol absoluto (Panreac) dos veces por 5 minutos, Etanol 96% (Panreac) dos veces por 5 minutos, Etanol 70% (a partir de agua destilada y etanol absoluto) dos veces por 5 minutos y finalmente agua destilada una vez por cinco minutos.

3.5.2. Tinción Tricrómico de Masson

Esta tinción utiliza tres colorantes Hematoxilina, escarlata de Biebrich con fucsina ácida y verde luz. Esto permite distinguir los núcleos, el tejido muscular y las fibras de colágeno respectivamente. Para llevara a cabo partimos de cortes histológicos de entre 5 - 8 µm de grosor adheridas a un portaobjetos recubierto de polilisina. Los pasos de este proceso son los siguientes:

1. Desparafinación e hidratación, según se indicó en apartado anterior.

2. Fijación en solución de Bouin. Una vez desparafinados e hidratados los tejidos, los portaobjetos, se colocaron en solución de Bouin (Panreac) durante 48 horas. La solución de Bouin permite fijar los tejidos y permite una mejor tinción nuclear. La solución de Bouin está compuesta por ácido pícrico saturado con 33% de agua (1,25ml), ácido acético glacial (5 ml) Formaldehído 35-40%) (25 ml) y agua 77 ml. Luego se lavaron los portaobjetos en agua corriente durante 10 min hasta que desapareció el color amarillo, y en agua destilada durante 2 min.

3. Hematoxilina férrica de Weigert. Los portaobjetos se dejaron 30 min en hematoxilina férrica de Weigert (Sigma-Aldrich). La hematoxilina de Weigert es una tinción básica que tiñe de morado oscuro a negro los núcleos. Se preparó mezclando en volúmenes iguales las partes A (hematoxilina 1% en etanol) y B (cloruro férrico 1,2 % (p/v) y ácido clorhídrico 1% (v/v)). Esta mezcla puede ser reutilizada durante dos semanas. Se lavó la hematoxilina con agua corriente 5 min y agua destilada 2 min.

4. Escarlata de Biebrich y Fucsina ácida. El cestillo con portaobjetos se colocó en escarlata durante 20 min. La escarlata tiñe de rosa el músculo y se prepara mezclando 90 ml escarlata Biebrich (Ponceau BS, Sigma) al 1 % en agua destilada con 90 ml de fucsina ácida (Sigma) al 1 % en agua destilada y 1 ml de ácido acético glacial 100% (Merck). Se lavó la escarlata tres veces con agua destilada durante 2 min.

5. Ácido fosfotúngstico. El cestillo se colocó 8 min en ácido fosfotúngstico (Sigma-Aldrich). El ácido fosfotúngstico sirve como diferenciador, se une a las moléculas teñidas del tejido para bloquearlas a otras tinciones. El ácido fosfotúngstico se preparó fresco al 5% en agua destilada.

6. Verde luz. El siguiente paso consiste en colocar los portaobjetos en la cubeta con verde luz (Sigma-Aldrich) durante 2 min. El verde luz tiñe de verde el colágeno. Esta solución se preparó con verde luz al 2% y ácido acético al 1%. Se lavó tres veces en agua destilada durante 2 min.

7. Ácido acético. Se colocó el cestillo en la cubeta con ácido acético (Merck) 3 min. El ácido acético glacial se usa para la preservación del tejido. El ácido acético glacial se preparó al 1% en agua destilada.

8. Deshidratación, aclarado y montaje. Para la deshidratación se pasó el cestillo con los portaobjetos dos veces en etanol 96% 3 minutos y dos veces en etanol absoluto 100% 3 min. Para el aclarado de portaobjetos se pasaron dos veces por xileno 3 min. El medio de montaje utilizado fue Eukitt (Kindler). A cada porta se le colocó el Eukitt y luego se colocó el cubre objeto. Los portaobjetos montados se dejaron secar en la campana de extracción.

La tinción del tricrómico de Masson muestra los núcleos en morado oscuro o negro, el músculo (también citoplasma y hematíes) en rosa o rojo y las fibras de colágeno y tejido conjuntivo en general en verde. Ver Figura 9.

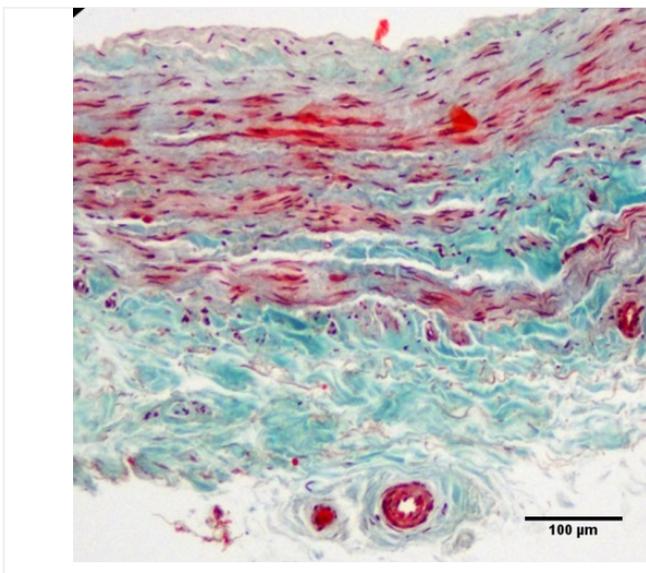


Figura 9: Ejemplo de tinción con tricrómico de Masson de vena safena de tiempo 0 con objetivo 20x. La tinción de Masson permite visualizar las capas vasculares. La túnica íntima se observa en verde, en la túnica media se observan las VSMC en rojo y las fibras de tejido conectivo en verde. La túnica adventicia se observa en verde y se pueden observar en ella *vaso vasorum*, donde se aprecian las células de músculo liso teñidas de rojo dispuestas en forma de circunferencias. Los núcleos pueden observarse de color morado oscuro o negro.

3.5.3. Inmunohistoquímica con Diaminobencidina (DAB)

La inmunohistoquímica es una técnica que permite localizar determinadas proteínas en las muestras histológicas mediante la utilización de anticuerpos capaces de detectar antígenos específicos. En este trabajo se ha empleado anticuerpos frente a las proteínas SM22 (Abcam), la Calponina (Abcam) y el canal KV1.5 (Alomone Labs). La detección se realiza utilizando DAB, el protocolo empleado se detalla a continuación.

1. Desparafinación e hidratación de los tejidos, como ya se describió previamente.
2. Inactivación de peroxidasa endógena. Después de desparafinar y deshidratar los cortes, se lavaron los portaobjetos con agua destilada (dos veces, 5 min) A continuación sobre el tejido se colocó 0.9 % H_2O_2 en agua destilada durante 5 minutos en oscuridad. El H_2O_2 sirve para inactivar la peroxidasa endógena y que la posterior reacción de detección con el reactivo DAB sólo sea debido a la reacción con la peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) del anticuerpo secundario. Se lavó con agua destilada 5 min y posteriormente se hicieron 2 lavados de 5 min con BPS.
3. Bloqueo. Primero las muestras se incuban durante 5 min en una solución de Tritón X-100 al 0.25% en PBS, para eliminar el recubrimiento hidrofóbico del porta. A continuación las muestras se incuban durante 30 minutos en solución de bloqueo. La solución de bloqueo es Tritón X-100 al 0.25 % y suero de cabra al 1% diluidos en PBS. LA solución de bloqueo va a bloquear las uniones inespecíficas y por lo tanto favorece las uniones específicas del anticuerpo a su epítipo, al mismo tiempo la presencia del detergente Tritón X-100 permeabiliza los tejidos para permitir que el anticuerpo entre en la células. Se cubren totalmente los tejidos con un volumen aproximado de 200 μ l de solución.
4. Anticuerpo primario. El portaobjetos se divide en dos partes, una parte se incubaba con el anticuerpo primario y la otra será nuestro control negativo que se incubaba con solución de bloqueo.
Se preparó el anticuerpo primario en la solución de bloqueo a concentración 1:50 para todos los anticuerpos primarios utilizados. Se dejó incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavó con agua destilada a chorro y luego dos lavados de 5 min con PBS. Finalmente se incuban en 0.25% Tx-100 en PBS durante 5 minutos.
5. Anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se prepara solución de bloqueo. Todos los anticuerpos primarios habían sido generados en conejo por lo que en todos los casos se utilizó anticuerpo secundario anti-conejo (Dako) conjugado con HRP a una concentración 1:1000. Se dejó incubar en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron dos lavados de 5 min con PBS y un lavado en Tris 0.05 M de 5 minutos.
6. Detección mediante reacción de peroxidación.

Para la detección se prepara una solución de 1% DAB, 3.3% H_2O_2 y 0.01% H_2O_2 en Tris 0,05 M. Esta solución se deja actuar entre 10-60 minutos hasta que se ve coloración marrón. Ver Figura 10. La reacción de peroxidación se para con Tris 0.05M y posteriormente se lava con agua destilada.

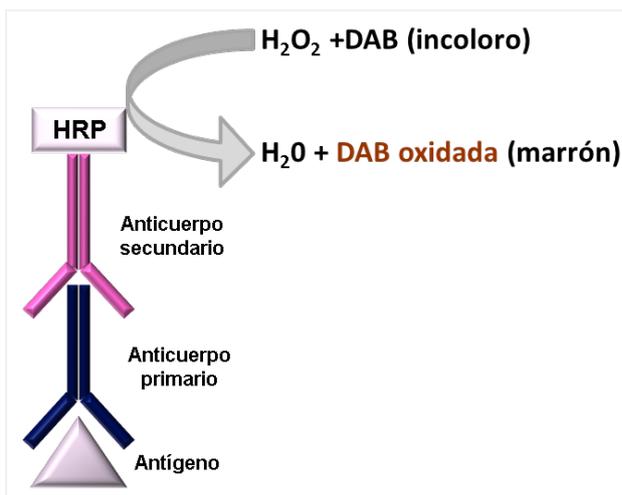


Figura 10. Esquema que representa lo que sucede durante la detección en la técnica de inmunohistoquímica utilizando DAB. El anticuerpo secundario, unido HRP, se coloca sobre la muestra a la que se ha unido el anticuerpo primario. Luego se añade una solución que contiene H_2O_2 , que se reduce durante la reacción y DAB que se oxida tornando a un color marrón. El desarrollo de color durante la reacción indica que el antígeno buscado está presente en la muestra.

7. Hematoxilina de Harris. Finalmente se incuban los cortes con hematoxilina de Harris Papanicolaou (Bio-optica) durante 1.5 minutos para contrateñir los núcleos de morado. Se lava con agua destilada.
8. Deshidratación, aclarado y montaje. Para la deshidratación se pasó el cestillo con los portaobjetos una vez en etanol 70% 3 min, dos veces en etanol 96% 3 min y dos veces en etanol 100% 3 min. Para el aclarado los portaobjetos se pasaron dos veces por xileno durante 3 minutos.

El medio de montaje utilizado fue Eukitt (Kindler). A cada porta se le añaden unas gotas de Eukitt y luego se cubren con el cubreobjetos. Los portaobjetos montados se dejaron secar en la campana de extracción antes de su observación al microscopio, Figura 11.

