



**Universidad de Valladolid**



**Facultad de Medicina**

Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular y Fisiología



**Instituto de Biología y  
Genética Molecular**

## **Efecto de la glucosa sobre la proliferación mediada por Kv1.3 en células de músculo liso vascular.**

**Memoria del Trabajo de Investigación Tutelado para optar por el Título de Máster en Investigación Biomédica.**



**Presentado por: Carlos Manuel González Casimiro.**

**Directoras: Dra. María del Pilar Ciudad Velasco.**

**Dra. Irene Cózar Castellano.**

**Valladolid, 2017.**

# Índice

Glosario de acrónimos y abreviaturas. ....	2
1. Introducción.....	4
1.1 Diabetes Mellitus e hiperglucemia. La glucosa como regulador de la expresión génica. ....	4
1.2 Vasos sanguíneos y músculo liso. Cambio fenotípico de las VSMC.....	5
1.3 Canales de potasio y modulación fenotípica. Canal Kv1.3.....	6
1.4 Glucosa como regulador de la expresión génica y su relación con el canal Kv1.3. ....	7
1.5 Objetivos. ....	10
2. Materiales y métodos. ....	11
2.1 Líneas celulares, cultivos y tratamiento experimental. ....	11
2.1.1 Obtención de muestras de tejido y línea celular empleada. ....	11
2.1.2 Mantenimiento de cultivos celulares. ....	11
2.1.3 Tratamiento experimental. ....	12
2.2 Análisis de expresión de mRNAs.....	14
2.2.1 Extracción de RNA. ....	14
2.2.2 Síntesis de cDNAs.....	15
2.2.2 PCR cuantitativa. ....	16
2.3 Ensayos de proliferación celular. ....	18
2.4 Procesamiento y análisis de la información. ....	20
3. Resultados y análisis.....	21
3.1 Expresión a nivel de mRNA.....	21
3.1.1 Canal Kv1.3.....	21
3.1.2 Transportadores de glucosa. ....	21
3.2 Ensayos de proliferación. ....	23
3.2.1 Glucosa y proliferación celular de hVSMC.....	23
3.2.1 Ensayos con inhibidor.....	23
4. Conclusiones.....	25
4.1 Perspectivas futuras. ....	25
5. Referencias bibliográficas. ....	26

## Glosario de acrónimos y abreviaturas.

<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico básico. ( <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> ).
<b>COLMAH</b>	COLección de Muestra de Arterias Humanas.
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus.
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> .
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico. ( <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> ).
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatados.
<b>EdU</b>	5-etinil-2'-deoxiuridina.
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico. ( <i>Epidermic Growth Factor</i> ).
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino. ( <i>Fetal Bovine Serum</i> .)
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa ( <i>GLUcose Transporter</i> ).
<b>h</b>	Relativo al ser humano, utilizado en minúsculas delante de siglas.
<b>Kcna3</b>	Gen que codifica para la proteína Kv1.3.
<b>Kv1.3</b>	Canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia 1, miembro 3.
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i> .
<b>mRNA</b>	RNA mensajero.
<b>PAP-1</b>	5-(4-fenoxibutoxi)psoraleno
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino. ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ).
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa. ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento plaquetario. ( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> ).
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa.
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa o en tiempo real.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico. ( <i>RiboNucleic Acid</i> ).

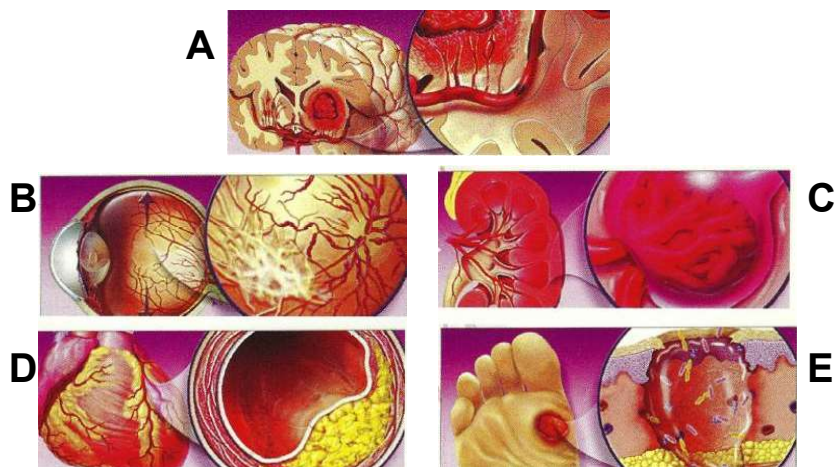
<b>RPL18</b>	Proteína ribosomal L18.
<b>RT</b>	Temperatura ambiente. ( <i>Room Temperature</i> ).
<b>RT</b>	Transcripción inversa.
<b>SLC2Ax</b>	Genes codificantes para un transportador de glucosa.
<b>SM</b>	Músculo liso. ( <i>Smooth muscle</i> ).
<b>VSMC</b>	Células de músculo liso vascular. ( <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> ).

## 1. Introducción.

### 1.1 Diabetes Mellitus e hiperglucemia. La glucosa como regulador de la expresión génica.

El término Diabetes Mellitus (DM) engloba a un conjunto de entidades nosológicas que cursan con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas que tienen en común la existencia de hiperglucemia debido a un fallo en la función de la insulina como hormona reguladora. Esta situación puede estar suscitada primariamente por un déficit real de insulina por insuficiencia de las células beta pancreáticas que normalmente la producen o bien por una disminución de la sensibilidad a la misma de los tejidos diana de esta hormona (*Tuomi et al., 2014*).

La hiperglucemia crónica en la DM no tratada, interviene en la etiopatogenia de numerosas complicaciones de la enfermedad, atribuibles fundamentalmente a lesiones vasculares (macro y microangiopatías) o de nervios periféricos (neuropatía). En el caso de las complicaciones vasculares, éstas se producen por lo general debido a cambios en la pared vascular arterial que traen como consecuencias alteraciones del flujo sanguíneo normal a las zonas irrigadas por el vaso (Figura 1). Aunque en la fisiopatología de estas alteraciones tienen un papel importante la proliferación del endotelio vascular y cambios histológicos de la túnica íntima, también existen cambios en la capa muscular lisa con engrosamiento de la misma y migración y proliferación de células de músculo liso vascular (VSMC) (*Suzuki et al., 2001*).



**Figura 1. Principales complicaciones macroangiopáticas de la Diabetes Mellitus: A. Enfermedad Cerebrovascular. B. Retinopatía Diabética. C. Nefropatía Diabética. D. Enfermedad Coronaria. E. Pie Diabético.**

Las lesiones en los principales órganos y sistemas afectados por estas complicaciones vasculares son causa importante de mortalidad y morbilidad y constituyen un grave problema sanitario tanto por su prevalencia como creciente incidencia. La prevalencia mundial de DM en adultos (mayores de 18 años) aumentó

según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 4,7% (108 millones de personas) en 1980 al 8,5% (422 millones de personas) en 2014, siendo en España en 2010 de 13,8% (5,3 millones de personas) solo de Diabetes tipo 2 (*Soriguer et al., 2012*). Además de ser una importante causa de ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y amputación de los miembros inferiores (*Marcuello et al., 2012*); se estima que en 2015 esta enfermedad fue la causa directa de 1,6 millones de muertes. Casi la mitad de las muertes atribuibles a la hiperglucemia tienen lugar antes de los 70 años de edad y según proyecciones estimadas, la DM será la séptima causa de mortalidad en 2030 (*Mathers & Loncar, 2006*).

## **1.2 Vasos sanguíneos y músculo liso. Cambio fenotípico de las VSMC.**

Los vasos sanguíneos forman una extensa red que irriga prácticamente todos los tejidos del organismo, transportando oxígeno y nutrientes hacia ellos y recolectando productos de desecho para ser excretados, además de proveer de conducto para el sistema inmunitario y la regulación endocrina. Siguiendo la dirección del flujo sanguíneo y partiendo del corazón, los vasos comienzan en la arteria aorta en la circulación mayor y en la arteria pulmonar en la 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). Sin tener en cuenta los sistemas porta que presentan características particulares, en general, los capilares convergen para formar vénulas que a su vez se van uniendo para formar venas y terminar en las venas cavas en la circulación mayor y en las venas pulmonares en la circulación menor, llevando de regreso la sangre al corazón.

