



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina



Estudio del papel del canal Kv1.3 en la transformación de macrófagos en células espumosas

AUTORA: PAULA VIDALES MIGUÉLEZ

TUTORAS: PILAR CIDAD VELASCO, M^a TERESA PÉREZ-GARCÍA

Índice

Resumen	3
Abreviaturas.....	4
Introducción.....	5
Sistema cardiovascular: estructura de los vasos sanguíneos	5
Aterosclerosis	5
Macrófagos y células espumosas	7
Canal de potasio Kv1.3	8
Kv1.3 en macrófagos.....	9
Hipótesis y objetivos.....	10
Material y Métodos	11
Obtención de macrófagos y diferenciación a células espumosas	11
Tinción con Oil Red O (ORO)	12
Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa	12
Extracción de RNA.....	13
Síntesis de cDNA	13
PCR cuantitativa.....	13
Análisis estadístico de resultados	14
Resultados	15
Diferenciación de macrófagos a células espumosas	15
Efecto del canal Kv1.3 en la formación de células espumosas	15
Formación de células espumosas en un modelo de ratón KO para Kv1.3.....	15
Efecto del canal Kv1.3 en la formación de células espumosas en ratones BPH.....	17
Efecto de la diferenciación de macrófagos a FC en la expresión de Kv1.3	18
Discusión y líneas futuras	19
Líneas futuras	20
Conclusiones.....	21
Agradecimientos	21
Bibliografía.....	22

Resumen

Objetivo. La lesión básica de la aterosclerosis es la placa de ateroma y en su formación es central la disregulación del metabolismo del colesterol en macrófagos que hace que se transformen en células espumosas. Los macrófagos expresan el canal de potasio Kv1.3, entre cuyas funciones se encuentran la activación y proliferación celular. Nuestra hipótesis es que el canal Kv1.3 también interviene en el metabolismo del colesterol en macrófagos y en su transformación en células espumosas.

Materiales y métodos. Se estudió el papel del Kv1.3 en la formación de células espumosas obtenidas de macrófagos derivados de células madre hematopoyéticas tratados con LDL nativa y LDL oxidada. Se utilizaron dos modelos: un modelo procedente de ratones WT y KO para el canal y otro modelo procedente de ratones BPH en ausencia o presencia del inhibidor PAP-1. Las células espumosas se caracterizaron mediante microscopía óptica y espectrofotometría y la expresión del canal Kv1.3 se comprobó mediante PCR cuantitativa.

Conclusiones. Nuestros resultados no muestran diferencias en la formación de células espumosas en presencia o ausencia del canal Kv1.3. La expresión de Kv1.3 disminuye en presencia de LDL oxidado, pero la función del canal Kv1.3 no parece ser relevante en la formación de células espumosas.

Palabras clave: Macrófagos, células espumosas, Kv1.3

Abreviaturas

EC: Células endoteliales (*Endothelial Cells*)

VSMCs: Células de músculo liso vascular (*Vascular Smooth Muscle Cells*)

ROS: Radicales libres de oxígeno

LDL: lipoproteína de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*)

oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada

FC: Células espumosas (*Foam Cells*)

MMP: Metaloproteinasas

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea (*Bone Marrow Derived Macrophages*)

Cepa BPH: cepa de ratones con presión arterial elevada (*Blood Pressure High*)

nLDL: lipoproteína de baja densidad nativa

Tinción ORO: Tinción *Oil Red O*

Introducción

Sistema cardiovascular: estructura de los vasos sanguíneos

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y una red de vasos sanguíneos (arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas) que se encarga de transportar sangre oxigenada y nutrientes a los tejidos y de recoger los productos de deshecho a todo el organismo. Las paredes de los vasos sanguíneos se componen de tres capas concéntricas, de dentro hacia fuera: íntima, media o muscular y adventicia representadas en la **Figura 1** (1).

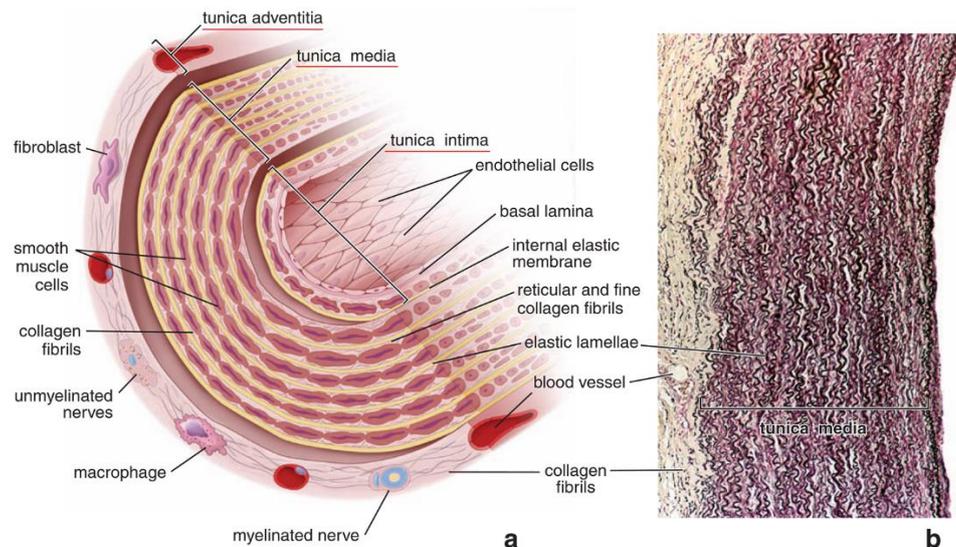


Figura 1. A. Estructura de la pared de los vasos sanguíneos. **B.** Microfotografía del corte de una arteria teñida con resorcina-fucsina de Weigert (1).

- La túnica íntima consta de una única capa de células endoteliales (EC). Está separada de la media por la lámina elástica interna.
- La túnica media está constituida por las células de músculo liso (VSMCs) que se distribuyen en varias capas organizadas en las arterias. En función de la proporción de elastina y VSMCs se distinguen arterias elásticas y musculares.
- La túnica adventicia es la capa más externa, delimitada por la lámina elástica externa. Se compone de tejido conjuntivo que alberga fibras nerviosas y *vasa vasorum* que inervan y nutren a los propios vasos sanguíneos.

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad vascular inflamatoria crónica que se define como el engrosamiento de la pared arterial debido a la formación de placas de ateroma en la íntima de arterias de mediano y gran calibre. La placa de ateroma es una lesión con un núcleo lipídico compuesto principalmente por colesterol con una cubierta fibrosa y células inflamatorias. Esta placa puede crecer hasta obstruir la luz arterial, impidiendo el flujo y ocasionando hipoxia tisular, o romperse, causando una trombosis vascular obstructiva. Se produce por un desequilibrio en

el metabolismo lipídico y la inadecuada respuesta del sistema inmune a la acumulación de lipoproteínas en las arterias (2).