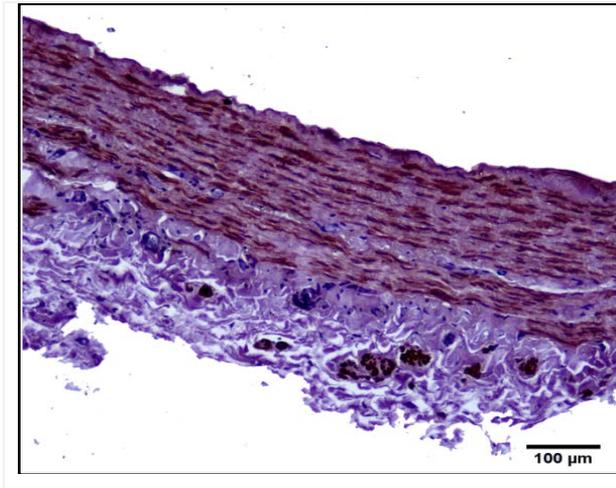


Figura 11. Ejemplo de inmunohistoquímica con DAB positiva de un corte de vena safena humana marcado con el anticuerpo anti-Calponina. En color marrón tendríamos la Calponina, en morado oscuro los núcleos y en morado claro el resto de tejido. Microfotografía tomada con objetivo de 10x.

3.5.4. Marcaje de núcleos con el colorante fluorescente Hoechst

Esta técnica se emplea para contar los núcleos y por lo tanto conocer el número de células. El protocolo seguido es el que se detalla a continuación:

1. Desparafinar e hidratar los tejidos. Tal y como está indicado anteriormente. Luego lavar 3 veces con PBS durante 5 min.

2. Hoechst. Incubar con Hoechst (Life Technologies) preparado en PBS a una concentración 1:2000 durante 30 min. Lavar 3 veces con PBS durante 5 min seguido de un lavado con agua destilada.

3. Montar. Montar con Vectashield (Vector Laboratories, Inc.) un medio de montaje acuoso adecuado que previene la pérdida de fluorescencia.

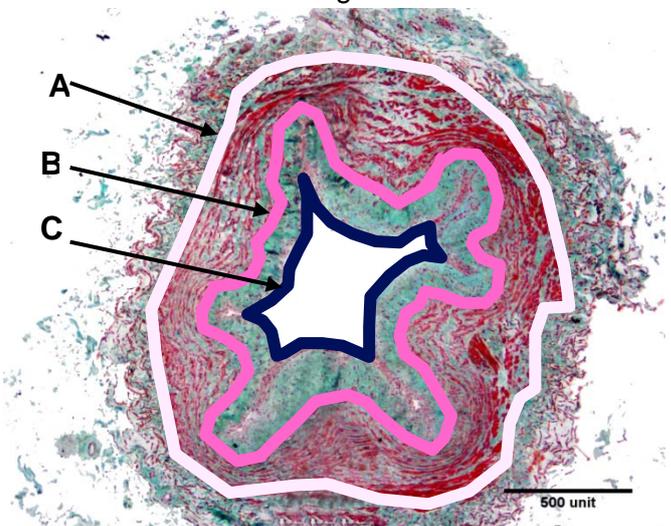
3.6. Análisis de imágenes

Para llevar a cabo los estudios morfohistológicos, en primer lugar se adquirieron las imágenes para lo que se utilizaron dos microscopios diferentes. El microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse 90i, asociado con cámara CCD (NIKON, modelo DS-Ri1) se utilizó para las fotografías con objetivo 4x, 10x y 20x. Y el microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse 80i asociado a cámara NIKON modelo DS-SM se utilizó para las imágenes con objetivo 2x.

3.6.1. Medidas de áreas de túnicas vasculares con tinción de Masson

Las distintas medidas realizadas en las microfotografías de los cortes histológicos se llevaron a cabo con el programa Image J (FIJI). Las medidas de las áreas de las diferentes capas de los vasos se realizaron en μm^2 . Para hacer las mediciones se utilizaron las imágenes de anillos obtenidos con la tinción del tricrómico de Masson. Las venas se midieron en fotografías con objetivo 2x y las arterias con objetivo 4x. Las medidas que se realizaron en FIJI fueron las áreas que se identificaron como C, B, y A que se muestra en la Figura 12

Figura 12. Imagen de vena safena con las áreas medidas con el programa FIJI. C, marcado en azul oscuro representa el área de la luz del vaso. B, marcado en rosa, es el límite entre la túnica íntima y la túnica media, representa el área de la luz más el área de la íntima. A, marcado en blanco, marca el límite entre la túnica media y la adventicia y representa el área de luz más la íntima más la media.



A partir de estas medidas fueron calculados el área de la túnica íntima, túnica media, pared del vaso (suma de íntima más media, la adventicia no se tiene en cuenta). Tabla I. Con estas áreas se determinaron el porcentaje de estenosis, el porcentaje de íntima, porcentaje de media, porcentaje de pared que permitieron analizar los cambios característicos de los anillos en cada condición.

Nombre	Definición	Formula
Luz	área de luz en μm^2	= C
área íntima	área de íntima en μm^2	= B-C
área media	área de media en μm^2	= A-B
área pared del vaso	área de íntima + media en μm^2	= A-C
área total	área íntima + área media + área luz en μm^2	= A
Porcentaje de estenosis	= área íntima/área íntima + área luz $\times 100$	= B - C/B $\times 100$
Porcentaje de pared	= área íntima + área media/área total $\times 100$	= A - C/A $\times 100$
Porcentaje luz	= área luz/área total $\times 100$	= C/A $\times 100$
Porcentaje íntima	= área íntima/área total $\times 100$	= B - C/A $\times 100$
Porcentaje media	= área media/área total $\times 100$	= A - B/A $\times 100$

Tabla I. Determinaciones realizadas a partir de las áreas A, B y C, tomadas con el programa Fiji, utilizadas para el posterior análisis del remodelado sufrido por los anillos vasculares

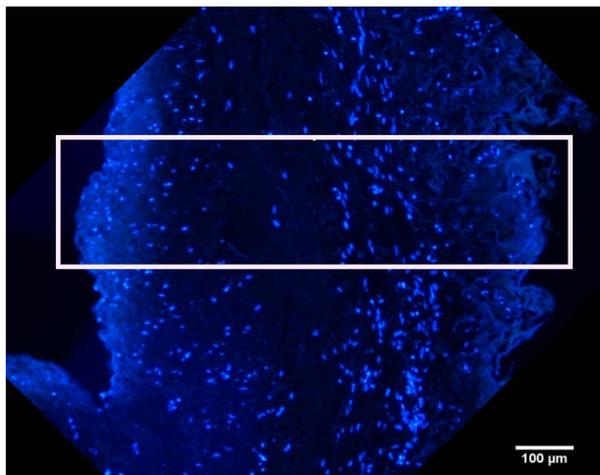


Figura 13. Microfotografía de vena safena con núcleos marcados con colorante fluorescente Hoechst. Adquirida con objetivo de 10x. El cuadro blanco delimita una franja de 225.18 μm de ancho donde se contaron la cantidad de núcleos totales en la capa íntima y capa media

3.6.2. Contaje de núcleos con Hoechst

Para contar los núcleos de los cortes teñidos con el colorante fluorescente Hoechst, como se indicó en el apartado 3.5.3, se adquirieron microfotografías con un microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse 90i, con el objetivo 10x y el filtro UV-2A (Ex 330-380) de fluorescencia. Se contaron los núcleos presentes en la túnica íntima y en la túnica media de una franja de 225.18 μm como se muestra en la Figura 13.

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas R Studio y Microsoft Excel. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativa cuando se comparan más de dos muestras, se utiliza cuando se comparan las condiciones de cultivo de órgano. Cuando el ANOVA revela diferencias entre grupos, para saber entre qué grupos se dan las diferencias, se realiza el test de

rangos de Tukey, cuando los datos cumplen criterios paramétricos o el test de Wilcoxon, si los datos no cumplen los criterios paramétricos. Para saber si las muestras cumplen los criterios paramétricos, es decir si siguen una distribución normal y si tienen varianzas homogéneas se realiza el test de Shapiro-Wilk y el test de Barlett respectivamente. En el caso de la vena safena se compararon las diferencias estadísticas entre las muestras de tiempo 0 frente a las de 0% FBS (dos muestras) utilizando un t-test.

Los resultados mostrados en los gráficos de barras y en las tablas de datos son las medias \pm SEM de 8-19 venas safenas y 4 arterias mamarias, medidas por triplicado. Las diferencias significativas se muestran con respecto al 0% FBS con *, con respecto al 20% FBS con # y con respecto al tiempo 0 con ∞ . A lo largo del trabajo se consideran diferencias significativas cuando $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** y $p < 0,001$ ***.

4. Resultados

4.1. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la vena safena en cultivo de órgano.

4.1.1. Caracterización histomorfométrica de la vena safena.

Para caracterizar los cambios histológicos que sufre la vena safena en las distintas condiciones se utilizó la tinción tricrómica de Masson. Esta tinción es especialmente útil en el estudio de los vasos sanguíneos porque permite distinguir las fibras de colágeno y tejido conectivo en general (verde) del tejido muscular (rojo) y además se marcan los núcleos (negro).

Este trabajo pretende comparar los cambios producidos en los anillos de vena safena sometidos a cultivo de órgano en distintas condiciones, pero además, en el caso de la vena safena se han caracterizado las diferencias en la estructura de los anillos vasculares no sometidos a cultivo de órgano (tiempo 0) con respecto al control negativo (0% FBS). En ambas condiciones tras el procesamiento y tinción con tricrómico de Masson se realizaron microfotografías con objetivo de 2x, ver Figura 1. Luego se realizaron las mediciones de las áreas de las diferentes capas de la vena y se realizaron las determinaciones detalladas en Material y Métodos, ver Tabla II.

Como muestra la Figura 14, se observa que el control negativo (0% FBS) frente al tiempo 0 sufre un aumento de la estenosis, del porcentaje de área de túnica íntima y la disminución de la luz del vaso. Esto indica que el cultivo de los anillos en medio de cultivo mínimo ya provoca un importante remodelado del vaso.

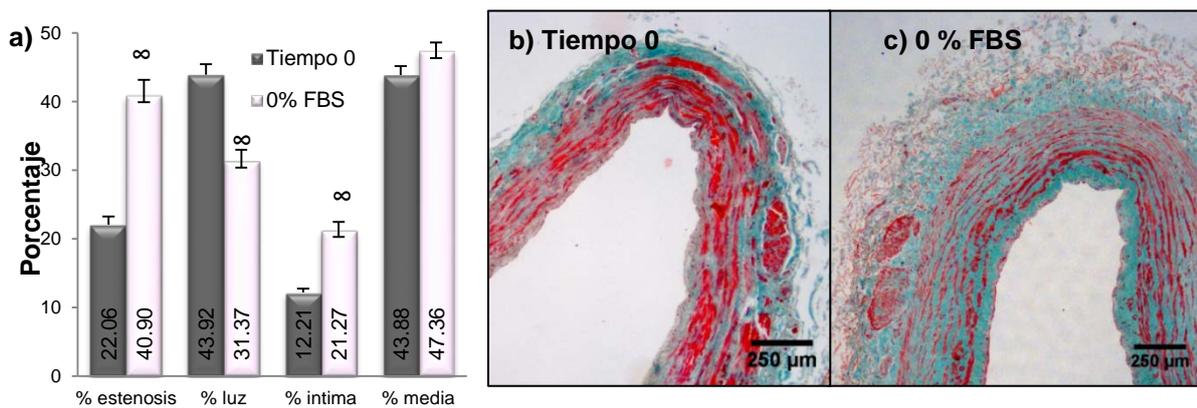


Figura 14 a). Gráfica que muestra los porcentaje de estenosis, área de la luz, de la íntima y de la media de las condiciones tiempo 0 y control negativo (0%FBS). [∞] Diferencias significativas con respecto a tiempo 0. Microfotografías representativas de cortes de vena safena humana teñidas con tricrómico de Masson y adquiridas con objetivo 10x, tiempo 0 (b) y tras cultivo de órgano con medio 0% FBS (c).