Como órgano tubular, un vaso sanguíneo presenta una luz o lumen y una pared. Dicha pared vascular está formada por tres capas: la túnica íntima o interna, la túnica muscular o media, y la túnica externa o adventicia (Figura 2). Aunque sus características varían según el tipo de vaso, tienen una estructura general conservada. Partiendo del lumen vascular, nos encontramos:

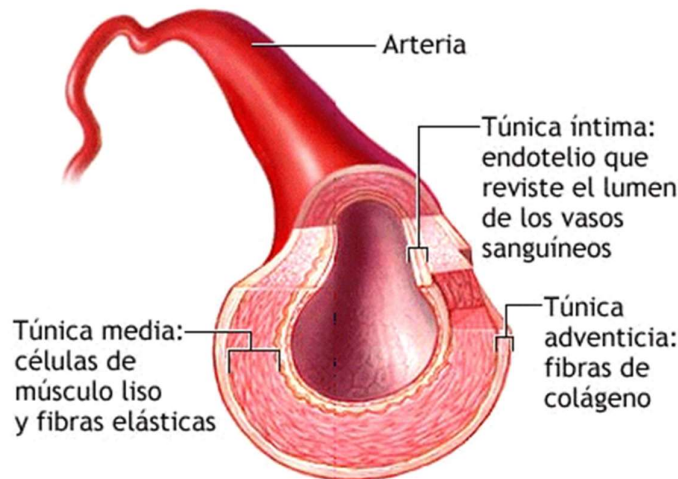
La **túnica íntima**, formada a su vez por tres capas: el endotelio, la lámina basal de las células endoteliales y la subendotelial. El endotelio es una monocapa de células epiteliales planas. La lámina basal es una fina capa de matriz extracelular que brinda sostén y protección al endotelio. La capa subendotelial consiste en tejido conectivo laxo, puede presentar VSMC y contiene 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 VSMC dispuestas en circunferencia. Pueden encontrarse fibras de elastina y proteoglicanos

## Introducción.

entre las VSMC. 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** está compuesta de fibras de colágeno longitudinales y algunas fibras elásticas. En los vasos grandes contiene los *vasa vasorum* (lit.: los vasos del vaso).



**Figura 2. Corte transversal de una arteria.** Se distinguen las tres capas que conforman la pared del vaso, encontrándose las células de músculo liso en la túnica media.

Durante su desarrollo las VSMC presentan una variedad de fenotipos que se manifiestan en diferentes fases de su proceso de diferenciación. Las VSMC maduras son células fusiformes y en su mayoría se encuentran en estado quiescente presentando un **fenotipo contráctil** caracterizado por la expresión de proteínas contráctiles importantes para su función y características de músculo liso (SM) como:  $\alpha$ -actina de SM, cadena pesada de miosina de SM, proteína SM22 $\alpha$ , h1-calponina, miocardina entre otros (Bárány, 1996). Sin embargo, las VSMC maduras pueden reaccionar a modificaciones en su entorno produciendo un fenotipo similar al que presentan en las etapas tempranas de la vasculogénesis; con una gran capacidad migratoria, una tasa de proliferación muy rápida y un alto índice de síntesis de proteínas de secreción. Este proceso se conoce como **modulación fenotípica** (Owens, 1995). 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.

### 1.3 Canales de potasio y modulación fenotípica. Canal Kv1.3.

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) constituyen una de las familias más diversas de proteínas de membrana, son proteínas ubicuas presentes tanto en

células excitables como no excitables. En las no excitables regulan el potencial de membrana y funciones como la migración y proliferación (*Pardo, 2004*).

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 del gen que codifica el canal Kv1.3 (*Cidad et al., 2010*).

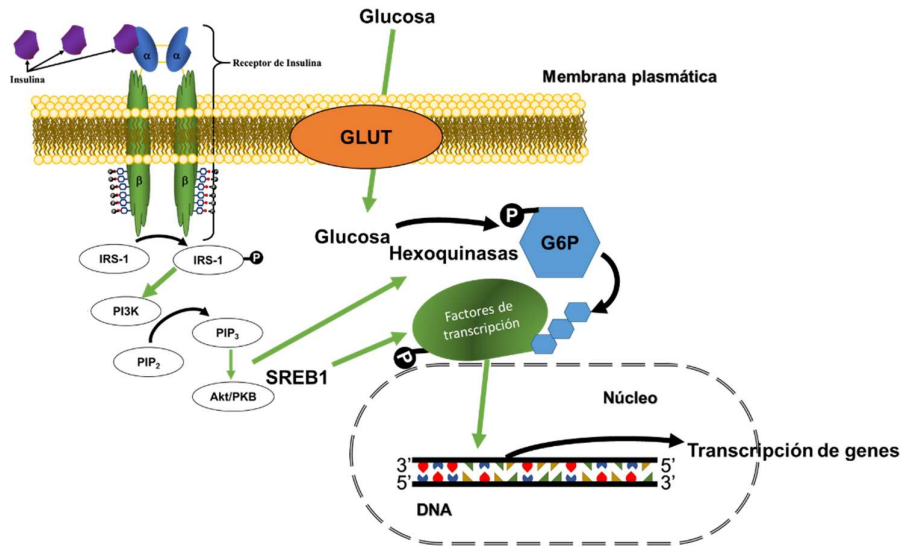
Entre los Kv, el canal Kv1.3 fue el primer canal que se encontró implicado en la proliferación celular, específicamente en linfocitos T. Posteriormente, esta observación se ha extendido a otros tipos celulares como células progenitoras de oligodendrocitos, glioma, y algunas líneas de cáncer y a otros canales de la familia Kv. En las VSMC se ha demostrado que la expresión Kv1.3 tiene relación con la proliferación celular ya que en presencia de bloqueantes selectivos como 5-(4-fenoxibutoxi)-psoraleno (PAP-1) (*Schmitz et al., 2005*) o margatoxina (MgTx), dicha proliferación disminuye tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (*Cidad et al., 2012, Ciudad et al., 2015*). En los modelos *in vitro* Kv1.3 se ha observado en diferentes lechos vasculares, incluyendo células humanas de arterias uterinas, coronarias, renales y venas safenas (*Cidad et al., 2015*).

## **1.4 Glucosa como regulador de la expresión génica y su relación con el canal Kv1.3.**

Además de los efectos de las hormonas involucradas en la regulación del metabolismo de la glucosa sobre la expresión génica, también se ha demostrado que el propio metabolito es capaz por sí solo de regular la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de glúcidos y lípidos. Se piensa que en su forma intracelular más abundante, la glucosa-6-fosfato, participa en la glicosilación de proteínas que se desplazan al núcleo y actúan como factores de transcripción (Figura 3). (*Vaulont et al., 2000*). Además, la glucosa se ha descrito que puede regular la expresión génica en VSMC mediante mecanismos que involucran regulación enzimática y modificación del citoesqueleto (*Hien et al., 2016, Suzuki et al., 2002*).



## Introducción.



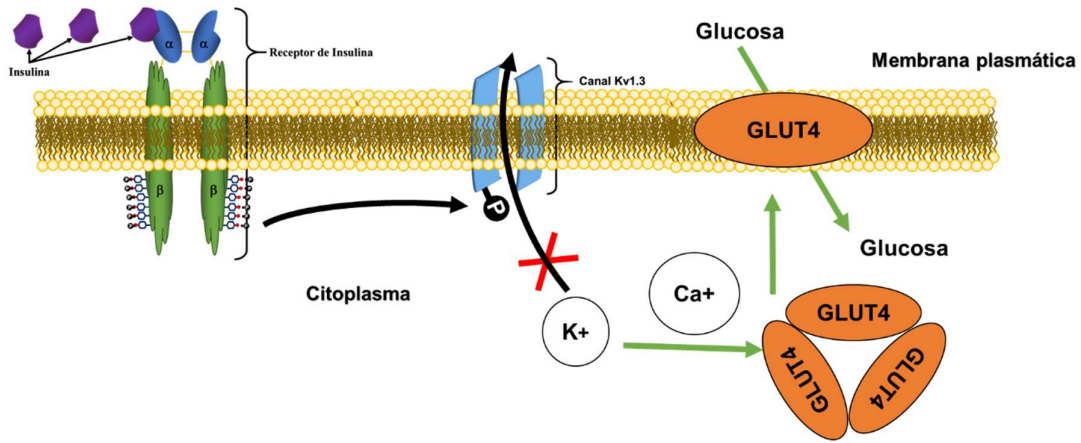
**Figura 3: Regulación por la glucosa de la expresión génica.** La glucosa junto a la insulina, participa en la regulación de la expresión génica mediante la glicosilación de factores de transcripción que son activados y se dirigen al núcleo donde se unen a promotores o silenciadores.

