



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE CANALES IÓNICOS EN
UN MODELO DE DIABETES**

Autora: Lucía Benito Salamanca

Tutoras: Pilar Ciudad Velasco, Lucía Citores González

Año 2023

Agradecimientos

Quisiera agradecer a Teresa Pérez y José Ramón López la oportunidad de haber podido formar parte de su grupo de investigación “Canales iónicos y Fisiopatología vascular”. Por supuesto, dar las gracias a mi tutora Pilar Ciudad, por su cercanía, su paciencia y por todo lo que me ha enseñado durante estos meses. Agradecer también a todo el Laboratorio C2 del IBGM: Esperanza Alonso, Sara Moreno, Jorge Rojo, Diego A. Peraza, Irina Rebollo y Nuria Daghbouche por su ayuda y por todo lo que he aprendido con ellos durante este tiempo. Me gustaría dar las gracias también a Lucía Citores, por acceder a ser mi tutora dentro de la Facultad de Ciencias y el trabajo y dedicación que esto conlleva.

Por último, dar las gracias a mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional, gracias al cual he llegado hasta aquí y soy quien soy; y a Luis, por estar siempre ahí.

Índice

Resumen	7
Abstract.....	8
Abreviaturas.....	9
Introducción.....	13
1.Sistema cardiovascular	13
1.1. Los vasos sanguíneos.....	13
1.2. Células de músculo liso vascular	14
1.3. Modulación fenotípica de las células de músculo liso vascular	15
2.Diabetes.....	16
3.Aterosclerosis	17
4.Macrófagos.....	19
5.Canales iónicos	20
5.1. Canales Kv1.3	21
5.2. Otros canales	23
5.2.1. Canales de potasio Kv1.5.....	23
5.2.2. Canales de potasio de rectificación interna, $K_{ir}2.1$	23
5.2.3. Canales catiónicos inespecíficos activados por ATP, P2X	25
Objetivos.....	27
Material y métodos	29
1.Modelos animales	29
1.1. Modelo de ratón diabético	29
2.Obtención de muestras experimentales	31
2.1. Tejidos.....	31
2.2. Macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM)	32

3.Tratamiento farmacológico	33
3.1. LPS.....	33
4.Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa.....	34
4.1. Extracción de RNA	34
4.1.1. Preparación de las muestras	34
4.1.2. Aislamiento de RNA.....	35
4.1.3. Lavado de RNA.....	35
4.2. Síntesis de cDNA	36
4.3. PCR cuantitativa (qPCR)	37
4.3.1. qPCR con ensayo TaqMan	38
4.3.2. qPCR con SYBR Green.....	40
5.Método de cuantificación relativo y análisis estadístico.....	42
5.1. Análisis estadístico.....	43
Resultados.....	45
1.Obtención de un modelo de ratón con diabetes	45
2.La expresión de marcadores metabólicos en macrófagos	47
3.La expresión de canales iónicos en macrófagos.....	50
3.1. Receptores purinérgicos, P2X.....	50
3.2. Canales de potasio dependientes de voltaje.....	53
4.Expresión del Kv1.3 en diferentes tejidos de modelo de murino diabético	55
4.1. Estudio de la expresión de Kv1.3 y Kv1.5 en aortas.....	56
Discusión.....	59
Conclusiones	61
Bibliografía.....	63
Anexo I.....	69

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de mortalidad en el mundo, donde la diabetes tipo 2 (T2DM) se encuentra entre uno de los motivos de dicha tendencia al alza. Con el aumento de la prevalencia de la diabetes en todo el mundo, las complicaciones vasculares de la diabetes también van en aumento, dando como resultado un riesgo mayor de desarrollo de complicaciones macrovasculares, siendo la enfermedad cardiovascular aterosclerótica la principal causa de muerte en adultos con diabetes. La diabetes está relacionada con un ambiente que propicia la activación de los macrófagos hacia un fenotipo metabólico que puede formar parte de las complicaciones vasculares en diabetes.

En este trabajo se pretende realizar un estudio de la expresión de RNA de diferentes canales iónicos y marcadores de fenotipo en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) así como el estudio de la expresión de RNA del canal de potasio Kv1.3 en diferentes tejidos sensibles a insulina. Para ello, se utilizan técnicas moleculares como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para estudiar los niveles de expresión en muestras de ratones macho y hembras alimentados con una dieta estándar (SD) y con una dieta alta en grasa (HFD) que simula el metabolismo de una persona diabética.

A la luz de los resultados puede concluirse que no existen cambios reseñables en la expresión de RNA entre ratones SD y HFD pero sí entre machos y hembras, hecho destacado de cara al planteamiento de posibles tratamientos contra la T2DM en función del sexo del paciente.

Palabras clave: Diabetes tipo 2, macrófagos, aorta, Kv1.3.

Abstract

Cardiovascular diseases are among the leading causes of mortality in the world, where type 2 diabetes (T2DM) is among one of the reasons for this upward trend. With the increasing prevalence of diabetes worldwide, vascular complications of diabetes are also increasing, resulting in an increased risk of developing macrovascular complications, with atherosclerotic cardiovascular disease being the leading cause of death in adults with diabetes. Diabetes is related to an environment that leads to the activation of macrophages towards a metabolic phenotype that can be part of the vascular complications in diabetes.

This project aims to carry out a study of the RNA expression of different ion channels and proinflammatory phenotypic markers in bone marrow-derived macrophages (BMDM) as well as the study of the RNA expression of the potassium channel Kv1.3 in different insulin-sensitive tissues. For this purpose, molecular techniques such as qPCR are used to study the expression levels in samples of male and female mice fed with a standard diet (SD) and a high-fat diet (HFD) that simulates the metabolism of a diabetic person.

In view of the results, it can be concluded that there are no notable changes in RNA expression between SD and HFD mice, but there are changes between males and females, a remarkable and very important fact for the development of possible treatments against T2DM based on the sex of the patient.

Abreviaturas

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

BPH: Presión arterial elevada (*Blood Pressure High*)

BPN: Presión arterial normal (*Blood Pressure Normal*)

cDNA: DNA complementario

Ct: *Cycle Threshold*

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*DeoxyriboNucleic Acid*)

ECV: Enfermedad cardiovascular

T2DM: Diabetes Mellitus Tipo 2

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

HFD: Dieta alta en grasa (*High Fat Diet*)

ipGTT: Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

ipITT: Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal

K_{ir}: Canal de potasio de rectificación interna (*Inward Rectifier Potassium Channel*)

K_v: Canal de potasio dependiente de voltaje (*Voltage Gated Potassium Channel*)

LDL: Lipoproteína de baja densidad (*Low-Density Lipoprotein*)

LPS: Lipopolisacárido

NOS2: Óxido nítrico sintasa 2 (*Nitric Oxide Synthase 2*)

NTC: *No Template control*

PA: Presión arterial

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PM: Modulación fenotípica (*Phenotypic Modulation*)

qPCR: PCR cuantitativa o en tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico (*RiboNucleic Acid*)

SD: Dieta estándar (*Standard Diet*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (*Tumor Necrosis Factor- α*)

V_m: Potencial de membrana

VRF: Factores de Riesgo Vascular (*Vascular Risk Factors*)

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

Listado de figuras y tablas

Figura 1 Estructura de la pared de los vasos sanguíneos.