La aterosclerosis es la principal causa de morbimortalidad en el mundo occidental, ya que sobre ella asienta la patogenia de la enfermedad coronaria, cerebral y vascular periférica. Sus principales factores de riesgo son la edad, la genética, la obesidad, la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, el tabaquismo y la diabetes mellitus (3). El proceso de aterosclerosis se puede dividir en tres fases (**Figura 2**) (4,5):

1. Inicio: La presión intraluminal o las fuerzas de cizallamiento, especialmente en zonas de flujo turbulento pueden modular, estructura y función del endotelio alterando sus propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias y antitrombogénicas (6). Su disfunción se debe fundamentalmente a la producción de radicales libres (ROS), que activan vías de inflamación en las ECs aumentando su permeabilidad y conducen a su apoptosis

El aumento de permeabilidad endotelial facilita el paso de la LDL circulante en sangre al espacio subendotelial, donde se transforma en LDL oxidada (oxLDL) (6). Los proteoglicanos secretados por las VSMCs retienen a la oxLDL en la íntima. La liberación de quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión por parte de las ECs atraen a los monocitos circulantes, que en el espacio subendotelial se convierten en macrófagos y fagocitan la oxLDL transformándose en células espumosas (FC, *Foam cells*).

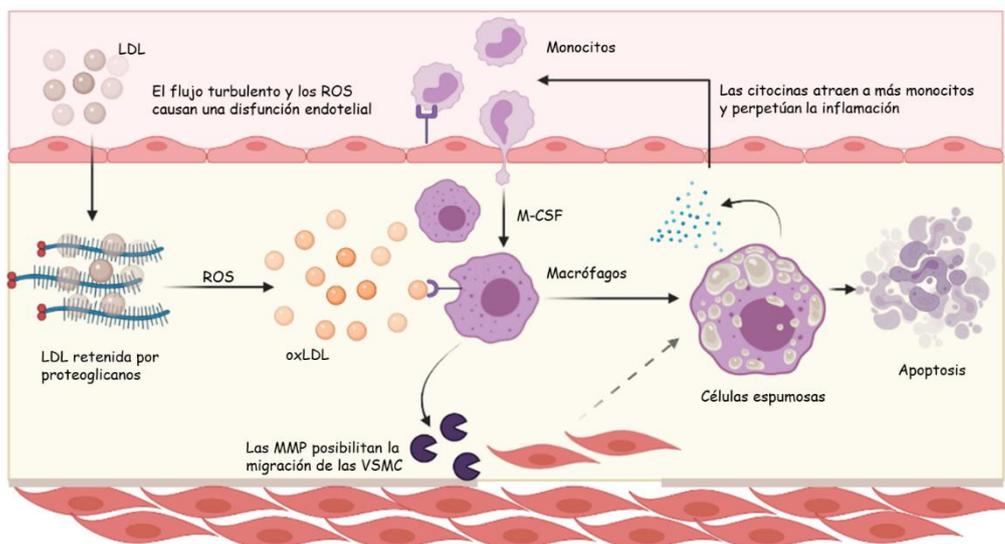


Figura 2. Proceso de aterosclerosis. Las LDL atraviesan el endotelio y son retenidas en el subendotelio, donde se oxidan e inician un proceso inflamatorio. Los monocitos ingresan en la íntima y se transforman en macrófagos que facilitan la migración de las VSMCs y fagocitan oxLDL transformándose en células espumosas. El acúmulo de oxLDL y el ambiente inflamatorio desemboca en la muerte celular.

2. Progresión: Los macrófagos producen metaloproteinasas (MMP) que degradan la lámina elástica interna y factores de crecimiento que estimulan la migración y proliferación de VSMCs a la íntima. Las VSMCs producen matriz extracelular, rica en colágeno que aporta estabilidad

a la placa de ateroma, pero también atrapa a los macrófagos y a la oxLDL (4). Como consecuencia, se produce un engrosamiento de la pared arterial y una estenosis de la luz vascular. Por otro lado, algunas VSMCs también fagocitan oxLDL influenciadas por la presencia de determinadas citocinas ambientales convirtiéndose en FC (5).

El medio inflamatorio y la oxLDL con los que interaccionan las FC desencadenan su muerte por apoptosis, formándose el núcleo necrótico de la placa (5). La eferocitosis de los restos apoptóticos por parte de los macrófagos se vuelve defectuosa, de modo que se acumulan en el espacio subendotelial, contribuyendo a la inflamación (7).

3. Rotura de la placa: La estabilidad de la placa de ateroma depende de la proporción en la que se encuentren los diferentes tipos celulares que la conforman. Una placa en la que abundan los macrófagos y los linfocitos es una placa vulnerable, ya que la producción de MMP adelgaza la capa fibrótica pudiendo llegar a romperla. Al contrario, una placa rica en VSMCs productoras de matriz extracelular es una placa estable (4). Otros factores importantes en la disrupción de la capa fibrosa son el aumento de la apoptosis, el crecimiento del núcleo necrótico y el flujo turbulento.

Macrófagos y células espumosas

Los macrófagos desempeñan un papel importante en la regulación de los niveles de colesterol en sangre y su metabolismo puede dividirse en tres pasos (**Figura 3**) (7,8):

- **Incorporación de LDL modificada:** Existen receptores denominados receptores basura o *scavenger receptors* (SR) que se encargan de la unión e internalización en la célula de las moléculas de LDL modificadas, especialmente de la oxLDL. Los más importantes son SR-A1, CD36 y LOX-1. El exceso de oxLDL favorece el incremento de su expresión (5). LOX-1 es el receptor más pro-aterogénico y no está presente en monocitos circulantes en sangre, pero sí en macrófagos (8). La oxLDL puede incorporarse a las células por otras vías, como la vía TLR-4, relacionada con la inmunidad innata (9).
- **Esterificación del colesterol:** Las LDL son hidrolizadas en colesterol libre y ácidos grasos. La enzima acetil-CoA acetiltransferasa (ACAT1) transforma el colesterol libre en ésteres de colesterol que se almacenan en el retículo endoplasmático en forma de gotas lipídicas. La colesterol éster hidrolasa neutra (NCEH) cataliza la reacción inversa, de ésteres de colesterol a colesterol libre.
- **Salida de colesterol:** El transporte reverso de colesterol al exterior de la célula tiene lugar a través de receptores de membrana ABCA1, ABCG2 y SR-B1 que transfieren el colesterol a la apolipoproteína A1 o a la HDL previniendo la excesiva acumulación de ésteres de colesterol en el citoplasma. Otro mecanismo de transporte es la difusión pasiva. Algunas moléculas inflamatorias pueden bloquear el transporte reverso de colesterol favoreciendo la carga de colesterol de los macrófagos (4).