Para garantizar la entrada de glucosa en las células, en casi todos los tejidos del organismo se expresa el transportador GLUT1, el cual es mayoritariamente constitutivo y realiza su función en condiciones basales e independientemente de regulación hormonal. Por otro lado, el transportador GLUT4 constituye el principal agente del transporte transmembrana de glucosa regulado por la insulina, ya que, aunque se refiere que su expresión en los tejidos muscular y adiposo es más o menos constante, en condiciones basales se encuentra en el citosol compactado en pequeñas vesículas y se transloca a la membrana celular como consecuencia de determinados estímulos (*Gómez-Zorita & Urdampilleta, 2015*), como la activación del receptor de insulina por su ligando, aparentemente por estimulación de la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (akt/PKB) (*Brewer et al., 2014, Stöckli et al., 2012*). Otras moléculas señalizadoras como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) han demostrado activar esta translocación, presumiblemente por estimulación de la misma vía (*Török et al., 2004, Zhao et al., 2011*).

El canal de potasio Kv1.3 ha sido también identificado como posible componente de la señalización por insulina en la regulación de la incorporación de la glucosa al medio intracelular. En concreto, el canal es sustrato de la fosforilación en residuos de tirosina por parte del receptor de insulina activado provocando el cierre del mismo en tejidos diana de la hormona, con los consecuentes cambios en las corrientes de potasio. Esto estimularía la translocación del GLUT4 a la membrana citoplasmática por un mecanismo dependiente de calcio poco dilucidado y por ende conllevaría un aumento de la captación de glucosa del medio (Figura 4) (*Colley et al., 2004, Kovach et al., 2016, Li et al., 2006*). Recientemente también se ha propuesto que esta vía de señalización podría funcionar independientemente a la estimulación por insulina. Algunos estudios han encontrado que tanto la delección genética del canal (Kv1.3<sup>-/-</sup>) como su bloqueo en

## Introducción.

tejidos periféricos, mejoraría la sensibilidad a la insulina de los mismos con el consecuente efecto en el metabolismo de la glucosa (Upadhyay et al., 2013, Xu et al., 2004). Estos hallazgos han propiciado que se haya propuesto este canal como candidato a objetivo terapéutico farmacológico en el tratamiento de la DM.



**Figura 4. Papel del canal Kv1.3 en la regulación del metabolismo de la glucosa.** La fosforilación en residuos de tirosina del canal Kv1.3 por el receptor de la insulina o por otros componentes celulares con actividad de tirosinquinasa, provoca su cierre y por ende la disminución de las corrientes de potasio. Esto desencadena un mecanismo mediado por calcio poco estudiado, que conlleva a la translocación del GLUT4 a la membrana, aumentando la entrada de glucosa a la célula.

## **1.5 Objetivos.**

La hiperglucemia, característica de la DM, está asociada con cambios en la pared arterial incluyendo aumento del grosor de la capa muscular y cambios fenotípicos en las células de músculo liso, lo que participa en la fisiopatología de las alteraciones vasculares de la DM, que causan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Este trabajo pretende estudiar el efecto de la glucosa elevada sobre la proliferación en células de músculo liso vascular humanas en cultivo y si en dicho efecto está implicado el canal de potasio Kv1.3, lo que contribuiría a valorar a este canal como posible objetivo terapéutico en el tratamiento de la DM y sus complicaciones a nivel vascular.

Para esto se llevan a cabo los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la expresión de los transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT4 en la modulación fenotípica de las células de músculo liso vascular.
2. Describir el efecto de concentraciones patológicas de glucosa sobre la expresión de mRNA del canal Kv1.3 y de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en células de músculo liso arterial humanas.
3. Cuantificar la proliferación de células humanas de musculo liso arterial en concentraciones patológicas de glucosa y evaluar el efecto de la presencia de un inhibidor del canal Kv1.3.

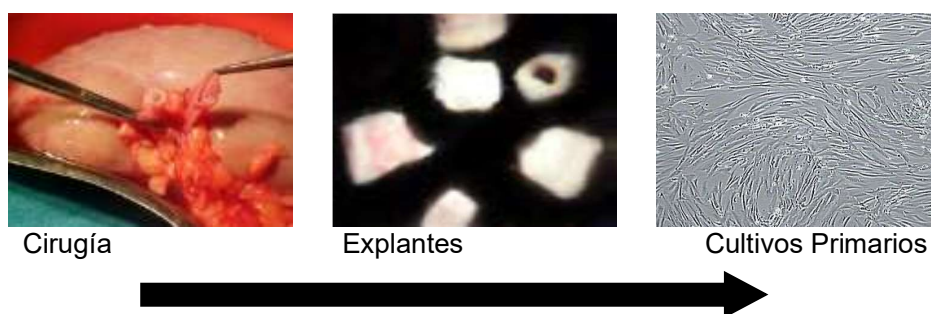
## 2. Materiales y métodos.

### 2.1 Líneas celulares, cultivos y tratamiento experimental.

#### 2.1.1 Obtención de muestras de tejido y línea celular empleada.

En este estudio se utilizaron cultivos primarios de células humanas de músculo liso vascular (hVSMC) derivadas de arterias renales. Estas células se obtuvieron de muestras de arterias de donantes anónimos pertenecientes a la colección COLMAH.

Las arterias se limpiaron para dejar sólo la capa muscular y se sembraron en explantes. Al cabo de 1-2 semanas, las células de músculo liso vascular proliferan y migran desde los explantes dando lugar a una línea celular primaria (Figura 5). Estos cultivos primarios representan un buen modelo del fenotipo proliferativo de las hVSMC. Una porción de la capa muscular de cada una de las muestras arteriales se conservó intacta en crioconservación y a partir de ellas se realizó extracción de RNA directamente como referencia de los cambios de expresión génica entre fenotipos.



**Figura 5. Obtención de las muestras de tejido y preparación de los cultivos primarios.** Los cultivos de hVSMC se obtuvieron a partir de explantes obtenidos de muestras de arterias procedentes de donantes anónimos.

#### 2.1.2 Mantenimiento de cultivos celulares.

Para el mantenimiento de los cultivos de hVSMC renales, se usó un medio de cultivo *Minimum Essential Medium* (MEM) con un 10% de suero fetal bovino (FBS), suplementado con insulina (5 µg/ ml, Gibco™), L-Glutamina (2 mM, Lonza™), bFGF (2 ng /ml) y EGF (5ng /ml, ambos de Gibco) y antibióticos (Penicilina 100 U/m, Streptomycin 100 U/m, Fungizona 5 µg/ ml).

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar Telstar Biostar (con filtro HEPA capaz de retener partículas superiores a 0,2 µm con una eficacia del 99,9 %), usando material y soluciones estériles. Las células se cultivaron en sus correspondientes medios a 37°C en una incubador de CO<sub>2</sub> Hera Cell 150 con una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>.

La separación de estas células adherentes de las placas de cultivo para su subcultivo y/o congelación, se hizo por tripsinización. Para ello, las células se dejaron crecer hasta

un 80%-90% de confluencia, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS para eliminar los restos del suero del medio que pueden inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadió una solución de tripsina-EDTA (0.02% de EDTA y 0.05% de tripsina en PBS) en un volumen suficiente como para cubrir la superficie de la placa y se incubaron durante 2 minutos en la incubadora. Tras la incubación, se adicionó medio de cultivo para inhibir la acción de la tripsina en un volumen dos veces mayor que el volumen de tripsina. La suspensión de células obtenida se centrifugó durante 4 minutos a 200 g. El *pellet* se resuspendió en 1ml de medio de cultivo. Este volumen se dividió en otras placas con medio de cultivo o se procedió a su congelación para su conservación.

Las hVSMC se mantuvieron en placas de 35 mm de diámetro con 500 µl de medio de cultivo (MEM, 10% FBS) cambiándose cada 24 horas. En la frecuencia y número de pases celulares realizados se tuvo en consideración la baja capacidad proliferativa de partida y el proceso de senescencia acelerado observado en las células de músculo liso vascular en cultivo, por el cual su capacidad proliferativa disminuía progresivamente con el número de pases llegando a ser nula alrededor de los 10-12 pases. Por este motivo, todos los experimentos se realizaron con células entre pases 3 a 7, en los que las células registran una buena respuesta proliferativa.