Para estudiar el efecto de las distintas condiciones sobre la vena safena en cultivo de órgano, los anillos vasculares se incubaron durante 2-3 semanas con los distintos tratamientos. Tras su procesamiento y tinción con tricrómico de Masson se realizaron microfotografías con objetivo de 2x como aparecen en la Figura 15. Posteriormente se realizaron las mediciones de las áreas de las diferentes capas de la vena y las determinaciones de las variables que nos van permitir caracterizar los cambios en la estructura según se detalla en Material y Métodos, los datos se adjuntan en la Tabla II.

Resultados

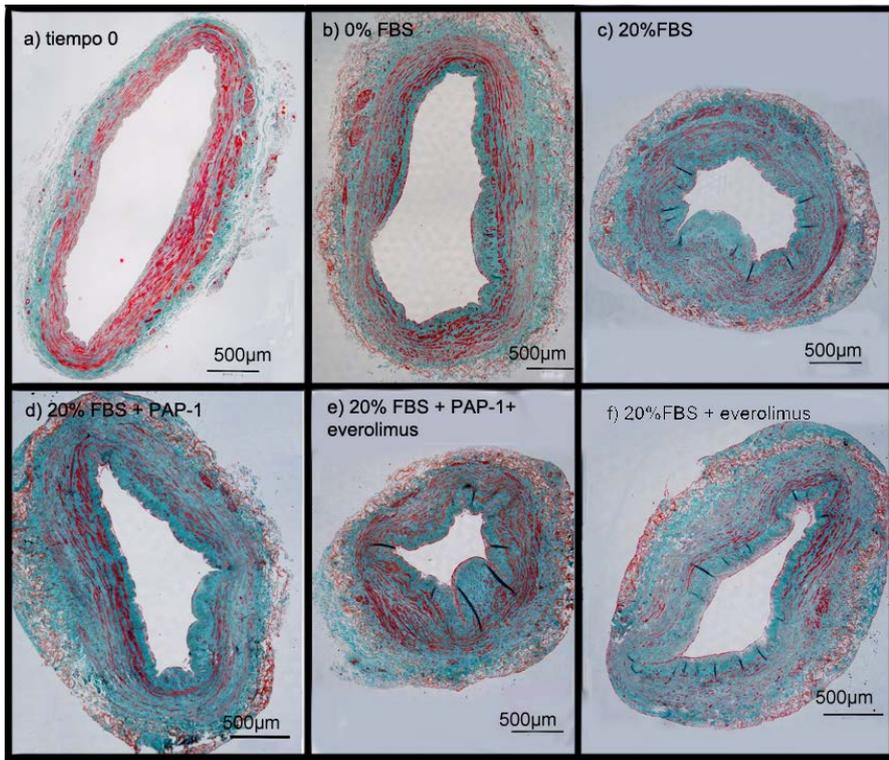


Figura 15. Fotografías representativas de cortes de vena safena humana teñidas con tricrómico de Masson y adquiridas con objetivo 4x. **a)** Vena no sometida a cultivo de órgano, la túnica íntima es delgada y homogénea, la media tiene un color rojo intenso y la adventicia se observa laxa. Resto de condiciones representan cortes tras 2-3 semanas en cultivo de órganos. **b)** Control negativo, la túnica íntima ha aumentado su grosor y el rojo de la media es menos intenso que en el tiempo 0. **c)** Control positivo, la túnica íntima es más gruesa y presenta pliegues. El tono rojo en la media es más tenue y escaso y se observan fibras en tono verde, la adventicia es más densa y cerrada. **d)** En presencia del inhibidor del canal Kv1.3, PAP-1 100 nM, se observa que la íntima tiene menor grosor que el control positivo 20%FBS y se observa mayor área luminal. **e)** Vena con tratamiento de PAP-1 100 nM y, everolimus 0,1 nM, se observa estructura similar al control positivo. **f)** Vena con tratamiento de everolimus 0,1 nM se observa efecto similar al obtenido en d).

Los resultados (Figuras 16, 17) muestran en primer lugar que en el control positivo (20% FBS) los porcentajes de área de túnica media, área de túnica íntima y estenosis aumentan con respecto al control negativo (0% FBS), mientras que el porcentaje de área de luz disminuye en el control positivo. Estos datos muestran que la incubación de los vasos en presencia de FBS provoca un importante remodelado del vaso que lleva a la disminución del área luminal,

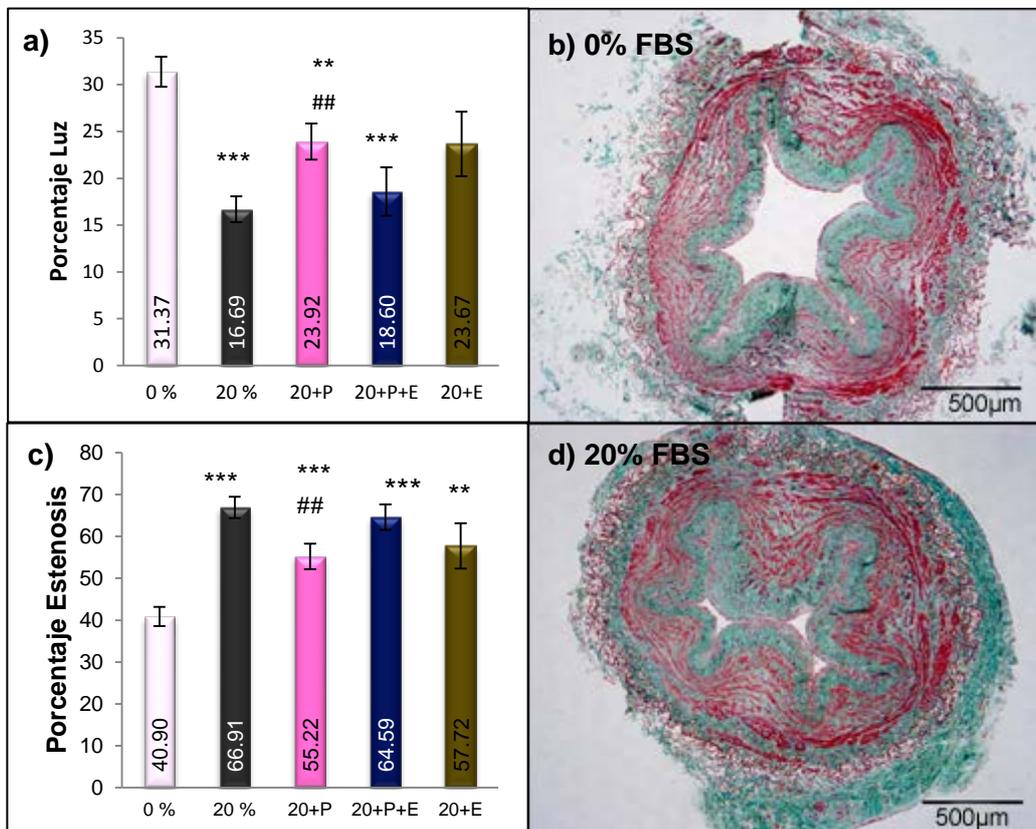


Figura 16. a) y c) Gráficas representando el porcentaje de área luminal y estenosis respectivamente, en cada condición. **b) y d)** Fotografías tomadas con objetivo 4X, representativas del control negativo (0%FBS) y del control positivo (20% FBS) respectivamente. En las imágenes se aprecia menor área luminal y mayor estenosis en el control positivo. * Diferencias significativas respecto a control negativo (0% FBS), # diferencias significativas respecto a control positivo (20% FBS).

Resultados

Cuando los anillos de vena safena se tratan con los inhibidores PAP-1 y everolimus en presencia de 20% FBS se observa que los anillos se alejan de las características del control positivo buscando parecerse más al control negativo. Sin embargo, en contra de lo que cabría esperar cuando los anillos se tratan con la combinación de ambos fármacos no se observan diferencias con el control positivo. En la Figura 4 se puede apreciar como la íntima aumenta en las condiciones 20% FBS y 20% FBS + PAP-1 + Everolimus, mientras que en las condiciones 20%FBS +PAP-1 y 20% FBS + everolimus disminuye.

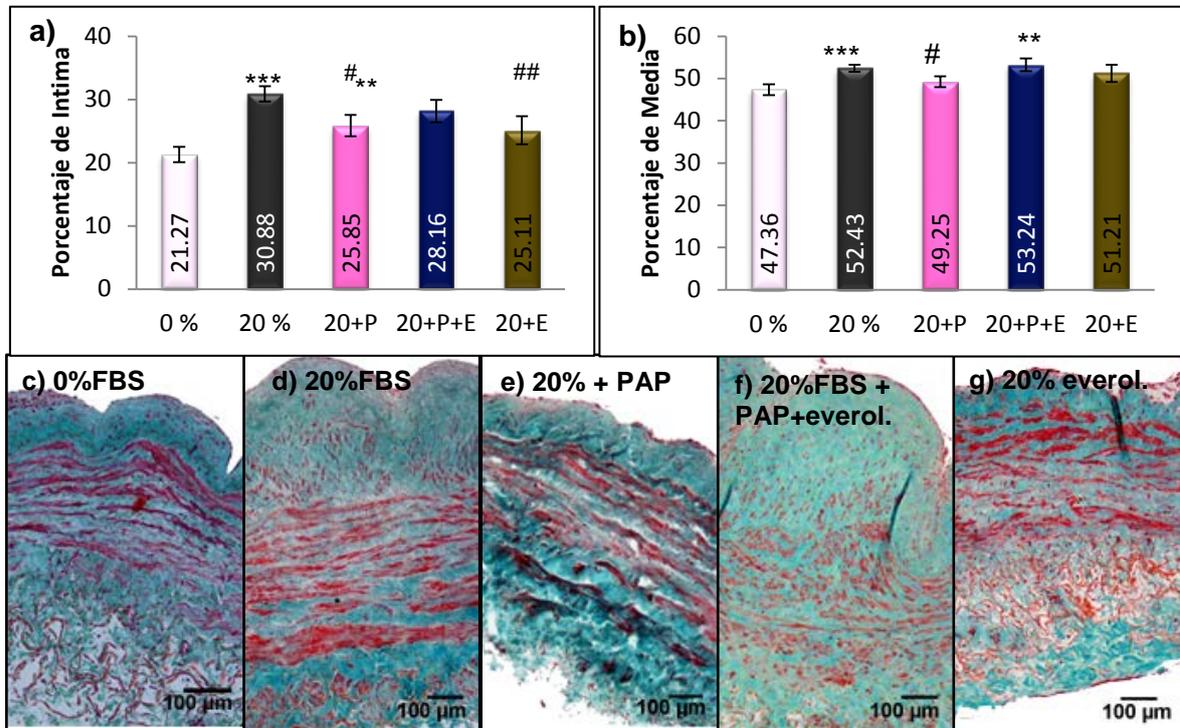


Figura 17. a) y b) Gráficas que representan el porcentaje área de túnica íntima y de túnica media respectivamente. Microfotografías representativas de las distintas condiciones adquiridas con objetivo 10x **c)** control negativo (0%FBS), **d)** control positivo (20%FBS), **e)** 20%FBS + PAP-1, **f)** 20%FBS + PAP-1 + everolimus, **g)** 20%FBS + everolimus. Se puede observar que la íntima aumenta en **d)** y **f)** mientras que disminuye en **e)** y **g)**. * Diferencias significativas con respecto a control negativo (0% FBS), # diferencias significativas con respecto a control positivo (20% FBS).