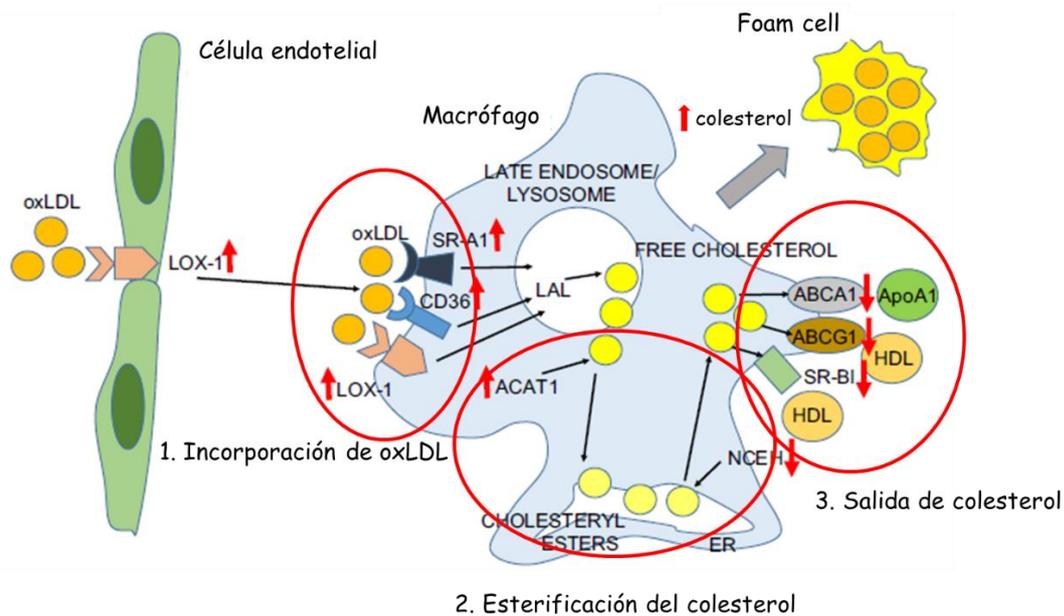


Figura 3. Metabolismo del colesterol en macrófagos y receptores y enzimas implicados (8).

La alteración de la homeostasis del colesterol a favor de la captación y acúmulo de ésteres de colesterol en el citoplasma intracelular conduce a la transformación de los macrófagos en FC. (8). Los macrófagos son las células principales de las que derivan las FC, aunque se han descrito FC procedentes de otras células como las VSMCs o las células endoteliales (10). Ambas expresan receptores para la captación de oxLDL como LOX-1 que también contribuyen al aumento de la expresión de moléculas de adhesión y la apoptosis en ECs o al aumento de la proliferación y la apoptosis en VSMCs (11).

Canal de potasio Kv1.3

Kv1.3 es un canal de potasio dependiente de voltaje que se ha descrito en células del sistema inmune, del sistema nervioso y en células de músculo liso vascular. El canal funcional es un tetrámero de subunidades alfa, cada una de ellas formada por seis hélices transmembrana (S1-S6). El poro está formado por los dominios S5-S6 y el sensor de voltaje encargado de detectar el potencial de membrana, por los dominios S1-S4 (**Figura 4**). La despolarización de la membrana induce un cambio conformacional en S4 que provoca que se abra el poro. Los extremos NH₂ y COOH terminales son citoplasmáticos y pueden unirse a otras proteínas y participar en cascadas de señalización (12).

Los canales de K⁺ están implicados en la proliferación de células normales y cancerosas debido a que contribuyen al potencial de membrana de reposo de las células. Los primeros trabajos que relacionan la proliferación celular con los canales de K⁺ se desarrollaron en linfocitos T. En estas células existen canales Kv1.3 y canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (KCa3.1) cuya activación conlleva una hiperpolarización de la membrana y un aumento de las corrientes de Ca²⁺ (12). El aumento de Ca²⁺ intracelular, en último término, conduce a la proliferación celular

por la vía de la IL-2. También se ha descrito el papel del canal Kv1.3 en la proliferación de linfocitos B y NK, macrófagos, oligodendrocitos, células de la microglía y VSMCs (12,13).

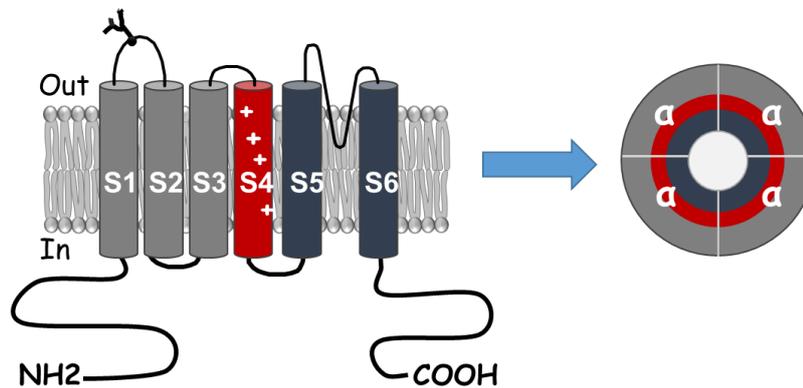


Figura 4. Estructura del canal Kv1.3.

En VSMCs, el canal Kv1.3 está implicado en la modulación fenotípica, proceso por el que las VSMCs son capaces de pasar de un estado quiescente y contráctil a uno migratorio y proliferativo en respuesta a distintos factores, y la capacidad del canal Kv1.3 de sensar los cambios de voltaje de la membrana de las VSMCs es un elemento fundamental en esa transición (14).

Kv1.3 en macrófagos

En macrófagos, los canales de K^+ se han relacionado con la fagocitosis, la producción de citocinas, migración, proliferación y apoptosis. Se han identificado corrientes de K^+ hacia fuera retardadas vehiculadas por el canal Kv1.3 y rectificadoras hacia dentro, mediadas por el canal Kir2.1 (13). El equilibrio entre estas corrientes determina el potencial de reposo de los macrófagos y tiene un papel importante en su activación y proliferación. Al igual que en linfocitos, la proliferación parece relacionarse con el aumento del Ca^{2+} intracelular (15). La presencia de sustancias que bloquean los canales Kv1.3 como la margatoxina en el medio extracelular detiene el crecimiento de los macrófagos, inhibiendo su activación (13).

Kv1.3 también se expresa en FC donde se ha descrito su participación en la regulación de la expresión de *scavenger receptors*. Se ha descrito que su inhibición disminuye la expresión de SR-A1, LOX-1 y ACAT-1 y, de esta forma, reduce la captación y acúmulo de ésteres de colesterol intracelulares (16). Por otro lado, el aumento de la corriente de Kv1.3 conlleva una disminución de K^+ intracelular, que constituye una señal para el comienzo de la apoptosis (13).

Hipótesis y objetivos

Los macrófagos tienen un papel fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis y está descrito que expresan de forma abundante el canal de potasio Kv1.3. Este canal regula diferentes funciones en macrófagos como la fagocitosis, la proliferación y la apoptosis y además se expresa en otras células también presentes en la placa de ateroma como las VSMCs, donde su función es esencial para la proliferación y migración. Sin embargo, el papel de este canal en el metabolismo lipídico y la formación de células espumosas a partir de macrófagos no está bien definido.

La hipótesis que planteamos en este trabajo es que **el canal Kv1.3 presente en macrófagos participa en el proceso de aterogénesis contribuyendo a la modulación del metabolismo del colesterol y a la formación de células espumosas.**

Por tanto, el objetivo global de este trabajo ha sido estudiar si el canal Kv1.3 desempeña una función en la formación de FC a partir de macrófagos tratados con lipoproteína oxidada.

Los objetivos específicos han sido:

1. **Obtener macrófagos** a partir de progenitores hematopoyéticos procedentes de la médula ósea de cepas de ratones WT y KO para Kv1.3 y BPH.
2. **Obtener células espumosas** a partir de macrófagos y caracterizarlos por microscopía y espectrofotometría.
3. **Analizar** si el canal Kv1.3 participa en la transformación de macrófagos en células espumosas.
4. Estudiar la **expresión del canal Kv1.3** mediante técnicas moleculares en el proceso de formación de las células espumosas.