### *2.1.3 Tratamiento experimental.*

Una vez estabilizado el cultivo de hVSMC renales y entre los pases celulares indicados, se procedió a subcultivar las células en placas de cuatro pocillos de 15 mm manteniendo el medio y las condiciones anteriormente descritos hasta su estabilización. En el caso de las células que se utilizarían para ensayos de proliferación celular, fueron sembradas sobre cristales de poli-L-lisina, no así las que se utilizaron para expresión de RNA, las cuales se sembraron directamente en los pocillos. En este punto se procedió al tratamiento experimental de estos cultivos celulares usando para ello un medio de cultivo específico.

Para el tratamiento experimental, se partió de un medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) sin glucosa ni FBS, suplementado con **PDGF** (20 ng/ml), L-Glutamina (2 mM) y antibióticos (Penicilina 100 U/m, Streptomycin 100 U/m, Fungizona 5 µg/ml). Las células se mantuvieron durante 4 horas en este medio sin glucosa (Ayuno), con el objetivo de sincronizar los cultivos eliminando los efectos basales que este metabolito produce en la regulación de la expresión génica.

Inmediatamente después de finalizado el período de Ayuno, partiendo del mismo medio descrito, se procedió a someter a cada uno de tres pocillos a una condición diferente de concentración de glucosa durante 24 horas: Uno de los pocillos continuó sin glucosa en el medio (0 mM); el segundo con una concentración de 5,5 mM de glucosa, equivalente a la glucemia normal y al tercer pocillo se le aplicó el medio con una concentración de 22 mM de glucosa, equivalente a hiperglucemia franca. La Tabla 1 resume dicho tratamiento:

Curso Temporal del Experimento		
Ayuno (4 Horas)	Tratamiento (24 Horas)	Ensayos (8-10 Horas)
DMEM 0 mM Glucosa 20 ng/ml PDGF	Tres condiciones. 1. 0 mM Glucosa 2. 5,5 mM Glucosa 3. 22 mM Glucosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensayos de expresión RNA</li> <li>• Ensayos de proliferación celular.</li> </ul>

**Tabla 1. Tratamiento experimental de los cultivos celulares de hVSMC de la arteria renal.** Se resumen las fases de los experimentos, la duración en horas y las condiciones de los medios de cultivos utilizados.

Solo para realizar ensayos de proliferación celular y con un tratamiento experimental similar al anterior pero sin utilizar la condición de 0 mM de glucosa, se procedió a incorporar en las condiciones de 5,5 mM y 22 mM de glucosa, la presencia o ausencia de un inhibidor del canal Kv1.3, obteniéndose así, para cada caso, cuatro condiciones en estos experimentos, como se observa en la Tabla 2:

Curso Temporal del Experimento		
Ayuno (4 Horas)	Tratamiento (24 Horas)	Ensayos (8-10 Horas)
DMEM 0 mM Glucosa 20 ng/ml PDGF	Cuatro condiciones. 1. 5,5 mM Glucosa sin inhibidor. 2. 22 mM Glucosa sin inhibidor. 3. 5,5 mM Glucosa con inhibidor. 4. 22 mM Glucosa con inhibidor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensayos de proliferación celular.</li> </ul>

**Tabla 2. Tratamiento experimental utilizado en los ensayos de proliferación celular con inhibidores.** Se prescindió de la condición de 0 mM de glucosa y se probaron las otras condiciones tanto en presencia como ausencia del inhibidor.

Específicamente en este trabajo se probó el PAP-1 como inhibidor selectivo del canal Kv1.3.

El PAP-1 es un bloqueante selectivo del canal de potasio Kv1.3. Se trata de una molécula pequeña sintética derivada del 5-metoxipsoraleno (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 IC<sub>50</sub> para el Kv1.3 de 2nM. Se necesitan dos moléculas de PAP-1 para inhibir un canal (Schmitz *et al.*, 2005).

## **2.2 Análisis de expresión de mRNAs.**

### *2.2.1 Extracción de RNA.*

Para cuantificar la expresión a nivel transcripcional de genes específicos se partió de la extracción y purificación del RNA presente en las muestras y su posterior procesamiento con la técnica de la transcripción inversa (RT+) para obtener los cDNAs correspondientes.

Todo el material y los reactivos utilizados en los procedimientos relacionados con la extracción y utilización de RNA estaban certificados como libres de ácidos nucleicos y de nucleasas.

La extracción del RNA, tanto para muestras de tejido como para los cultivos celulares, se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del reactivo TRIzol® de Invitrogen™. El TRIzol® consiste en una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina. Durante la lisis y homogeneización de la muestra, este reactivo permite mantener la integridad del RNA, al mismo tiempo que disuelve los componentes celulares y la disociación de los complejos nucleoproteicos.

En el caso de los cultivos celulares y al terminar el tratamiento de las células descrito en el apartado 2.1, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se procedió a añadir, bajo campana de extracción, 500 µl de TRIzol® en cada uno de los mismos. Se rasparon las células de la monocapa con puntas de pipetas y se homogenizó mediante pipeteo. Acto seguido, se recogió los lisados celulares con el reactivo en tubos Eppendorf™ de 1,5 ml y se dejaron reposar a RT durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se procedió a añadir 100 µl de cloroformo en cada tubo y a agitar vigorosamente durante 15 segundos. Se incubaron los homogenizados durante 3 minutos a RT y luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente a la centrifugación, las muestras quedaron separadas en dos fases, una rosa inferior que corresponde a la fase fenol-clorofórmica u orgánica y otra incolora que se corresponde con la fase acuosa. El RNA permanece en la fase acuosa por lo que se transfirió la misma a tubos nuevos, poniendo especial cuidado en no arrastrar nada de la fase orgánica, reservándose esta última para extracción de proteínas. Para precipitar el RNA de las fases acuosas, se añadió a las mismas 250 µl de 2-isopropanol, se agitaron y se incubaron a RT durante 10 minutos. Se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante quedando el RNA en el fondo del tubo en forma de pequeño *pellet* casi invisible. Se lavó dicho *pellet* de RNA añadiendo 500 µl de etanol por cada tubo y agitando en vórtex. Posteriormente, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, y se procedió a secar *pellet* de RNA al aire, colocando el tubo boca abajo durante 20 minutos. Finalmente el RNA se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas, donde las muestras se incubaron a 60°C en bloque térmico durante 10 minutos para garantizar la completa disolución del RNA.

## *Materiales y métodos.*

La concentración y pureza del RNA aislado fue cuantificada mediante la medida de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro Nanodrop®. Las muestras de RNA se conservaron a -80°C hasta su empleo.

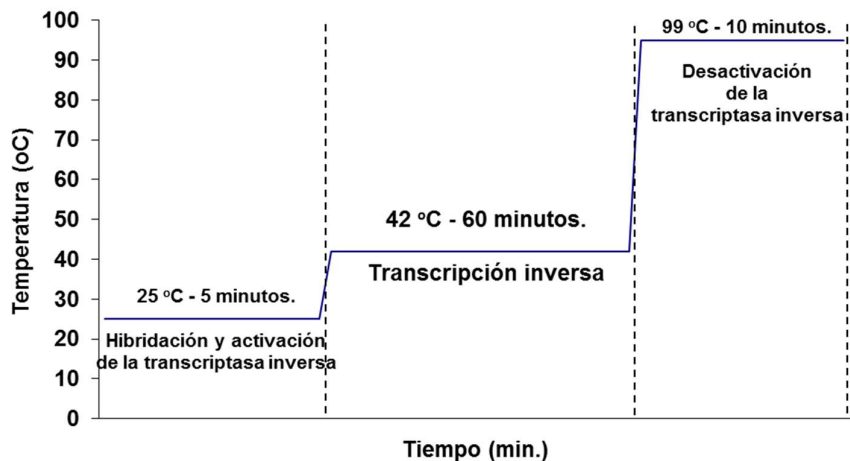
En el caso de los tejidos, en este caso fragmentos de arterias humanas, se procedió de forma similar para la extracción de RNA, salvo por el requerimiento de un paso previo de homogeneización mecánica del tejido imbuído en TRIzol®, utilizándose un volumen del reactivo 10 veces superior al de tejido utilizado. Tras la homogeneización del tejido y posterior centrifugación a 12.000 g 10 minutos se procedió de igual manera que con las muestras de cultivo celular, siempre respetando las proporciones de volúmenes de los reactivos empleados.