Todas las medidas histomorfométricas de los anillos de vena safena que se realizaron para tratar de caracterizar lo más exhaustivamente posible la preparación se muestran en la Tabla II. Los detalles de su determinación se encuentran en la sección de material y métodos.

	Tiempo0	0% FBS	20% FBS	PAP-1	PAP+Ever	Everolimus
% estenosis	22.1±1.2	40.9± 2.9 ∞	66.9±2.6 ***	55.2±3.0***,##	64.6±3.0***	57.7±5.4**
%luz	43.9±1.6	31.4±1.6 ∞	16.7±1.4 ***	23.9±1.9 **,##	18.6±2.6***	23.7±3.5
%Íntima	12.2±0.6	21.3±1.2∞	30.9±1.2 ***	25.9±1.7#	28.2±1.8**	25.1±2.2##
%media	43.9±1.3	47.4±1.3	52.4±0.8 ***	49.3±1.3 #	53.2±1.5 **	51.2±2.1
% pared vascular	56.1±1.6	68.6±1.6 ∞	83.3±1.4 ***	76.1±1.9 **,##	81.4±2.6 ***	76.3±3.5
Área pared vascular (mm ²)	2.5±0.3	2.7±0.1	2.4±0.1	2.5±0.1	2.4±0.1	2.6±0.1
Área del vaso (mm ²)	4.3±0.4	4.0±0.2∞	2.9±0.1 ***	3.4±0.1**,##	3.0±0.1**	3.8±0.2###
Área luminal (mm ²)	1.9±0.2	1.3±0.1∞	0.5±0.1***	0.9±0.1**,##	0.6±0.1***	0.9±0.2
Nº células pared vascular	93.8 ±13.4	82.6 ± 8.5	77.1 ± 30.9	66.82±39.3		

Tabla II. Tabla resumen que muestra los valores medios de los ratios calculados para cada condición. * Diferencias significativas con respecto a control negativo (0% FBS), # diferencias significativas con respecto a control positivo (20% FBS) y ∞ diferencias significativas con respecto a tiempo 0. En rojo se marcan los dos parámetros de interés clínico que encontramos más útiles para describir el remodelado que sufren las venas y en azul los parámetros que se utilizaron para definir el tipo de remodelado que se genera en la vena safena.

Los resultados obtenidos de la caracterización de la vena safena sometida a cultivo durante tres semanas muestran que en presencia de FBS éstas sufren un remodelado inward, ya que disminuye el tamaño del vaso (ver área del vaso), eutrófico porque la masa de la pared vascular (área de la pared vascular sin incluir la luz) se mantiene igual en ambos controles, con disminución de la luz del vaso, ver datos en Tabla 2.

4.1.2. Análisis inmunohistoquímico en la Vena Safena.

Para estudiar la expresión de las proteínas SM22, Calponina y el canal Kv1.5, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos frente a esto anticuerpos y se utilizó DAB para detectar su presencia. Las proteínas SM22 y Calponina son proteínas marcadores de músculo liso que son más abundantes cuando las células presentan un fenotipo contráctil y su expresión es menor cuando tienen fenotipo proliferativo. El canal Kv1.5 también es más abundante en células con fenotipo contráctil que con fenotipo proliferativo.

Inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a SM22 (Figura 18) A tiempo 0 resultado con un marcaje fuerte. En el control negativo (0% FBS) el marcaje es más tenue en comparación con tiempo 0 y esta presente en toda la media. Sin embargo, en el control positivo se observa menos marcaje cuando las venas muestran un remodelado vascular muy evidente

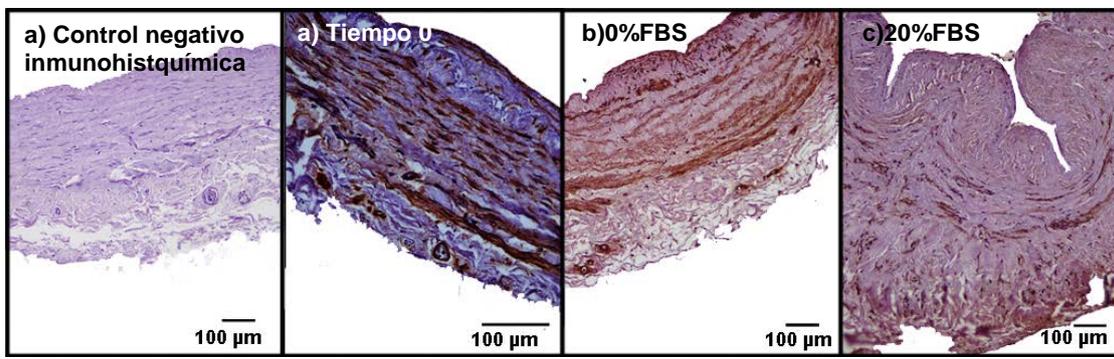


Figura 18 fotografías de vena safena con inmunohistoquímica de DAB para SM22. El marcaje se observa en marrón. Se observa marcaje más intenso a tiempo 0 y con 0%FBS. Sin embargo el marcaje disminuye en el control positivo (20%FBS). **a)** control negativo de inmunohistoquímica, (10x) **b)** tiempo 0 (20x), **c)** 0%FBS (10x) **d)** 20%FBS(10x).

Inmunohistoquímica con anticuerpo frente a calponina (Figura 19) Resultó similar a la inmunohistoquímica frente a la proteína SM22. Se observa un fuerte marcaje en tiempo 0, que disminuye en arterias incubadas en 0% FBS y más aún en 20% FBS

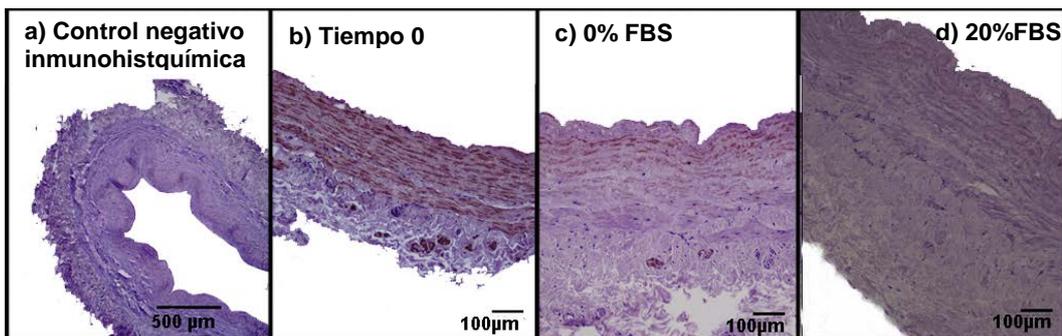
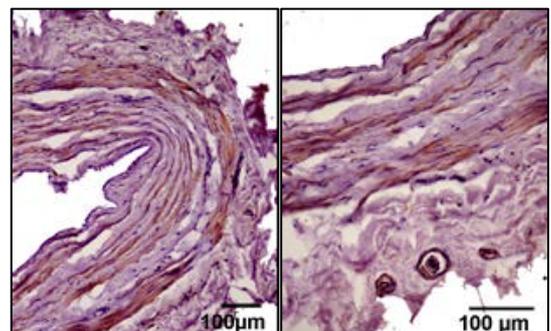


Figura 19 Imágenes representativas de inmunohistoquímica con anticuerpo frente a Calponina en vena safena. El marcaje se muestra en marrón. **a)** control negativo **b)** tiempo 0, **c)** 0% FBS y **d)** 20% FBS.

Inmunohistoquímica con anticuerpo frente a Kv1.5.

La inmunohistoquímica utilizando anticuerpos frente al canal de potasio Kv1.5 en el tiempo 0 con un marcaje más tenue que el que se obtuvo con los anticuerpos frente a SM22 y Calponina. Ver Figura 20

Figura 20. Microfotografías representativas obtenidas con anticuerpo frente a Kv1.5 en vena safena a tiempo 0. Se observa marcaje en las VSMCs de la capa media. Microfotografías tomadas con objetivo 10x (izquierda) y 20x (derecha).



4.1.3. Determinación del número total de células mediante conteo de núcleos

Para tratar de determinar el tipo de remodelado que sufren las venas se realizaron medidas del número total de células en la túnica media e íntima del vaso mediante el conteo de núcleos marcados con el colorante fluorescente Hoechst. El número total de células presentes en la íntima y media no mostró diferencias significativas entre las condiciones tiempo 0, control negativo, control positivo y 20%FBS + PAP-1 (Figura 21). Estos resultados sugieren que el remodelado vascular es debido a migración (reorganización de células) y formación de matriz extracelular.

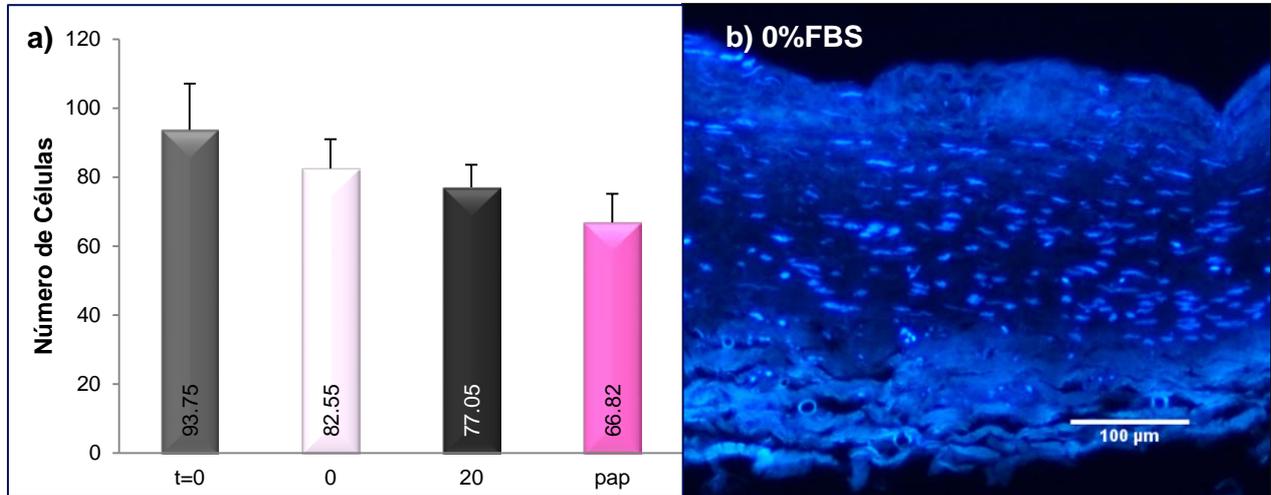


Figura 21. a) Gráfica de barras que representa la cantidad de células presentes en la íntima y media de la vena safena en las condiciones indicadas. Se aprecia que no hay diferencias significativas en el número de células entre las diversas condiciones. **b)** Microfotografía representativa de sección de vena safena incubada en 0%FBS, tomada con objetivo 10. Los núcleos aparecen fuertemente marcados con el colorante fluorescente Hoechst, se pueden apreciar las distintas capas del vaso y como los núcleos son más abundantes en la túnica media.

4.2. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la arteria mamaria en cultivo de órgano.