Figura 2 Fenotipo metabólico en células de músculo liso vascular.

Figura 3 Esquema resumen del proceso de aterosclerosis.

Figura 4 Representación de los componentes estructurales básicos de un canal iónico.

Figura 5 Estructura de la subunidad Kv1.3 humana.

Figura 6 Dibujo esquemático de una subunidad del canal K_{ir} .

Figura 7 Esquema de los receptores P2X.

Figura 8 Esquema resumen de la obtención de ratones con diabetes y otros factores de riesgo.

Figura 9 Sistema de medición de presión arterial en ratones.

Figura 10 Equipo de anestesia Somno Suite™ de Kent Scientific.

Figura 11 Esquema resumen de los tejidos extraídos del ratón sacrificado.

Figura 12 Esquema resumen de la obtención de BMDM.

Figura 13 Estructura general del lipopolisacárido (LPS).

Figura 14 Programa seguido para llevar a cabo una reacción de retrotranscripción.

Figura 15 Esquema resumen del proceso de actuación utilizando un ensayo TaqMan.

Figura 16 Esquema de protocolo qPCR con ensayo TaqMan.

Figura 17 Esquema resumen del proceso de actuación utilizando un ensayo SybrGreen.

Figura 18 Esquema de protocolo qPCR con SybrGreen.

Figura 19 Ejemplo de una curva de Melting obtenida al final de una qPCR utilizando SybrGreen.

Figura 20 Ejemplos de gráficas de fluorescencia en función del tiempo obtenidas en qPCR.

Figura 21 Gráfico del incremento de peso y medidas de presión arterial en ratones.

Figura 22 Medidas de glucosa en sangre.

Figura 23 Curvas obtenidas en las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina intraperitoneales.

Figura 24 Abundancia relativa de los marcadores de fenotipo metabólico.

Figura 25 Diferencias en la expresión relativa de marcadores en hembras con respecto a machos en macrófagos M0.

Figura 26 Abundancia relativa de receptores purinérgicos en macrófagos.

Figura 27 Diferencias en la expresión relativa de receptores purinérgicos en hembras con respecto a machos en macrófagos M0.

Figura 28 Abundancia relativa de los canales iónicos dependientes de voltaje en macrófagos.

Figura 29 Diferencias en la expresión relativa de canales iónicos en hembras con respecto a machos en macrófagos M0.

Figura 30 Abundancia relativa del canal Kv1.3 en diferentes tejidos de ratonas.

Figura 31 Abundancia relativa de los canales Kv1.3 y Kv1.5 en aorta.

Figura 32 Ratio Kv1.3/Kv1.5

Tabla 1 Composición (mM) de la disolución Tyrode 1X.

Tabla 2 Tabla resumen de los volúmenes necesarios para llevar a cabo una qPCR con cada uno de los ensayos.

Tabla A.I Ensayos TaqMan comerciales y personalizados usados.

Introducción

1. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y un sistema de vasos sanguíneos (arterias, capilares y venas), cuya función es transportar oxígeno y nutrientes a todos los tejidos del cuerpo y sustraer los productos de degradación del metabolismo. También participa en otros mecanismos homeostáticos, como el mantenimiento del gradiente de concentración intracelular y extracelular, la señalización química mediada por neurotransmisores y hormonas, el control de la temperatura corporal...[1]

1.1. Los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos constituyen un circuito cerrado de conductos dispuestos a modo de red, encargados de irrigar todos los órganos y tejidos del cuerpo. Su estructura varía, adaptándose a las diferentes funciones específicas. Las paredes de los vasos sanguíneos, están compuestas por tres capas concéntricas (**Figura 1**): [1]

- **La túnica íntima:** Es la capa más interna y está integrada por una sola capa de células endoteliales (EC), separadas de la túnica media por la lámina basal y la lámina elástica interna. Las células endoteliales son células especializadas que permiten el intercambio de sustancias entre el torrente sanguíneo y los tejidos, además de prohibir el paso de otras sustancias.
- **La túnica media:** Contiene células de músculo liso alojadas en una matriz de colágeno, elastina y varias glucoproteínas. Pueden existir varias capas de células de músculo liso, dispuestas en diferente orientación en función del eje longitudinal del vaso. Se encuentran organizadas de modo que su contracción disminuye el diámetro del vaso. La proporción entre colágeno, músculo liso y elastina determina las propiedades mecánicas generales del vaso.
- **Adventicia:** Es la capa más externa del vaso y se encuentra separada de la capa media por la lámina elástica externa. Contiene colágeno, fibroblastos, vasos sanguíneos (para nutrir el propio vaso) y linfáticos y nervios autónomos.

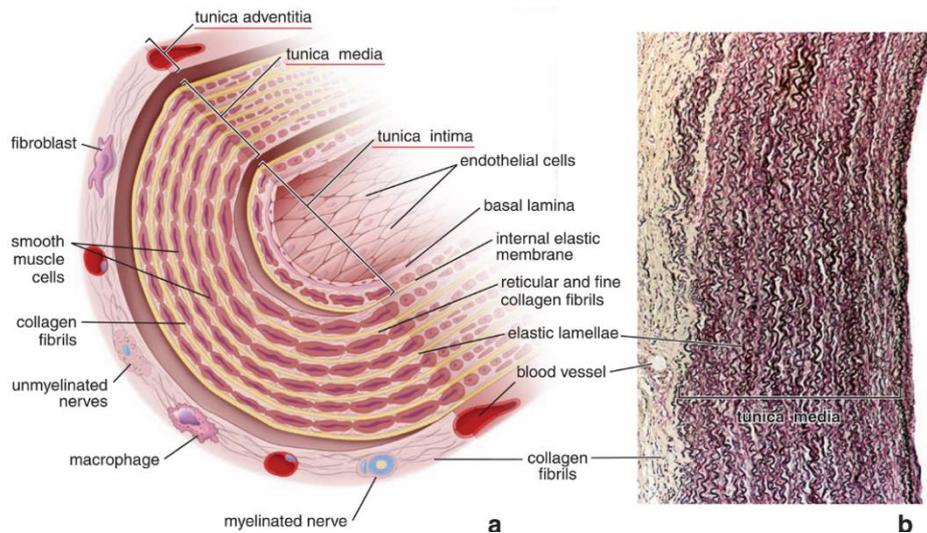


Figura 1. Estructura de la pared de los vasos sanguíneos (A). Microfotografía del corte de una arteria (B) [2]