### *2.2.2 Síntesis de cDNAs.*

Antes de proceder a la síntesis de cDNAs, todas las muestras de RNA fueron tratadas con DNAsa I de Ambion® incubándose a 37°C durante 30 minutos en buffer específico de DNAsa I (incluido en el kit) con la enzima en las proporciones indicadas por el fabricante y con el fin de eliminar posibles contaminaciones de DNA genómico. Terminado el tratamiento con DNAsa se utilizó el Reactivo Removedor de DNAsa suministrado, incorporándolo con pipeteo vigoroso sin hacer espuma, para precipitar la enzima y obtener el RNA libre de DNA en el sobrenadante tras centrifugación durante un minuto a 10.000 g y RT.

Se utilizaron entre 500 y 750 ng de RNA total para obtener los cDNAs mediante una reacción de transcripción inversa (RT+) con la enzima MuLvRT (concentración final 5000 u/ml) en presencia de inhibidores de RNAsa (20 u/ml), hexadesoxinucleótidos de secuencia aleatoria (*random hexamers*) (50 mM), buffer de PCR (10X), MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y mezcla de dNTPs (10 mM). El protocolo seguido incluye un período de activación de la enzima e hibridación de 10 minutos a 25 °C, seguido de una fase de transcripción inversa de 60 minutos a 42 °C y finalmente un periodo de inactivación de la polimerasa de 5 minutos a 99°C (Figura 6). Los reactivos empleados son de Applied Biosystems™. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene® RG3000 de Corbett Research™.





**Figura 6. Programa ejecutado en el termociclador durante la síntesis de cDNAs.** Se detallan la duración de las fases y condiciones de temperatura programadas.

En paralelo se llevó a cabo un control de contaminación por DNA genómico mediante una reacción de transcripción inversa simulada (RT-) en la que la enzima MuLvRT y los inhibidores de RNAsa no se añadieron a la mezcla. La consiguiente qPCR de estas muestras permite descartar la presencia de DNA genómico en las muestras analizadas, lo que es importante en el caso de genes cuyos cebadores se encuentran en el mismo intrón como es el caso del gen del canal Kv1.3.

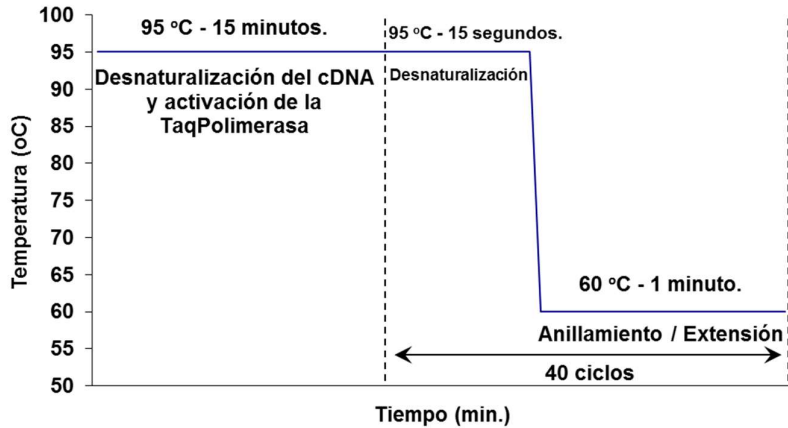
### 2.2.2 PCR cuantitativa.

El cDNA obtenido fue utilizado para realizar amplificaciones a tiempo real de los genes seleccionados en un termociclador Rotor-Gene® RG3000 de Corbett Research™.

Se denomina PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real a una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite monitorizar a tiempo real la amplificación del DNA diana, mediante la lectura de fluorescencia en cada ciclo de la reacción (Figura 7). Esto va a permitir cuantificar de expresión del mRNA de los genes diana.

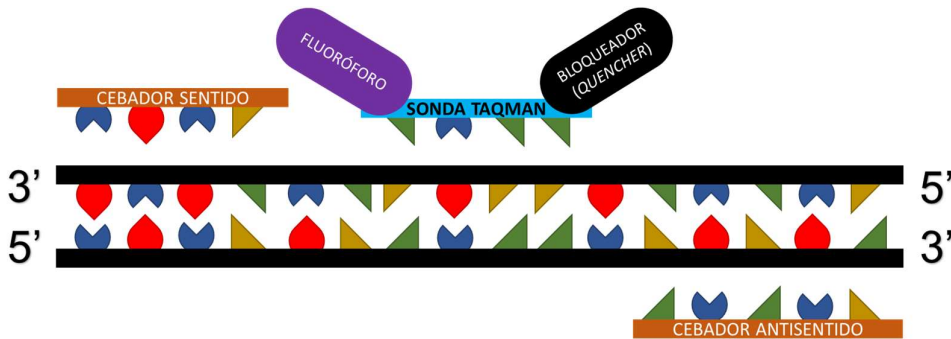
Para la qPCR se requiere: un molde de DNA, al menos un par de cebadores (*primers*) con secuencias específicas (sentido y antisentido), dNTPs, un buffer de reacción determinado, y una DNA polimerasa termoestable. Además, a la reacción se le añade un fluoróforo que permite, con un termociclador que mide fluorescencia, obtener la tasa de generación de un producto específico. También se denomina PCR en tiempo real porque dicha medición se realiza al finalizar cada ciclo de amplificación. Cuanto mayor sea el número de copias del cDNA específico de partida más rápido se alcanzará el máximo de fluorescencia emitida.

## Materiales y métodos.



**Figura 7. Programa ejecutado por el termociclador durante la qPCR.** Se detallan la duración de las fases y condiciones de temperatura programadas.

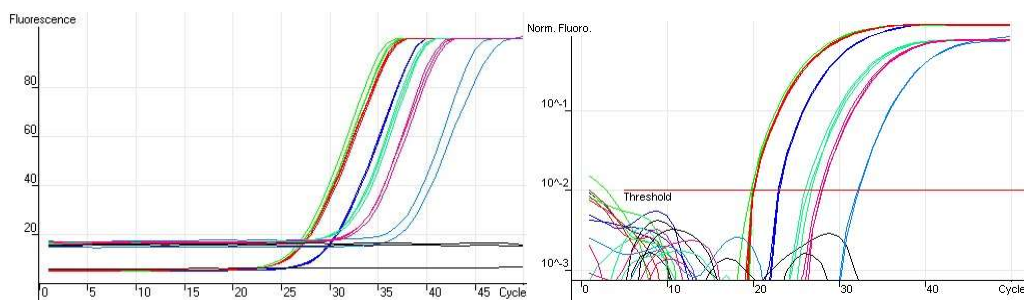
En este trabajo se han empleado ensayos TaqMan® que contienen además de los dos cebadores, una sonda de DNA con secuencia complementaria a la zona central de una de las hebras del DNA que aumenta la especificidad de la reacción (Figura 8).



**Figura 8. Cebadores y sonda del ensayo TaqMan.** Estas sondas se encuentran modificadas en ambos extremos presentan un fluoróforo y una molécula llamada *quencher* que en la proximidad del primero, bloquea o inhibe la emisión de la fluorescencia. La DNA polimerasa, específica de este método, conocida como Taq-Polimerasa, al encontrar la sonda hibridada al DNA durante la amplificación, la hidroliza con su actividad exonucleasa 5'-3', lo que libera al fluoróforo y permite que éste emita fluorescencia, que va ser detectada por el termociclador.

Al representar un gráfico de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos de la reacción, el número de ciclos en el que la variación de la fluorescencia supera un umbral definido, se denomina **Ct** (*Cycle Threshold*) (Figura 9). Dicho valor es inversamente proporcional a las concentraciones de cDNA originales.

## Materiales y métodos.



**Figura 9. Ejemplos de gráficas de fluorescencia con respecto al tiempo obtenidas en qPCRs durante este estudio. Se muestra a la derecha la fluorescencia absoluta y a la izquierda la normalización en escala logarítmica. La línea roja en el gráfico normalizado, representa el umbral o threshold.**

La cuantificación de la expresión de mRNA se realizó mediante el método del  $\Delta\Delta Ct$  cuantificación o de cuantificación relativa (Livak & Schmittgen, 2001).