4.2.1. Caracterización histomorfométrica de la arteria mamaria.

Al igual que para la vena safena se utilizó la tinción de Masson para hacer la caracterización de los cambios en la estructura de la pared de la arteria mamaria tras su cultivo en tres condiciones, en medio sin suero (0% FBS o control negativo), en presencia de suero (20 % FBS o control positivo) y en con suero más el inhibidor del canal de potasio Kv1.3 (Figura 22). Se realizaron microfotografías objetivo 4x para hacer mediciones de las áreas de las diferentes capas de las arterias como se detalla en materiales y métodos.

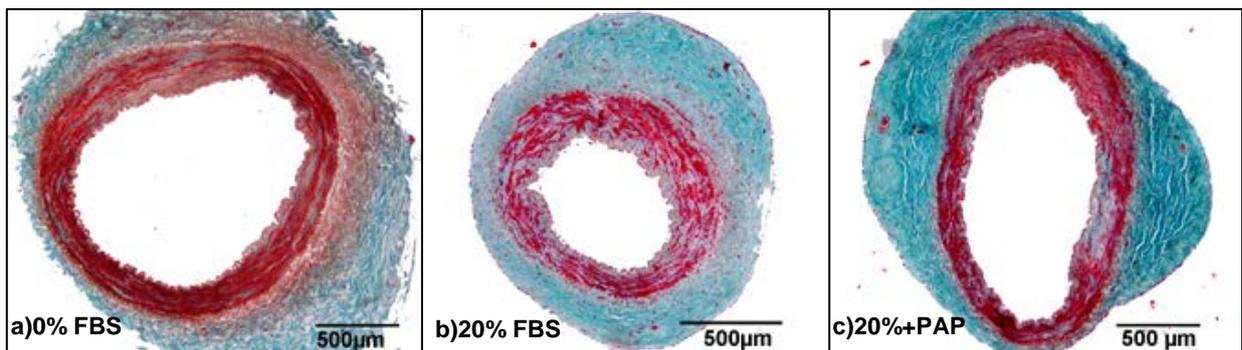


Figura 22. Microfotografías representativas de arteria mamaria después de 15 días de cultivo de órgano, tomadas con objetivo 4x. **a)** Control negativo (0%FBS) la túnica íntima es una delgada línea y la túnica media se observa en color rojo intenso. **b)** control positivo (20%FBS) la túnica íntima se engruesa, al igual que la túnica media, que presenta un tono menos intenso. **c)** 20% FBS+PAP, la túnica íntima y la túnica media se adelgazan con respecto al control positivo.

Se calcularon los porcentajes de capa media, capa íntima, luz y estenosis para cada condición. Los resultados obtenidos (Figura 23) indican que en el control positivo los porcentajes de media, íntima y estenosis aumentan, mientras que el porcentaje de luz disminuye.

Resultados

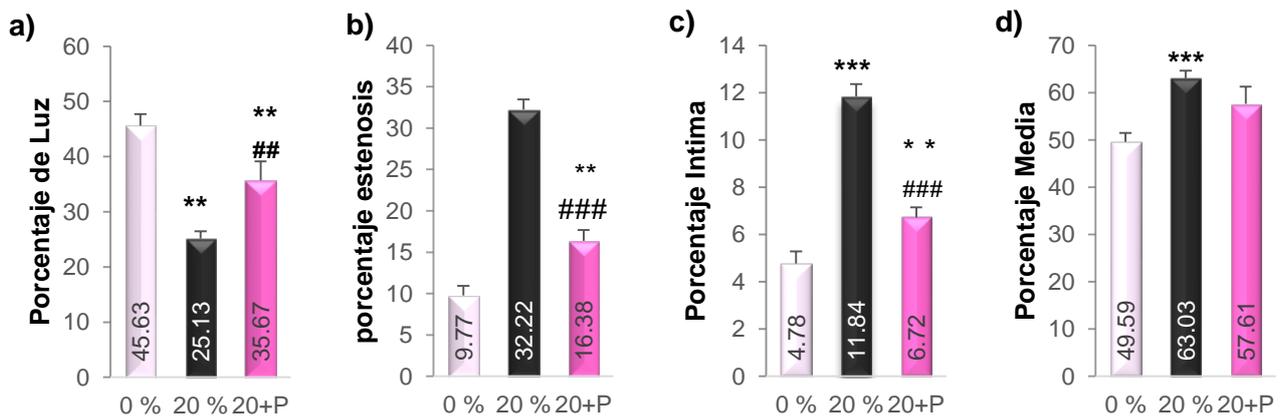


Figura 23. Gráficas que muestran el porcentaje de área luminal (a) , de estenosis (b) , de área de intima (c) y de área de media (d) en la arteria mamaria. * Diferencias significativas con respecto a control negativo (0% FBS), # diferencias significativas con respecto a control positivo (20% FBS).

El tratamiento con el inhibidor del canal Kv1.3, PAP-1 supuso una disminución del porcentaje de intima y estenosis y un aumento del porcentaje de luz cuando se comparó con el control positivo. Sin embargo el porcentaje de túnica media se mantiene sin diferencias significativas respecto al control positivo. Esto parece sugerir PAP-1 tiene una acción sobre la intima o que inhibe la migración de VSMC hacia la intima.

En las imágenes de la Figura 24 se puede observar que la túnica intima aparece como una capa delgada de color verde (prácticamente indetectable en a) y c), la túnica media se muestra un color rojo intenso delimitado por las láminas elásticas internas y externas mientras que la túnica adventicia se tiñe de color verde.

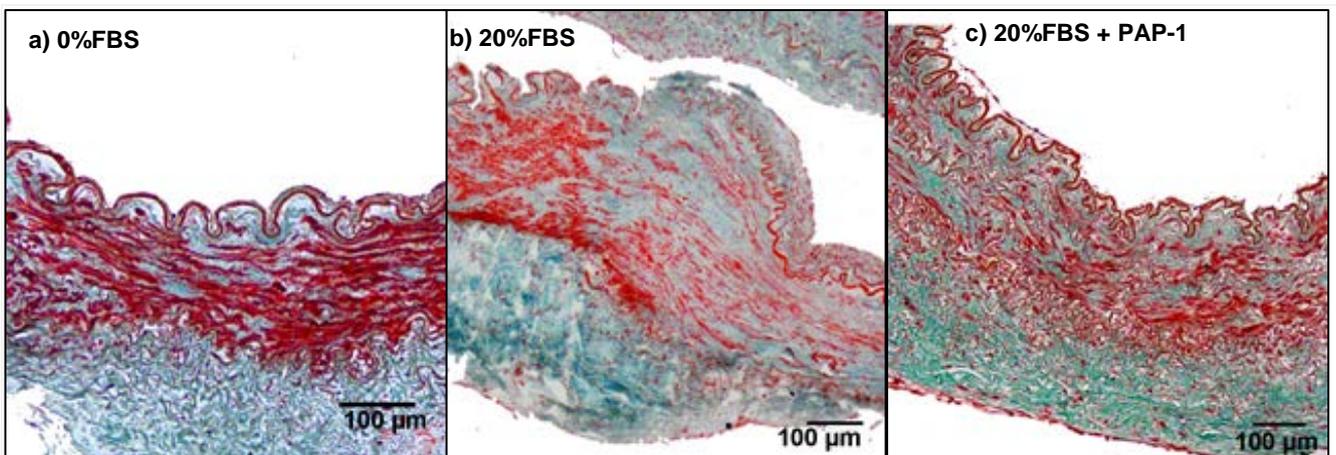


Figura 24. fotografías de arteria mamaria con objetivo 10x. **a)** control negativo (0%FBS), **b)** control positivo (20%FBS), **c)** 20%FBS + PAP. Se puede observar que la intima aumenta en el control positivo y disminuye en la condición en presencia de PAP-1.

Las diferentes determinaciones realizadas se muestran en la Tabla 3. Los resultados obtenidos sugieren que la arteria mamaria sufre un remodelado inward, en el control positivo disminuye el tamaño del vaso (ver valores de área del vaso) con respecto al control negativo. Es eutrófico, la masa de la pared vascular (ver valores área de pared), se mantiene igual tanto en el control negativo como en el positivo y el área luminal está reducido.

Resultados

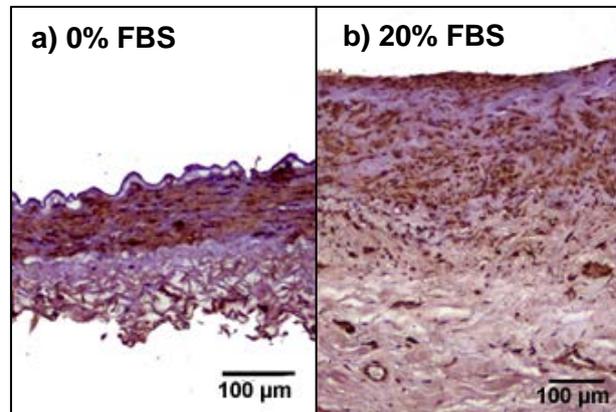
	0%FBS	20%FBS	pap-1
porcentaje de estenosis	9.8±1.2	32.2±1.2***	16.4±1.3**,###
% luz	45.6±2.1	25.1±1.3***	35.7±3.5**,##
% íntima	4.8±0.5	11.8±0.5***	6.7±0.4**,###
% media	49.6±1.9	63.0±1.6***	57.6±3.6
% pared	54.4±2.1	74.9±1.4***	64.3±3.5**,##
área pared mm2	0.9±0.1	0.8±0.1	1.0±0.2##
área del vaso mm2	1.6±0.2	1.0±0.1**	1.7±0.2##
área luminal mm2	0.8±0.1	0.3±0.0***	0.6±0.1###
Nº células en pared vascular.	38.3±3.5	83.25±8.8***	40.25±5.6###

Tabla III. * Diferencias significativas respecto a control negativo (0% FBS), # diferencias significativas con respecto a control positivo (20% FBS). En rojo se marcan los dos parámetros de interés clínico que encontramos más útiles para describir el remodelado que sufren las arterias y en azul los parámetros que se utilizaron para definir el tipo de remodelado que se genera en la arteria mamaria.

4.2.2. Análisis inmunohistoquímico en la arteria mamaria.

En la arteria mamaria se estudio la expresión de la proteína SM22 mediante inmunohistoquímica con DAB (Figura 25). En el control negativo se observa un marcaje marrón en la media, capa que se observa compacta y organizada. Mientras que en el control positivo (20 % FBS) se observa un marcaje más suave en la media, que aparece como una capa menos compacta. También aparece marcaje en la íntima del control positivo, lo que permitiría inferir que las VSMC han migrado para formar la neoíntima.

Figura 25. Fotografías 10x de arteria mamaria con inmunohistoquímica de DAB para SM22. **a)** control negativo (0%FBS) en que el marcaje se observa en la capa media. **b)** en la control positivo (20%FBS) se aprecia marcaje en la íntima.



4.2.3. Determinación del número total de células mediante contaje de núcleos

Al igual que para vena safena se marcaron los núcleos de la pared de la arteria mamaria con el colorante fluorescente Hoechst (Figura 26). A diferencia de la vena safena, la arteria mamaria mostró diferencias significativas entre la cantidad de células presentes en la pared (la íntima más la media). El número de células aumenta significativamente en el control positivo (20%FBS) con respecto al control negativo (0%FBS). En presencia de PAP-1 el número de células disminuye con respecto al control positivo no mostrando diferencias significativas con el control negativo.