1.2. Células de músculo liso vascular

Las células de músculo liso vascular (VSMC) son el principal componente de los vasos sanguíneos y proporcionan soporte estructural y funcional para mantener la homeostasis vascular. [3] De manera característica, las VSMC tienen un diámetro de entre $5\ \mu\text{m}$ y $10\ \mu\text{m}$ y una longitud entre $50\ \mu\text{m}$ y $300\ \mu\text{m}$. Numerosas y pequeñas invaginaciones denominadas caveolas, ubicadas en la membrana, aumentan de manera significativa el área de superficie de las células. [1] Las VSMC cuentan con proteínas contráctiles (actina y miosina), que se organizan de forma diferente a como lo hacen en músculo cardíaco y esquelético. En este caso, existen bandas de filamentos de actina unidos entre sí y anclados por cuerpos densos en el interior de la célula. Cada filamento de miosina está rodeado por varios filamentos de actina. [1]

Las células de músculo liso vascular contienen una conexión eléctrica por medio de uniones comunicantes que permiten la propagación de respuestas a lo largo de todos los vasos sanguíneos. [1]

El estado fisiológico de las arterias es una contracción parcial y continua denominada tono basal, de forma que existe un mecanismo para aumentar el tono vascular (vasoconstricción) o para reducirlo (vasodilatación). La contracción del músculo liso vascular puede iniciarse por estímulos eléctricos, químicos y mecánicos. [1]

1.3. Modulación fenotípica de las células de músculo liso vascular

Las células de músculo liso vascular son células altamente especializadas, cuya principal función es la contracción. En un vaso sano se encuentran en un estado o fenotipo desdiferenciado o maduro, expresando proteínas que son importantes en la contractilidad, como los canales iónicos y las moléculas de señalización que permiten que las VSMC sean capaces de regular la presión arterial sistémica a través de la modulación del tono vascular. A diferencia de la mayoría de las células diferenciadas terminales, las VSMC conservan una notable plasticidad y son capaces de sufrir cambios reversibles en el fenotipo en respuesta a cambios en las señales ambientales locales.[4] Dicha plasticidad es una propiedad fundamental del músculo liso vascular que depende de la amplia diversidad en las propiedades, distribución y función de las poblaciones de células musculares lisas individuales. [5]

En respuesta a los cambios en las señales ambientales, las VSMC cambian de un fenotipo **diferenciado contráctil** a un fenotipo **desdiferenciado, sintético y proliferativo (Figura 2)**. Este proceso, conocido como cambio o modulación fenotípica (PM), conlleva profundos cambios estructurales y funcionales que implican cambios en la expresión génica y en los mecanismos de señalización. [6]

El fenotipo contráctil o diferenciado se caracteriza por bajas tasas de migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular; y altos niveles de expresión de genes contráctiles. Por el contrario, las VSMC desdiferenciadas presentan una baja expresión de genes contráctiles, así como una regulación positiva de genes relacionados con la migración, la proliferación, la inflamación y la producción de proteínas de la matriz extracelular.

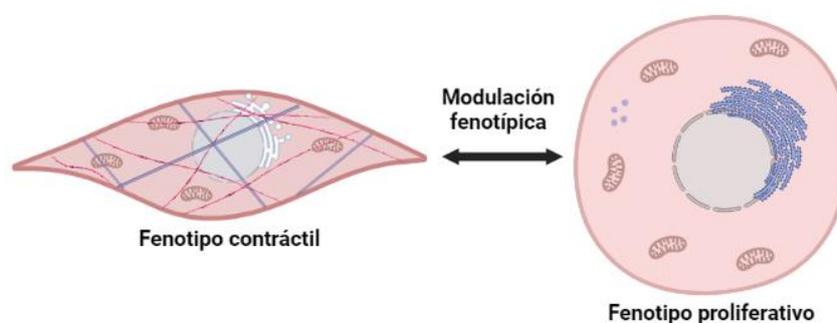


Figura 2. Fenotipo metabólico en VSMCs. Las células contráctiles contienen filamentos de actina y miosina. Las células con fenotipo proliferativo presentan un gran retículo endoplásmico rugoso y proteínas de la matriz extracelular.

2. Diabetes

La diabetes mellitus se define como una enfermedad endocrino-metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Puede deberse a una deficiencia en la secreción de insulina, resistencia a la acción de esta, o una combinación de ambas. En condiciones normales circula en la sangre cierta cantidad de glucosa. La insulina, hormona que produce el páncreas, controla la concentración de glucosa en la sangre al regular su producción y almacenamiento. [7]

En la diabetes se elimina la capacidad del cuerpo para reaccionar a la insulina, o bien el páncreas deja de producirla. Esto conduce a hiperglucemia, que puede ocasionar complicaciones metabólicas graves. [7] Los dos tipos principales de diabetes son la diabetes mellitus tipo 1 (T1DM), cuando el páncreas no es capaz de producir insulina debido a una reacción inmunológica; y la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), cuando el paciente produce insulina de manera insuficiente o los mecanismos de respuesta están alterados.

La insulina es una hormona secretada por las células del páncreas, cuya función se basa en el transporte de la glucosa que entra en el organismo a las células para poder ser convertida en energía a través del proceso de glucólisis. En personas que padecen diabetes, el organismo es capaz de descomponer los hidratos de carbono de los alimentos ingeridos y convertirlos en glucosa; sin embargo, cuando esta llega al torrente sanguíneo, no hay insulina o la cantidad es insuficiente para poder trasladar la glucosa a las células y convertirla en energía. Como consecuencia, la glucosa se acumula en la sangre. Cuando la secreción de insulina ya no puede compensar la resistencia a insulina, se produce la T2DM. [8]

Los pacientes con resistencia a la insulina o T2DM muestran una mayor probabilidad de presentar hipertensión (presión sanguínea alta) o valores elevados en el perfil de lípidos (colesterol y triglicéridos). Dicha resistencia a insulina es el componente central del llamado síndrome metabólico. [9] El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2. [10] Entre dichas alteraciones se incluyen el aumento de la presión arterial, niveles altos de azúcar en sangre, exceso de grasa corporal y niveles anormales de colesterol o triglicéridos.