En nuestro caso se emplea como control endógeno el gen de la proteína ribosomal L18 (RPL18). La abundancia relativa se calcula a partir de  $2^{-\Delta Ct}$ , donde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ (gen problema)} - Ct \text{ (control endógeno (RPL18))}$$

Por otro lado, las diferencias de expresión relativa de un mismo gen entre las diferentes muestras se expresa como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , que indica el número de veces que cambia la expresión de un gen en una condición respecto a otra, donde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra problema)} - \Delta Ct \text{ (muestra calibradora)}$$

Para las comparaciones en este estudio, se designó como muestra calibradora en los experimentos en cultivos celulares a la de la condición de 5,5 mM de glucosa, mientras que en el caso de la comparación entre cultivo y tejido, se utilizó como calibrador el tejido.

A continuación se detallan los ensayos TaqMan empleados para estudiar los genes indicados.

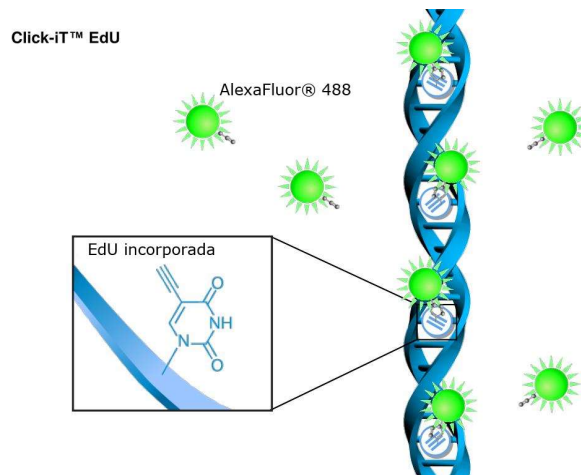
- hRPL18: Cebador Sentido: 5'-AACTGATGATGtGCGGGTTC-3  
Cebador Antisentido: 5'-CAGCTGGTTCGAAAGTGAGG-3'  
Sonda: 5'-FAM-CTGAAGGTATGTGCACTGCGCGTGA-BHQ1-3'
- hKCNA3 (Kv1.3): Hs00704943\_s1
- hSLC2A1 (GLUT1): Hs00892681\_m1
- hSLC2A4 (GLUT4): Hs00168966\_m1

### 2.3 Ensayos de proliferación celular.

Para medir la proliferación celular se determinó el porcentaje de células que incorporan 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU). La EdU es un análogo de la timidina y es utilizado en su lugar en la síntesis de DNA por células que se encuentran en la Fase S del ciclo celular y que por tanto se consideran en estado proliferativo. Dichas células son

## Materiales y métodos.

marcadas mediante una reacción rápida catalizada por cobre que conjuga un compuesto azida fluorescente con un grupo alcalino que presenta la EdU incorporada (reacción *click*), lo que permite sean identificables con un microscopio de fluorescencia (Figura 10). Además, todos los núcleos en la placa son marcados con otro fluoróforo indiscriminante, lo que permite contabilizar el total de células.



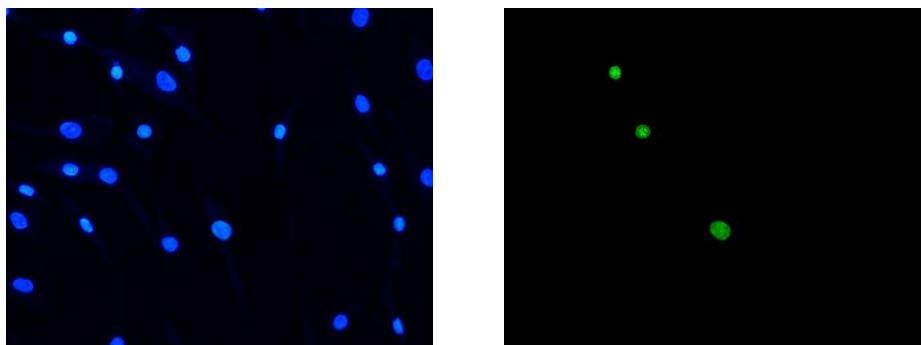
**Figura 10. Reacción Click.** Las células en estado proliferativo han incorporado la EdU a su material genético durante la fase S del ciclo celular por su analogía química y estructural con la timidina. Al añadir el azida AlexaFluor® 488, éste se une a la EdU incorporada, a través de un grupo alcalino que contiene dicha molécula. Este azida emite fluorescencia en el rango del color verde, lo que permitirá identificar los núcleos de estas células bajo un microscopio de fluorescencia.

Se utilizó el paquete comercial *Click-iT™ EdU Cell Proliferation Assay* de Invitrogen™, específicamente en este caso con el azida AlexaFluor® 488 (con fluorescencia de color verde) y para marcar el total de núcleos se utilizó Hoechst® 33342 (contratinción nuclear que penetra en la célula y cuando está unida al DNA emite fluorescencia de color azul), también de Invitrogen™.

Las células para ensayos de proliferación, se sembraron en cristales de poli-L-lisina y se sometieron al tratamiento descrito en el apartado 2.1. Una vez terminado el tratamiento, se incubaron las células en medio de cultivo con EdU 500 nM durante 6 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, se procedió a fijar las células con paraformaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) y luego de 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, se aplicó el compuesto azida según las instrucciones del fabricante para que se produjera la reacción *click*. Por último se incubaron las células con Hoechst® 33342 por 15 minutos a RT y en oscuridad y tras 6 lavados con PBS y uno con agua destilada y estando aún mojados, se aplicaron 4µl de Vectashield para montar y fijar los cristales a portaobjetos de microscopio.

Utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i, con el objetivo 10X, se capturaron imágenes a las longitudes de onda 495 nM (AlexaFluor® 488) y 350 nM (Hoechst® 33342) de al menos 10 campos en cada cristal (Figura 11). El conteo de las células proliferantes y el del total de células en las imágenes permitió calcular la fracción

de células proliferando y establecer comparaciones entre diferentes condiciones experimentales.



**Figura 11. Ejemplo de imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia en un ensayo de proliferación celular por incorporación de EdU.** A la **izquierda**, se observan en **azul** el total de núcleos marcados con Hoechst® 33342. A la **derecha**, se observan en **verde** los núcleos de las células en estado proliferativo. Estas últimas han incorporado, durante la fase S del ciclo celular la EdU, a su material genético y, mediante la reacción *click*, a la misma se ha unido el fluoróforo AlexaFluor® 488.

## **2.4 Procesamiento y análisis de la información.**

Se procesó la información utilizando el paquete ofimático Microsoft Office® para Windows® calculando estadísticos de tendencia central (media aritmética) y dispersión (desviación estándar, error típico) con Microsoft Excel®. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad® v.6. Los resultados fueron presentados en gráficos y tablas para su mejor comprensión. A lo largo del trabajo para comprobar la significación estadística de las diferencias encontradas, se utilizó la prueba t de Student para muestras no pareadas y se llevó a cabo un ANOVA cuando existían más de dos grupos experimentales. Se consideraron diferencias significativas (\*) cuando  $p < 0,05$  y no significativas (ns) cuando  $p \geq 0,05$ .

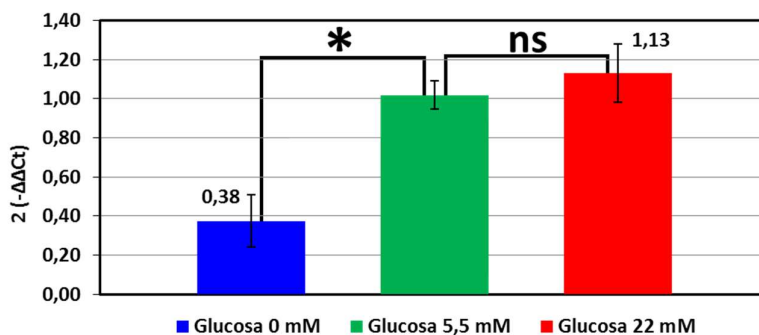
### 3. Resultados y análisis.

#### 3.1 Expresión a nivel de mRNA.

Para estudiar los cambios en la expresión de mRNA se empleó la técnica de PCR a tiempo real como se ha descrito en la sección de material y métodos.

##### 3.1.1 Canal Kv1.3

El cultivo de VSMC procedentes de arteria renal se mantuvo en ausencia de glucosa durante 4 horas antes de empezar el tratamiento de 24 horas con diferentes concentraciones de glucosa. El ayuno no pudo ser de más tiempo porque las células no soportaban ayunos más largos. En estas condiciones observamos que la expresión relativa del canal de potasio Kv1.3 se encontró significativamente menor en el grupo con 0 mM de glucosa en comparación con el control (5,5 mM de glucosa) mientras que el tratamiento con 22 mM no produjo cambios significativos en la expresión génica del canal (Figura 12).