En el caso de las arterias se puede atribuir el remodelado vascular a la proliferación de las VSMCs. Puesto que el remodelado es eutrófico (no hay cambios en el área de la pared del vaso) podemos inferir que estas VSMCs tienen menor tamaño.

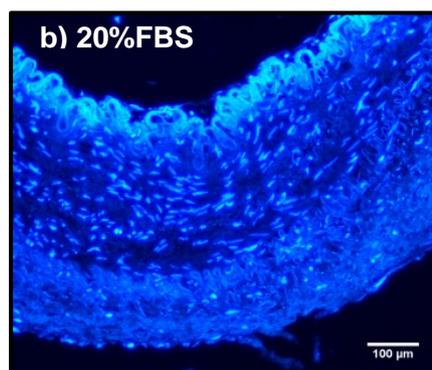
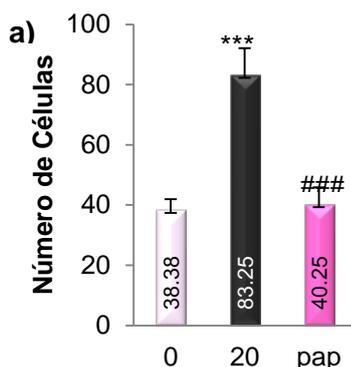


Figura 26. **a)** Gráfica que muestra el número de células presentes en la íntima y media de arteria mamaria. **b)** fotografía de control positivo (20%FBS) de arteria mamaria con coloración de Hoechst aumento 10x. * Diferencias significativas con respecto a control negativo (0% FBS), # diferencias significativas con respecto a control positivo (20% FBS).

5. Discusión

5.1. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la vena safena en cultivo de órgano.

5.1.1. Caracterización histomorfométrica de la vena safena

La vena safena es un vaso muy utilizada para realizar vascularización de arteria coronaria. Sin embargo a medio plazo termina fracasando por aparecer restenosis. En este estudio se demostró que el PAP-1 disminuye el porcentaje de estenosis al disminuir la formación de neoíntima en cultivo de órgano de vena safena. Para demostrarlo se recreó en cultivo de órgano la estenosis que ocurre en diversas patologías, utilizando la condición 20% FBS como control positivo de estenosis y la condición 0%FBS como control negativo.

La vena Safena es considerada como una vena atípica porque presenta una **túnica íntima** gruesa con numerosos VSMC dispuestos en forma longitudinal su **túnica media** es gruesa con VSMC dispuestos en forma circular y la **túnica adventicia** también presenta VSMC longitudinales². Estas características se constataron con el estudio histológico con tinción tricrómica de Masson. Figura 27.

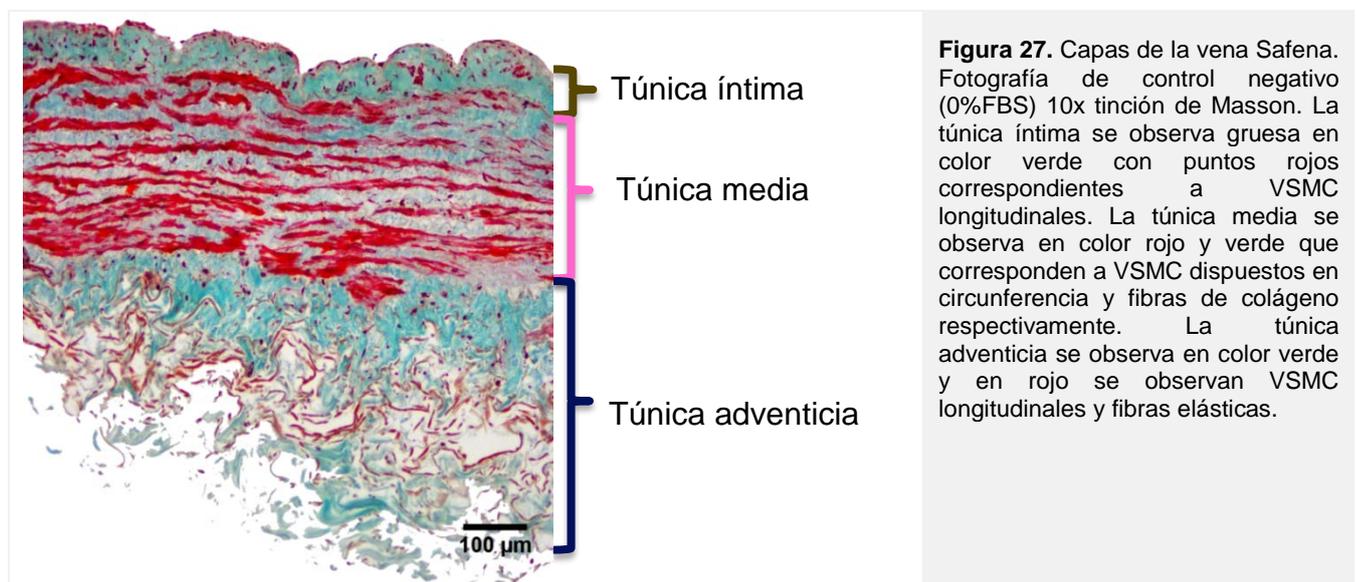


Figura 27. Capas de la vena Safena. Fotografía de control negativo (0%FBS) 10x tinción de Masson. La túnica íntima se observa gruesa en color rojo con puntos rojos correspondientes a VSMC longitudinales. La túnica media se observa en color rojo y verde que corresponden a VSMC dispuestos en circunferencia y fibras de colágeno respectivamente. La túnica adventicia se observa en color verde y en rojo se observan VSMC longitudinales y fibras elásticas.

Se observó que el control positivo tiene una íntima más gruesa y con pliegues cuando se compara con el control negativo. Se determinó que el control positivo presenta aumento del porcentaje de estenosis, de íntima, media y una disminución el porcentaje de luz comparado con control negativo. Estas características permiten recrear una estenosis en cultivo de órgano de vena safena, lo que permite utilizar este sistema como modelo de estenosis. Vemos que la vena safena sufre un remodelado inward eutrófico. Es inward porque disminuye el área total del vaso en el control positivo. Es eutrófico porque la masa de pared vascular se mantiene igual tanto en el control positivo como negativo. Además, se observa que el número de células no cambia entre los controles. Estos resultados sugieren que las VSMC cambian de tamaño, migran y se reorganizan alrededor de un lumen más pequeño.

Existen varias hipótesis sobre cómo se produce el remodelado vascular. Se dice que el remodelado es *inside-out* cuando comienza en la íntima y ésta responden con señales liberando señales hacia fuera y es *outside-in* es cuando comienza desde las células de la adventicia y se propaga hacia la íntima.²³ Se debe destacar, aunque no se midió directamente, que las observaciones realizadas permiten sugerir que la túnica adventicia está implicada en el remodelado vascular(Figura 28). En el control positivo (20% FBS) la túnica adventicia es más densa, las fibras elásticas están más concentradas alrededor de la media, y se forma tejido cicatrizal en el borde más externo, generando pliegues en la íntima que ocluyen el área luminal. Esto sugiere que la vena safena sufre remodelado

tipo constrictivo según la hipótesis *outside-in*. La hipótesis *outside-in* consiste en que la respuesta se inicia en la adventicia donde hay células madres que pueden diferenciarse a VSMC o fibroblastos y pueden avanzar hacia la íntima^{23,24}. El remodelado constrictivo ocurre cuando la respuesta se inicia en la adventicia y se forma tejido cicatrizal rico en colágeno que comprime la íntima y media hacia dentro²³. Esto se ve reflejado en los resultados ya que el área del vaso disminuye causando un remodelado inward. Además se mantiene la masa de la pared vascular ya que ésta no cambia.

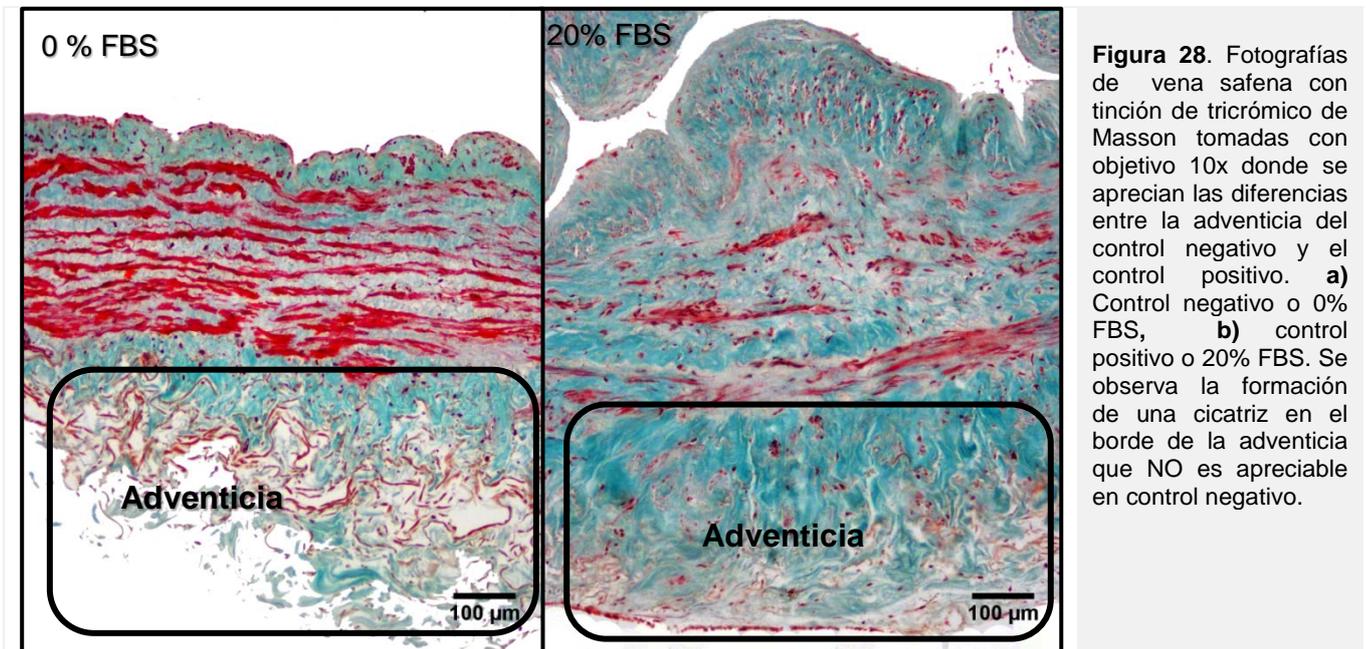


Figura 28. Fotografías de vena safena con tinción de tricrómico de Masson tomadas con objetivo 10x donde se aprecian las diferencias entre la adventicia del control negativo y el control positivo. **a)** Control negativo o 0% FBS, **b)** control positivo o 20% FBS. Se observa la formación de una cicatriz en el borde de la adventicia que NO es apreciable en control negativo.

Para tratar de revertir la estenosis inducida por FBS se utilizaron los inhibidores PAP-1, everolimus y al combinación de ambos. Cuando se utilizó PAP-1 los porcentajes de íntima, media y estenosis disminuyeron en comparación con el control positivo (20%FBS), sin embargo en el caso de 20%FBS + everolimus solo disminuyó el porcentaje de íntima. En estudios previos han demostrado que PAP-1 es capaz de inhibir tanto la proliferación como la migración de las células de músculo liso vascular^{14,25} por lo que estas diferencias podrían atribuirse a ese doble efecto del PAP-1 sobre las VSMCs ya que del everolimus solo están documentados su efectos como agente antiproliferativo. El PAP-1 (y en menor medida el everolimus) consigue disminuir el remodelado vascular inducido por suero que sufre la vena safena aunque no llega a recuperar las características del control negativo. Pero su efecto es capaz de evitar estenosis total del vaso en estas condiciones de trabajo.