Material y Métodos

Obtención de macrófagos y diferenciación a células espumosas

Para realizar este trabajo hemos utilizado macrófagos derivados de médula ósea (BMDM, *Bone Marrow Derived Macrophages*) que se han obtenido a partir de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea (MO) de ratón. Se utilizaron ratones WT y KO para el canal Kv1.3 y la cepa BPH (*Blood Pressure High*).

El sacrificio se realizó con isofluorano y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo respetando la reglamentación del Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid.

Se extrajo el fémur y la tibia de los animales, se separaron las epífisis de ambos huesos proximales a la rodilla y se introdujeron en tubos con 100 μ L de medio de cultivo RPMI con 10% de suero fetal bovino (FBS). La MO se extrajo mediante centrifugación a 3.000 x g durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro en medio RPMI con 10% FBS, 1% antibióticos (estreptomicina, penicilina y fungizona), 1% L-glutamina y sobrenadante de la línea celular L-929. La línea celular L-929 secreta el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) que induce la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos a macrófagos.

Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con elevada humedad y 5% de CO₂, cambiándose el medio los días 5 y 7. El día 8 se cambió el medio de cultivo por uno sin L-929 durante 1 día. La cronología del procedimiento se detalla en la **Figura 5**.

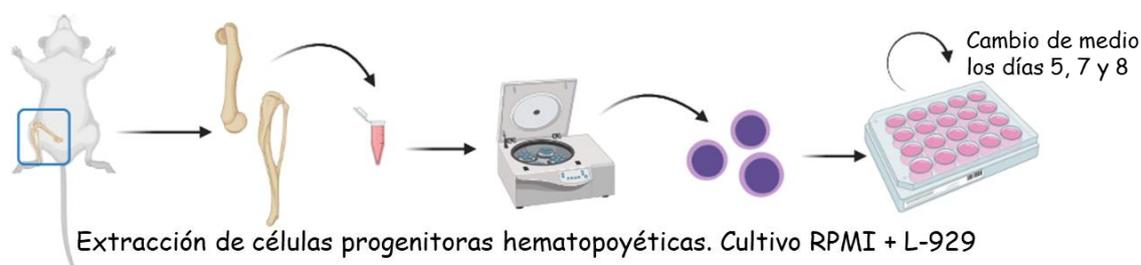


Figura 5. Obtención de macrófagos a partir de células progenitoras hematopoyéticas.

Las células espumosas se obtuvieron a partir de macrófagos tratados con LDL oxidada (oxLDL). La oxLDL se obtuvo a partir de LDL nativa (nLDL) comercial que se oxidó con CuSO₄.

Los macrófagos se trataron con nLDL y oxLDL en medio RPMI a una concentración de 50 μ g/mL y se incubaron a 37°C durante 24 o 48h. Como condición control se utilizó el medio RPMI. Cuando fue requerido se añadió el bloqueante de Kv1.3, PAP-1, a la concentración 100 nM.

Tinción con Oil Red O (ORO)

La identificación de células espumosas se realizó mediante la tinción de Oil Red O (ORO). Esta tinción se emplea para visualizar la acumulación de lípidos neutros (como triacilglicéridos y ésteres de colesterol) en el citoplasma de las células.

La solución madre del reactivo se preparó disolviendo 0.7 g de ORO (Sigma O0625) en 200 ml de isopropanol puro, se mantuvo en agitación toda la noche a temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro. Puede conservarse a 4 °C durante un año. La solución de trabajo se preparó a partir de la solución madre en una proporción 6:4 (ORO: diH₂O), se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente y se filtra con filtro de 0,2 µm. La solución de trabajo es estable durante 2 horas.

Las células se fijaron con formaldehído 4% durante 15 minutos y se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino 1X (PBS) y un lavado con isopropanol al 60%, tras el que se dejan secar las células durante 10 minutos. Posteriormente, las células se tiñeron con la solución ORO de trabajo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la tinción y se realizaron 4 lavados con diH₂O.

Terminada la tinción las células se observaron con un microscopio óptico y se tomaron fotos a 20 y 40 aumentos de cada una de las condiciones (**Figura 6**).

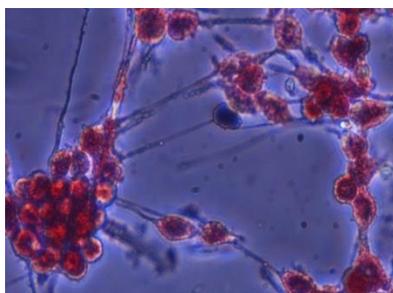
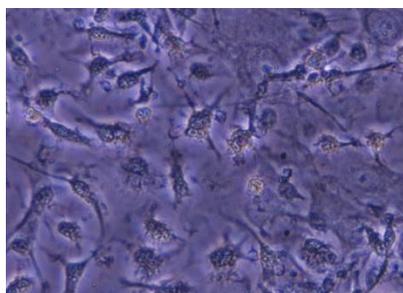


Figura 6. Imágenes de macrófagos teñidos con ORO en condiciones control (izquierda) y tras el tratamiento con oxLDL (derecha). Los acúmulos lipídicos se observan en un color rojo brillante.

Este colorante nos permite también cuantificar la acumulación de lípidos en las células mediante espectrofotometría, haciendo medidas de absorbancia a 510 nm de longitud de onda.

Para llevar a cabo esta determinación se retiró el H₂O, se dejaron secar las células y se añadió isopropanol 100% durante 10 min. para extraer el colorante. Se recogió el isopropanol y se midió la absorbancia en un lector de placas VersaMax. Se utilizó como blanco isopropanol 100%.

Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

Esta determinación requiere la realización de varios pasos consecutivos que se detallan a continuación.

Extracción de RNA

Se añadieron 500 mL del reactivo Trizol a las células para lisar la membrana celular, y se procedió a la separación del RNA del DNA y las proteínas añadiendo 100 μ L de cloroformo y centrifugando las muestras. Se recogió la fase superior acuosa donde se encuentra el RNA, para su precipitación se añadieron 250 μ L de isopropanol 100% y se centrifugaron las muestras. Se descartó el sobrenadante, dejando el pellet de RNA. Se añadió etanol al 75%, se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. El RNA se resuspendió en agua libre de RNAsas y se incubó a 60°C durante 5 minutos.

La concentración del RNA se midió a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop. Para comprobar la pureza del RNA se tuvo en cuenta que el ratio de absorbancias 260/280 fuera entre 1.8-2.

Síntesis de cDNA

Se realizó un tratamiento con DNAsa, para eliminar posibles restos de DNA. Se incubó la muestra de RNA con la enzima en el termociclador a 37°C durante 30 minutos. La DNAsa se retiró con un reactivo de eliminación de DNAsa (DRR, *DNAsa Removal Reagent*) a un 10% del volumen de la reacción. Se centrifugaron las muestras y se recogió el sobrenadante.

El cDNA se sintetizó a partir de las muestras de RNA utilizando buffer 5X, dNTPs 10 mM, inhibidor de RNAsa 20 U/ μ L, random hexámeros 50 μ M y la enzima retrotranscriptasa M-MLV 200 U/ μ L. El programa que se utilizó fue: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 40°C y 15 minutos a 70°C.

PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa o en tiempo real permite amplificar y cuantificar la cantidad inicial de un fragmento diana de DNA.

Se llevaron a cabo PCRs cuantitativas con SybrGreen en las que se estudió la presencia de RPL18 como control endógeno, de Kv1.3 y CD36.