**Figura 12. Expresión relativa del canal Kv1.3 a nivel de mRNA en las diferentes condiciones experimentales.** En todos los gráficos a lo largo del trabajo el color azul representa la condición de 0 mM de glucosa, el color verde la de 5,5 mM de glucosa y el rojo la de 22 mM de glucosa. A lo largo de todo el trabajo se representa con un asterisco (\*) la diferencia estadísticamente significativa con un valor  $p < 0,05$ .  $n=3$ .

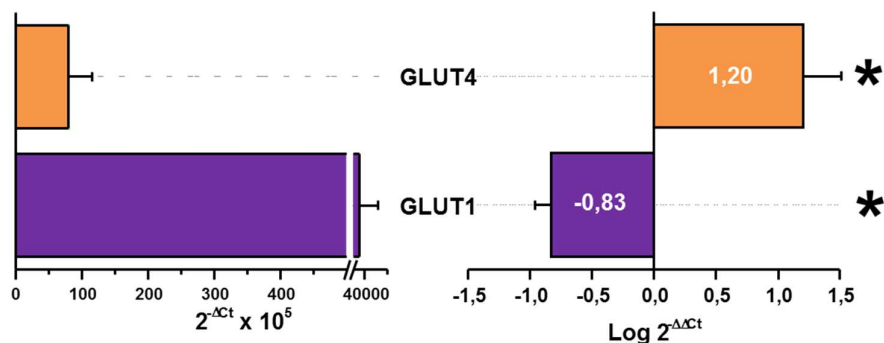
Este resultado apunta a que la privación de glucosa provoca disminución en la expresión de mRNA del canal Kv1.3 en las hVSCM renales en cultivo. Esto está en congruencia con investigaciones que han demostrado que la privación de glucosa puede disminuir las corrientes de potasio por Kv1.3 en otros tipos celulares (Cayabyab et al., 2000).

##### 3.1.2 Transportadores de glucosa.

Al evaluar el cambio en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 durante la modulación fenotípica mediante la comparación de tejidos con

## Resultados y análisis.

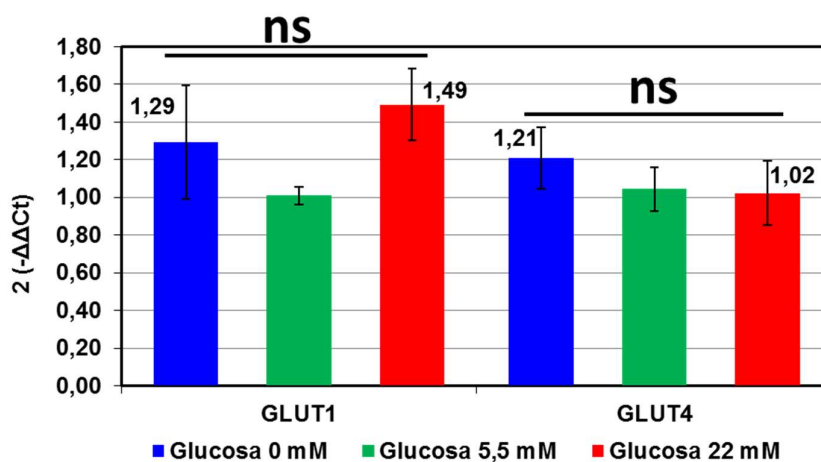
cultivos, hemos constatado que la expresión del GLUT1 disminuye muy significativamente, así como aumenta significativamente la expresión del GLUT4.



**Figura 13. Cambios en la expresión de los genes de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 a nivel de mRNA comparando cultivos celulares con muestras procesadas directamente de los tejidos de origen.** En el gráfico de la izquierda aparece la abundancia relativa de cada gen en las muestras de tejido. El gráfico de la derecha muestra la variación de la expresión relativa de ambos mRNAs al comparar los cultivos frente a los tejidos. n=3.

Esto podría sugerir que con el cambio fenotípico el transporte de glucosa en el cultivo es más dependiente de insulina u otros factores que activen la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Pero no se puede dejar de notar que aunque disminuye en el cultivo con relación al tejido, la abundancia del mRNA de GLUT1 siempre es mayor significativamente que la del GLUT4.

Cuando evaluamos la expresión de mRNA de estos transportadores en hVSMC sometidas a las tres condiciones experimentales de variación de los niveles extracelulares de glucosa, observamos que ambos casos no se producen diferencias significativas entre condiciones.



**Figura 10. Expresión relativa del gen - a nivel transcripcional en las diferentes condiciones experimentales.** n=3.

Estos resultados apuntan a que al menos, a nivel de transcripción de mRNA las variaciones de los niveles extracelulares de glucosa no afectan la expresión génica de los transportadores de GLUT1 y GLUT4 en las VSMC en su fenotipo proliferativo.

### 3.2 Ensayos de proliferación.

#### 3.2.1 Glucosa y proliferación celular de hVSMC.

Los ensayos de proliferación llevados a cabo con las células en las condiciones experimentales permitieron constatar los efectos de la glucosa aumentando la tasa de proliferación celular de las VSMC.

Esta diferencia fue significativa tanto al comparar la condición de 0 mM de glucosa con el control como éste con la condición de glucosa elevada (Figura

Estos resultados indican que el efecto reportado en la literatura en otros modelos celulares, también se observa en estas VSMC humanas y pudiera estar relacionado con la fisiopatología de las lesiones vasculares que se observan en la DM.

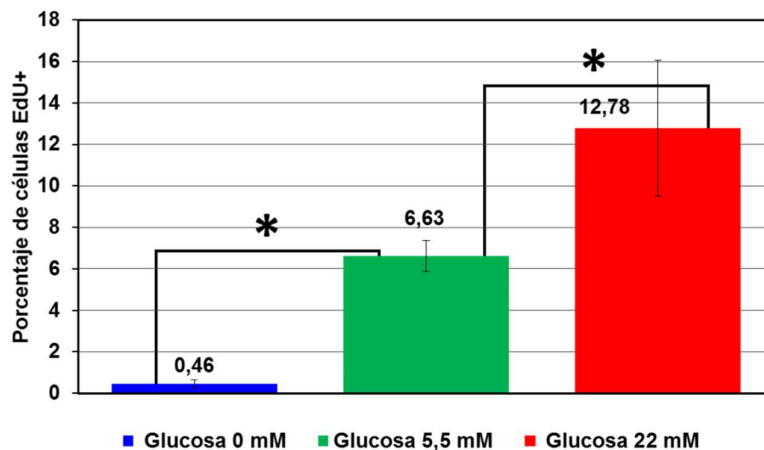


Figura 11. Diferencias en la tasa de proliferación celular expresado en porcentaje de células EdU+ entre las diferentes condiciones experimentales. n=2.

#### 3.2.1 Ensayos con inhibidor.

El uso del PAP-1 conjuntamente con las condiciones experimentales de concentración de glucosa normal y elevada, arrojó como resultado que este inhibidor provoca un efecto similar en ambas condiciones disminuyendo alrededor del 50% la tasa de proliferación, en ambos casos (Figura 12). Esto sugiere que el bloqueo del canal Kv1.3, inhibe la proliferación de las hVSMC renales independientemente de la modulación por la concentración de glucosa.



Resultados y análisis.

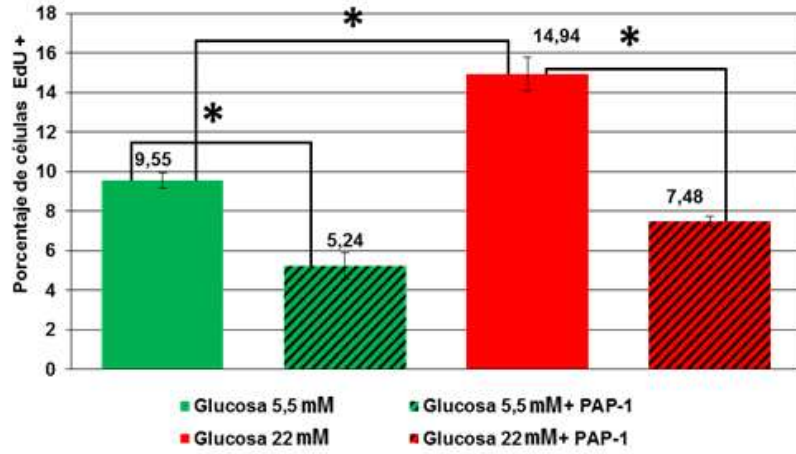


Figura 12. Tasa de proliferación celular de hVSMC renales en presencia o ausencia de PAP-1 y con concentraciones de glucosa normal y elevada. n=3

## **4. Conclusiones.**

Los resultados del presente trabajo sugieren que:

- En células musculares lisas de arteria renal humana con fenotipo proliferativo, una concentración extracelular fisiopatológica de glucosa (22 mM), no provoca un cambio significativo de la expresión transcripcional del gen codificante para el canal Kv1.3, ni de aquellos de los transportadores GLUT1 y GLUT4. Sin embargo, la privación de glucosa disminuye la expresión de Kv1.3, pero no la de ninguno de los dos transportadores estudiados.
- Existe una correlación positiva entre las concentraciones extracelulares de glucosa y la tasa de proliferación de células de músculo liso de la arteria renal en cultivo.
- El bloqueo del canal Kv1.3 produce un efecto de disminución de la proliferación celular similar en cultivos con glucosa normal y elevada; lo que sugiere que el efecto expuesto en la conclusión anterior, al menos en parte, se produce por una vía independiente de la participación de este canal.