Al usar la combinación de fármacos (PAP-1 y everolimus) no se observaron diferencias significativas con respecto al control positivo (20%FBS). Este hallazgo no es el esperado porque estudios anteriores muestran que el PAP-1 y everolimus actúan por vías diferentes, y su combinación potencia la inhibición e proliferación en VSMCs en cultivo celular.²⁵ Es necesario profundizar sobre la acción de ambos fármacos y conocer la razón por la que tienen efectos diferentes en cultivo celular y cultivo de órganos.

5.1.2. Análisis inmunohistoquímico en la vena safena.

Como se ha dicho en la introducción las células de músculo son células con plasticidad y con capacidad para cambiar su fenotipo (maduro) contráctil a un fenotipo proliferativo. Este cambio fenotípico trae consigo una disminución de las proteínas de la maquinaria contráctil y también de proteínas de membrana entre las que interesa para este trabajo el canal de potasio Kv1.5 que se visto que su expresión cae dramáticamente en el fenotipo proliferativo dejando al canal Kv1.3 como el principal Kv1.3 en el fenotipo proliferativo.

La inmunohistoquímica con anticuerpos frente a las SM22, calponina (ambas marcadores de músculo liso) y Kv1.5 serviría de control del cambio fenotípico que sufren las VSMCs.

Pudimos comprobar que la condición de **tiempo 0** tiene mucho marcaje en la túnica media de las proteínas SM22 y calponina, y en menor medida en la íntima y adventicia. El Kv1.5 presento marcaje aunque más suave comparado con SM22 y calponina (Figura 29) Esto puede deberse a que la

expresión del kv1.5 es menos abundante en comparación con la del las proteínas SM22 y calponina, aunque no podemos descartar la contribución de diferencias en la afinidad de los anticuerpos

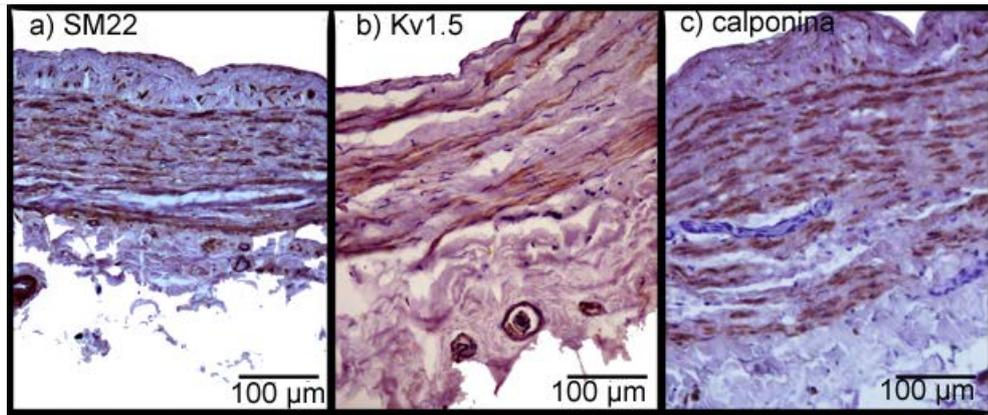


Figura29. Inmunohistoquímica del vena safena a tiempo 0 empleando anticuerpos frente a SM22, Kv1.5 y calponina. Se puede observar como el marcaje es mayor con SM22 y calponina.

En el **control negativo (0% FBS)** también se logra apreciar marcaje en la capa media e intima de SM22 y calponina, pero no así para Kv1.5. En el **control positivo (20% FBS)** vemos que el marcaje disminuye notoriamente. Esto se explica por el cambio fenotípico que ocurre en las VSMC de contráctil a proliferativo es progresivo, se observa en anillo en cultivo sin suero y es mayor en presencia de suero. Cabe destacar que aquellas venas que mostraron un remodelado mas evidente manifiestan mucho menos marcaje en el control positivo (20%FBS) mientras que las venas que revelan un remodelado mas sutil muestran un marcaje muy similar a la condición al control negativo (0%FBS).

5.1.3. . Determinación del número total de células mediante conteo de núcleos

La determinación del número total de células mediante el recuento de núcleos marcados con Hoechst muestran que no hay diferencias entre el número de células que forman la pared vascular de la vena safena dejando en evidencia que el remodelado vascular NO se debe a una proliferación celular excesiva sino a una reorganización de las VSMC alrededor de un lumen más pequeño. Por tanto se puede concluir que el PAP-1 ejerce un efecto sobre la migración de las VSMC.

Es de importancia resaltar que el marcaje con Hoechst muestra diferencias entre las formas de núcleos de las diferentes condiciones, Figura 30. Las condiciones tiempo 0, control negativo (0 %FBS) y 20%FBS + pap-1 muestran núcleos delgados y alargados, en cambio el control positivo (20% FBS) presenta núcleos ovalados, gruesos y muchas veces redondos. Este cambio de forma nuclear puede ser debido a la modulación fenotípica de las VSMC por la presencia de FBS. El hecho de que en la condición 20%FBS + PAP-1 se observen los núcleos de forma similar al control negativo lleva a deducir que el PAP-1 evita la modulación fenotípica que ocurre debido al FBS.

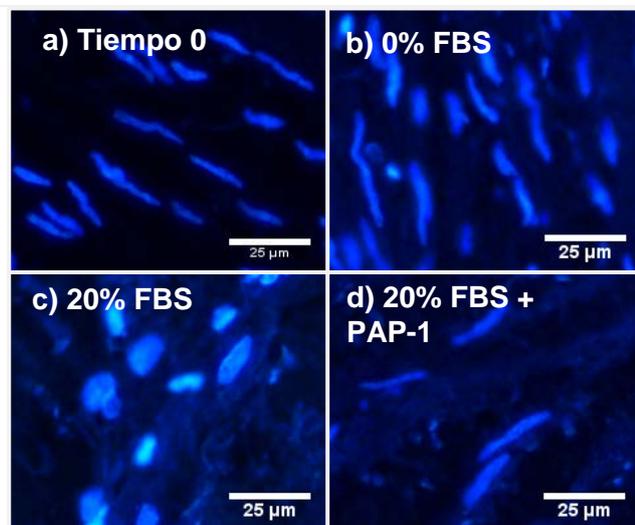


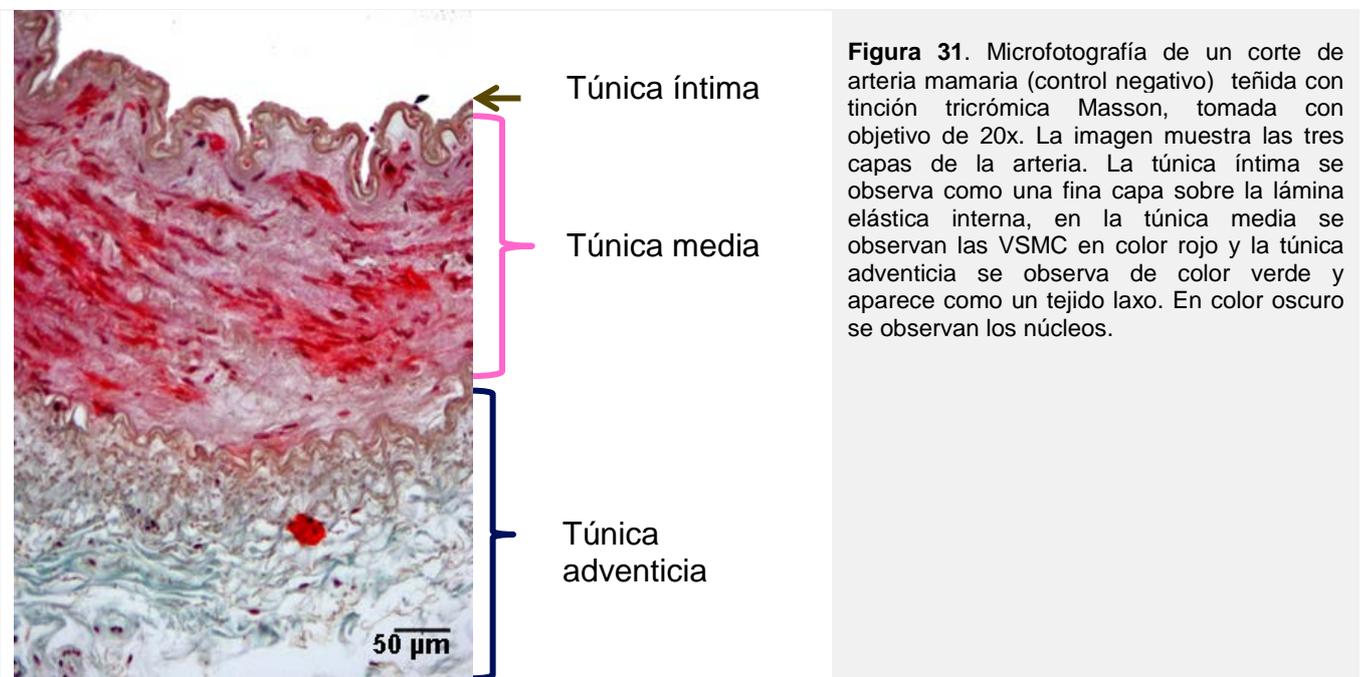
Figura 30 fotografía de núcleos marcados con Hoechst 20x de vena Safena. **a)** tiempo 0 se observan núcleos delgados y largos. **b)** control negativo (0%FBS) se observan núcleos alargados y delgados. **c)** control positivo (20%FBS) se observan núcleos redondos u ovalados. **d)** 20%FBS + PAP-1 se observan núcleos alargados.

5.2. Caracterización de la estructura y el remodelado vascular que sufre la arteria mamaria en cultivo de órgano.

5.2.1. Caracterización histomorfométrica de la arteria mamaria.

La arteria mamaria es otro de los vasos empleados en cirugía de revascularización coronaria. Se prefiere su uso (cuando es posible) porque es una arteria mediana muscular con características similares a la arteria coronaria, porque anatómicamente deriva de la arteria subclavia lo que facilita su uso en el bypass coronario y solo implica un punto de sutura y además porque tarda más tiempo en desarrollarse la restenosis que cuando se emplea la vena safena.

La arteria mamaria es una arteria muscular, en el control negativo su capa íntima aparece como una delgada línea formada por endotelio sobre la lámina elástica interna. Cuando se incubaba con suero la capa íntima muestra engrosamientos en algunas zonas. La capa media es gruesa con poco material elástico y conectivo, en el control negativo (0%FBS) se tiñe de color rojo intenso, mientras que cuando se trata con 20% FBS se tiñe con menor intensidad y presenta más material elástico y conectivo. Como está descrito para las arterias de sus características presenta unas membranas elásticas externa e interna bien marcadas, especialmente la lámina elástica interna.² (Figura 31)



En cultivo de órgano la presencia de 20% FBS induce un aumento del porcentaje de estenosis, del área de la íntima y de la media acompañado de la disminución del porcentaje de luz, cuando se compara con la ausencia de suero (control negativo).