El SybrGreen es un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une al DNA de doble cadena y permite monitorizar el avance de la reacción de PCR en cada ciclo. Para la PCR con SybrGreen se utilizó una MasterMix que contiene la enzima DNA polimerasa, el colorante SybrGreen, los nucleótidos y el buffer de trabajo, además de los *primers forward* y *reverse* de cada gen que se amplificó. Como el SybrGreen se une a cualquier DNA de doble cadena para comprobar la especificidad de la reacción, tras los ciclos de amplificación, se realiza una curva de *melting* o disociación, para descartar que se hayan amplificado fragmentos no deseados. En la **Figura 7** se detalla el programa de PCR.

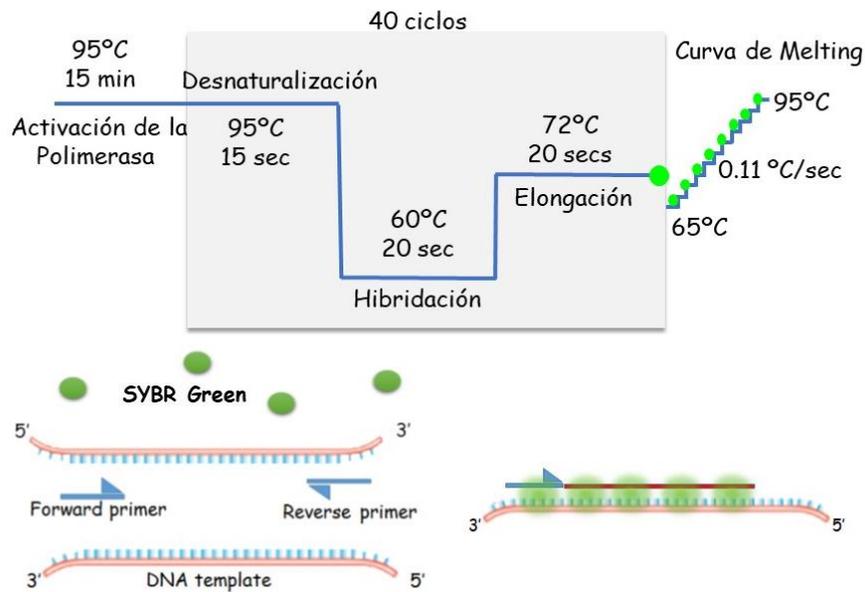


Figura 7. Esquema del protocolo de PCR cuantitativa con SybrGreen.

Se calcularon los cambios en la expresión del RNA según el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$ (18). El RNA endógeno L18 se utilizó como estándar frente al que se normalizó la expresión de los RNA estudiados. La abundancia relativa se representa como el valor $2^{-\Delta Ct}$ donde

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ problema} - Ct_{L18}$$

Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico se realizó con los paquetes de software R y Microsoft Excel. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. Para comprobar si existían diferencias entre 3 o más grupos se utilizó el test de análisis de la varianza (ANOVA), seguido de un test de Tukey. Para comparar las diferencias entre 2 grupos se utilizó el test T-Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Diferenciación de macrófagos a células espumosas

La primera etapa de este trabajo ha sido conseguir células espumosas a partir de BMDM. Para ello tratamos los macrófagos con oxLDL siguiendo protocolos previamente descritos (9). Los macrófagos fueron incubados en las siguientes condiciones: medio control RPMI, 50 µg/mL de LDL nativa o 50 µg/mL de oxLDL durante 24 horas.

Para demostrar la diferenciación de los macrófagos a FCs teñimos las células con tinción ORO siguiendo el protocolo previamente descrito. La observación mediante microscopía óptica muestra como el tratamiento con oxLDL provoca una **evidente acumulación de lípidos** que se marcan en color rojo con esta tinción, que no se observa en la situación control y se observa de forma ligera y aislada en con la nLDL (**Figura 8**).

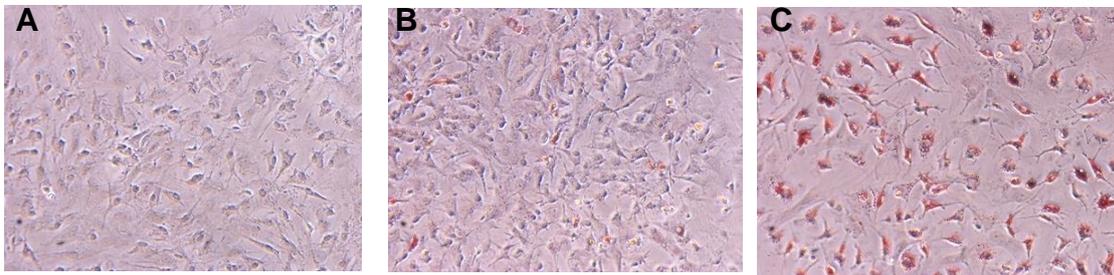


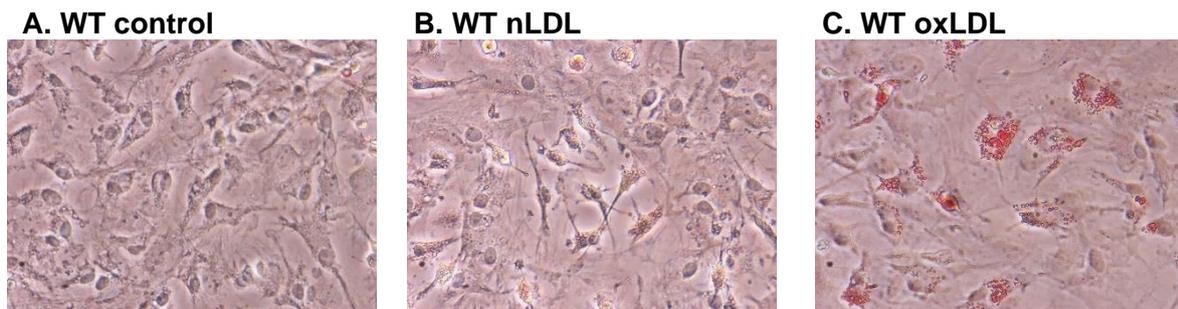
Figura 8. Macrófagos tratados con medio control (A), 50 µg/mL nLDL (B) y 50 µg/mL oxLDL (C) teñidos con Oil Red Oil. Imágenes tomadas con objetivo 20X.

Efecto del canal Kv1.3 en la formación de células espumosas

Formación de células espumosas en un modelo de ratón KO para Kv1.3

Para comprobar el efecto del canal Kv1.3 en la formación de FC utilizamos en primer lugar macrófagos procedentes de ratones WT y KO para el canal Kv1.3.

Los macrófagos de ambos tipos de ratones fueron tratados con medio control, nLDL y oxLDL ambas a 50 µg/mL, durante 24h y comparamos sus efectos con la tinción ORO. Las imágenes obtenidas con microscopía muestran un mayor acúmulo de lípidos en las células tratadas con oxLDL pero **no se pueden apreciar diferencias** en el marcaje de las células procedentes del ratón WT y el ratón KO (**Figura 9**).