Con el aumento de la prevalencia de la diabetes en todo el mundo, las complicaciones vasculares de la diabetes también van en aumento. La diabetes da como resultado un mayor

riesgo de complicaciones macrovasculares, siendo la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECV) la principal causa de muerte en adultos con diabetes. [11] Los mecanismos exactos por los que la diabetes promueve el riesgo de ECV nos son claros, aunque hay evidencias del papel de las VSMCs, los macrófagos y otras células en dicho proceso. Además, la diabetes deja una huella, llamada memoria metabólica, en este tipo de células, lo que favorece esta mayor susceptibilidad a sufrir enfermedades cardiovasculares.

3. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad vascular que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Afecta a las arterias de mediano y gran calibre de diferentes lechos vasculares y su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias. Se produce un desequilibrio en el metabolismo lipídico y la inadecuada respuesta del sistema inmune a la acumulación de lipoproteínas en las arterias. [12]

La aterosclerosis tiende a asentarse en las arterias que irrigan al corazón, el cerebro y las extremidades inferiores. [13] Sus principales factores de riesgo son la edad, la genética, la obesidad, la dieta poco saludable, la hiperlipidemia (exceso de grasa en sangre), la hipertensión y el consumo elevado de alcohol. La exposición a dichos factores de riesgo tiene un efecto acumulativo a lo largo de la vida. [14]

En el proceso de aterosclerosis pueden diferenciarse tres etapas: inicio, progresión y rotura de la placa (**Figura 3**).

Inicio

Las células endoteliales (EC) de las áreas vasculares se encuentran expuestas a fuerzas de cizallamiento, sobre todo en zonas de flujo turbulento, los cuales promueven la lesión endotelial y desencadenan la formación de placas focales que modulan su estructura y función. Su disfunción se debe a la producción de radicales libres (ROS), capaces de activar las vías de inflamación en las ECs, aumentando su permeabilidad y conduciendo a su apoptosis.[15]

El aumento de la permeabilidad endotelial facilita el paso de la lipoproteína de baja densidad (LDL) circulante al espacio subendotelial, produciendo LDL oxidadas (oxLDL) que dañan el

endotelio. En condiciones normales, los macrófagos regulan el metabolismo de las lipoproteínas controlando el contenido de LDL y colesterol. Sin embargo, esta regulación se altera en la aterosclerosis, ya que se permite la acumulación de colesterol y se reduce la expresión de los transportadores de colesterol fuera de la célula. [15]

Por lo tanto, en esta etapa temprana de la aterosclerosis, la placa constará de varias placas de macrófagos cargados de lípidos. [16]

Progresión

Una vez establecidas, las placas ateroscleróticas progresan por la acumulación continua de lípidos y células llenas de lípidos. [14]

Durante la evolución de la placa aterosclerótica, las células de músculo liso vascular (VSMCs) residentes y reclutadas producen moléculas de matriz extracelular (colágeno, elastina intersticial o proteoglucanos) que contribuyen al engrosamiento de la íntima, pero también atrapa a los macrófagos y a la oxLDL. Además, los macrófagos activados muestran una mayor producción de enzimas de la familia de las metaloproteínas de la matriz (MMP) que degradan el colágeno intersticial, además de inducir la proliferación y la migración de las células de músculo liso. [14], [16]

Las VSMCs y los macrófagos en la lesión en evolución pueden dividirse, así como sufrir muerte celular. Los desechos de las células muertas se acumulan, formando el núcleo necrótico rico en lípidos del ateroma. La eferocitosis (eliminación de células muertas) por parte de los macrófagos, se vuelve defectuosa, contribuyendo a la inflamación. [14]

Rotura de la placa

La rotura de la placa se define como un área de ruptura de la cubierta fibrosa. La tapa propensa a la ruptura suele ser delgada, infiltrada por macrófagos y linfocitos y con un contenido limitado de VSMCs. La proporción en la que se encuentren los diferentes tipos celulares que conforman la placa de ateroma determinan su estabilidad. De modo que una placa que presenta abundancia en macrófagos y linfocitos será una placa vulnerable; mientras que una placa rica en VSMCs productoras de matriz extracelular será una placa estable. [16] Además, existen otros factores que cobran importancia en la ruptura de la placa de ateroma como puede ser el flujo turbulento, el aumento de la apoptosis o el crecimiento del núcleo necrótico.

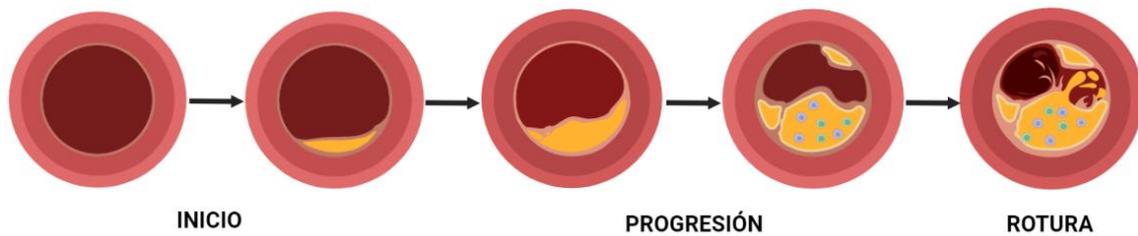


Figura 3. Esquema resumen del proceso de aterosclerosis.

4. Macrófagos

Los macrófagos son células inmunitarias mieloides que se ubican estratégicamente en todos los tejidos del cuerpo, donde ingieren y degradan células muertas, desechos y materiales extraños y organizan procesos inflamatorios. Los macrófagos se clasificaron como parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS) junto con monocitos y células dendríticas (DC). [17]

En los mamíferos adultos se encuentran en todos los tejidos, donde presentan una gran diversidad anatómica y funcional. En los tejidos, están organizados en patrones definidos con cada célula ocupando su propio territorio. [18]

Los macrófagos tienen muchas funciones en la configuración de la arquitectura de diversos tejidos. Después del desarrollo del organismo, los macrófagos modulan la homeostasis y la fisiología normal mediante la regulación de diversas actividades y la detección de daños. Sin embargo, estas funciones tróficas y reguladoras pueden verse alteradas y los macrófagos pueden contribuir a ciertas enfermedades. [18]

Cuando los tejidos se dañan después de una infección o lesión, se reclutan monocitos inflamatorios de la circulación y se diferencian en macrófagos a medida que migran a los tejidos afectados. Estos macrófagos reclutados secretan una variedad de mediadores inflamatorios (TNF- α , NO...) que activan los mecanismos de defensa antimicrobianos que contribuyen a la muerte de los organismos invasores. [18]