La arteria mamaria sufre un remodelado inward ya que hay disminución del área del vaso en presencia de suero fetal y eutrófico porque la cantidad de masa de la pared vascular se mantiene constante. Sin embargo el número de células de la pared aumenta considerablemente en presencia de suero fetal, por lo que se infiere que hay proliferación celular pero estas células son de menor tamaño que las presentes en el control negativo.

El tratamiento con PAP-1 produce disminución del porcentaje de estenosis y de íntima y un aumento de la luz de la arteria. Sin embargo, el porcentaje de media se mantiene igual al del control positivo. Cabe mencionar, que en presencia de PAP-1 la masa de la pared vascular aumenta y disminuye el número de células. Esto sugiere que el PAP-1 inhibe la proliferación y migración de VSMC pero no la producción de tejido extracelular y el aumento de masa de pared vascular puede deberse a la mayor producción de tejido conectivo causado por el FBS.

5.2.2. Análisis inmunohistoquímico en la arteria mamaria.

La inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a SM22 en arteria mamaria muestra marcaje en la túnica media del control positivo mientras que el tratamiento con suero se observa marcaje más tanto en la íntima y como en la media. Esto indicaría que hay migración de VSMCs hacia la íntima durante el remodelado vascular. Además se observa que las células tienen diferente morfología lo que evidencia el cambio fenotípico que han sufrido las VSMCs.

5.2.3. Determinación del número total de células mediante conteo de núcleos

El estudio del número de células en la íntima y media de la arteria mamaria muestra que el remodelado vascular se debe a un aumento de la proliferación de VSMC. Y demostró que con el PAP-1 el número de VSMC disminuyen significativamente dejando en evidencia el efecto antiproliferativo que tiene el PAP-1 sobre las VSMC. Puesto que se ha determinado que la arteria mamaria sufre un remodelado eutrófico, las VSMC que proliferan deben ser mas pequeñas en el control positivo que en negativo.

Las láminas elásticas de las arterias son sobresalientes y presentan autofluorescencia. (Figura 32) En la control negativo (0%FBS) se observa una lamina elástica interna y externa muy delimitadas, no obstante en el control positivo (20%FBS) la lamina elástica externa no es tan evidente y se observan varias laminas a lo largo de la túnica media. Este cambio puede ser producto del cambio fenotípico de las VSMC que han adquirido fenotipo proliferativo y tienen mayor capacidad de fabricar material extracelular. En presencia de PAP-1, se puede observar que las láminas elásticas están bien definidas de forma similar a cómo sucede en el control negativo aunque es notoria la presencia de alguna lámina en la túnica media, pero en menor cantidad que en el control positivo.

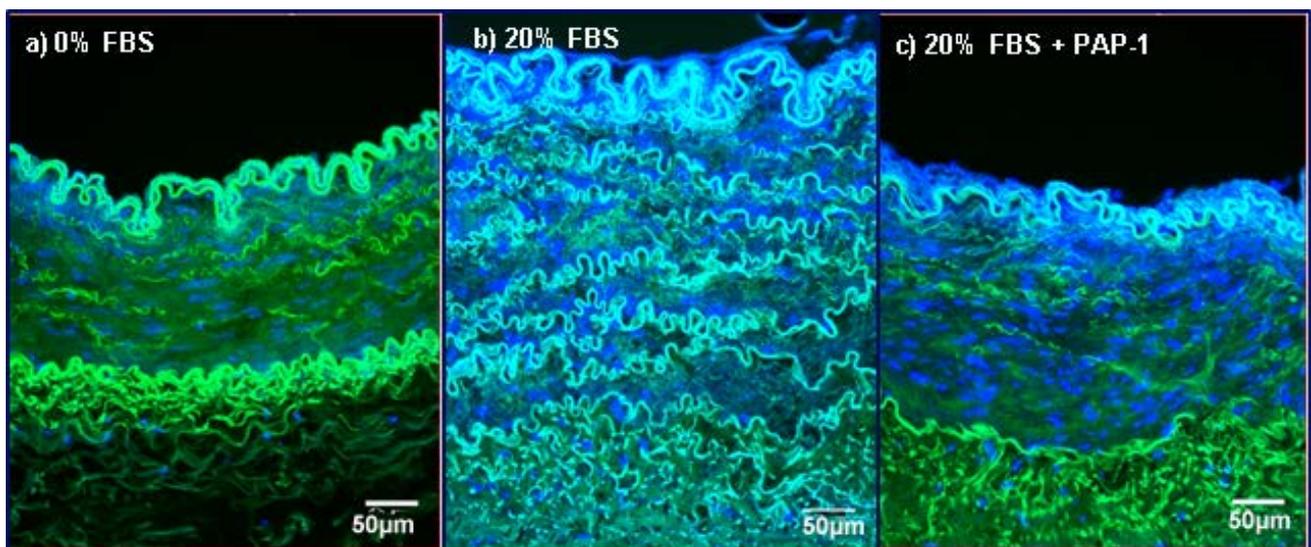


Figura 32. Fundido de dos microfotografías de arteria mamaria adquirida con objetivo 20x y filtros de fluorescencia UV2A (Ex 330-380) y B-2A (Ex 450-490). El fundido muestra en azul los núcleos marcados con DAPI y en verde la autofluorescencia de las láminas. **a)** Control negativo (0% FBS) donde se observan las láminas externa e interna muy evidentes. **b)** Control positivo (20%FBS) se observa una pared vascular mas gruesa y es visible la presencia de muchas laminas elásticas en la túnica media. **c)** 20%FBS + PAP-1 la lamina elástica externa no es tan evidente y no se observan laminas elásticas en la túnica media.

En resumen con este trabajo se determinó que la Vena Safena y Arteria Mamaria sufren un remodelado inward eutrófico en presencia de FBS en cultivo de órgano. Sin embargo, ambos vasos son diferentes y el remodelado que se produce, aunque es del mismo tipo, parece ser el resultado de mecanismos distintos. Mientras que en la arteria mamaria hay un aumento de número de células de la pared vascular, en la vena safena el número de células se mantiene igual. Es interesante destacar que el efecto del PAP-1 en ambos vasos es el mismo, la reducción del porcentaje de estenosis y de íntima. Por consiguiente hay una menor reducción de la luz del vaso.

6. Conclusiones

- 1- El cultivo de órgano de vena safena causa aumento de porcentaje de estenosis y túnica íntima así como una disminución del porcentaje de área luminal.
- 2- El cultivo de órgano de vena safena y arteria mamaria en presencia de FBS causa aumento de porcentaje de estenosis, íntima, media y disminuye el porcentaje de luz comparado con cultivo de órgano en ausencia de FBS. .
- 3- La vena safena y arteria mamaria sufren un remodelado inward eutrófico con disminución de la luz del vaso cuando se induce remodelado en cultivo de órganos en presencia de FBS.
- 4- En vena safena, el PAP-1 disminuye significativamente el porcentaje de estenosis, de área de túnica íntima, túnica media y luz inducida por suero en el cultivo de órganos. El everolimus únicamente redujo significativamente el porcentaje de túnica íntima y en contra de lo que cabría esperar el uso combinado de PAP-1 y everolimus no pareció tener ningún efecto sobre el remodelado inducido por la incubación con suero.
- 5- En arteria mamaria el PAP-1 disminuyó significativamente el porcentaje de estenosis, de área de la luz y de área de la íntima inducida por suero en el cultivo de órgano.
- 6- Ambas preparaciones sufren un remodelado inward eutrófico, pero en el caso de la vena safena no hay aumento en el número de células en la pared del vaso mientras que en la arteria mamaria hay un aumento significativo del número de células.

Perspectivas Futuras

Como ya se ha indicado la reestenosis debido a hiperplasia de la íntima es causa de numerosas patologías, por lo que resulta sumamente interesante continuar con esta línea de investigación para ofrecer nuevos tratamientos más efectivos contra estas patologías.

Los resultados obtenidos en este trabajo plantean nuevas preguntas que se podrían explorar mediante los experimentos que se proponen.

- Cultivo de órgano de arterias y venas presurizadas, con el fin de recrear el microambiente en que se encuentran los vasos sanguíneos en el organismo vivo.
- Infección con lentivirus del canal de potasio Kv1.5 para determinar si la sobreexpresión de este canal detiene o disminuye el remodelado vascular.
- Estudios *in vivo* utilizando como modelo animal el ratón. En este animal se podría realizar un modelo de estenosis mediante ligadura de la arteria carótida en el que comprobar si el PAP-1 reduce el remodelado vascular como sucede en el cultivo de órgano.

Bibliografía

1. Aaronson PI, Ward JPT. *The Cardiovascular System*. 2004. Oxford.
2. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas*. 2011. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business..
3. van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet*. 2012;3:290.
4. Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ Res*. 2007;101:441-454.
5. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002;17:105-109.
6. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of Intimal Hyperplasia. *British Journal of Surgery*. 1994;81:1254-1269.
7. Aranda JM, Jr., Hill J. Cardiac transplant vasculopathy. *Chest*. 2000;118:1792-1800.
8. Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments. *Circulation*. 2008;117:2131-2141.
9. Murphy GJ, Angelini GD. Insights into the pathogenesis of vein graft disease: lessons from intravascular ultrasound. *Cardiovasc Ultrasound*. 2004;2:8.
10. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 1999;354:1493-1498.
11. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of Accelerated Atherosclerosis - Role of Vascular Injury and Smooth-Muscle Cell-Proliferation. *Journal of the American College of Cardiology*. 1990;15:1667-1687.
12. Yoshida T, Owens GK. Molecular Determinants of Vascular Smooth Muscle Cell Diversity. *Circ Res*. 2005;96:280-291.
13. Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ Res*. 2006;98:868-878.
14. Ciudad P, Moreno-Dominguez A, Novensa L, Roque M, Barquin L, Heras M, Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR. Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1203-1211.
15. Pardo LA. Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology*. 2004;19:285-292.
16. DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-Gated K⁺ Channels in Human Lymphocyte-T - A Role in Mitogenesis. *Nature*. 1984;307:465-468.
17. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, St+hmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2014;369.
18. Ciudad P, Jimenez-Perez L, Garcia-Arribas D, Miguel-Velado E, Tajada S, Ruiz-McDavitt C, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT. Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1299-1307.
19. Ciudad P, Novensa L, Garabito M, Battle M, Dantas AP, Heras M, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT, Roque M. K⁺ channels expression in hypertension after arterial injury, and effect of selective Kv1.3 blockade with PAP-1 on intimal hyperplasia formation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28:501-511.
20. Schmitz A, Sankaranarayanan A, Azam P, Schmidt-Lassen K, Homerick D, Hansel W, Wulff H. Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1254-1270.
21. Pereira LE, Villinger F, Wulff H, Sankaranarayanan A, Raman G, Ansari AA. Pharmacokinetics, Toxicity, and Functional Studies of the Selective Kv1.3 Channel Blocker 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen in Rhesus Macaques. *Exp Biol Med*. 2007;232:1338-1354.
22. Formica Jr RN, Lorber KM, Friedman AL, Bia MJ, Lakkis F, Smith JD, Lorber MI. The evolving experience using everolimus in clinical transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2004;36:S495-S499.
23. Kloc M, Ghobrial RM. Chronic allograft rejection< A significant hurdle to transplant success. *Burns & Trauma*. 2014;2:3-10.
24. Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2007;75:640-648.
25. Ciudad P, Miguel-Velado E, Ruiz-McDavitt C, Alonso E, Jimenez-Perez L, Asuaje A, Carmona Y, Garcia-Arribas D, Lopez J, Marroquin Y, Fernandez M, Roque M, Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR. Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflugers Arch*. 2014.