### **4.1 Perspectivas futuras.**

- Continuar explorando los componentes mecanísticos de la regulación de la proliferación celular en VSMC por la glucosa elevada, con el objetivo de encontrar un sitio de intervención que pueda valer como objetivo terapéutico.
- Evaluar el efecto de la glucosa elevada a otros niveles como el estudio de la expresión de proteínas y de la translocación del GLUT4 a la membrana celular con concentraciones fisiopatológicas de glucosa.

## 5. Referencias bibliográficas.

- Bárány, M. (1996). *Biochemistry of smooth muscle contraction*, Academic Press.
- Brewer, P. D., Habtemichael, E. N., Romenskaia, I., Mastick, C. C. and Coster, A. C. F. (2014). "Insulin-regulated Glut4 translocation: Membrane protein trafficking with six distinctive steps." *Journal of Biological Chemistry* **289**(25): 17280-17298.
- Cayabyab, F. S., Khanna, R., Jones, O. T. and Schlichter, L. C. (2000). "Suppression of the rat microglia Kv1.3 current by src-family tyrosine kinases and oxygen/glucose deprivation." *European Journal of Neuroscience* **12**(6): 1949-1960.
- Ciudad, P., Jiménez-Pérez, L., García-Arribas, D., Miguel-Velado, E., Tajada, S., Ruiz-McDavitt, C., López-López, J. R. and Pérez-García, M. T. (2012). "Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(5): 1299-1307.
- Ciudad, P., Miguel-Velado, E., Ruiz-McDavitt, C., Alonso, E., Jiménez-Pérez, L., Asuaje, A., Carmona, Y., García-Arribas, D., López, J., Marroquín, Y., Fernández, M., Roqué, M., Pérez-García, M. T. and López-López, J. R. (2015). "Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **467**(8): 1711-1722.
- Ciudad, P., Moreno-Domínguez, A., Novensá, L., Roqué, M., Barquín, L., Heras, M., Pérez-García, M. T. and López-López, J. R. (2010). "Characterization of Ion Channels Involved in the Proliferative Response of Femoral Artery Smooth Muscle Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**(6): 1203.
- Colley, B., Tucker, K. and Fadool, D. A. (2004). "Comparison of Modulation of Kv1.3 Channel by Two Receptor Tyrosine Kinases in Olfactory Bulb Neurons of Rodents." *Receptors and Channels* **10**(1): 25-36.
- Gómez-Zorita, S. and Urdampilleta, A. (2015). "El GLUT4: efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2." *Avances en Diabetología* **31**(3): 19-26.
- Hien, T. T., Turczyńska, K. M., Dahan, D., Ekman, M., Grossi, M., Sjögren, J., Nilsson, J., Braun, T., Boettger, T., Garcia-Vaz, E., Stenkula, K., Swärd, K., Gomez, M. F. and Albinsson, S. (2016). "Elevated Glucose Levels Promote Contractile and Cytoskeletal Gene Expression in Vascular Smooth Muscle via Rho/Protein Kinase C and Actin Polymerization." *Journal of Biological Chemistry* **291**(7): 3552-3568.
- Kovach, C. P., Al Koborssy, D., Huang, Z., Chelette, B. M., Fadool, J. M. and Fadool, D. A. (2016). "Mitochondrial Ultrastructure and Glucose

Referencias bibliográficas.

Signaling Pathways Attributed to the Kv1.3 Ion Channel." *Frontiers in Physiology* **7**: 178.

- Li, Y., Wang, P., Xu, J. and Desir, G. V. (2006). "Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **290**(2): C345.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method." *Methods* **25**: 402-408.
- Marcuello, C., Calle-Pascual, A. L., Fuentes, M., Runkle, I., Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Carmena, R., Casamitjana, R., Castaño, L., Castell, C., Catalá, M., Delgado, E., Franch, J., Gaztambide, S., Girbés, J., Gomis, R., Gutiérrez, G., López-Alba, A., Martínez-Larrad, M. T., Menéndez, E., Mora-Peces, I., Ortega, E., Pascual-Manich, G., Rojo-Martínez, G., Serrano-Rios, M., Valdés, S., Vázquez, J. A. and Vendrell, J. (2012). "Evaluation of Health-Related Quality of Life according to Carbohydrate Metabolism Status: A Spanish Population-Based Study (Di@bet.es Study)." *International Journal of Endocrinology* **2012**: 6.
- Mathers, C. D. and Loncar, D. (2006). "Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030." *PLOS Medicine* **3**(11): e442.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." *Physiological Reviews* **75**(3): 487.
- Pardo, L. A. (2004). "Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation." *Physiology* **19**(5): 285.
- Schmitz, A., Sankaranarayanan, A., Azam, P., Schmidt-Lassen, K., Homerick, D., Hänsel, W. and 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**(5): 1254.
- Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castaño, L., Castell, C., Catalá, M., Delgado, E., Franch, J., Gaztambide, S., Girbés, J., Gomis, R., Gutiérrez, G., López-Alba, A., Martínez-Larrad, M. T., Menéndez, E., Mora-Peces, I., Ortega, E., Pascual-Manich, G., Rojo-Martínez, G., Serrano-Rios, M., Valdés, S., Vázquez, J. A. and Vendrell, J. (2012). "Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study." *Diabetologia* **55**(1): 88-93.
- Stöckli, J., Fazakerley, D. J. and James, D. E. (2012). "GLUT4 exocytosis." *Journal of Cell Science* **124**(24): 4147.
- Suzuki, L. A., Poot, M., Gerrity, R. G. and Bornfeldt, K. E. (2001). "Diabetes Accelerates Smooth Muscle Accumulation in Lesions of Atherosclerosis." *Diabetes* **50**(4): 851.
- Suzuki, M., Akimoto, K. and Hattori, Y. (2002). "Glucose upregulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in vascular smooth muscle cells." *Life Sciences* **72**(1): 59-66.

*Referencias bibliográficas.*

- Török, D., Patel, N., JeBailey, L., Thong, F. S. L., Randhawa, V. K., Klip, A. and Rudich, A. (2004). "Insulin but not PDGF relies on actin remodeling and on VAMP2 for GLUT4 translocation in myoblasts." *Journal of Cell Science* **117**(22): 5447.
- Tuomi, T., Santoro, N., Caprio, S., Cai, M., Weng, J. and Groop, L. (2014). "The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity." *The Lancet* **383**(9922): 1084-1094.
- Upadhyay, S. K., Eckel-Mahan, K. L., Mirbolooki, M. R., Tjong, I., Griffey, S. M., Schmunk, G., Koehne, A., Halbout, B., Iadonato, S., Pedersen, B., Borrelli, E., Wang, P. H., Mukherjee, J., Sassone-Corsi, P. and Chandy, K. G. (2013). "Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(24): E2239-2248.
- Vaulont, S., Vasseur-Cognet, M. and Kahn, A. (2000). "Glucose Regulation of Gene Transcription." *Journal of Biological Chemistry* **275**(41): 31555-31558.
- Xu, J., Wang, P., Li, Y., Li, G., Kaczmarek, L. K., Wu, Y., Koni, P. A., Flavell, R. A. and Desir, G. V. (2004). "The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(9): 3112-3117.
- Zhao, Y., Biswas, S. K., McNulty, P. H., Kozak, M., Jun, J. Y. and Segar, L. (2011). "PDGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation is associated with dysregulation of insulin receptor substrates." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **300**(6): C1375-C1385.