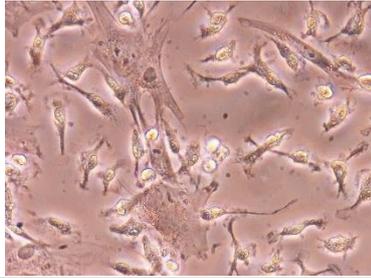
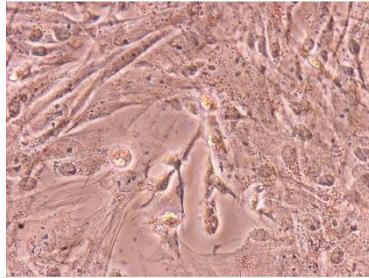
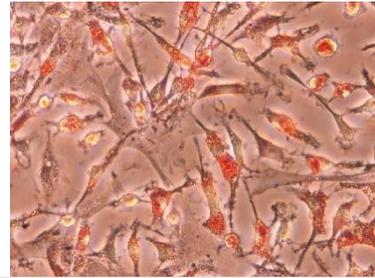
D. KO control**E. KO nLDL****F. KO oxLDL**

Figura 9. Imágenes de macrófagos procedentes de ratones WT (arriba) y KO (abajo) tratados con medio control, nLDL y oxLDL. Imágenes tomadas con objetivo 40X.

Como blanco para las medidas de espectrofotometría se usó isopropanol al 100%. Observamos que, de acuerdo con los observado mediante microscopía, las **células tratadas con oxLDL** presentan un **aumento significativo de los valores de absorbancia** respecto a las células control y a las tratadas con nLDL. **El tratamiento con nLDL no produjo efectos significativos** sobre la incorporación de lípidos a los macrófagos comparado con las células control (**figura 10A**).

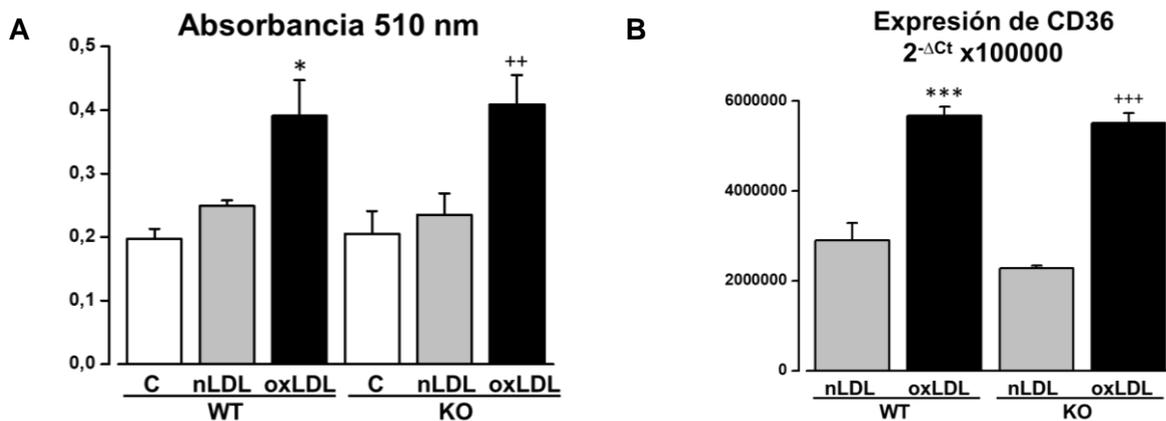


Figura 10. A. Cuantificación por espectrofotometría de lípidos intracelulares, en macrófagos WT y KO tratados con medio control, nLDL o oxLDL (n = 3-4 experimentos). **B.** Expresión relativa de CD36 en macrófagos WT y KO tratados con nLDL y oxLDL (n=3). El asterisco indica diferencias significativas respecto a la condición nLDL en WT y las cruces respecto a la condición nLDL del KO. Entre las condiciones oxLDL de WT y KO no hay diferencias significativas. A lo largo del trabajo: * P < 0,05; ** P < 0,01; ***P < 0,001.

Esto fue así tanto en los macrófagos procedentes de ratones WT como en los procedentes de ratones Kv1.3-KO. Además, con esta determinación **tampoco observamos diferencias entre la cantidad de lípidos acumulados en ratones WT y KO** tratados con oxLDL, lo que sugiere que el papel del canal de potasio no es relevante en el proceso de diferenciación de macrófagos a células espumosas.

Como control adicional de que obtenemos células espumosas analizamos mediante PCR cuantitativa la expresión del **receptor scavenger CD36** que se emplea como **marcador de células espumosas**. Este receptor facilita la entrada de LDL modificada a los macrófagos y su expresión aparece aumentada en condiciones pro-aterogénicas (8). En los **macrófagos**

tratados con oxLDL observamos un **aumento de la expresión de CD36** respecto a los macrófagos tratados con nLDL (**Figura 10B**). El aumento de expresión es similar y no es significativamente diferente en WT y KO, lo que de nuevo sugiere el canal Kv1.3 no participa en la conversión de macrófagos en FC.

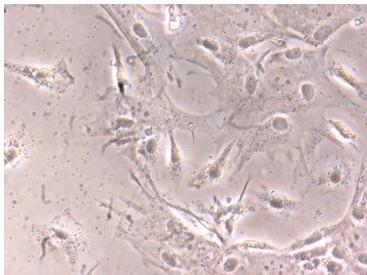
Efecto del canal Kv1.3 en la formación de células espumosas en ratones BPH

Para confirmar los resultados obtenidos con el modelo de ratón KO para el canal decidimos abordar la misma pregunta utilizando un bloqueante del canal en macrófagos procedentes de otra cepa diferente de ratones BPH, animales que se utilizan de forma habitual en el laboratorio.

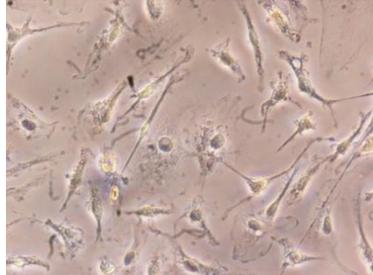
Los macrófagos se obtuvieron según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos siguiendo el mismo esquema que en el apartado anterior. Las células fueron tratadas con medio control y con nLDL y oxLDL 50 µg/mL en ausencia o presencia del inhibidor del canal, PAP-1 100 nM durante 48 horas (**Figura 11**).

La visualización al microscopio después de la tinción con ORO muestra que los macrófagos tratados con oxLDL acumulan una mayor cantidad de lípidos intracelulares que los macrófagos control o los nLDL, pero **no se aprecian diferencias en ausencia o presencia de PAP-1**, lo que parece indicar que el inhibidor no afecta al proceso.

A. Control



B. nLDL



C. oxLDL

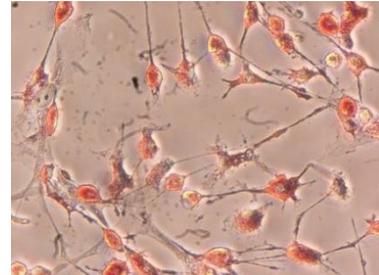
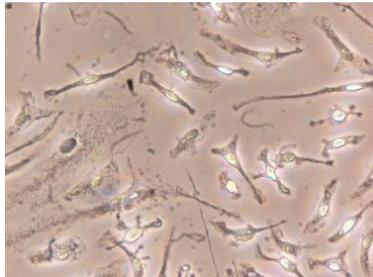


Figura 11. Macrófagos teñidos con ORO tratados con medio control y con nLDL y oxLDL en ausencia o presencia de PAP-1. Imágenes tomadas con objetivo de 40X.