Aunque estos macrófagos inflamatorios son inicialmente beneficiosos porque facilitan la eliminación de los organismos invasores, también pueden desencadenar un daño tisular. De hecho, si la respuesta inflamatoria de los macrófagos no se controla rápidamente, puede volverse patógena y contribuir a la progresión de la enfermedad. Para contrarrestar el potencial de daño tisular de la respuesta inflamatoria, los macrófagos sufren apoptosis o

cambian a un fenotipo antiinflamatorio o supresor que amortigua la respuesta proinflamatoria al tiempo que facilita la cicatrización de las heridas. [18]

Los macrófagos juegan un papel crucial en la respuesta inflamatoria, actuando como células presentadoras de antígenos. Los mecanismos de proliferación, activación y resolución de las células inmunes se deben, principalmente, a las respuestas de estas células a señales. Estas señales incluyen cambios en el flujo de iones a través de la membrana. Como cualquier tipo celular, los macrófagos expresan canales iónicos y transportadores que regulan el potencial de membrana (V_m). [19], [20]

Los canales de potasio dependientes de voltaje son uno de los reguladores más importantes durante la maduración, activación y diferenciación de los macrófagos. Se han relacionado con la fagocitosis, migración, proliferación, apoptosis y la producción de citoquinas. [19] El equilibrio entre las corrientes determina el potencial de reposo de los macrófagos y tiene un papel importante en su activación y proliferación. [21]

5. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana formadoras de poros que median la entrada/salida pasiva de iones de señalización esenciales hacia/desde la célula o los orgánulos intracelulares, controlando así la concentración de iones intra y extracelulares, el potencial de membrana y el volumen celular. Los canales iónicos contribuyen a prácticamente todos los procesos celulares básicos y están involucrados en procesos fisiológicos básicos del potencial de acción como la contracción muscular, la propagación y la secreción. [22]

En términos básicos, los canales iónicos son una colección de dominios de proteínas que juntos crean un poro que permite el paso de iones a través de una membrana celular en respuesta a estímulos químicos, cambios de temperatura o fuerzas mecánicas (**Figura 4**).

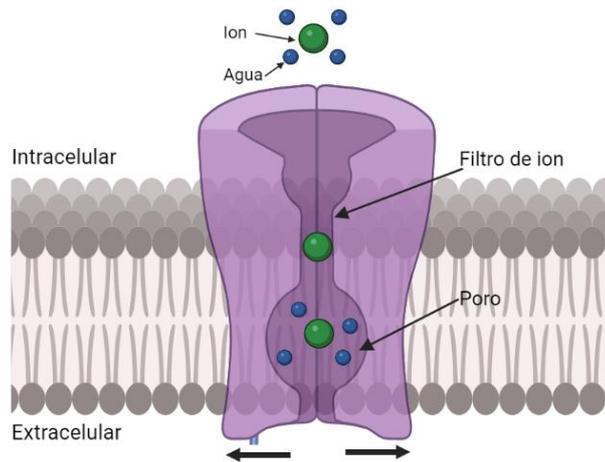


Figura 4. Representación de los componentes estructurales básicos de un canal iónico.

Para cumplir la función de filtrar selectivamente los iones a través de la membrana biológica, la mayoría de los canales iónicos poseen una región de bucle denominada filtro de iones o de selectividad que se encarga de regular qué iones tienen permitido el paso a través del poro.[23]

Existe una sorprendente variedad molecular de canales iónicos. Se clasifican por selectividad iónica (canales de sodio, canales de potasio, canales de cloruro, canales de calcio, canales de protones...), mecanismo de activación (activado por voltaje, activado por ligando, activado por luz...) o localización (membrana plasmática o intracelular). [22]

En este trabajo nuestra atención se centrará en el estudio de los canales iónicos dependientes de voltaje debido a su importancia en muchos aspectos de la transducción de señales y la regulación celular; en concreto en el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 debido a la importancia que tiene su estudio en el grupo de investigación. Sin embargo, también estudiaremos el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.5, canales de potasio de rectificación interna como el $K_{ir}2.1$, así como canales catiónicos inespecíficos activados por ATP.

5.1. Canales Kv1.3

El canal Kv1.3 es un canal de potasio dependiente de voltaje descrito en células del sistema nervioso, inmune y en VSMCs. Este tipo de canales son tetrámeros de subunidades formadoras de poro, cada uno con seis hélices transmembrana (S1-S6) conectadas a través de bucles intra y extracelulares. Los dominios NH_2 - y $-COOH$ terminales son regiones intracelulares de longitud variable que pueden unirse a otras proteínas y participar en cascadas de señalización. [24]

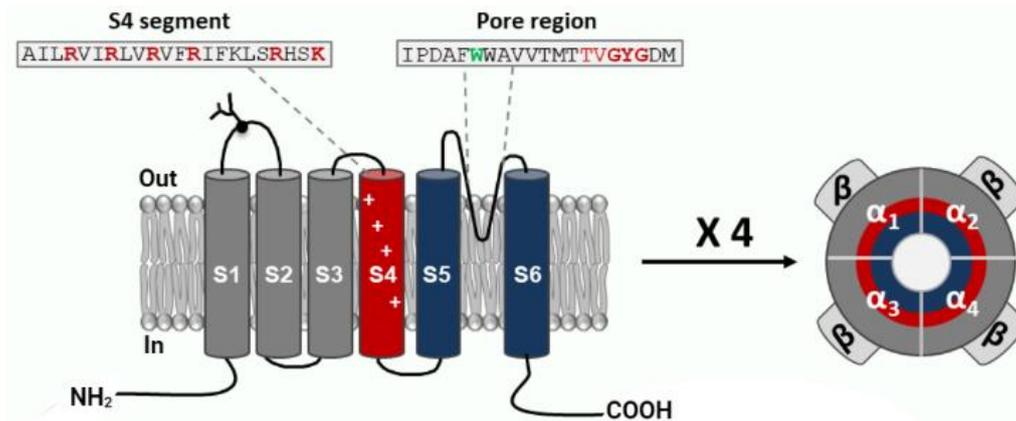


Figura 5. Estructura de la subunidad Kv1.3 humana. La secuencia del segmento S4 con los residuos cargados en rojo, un sitio de N-glicosilación y la secuencia de la región del poro con el filtro de selectividad de K resaltado. [24]

Las hélices transmembrana de cada subunidad Kv- α contienen dos dominios funcional y estructuralmente independientes: el poro selectivo, formado por las hélices S5 y S6 unidas por un dominio peptídico o lazo P, y el dominio del sensor de voltaje, formado por las hélices transmembrana S1-S4 (**Figura 5**). El poro tiene un dominio de cinco aminoácidos que forman la parte más estrecha del canal, denominada filtro de selectividad, que está muy conservada en los canales de potasio (TVGYG) y determina la selectividad al potasio del canal. La despolarización de la membrana induce un cambio conformacional en S4 provocando la apertura del poro. [24]

Además, las subunidades α Kv1.3 son capaces de formar canales heterotetraméricos con las subunidades α de Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.5, lo que permite formar un canal con diferentes propiedades cinéticas y funcionales.