D. nLDL + PAP-1



E. oxLDL + PAP-1



El análisis de los valores de absorbancia para los condiciones indicadas muestra una carga lipídica casi 2 veces mayor en las células tratadas con oxLDL, pero **no se observan diferencias** significativas cuando añadimos PAP-1, por lo que el bloqueante no tiene efecto sobre el tratamiento con la oxLDL ni con la nLDL (**Figura 12A**). Estos resultados confirman los resultados del apartado anterior. Como en el caso del modelo KO estudiamos la expresión del **receptor de CD36** mediante PCR cuantitativa y comprobamos que la expresión de este marcador de células espumosas aumenta de forma significativa en los macrófagos tratados con

oxLDL (**Figura 12B**). Los resultados obtenidos con los macrófagos BPH y el bloqueante del canal indican que el canal Kv1.3 no parece estar implicado en la diferenciación de macrófagos a células espumosas.

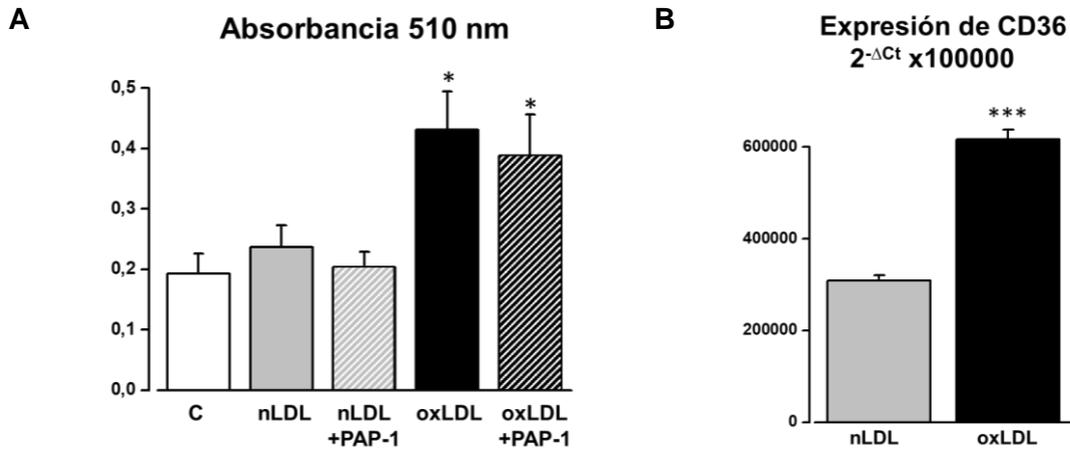


Figura 12. A. Cuantificación de lípidos intracelulares mediante espectrofotometría. B. Expresión relativa de CD36 en macrófagos BPH tratados con nLDL y oxLDL. El asterisco indica que hay una diferencia significativa frente a nLDL (n=3).

Efecto de la diferenciación de macrófagos a FC en la expresión de Kv1.3

Hemos visto que el canal no parece ser necesario en el proceso de diferenciación de macrófagos a células espumosas, pero nos preguntamos qué sucedería con la expresión del canal en este proceso. Mediante PCR cuantitativa con SybrGreen estudiamos la expresión del canal Kv1.3 en los macrófagos y las células espumosas de los ratones WT, KO y BPH.

Observamos en primer lugar cómo en el modelo KO, en las células WT **la expresión del canal disminuye de forma significativa en presencia de oxLDL**. En el caso de las células procedentes de KO se detecta una muy baja expresión y no se observan diferencias en presencia del oxLDL (**Figura 13 A**). En el caso de las células de BPH, oxLDL también disminuye la expresión del canal y esta no se ve afectada por la presencia del bloqueante PAP-1 (**Figura 13B**).

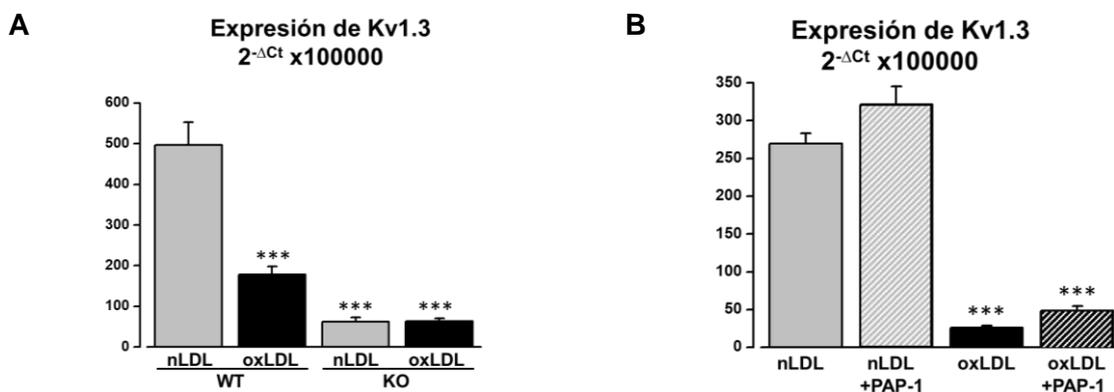


Figura 13. A. Expresión de Kv1.3 en células de ratones WT y KO (n=6). B. Expresión de Kv1.3 en células de ratones BPH (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas frente a la condición nLD, en la gráfica A respecto al nLDL del WT.

Discusión y líneas futuras

La **aterosclerosis** es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared de las arterias de medio y largo calibre que se caracteriza por la acumulación de lípidos y células inflamatorias. La hipótesis más extendida acerca de la causa del proceso de aterogénesis es la oxidativa, en la que los cambios de la pared del vaso pivotan en torno al estrés oxidativo. La disfunción endotelial y la oxidación de la LDL constituyen el primer paso a partir del cual se produce la atracción de los monocitos al espacio subendotelial, su diferenciación a **macrófagos** que incorporan oxLDL y ven alterado su metabolismo lipídico y su transformación en células espumosas cargadas de colesterol (2,4).

Por otro lado, tenemos el canal de potasio dependiente de voltaje, **Kv1.3**, cuya función en proliferación y activación de distintos tipos celulares (linfocitos T y B, macrófagos, microglía, astrocitos, células cancerosas y VSMCs entre otras) está ampliamente documentada (12) proponiéndose en numerosos trabajos como posible diana terapéutica para el tratamiento de tumores, enfermedades autoinmunes y enfermedades vasculares oclusivas (19,20). En el caso de los macrófagos está bien aceptado que su expresión es abundante y que la adecuada modulación de esta expresión es importante para su activación y respuesta ante distintos estímulos (13), pero se sabe poco acerca de la relevancia del canal Kv1.3 en la formación de células espumosas.

En este trabajo nos planteamos estudiar el **papel del canal Kv1.3 en la formación de células espumosas a partir de macrófagos**, que es uno de los pasos críticos en la formación de la placa de ateroma. Para ello empleamos macrófagos obtenidos a partir de células progenitoras procedentes de médula ósea de ratón que se diferenciaron a células espumosas con oxLDL.

El efecto del canal lo estudiamos en primer lugar con un modelo de ratón KO utilizando la tinción de Oil Red O que analizamos mediante microscopía y espectrofotometría y observamos que el tratamiento con oxLDL inducía la acumulación de lípidos, pero que no había diferencias en la acumulación entre las células de los ratones WT y los KO.