Las moléculas que inhiben el canal Kv1.3 se dividen en dos categorías estructurales: péptidos derivados del veneno de escorpiones u otros animales (margatoxina, kaliotoxina o caribdotoxina) y moléculas orgánicas pequeñas tales como 4-aminopiridina (4-AP), 5-(4-fenoxibutoxi)-psoraleno (PAP-1) o tetraetilamonio (TEA). [24]

Los canales de potasio están implicados en la proliferación de células puesto que contribuyen al potencial de membrana. Los primeros estudios relacionaron los canales de potasio con la proliferación celular de linfocitos T. En estas células existen canales Kv1.3 y canales de potasio activados por Ca^{2+} cuya activación conlleva la hiperpolarización de la membrana. También está descrito el papel del canal Kv1.3 en la proliferación de linfocitos B células *natural killer* (NK), oligodendrocitos, células de la microglía, macrófagos y VSMCs. [24]

Además, en las células de músculo liso vascular el canal Kv1.3 está implicado en la modulación fenotípica (PM), pasando de un estado contráctil o diferenciado a uno migratorio y proliferativo o desdiferenciado en respuesta a distintos factores. El canal Kv1.3 tiene la capacidad de responder a los cambios de voltaje de las membranas de las VSMCs, por lo que juega un papel importante en dicha PM. [24], [25]

5.2. Otros canales

5.2.1. Canales de potasio Kv1.5

El canal Kv1.5 se expresa fundamentalmente en la aurícula, así como en los vasos sanguíneos, músculo esquelético y células del sistema inmune. Participa en el mantenimiento del tono del músculo liso vascular, la liberación de insulina, la regulación del volumen celular y la proliferación. [26]

Los canales Kv1.5 son sensibles al bloqueo por 4-AP, bloqueando el estado abierto del canal a través de la apertura interna del poro iónico. [27]

Los macrófagos generan corrientes dependientes de voltaje que son corrientes iónicas de K^+ generadas por heterotetrámeros Kv1.3/Kv1.5.[24] La estequiometría de estos heterotetrámeros varía en función del estado de polarización de los macrófagos y, por tanto, sus propiedades biofísicas cambian. Los heterotetrámeros Kv1.3/Kv1.5 se localizan en *lipid rafts* o balsas lipídicas de la membrana plasmática y representan una diferente expresión en función de la composición de los heterotetrámeros y, fundamentalmente, debido al nivel de canales Kv1.5. [19], [20], [28]

5.2.2. Canales de potasio de rectificación interna, K_{ir} 2.1

La rectificación es un cambio en la conductancia iónica debido al voltaje. Los canales de potasio de rectificación interna, K_{ir} , son una clase importante de canales de potasio que regulan la excitabilidad de la membrana, la frecuencia cardíaca, el tono vascular, la liberación de insulina y el flujo de sal a través del epitelio. Estos canales se expresan en diferentes tipos celulares del cerebro, el endotelio o en células de músculo liso. En general, en la mayoría de los tejidos contribuyen a mantener el potencial de membrana. [29]–[31]

Los canales K_{ir} se agrupan dentro de siete familias denominadas $K_{ir}1-7$, que permiten la salida de K^+ y se pueden distinguir por su fuerza de rectificación y sus respuestas a señales celulares. La rectificación interna hace referencia a la capacidad del canal iónico para permitir una mayor entrada de iones que salida. En el caso de los canales K_{ir} , la rectificación hacia el interior es causada por iones citoplasmáticos como poliaminas y Mg^{2+} que obstruyen la vía de conducción en la despolarización y, por lo tanto, impiden el flujo de K^+ hacia el exterior. [31]

Los canales K_{ir} presentan un poro iónico más largo que los canales K_v y está compuesto por el dominio transmembrana y el dominio intracelular (**Figura 6**). [32]

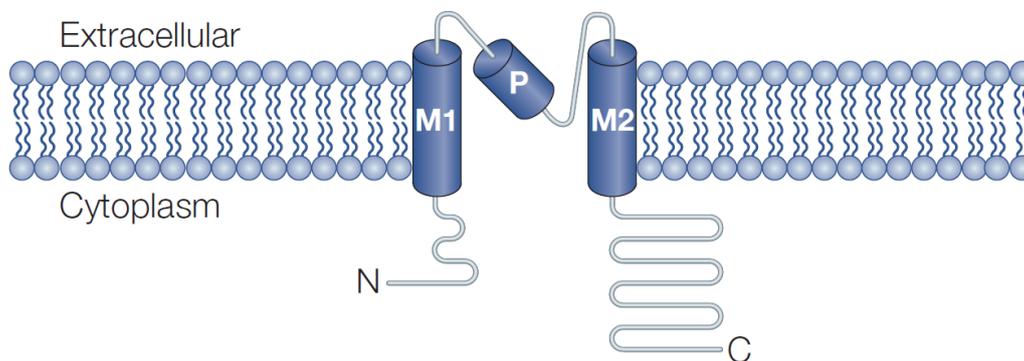


Figura 6. Dibujo esquemático de una subunidad del canal K_{ir} . Cada subunidad comprende dos hélices transmembrana (M1 y M2), un bucle de poro (P) y un dominio citoplasmático formado por los extremos amino (N) y carboxilo (C). [31]

El canal $K_{ir}2.1$ genera una corriente de rectificación interna denominada I_{K1} . Este canal forma homotetrámeros, pero, además, con los canales $K_{ir}2.2$ y $K_{ir}2.3$ puede formar heterotetrámeros con diferentes propiedades. [33]

En VSMCs, los canales K_{ir} clásicos pueden contribuir a la vasodilatación en respuesta a una alta concentración de potasio extracelular. Dicho aumento, despolariza las VSMCs y contrae los vasos sanguíneos. Sin embargo, un aumento leve en la concentración de K^+ extracelular hiperpolariza la membrana y dilata arterias, como las arterias coronarias o cerebrales. Se ha visto que en VSMCs $K_{ir}2.1$ es la subunidad principal encargada de formar las corrientes K_{ir} clásicas.[34]

En macrófagos, los canales $K_{ir}2.1$ los son responsables de regular el potencial de membrana, junto con los heterotetrámeros $K_v1.3/K_v1.5$. Además, los estímulos que conducen a los macrófagos a su activación inflamatoria, como la presencia de lipopolisacárido (LPS) en el medio, reducen la corriente generada por los canales $K_{ir}2.1$. [20], [30]