Los resultados con ratones KO pueden no ser concluyentes porque a veces la ausencia del gen deletado se compensa con el aumento de expresión de otro gen. En este sentido, se ha descrito en algunos tipos celulares la compensación de la ausencia del canal por un canal de cloruro (21). Por otro lado, el ratón KO del Kv1.3 está generado mediante delección parcial por lo que no se puede excluir totalmente la expresión y/o actividad de una proteína truncada.

Para confirmar nuestros resultados utilizamos el bloqueante del canal PAP-1, en ratones que sí expresan el canal, como los BPH. Comprobamos que el tratamiento con oxLDL promueve la incorporación de gotas lipídicas y que el bloqueo con PAP-1 no tenía ningún efecto.

Nuestro trabajo no está de acuerdo con el único trabajo que hemos encontrado en la literatura (16), que emplea una línea de monocitos humana tratados con oxLDL, Encuentran que el bloqueo del canal con un anticuerpo disminuye la formación de gotas lipídicas y cambia la expresión de algunos receptores responsables del metabolismo del colesterol y concluyen que previene la formación de células espumosas. Las discrepancias con nuestro trabajo podrían deberse a que están realizados en diferente especie y la fuente de los macrófagos es distinta, ya que está descrito que el origen de los macrófagos puede influir en la expresión de Kv1.3 (13).

A continuación, exploramos el efecto de diferenciación de los macrófagos a células espumosas sobre la expresión del canal Kv1.3. Está descrito que los macrófagos expresan Kv1.3 y que esa expresión aumenta cuando se activa en respuesta a estímulos inflamatorios (12). En este trabajo encontramos que, efectivamente, los macrófagos expresan el canal, pero el tratamiento con oxLDL disminuye su expresión tanto en ratón WT como en BPH. No hemos encontrado datos de fuentes fiables en la literatura relativos a este resultado y desconocemos cuál puede ser el mecanismo responsable de este cambio y la relevancia del mismo.

En las células del KO se observa una expresión baja que no cambia con el tratamiento y que podría deberse a que la delección de KO no es total como se ha comentado previamente.

En conclusión, los resultados que aquí se presentan indican que el canal Kv1.3 no es necesario para el proceso de diferenciación de macrófagos a células espumosas, por lo que no parece un buen candidato como diana terapéutica para prevenir este proceso.

Líneas futuras

Tradicionalmente se ha considerado a los macrófagos como la principal fuente de células espumosas, pero en los últimos años numerosos grupos han demostrado que hay otros posibles orígenes, como son las células endoteliales y especialmente las células de músculo liso vascular (5,7,8,10). De acuerdo con ello, sería interesante explorar si el canal Kv1.3 juega un papel importante en la diferenciación a FC de las VSMCs. Si ese fuera el caso tendríamos que analizar la contribución relativa del linaje de VSMCs y macrófagos a las FC de la placa de ateroma para explorar la contribución de los canales Kv1.3 a la formación de la placa in vivo, y en consecuencia el impacto de los bloqueantes del canal en la prevención de estas lesiones.

Conclusiones

1. Los macrófagos derivados de células progenitoras de médula ósea **se diferencian a células espumosas** cuando se exponen a **lipoproteínas de baja densidad oxidadas**.
2. **El canal de potasio Kv1.3 no es necesario en la diferenciación** de macrófagos a células espumosas. La ausencia del canal en un modelo *Knock-out* o su bloqueo con PAP-1 no disminuye la acumulación intracelular de lípidos ni la expresión del marcador de células espumosas CD36.
3. **La expresión del canal Kv1.3 disminuye en el proceso de diferenciación**, es menor en las células espumosas que en los macrófagos.

El canal de potasio Kv1.3 no parece ser relevante en el proceso de captación de LDL oxidada ni por la tanto en el proceso de diferenciación de células espumosas.

Agradecimientos

Quiero darles las gracias a todos los miembros del laboratorio C2: M^a Teresa Pérez, José Ramón López, Pilar Ciudad, Esperanza Alonso, Nuria Daghbouche, Virginia Revuelto, Sara Moreno, Marycarmen Arévalo-Martínez y Jorge Rojo por su ayuda, paciencia y por todo lo que me han enseñado.

Bibliografía

1. Ross M, Wojciech P. Ross. *Histología*. 7th ed. Wolters Kluwer; 2015.
2. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. octubre de 2013;13(10):709-21.
3. Lahoz C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol*. 1 de febrero de 2007;60(2):184-95.
4. Goikuria H, Vandebroek K, Alloza I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1 de febrero de 2018;39:62-70.
5. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primer*. 16 de agosto de 2019;5(1):1-18.
6. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 1 de julio de 2019 [citado 31 de enero de 2021];2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6636482/>
7. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao Q. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. enero de 2019;112:54-71.
8. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med*. noviembre de 2017;95(11):1153-65.
9. Howell KW, Meng X, Fullerton DA, Jin C, Reece TB, Cleveland JC. Toll-like Receptor 4 Mediates Oxidized LDL-Induced Macrophage Differentiation to Foam Cells. *J Surg Res*. noviembre de 2011;171(1):e27-31.
10. Lao KH, Zeng L, Xu Q. Endothelial and smooth muscle cell transformation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. octubre de 2015;26(5):449-56.
11. Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants* [Internet]. 11 de julio de 2019 [citado 7 de febrero de 2021];8(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6680802/>
12. Pérez-García MT, Ciudad P, López-López JR. The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 1 de enero de 2018;314(1):C27-42.
13. Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sánchez-Tilló E, López-Iglesias C, et al. Differential Voltage-dependent K⁺ Channel Responses during Proliferation and Activation in Macrophages*. *J Biol Chem*. 21 de noviembre de 2003;278(47):46307-20.
14. Ciudad P, Moreno-Domínguez A, Novensá L, Roqué M, Barquín L, Heras M, et al. Characterization of Ion Channels Involved in the Proliferative Response of Femoral Artery Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. junio de 2010;30(6):1203-11.
15. Zhang W, Lei X, Wang Y, Wang D, Yuan Z. Role of Kir2.1 in human monocyte-derived foam cell maturation. *J Cell Mol Med*. marzo de 2016;20(3):403-12.
16. Yang Y, Wang Y-F, Yang X-F, Wang Z-H, Lian Y-T, Yang Y, et al. Specific Kv1.3 blockade modulates key cholesterol-metabolism-associated molecules in human macrophages exposed to ox-LDL. *J Lipid Res*. enero de 2013;54(1):34-43.
17. Cao Y-Q, Yu, Dong G, Chen B, Zhang B. Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules*. 6 de febrero de 2020;25:706.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 1 de diciembre de 2001;25(4):402-8.
19. Villalonga N, David M, Bielańska J, González T, Parra D, Soler C, et al. Immunomodulatory effects of diclofenac in leukocytes through the targeting of Kv1.3 voltage-dependent potassium channels. *Biochem Pharmacol*. 15 de septiembre de 2010;80(6):858-66.
20. Teisseyre A, Palko-Labuz A, Sroda-Pomianek K, Michalak K. Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 as a Target in Therapy of Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 24 de septiembre de 2019 [citado 10 de mayo de 2021];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769076/>
21. Koni PA, Khanna R, Chang MC, Tang MD, Kaczmarek LK, Schlichter LC, et al. Compensatory Anion Currents in Kv1.3 Channel-deficient Thymocytes *. *J Biol Chem*. 10 de octubre de 2003;278(41):39443-51.