5.2.3. Canales catiónicos inespecíficos activados por ATP, P2X

Los receptores purinérgicos, comúnmente conocidos como purinoceptores, son una familia de proteínas de membrana plasmática implicadas en diversas funciones celulares como la reactividad vascular, la apoptosis y la secreción de citoquinas. Estos receptores, según su mecanismo de activación, se clasifican en dos clases: P1 y P2. EL tipo de receptor P1 es activado por la molécula de adenosina (ADO), mientras que la clase de receptor P2 es activada por moléculas de adenosina difosfato (ADP) o adenosina trifosfato (ATP) y consta de dos familias, P2Y y P2X. [35]

Los receptores P2X son canales catiónicos no selectivos controlados por ATP. Son una familia distinta de canales iónicos controlados por ligando activados por ATP extracelular. Se cree que son de naturaleza oligomérica y se expresan en muchas células excitables y no excitables, donde median una variedad de acciones fisiológicas, incluida la contractilidad de músculo liso o la modulación de la transmisión sináptica. [36] Hay siete subunidades P2X diferentes (P2X₁-P2X₇), cada una de las cuales se ensambla como trímeros y tiene dos dominios transmembrana insertados en la membrana plasmática, de modo que tanto los extremos amino como carboxilo están ubicados intracelularmente (**Figura 7**). [37]

El sitio de unión de ATP de los receptores P2X parece estar ubicado cerca de los dominios transmembrana. El segundo dominio transmembrana de las subunidades P2X forma el poro del canal, que es permeable a diferentes cationes. Todos los receptores P2X son canales selectivos a cationes con una permeabilidad casi igual a Na⁺ y K⁺, y una permeabilidad significativa a Ca²⁺. [37]

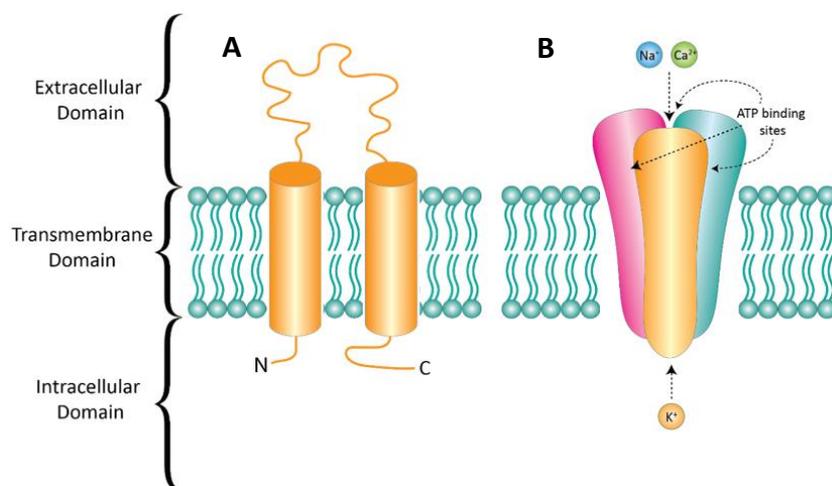


Figura 7. Esquema de los receptores P2X. **A)** Representa una subunidad monomérica del receptor P2X en la membrana plasmática. **B)** Representación de un receptor trimérico funcional P2X. Hay tres sitios de unión de ATP ubicados en el dominio extracelular entre subunidades. [38]

Los receptores P2X se expresan ampliamente. Las subunidades P2X₄, por ejemplo, se encuentran en muchos tejidos y su papel en los tejidos epiteliales y endoteliales ha creado un interés particular. Por otro lado, los receptores P2X₁ se expresan abundantemente en el músculo liso de los vasos sanguíneos y las plaquetas. [39]

Objetivos

Las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de mortalidad a nivel mundial a pesar de los avances en la prevención de los factores de riesgo y en los tratamientos médicos. Uno de los principales motivos de esta tendencia es la creciente epidemia de diabetes tipo 2 (T2DM). La diabetes está asociada con una mayor prevalencia de la enfermedad vascular, con formas más agresivas de la enfermedad y con peores resultados en las intervenciones vasculares. La diabetes se asocia con un ambiente inflamatorio crónico en el que la activación de los macrófagos hacia un fenotipo descrito como fenotipo metabólico podría contribuir a las complicaciones vasculares en la T2DM.

Estudios previos del grupo de investigación han demostrado que bloqueantes del canal de potasio Kv1.3 inhiben la proliferación de las VSMCs y que pueden ser útiles en el tratamiento de la restenosis (estrechamiento de la luz de la arteria). Además, la aplicación sistémica de dichos bloqueantes mejora la disfunción metabólica en un modelo de diabetes animal, lo que indica que debe estar actuando a nivel de otras células además de la VSMCs.

Dado que el macrófago se ha descrito como un factor relevante en la disfunción vascular y que además expresa de forma abundante el canal Kv1.3, en este trabajo nos proponemos: explorar los cambios en el fenotipo de los macrófagos asociados a la diabetes que puedan ser responsables de las complicaciones en dicha enfermedad.

Para ello, empleando ratones macho y hembras de un modelo de diabetes, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar en macrófagos el perfil de expresión de marcadores metabólicos.
- Estudiar en macrófagos el perfil de expresión del canal Kv1.3 y de otros canales iónicos relevantes para la función de los macrófagos.
- Estudiar el perfil de expresión del canal Kv1.3 en distintos tejidos del modelo murino de diabetes.

Material y métodos

1. Modelos animales

Todos de los procedimientos experimentales llevados a cabo con animales han respetado el reglamento del Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid.

1.1. Modelo de ratón diabético

Para realizar el trabajo se utilizaron muestras celulares y tisulares de animales machos y hembras de la cepa de ratones hipertensos BPH (*Blood Pressure High*) de Jackson Laboratories. Estos ratones mostraron una presión arterial media significativamente más alta en comparación con los ratones normotensos control BPN (*Blood Pressure Normal*).

Los ratones BPH fueron alimentados bien con una dieta estándar (SD) o con una dieta alta en grasas (HFD) de 12 a 24 semanas, pesándolos una vez por semana, para conseguir el modelo de ratones con factores de riesgo vascular (VRF).

Durante este periodo se midieron una serie de parámetros como el peso o la glucosa en sangre, la cual se midió una vez al mes. La presión arterial y la tolerancia a glucosa y a insulina se evaluaron cada seis semanas (**Figura 8**).

El estudio de la evolución de los parámetros anteriormente indicados mostró que, en el medio experimental creado, los efectos de la dieta alta en grasa (HFD) eran máximos cuando se llega a la semana 12, sin observar ningún cambio desde dicha semana hasta la semana 24.

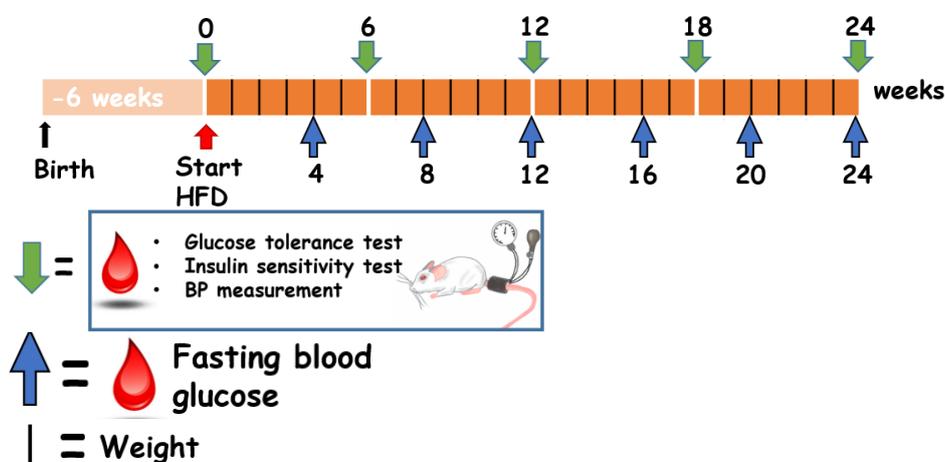


Figura 8. Esquema resumen de la obtención de ratones con diabetes y otros factores de riesgo.

Medidas de presión sanguínea

La presión arterial (PA) se midió en animales despiertos mediante un sistema de alto rendimiento CODA[®] (**Figura 9**), el cual posee un diseño de sistema que consta de un manguito de cola de ratón para mediciones de presión arterial no invasivas.

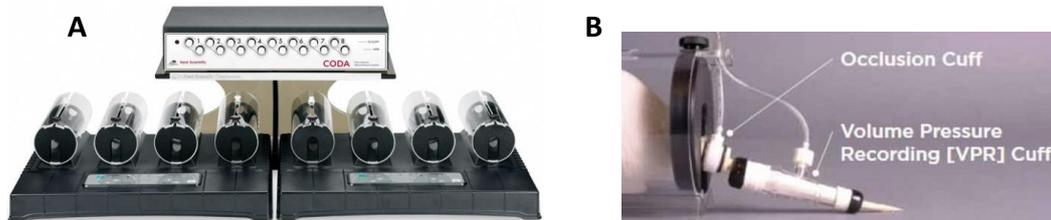


Figura 9. Sistema de presión arterial no invasivo de alto rendimiento CODA[®] (A) y cola de ratón con manguito de oclusión y la configuración del manguito VPR (B).

El manguito mencionado, colocado en la cola del ratón como se muestra en la **Figura 9.B**, permite ocluir el flujo de aire de manera que, al desinflarse, se miden las presiones arteriales sistólica y diastólica, pudiendo determinar la velocidad de los cambios en el volumen sanguíneo de la cola del animal mediante un registro de presión volumétrica.

Antes de realizar las medidas de presión, los ratones se aclimataron durante 15 minutos a 32-35°C. Las adquisiciones de datos fueron diarias durante 4-6 días consecutivos intentando que fuesen a la misma hora para asegurar datos confiables además de intentar reducir el posible estrés de los animales. Cada sesión consistió en 40 ciclos, utilizándose los 5 primeros como aclimatación y excluyéndose del análisis. Cada ciclo estaba formado por un paso de inflado a una presión máxima de oclusión de 250 mmHg, seguido de un paso de desinflado de 15 segundos.

Parámetros metabólicos

Niveles de glucosa en sangre: Se determinaron usando un glucómetro Contour[®]XT a partir de una gota de sangre obtenida de la cola del ratón. La glucosa en sangre se obtuvo en condiciones de ayuno de 16 horas y su concentración se midió en mg/dl.

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT): Se realizó para medir el aclaramiento de una carga de glucosa. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche y se les inyectó glucosa por vía intraperitoneal en una dosis de 2 gramos por kilogramo de peso corporal. Los niveles de glucosa se determinaron a tiempo 0 y a 20, 40, 60 y 120 minutos después de la inyección de glucosa. Dichos niveles de glucosa en sangre se representaron en

función del tiempo y el área bajo la curva se calculó relacionándolo con las concentraciones de glucosa en ayunas.

Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (ipITT): Se realizó para evaluar la acción de la insulina. La prueba permite evaluar la sensibilidad a la insulina a través del control del curso temporal de la disminución y recuperación de la glucosa en sangre en respuesta a una inyección de insulina. La tasa de aclaramiento refleja la acción de la insulina en tejidos, permitiendo la determinación de la sensibilidad a la insulina. A los ratones en condiciones de ayunos se les inyecta insulina humana por vía intraperitoneal a una dosis de 1 unidad por kilogramo de peso corporal. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron a tiempo 0 y 20, 40, 60 y 90 minutos después de la inyección. Los niveles medidos se presentaron como porcentaje de la concentración de glucosa basal y se representaron en función del tiempo y se calculó el área bajo la curva del mismo modo que en el caso anterior.

2. Obtención de muestras experimentales

Una vez que los parámetros del modelo animal fueron los óptimos y deseados, se procedió al sacrificio de estos. Dicho sacrificio se realizó utilizando un sistema de anestesia con isoflurano de flujo bajo (SomnoSuite™ de Kent Scientific, **Figura 10**) y la posterior decapitación. A continuación, se procedió a la extracción de las muestras deseadas.

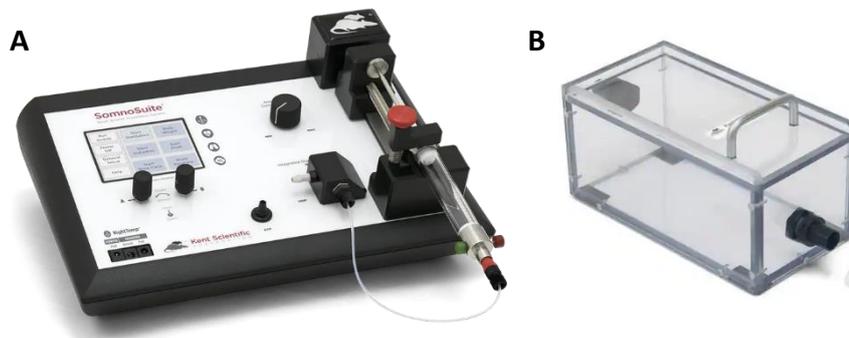


Figura 10. Equipo de anestesia Somno Suite™ Kent Scientific (A) y jaula donde se introduce al ratón para anestesiarse (B).

2.1. Tejidos

Tras el sacrificio, se extrajeron y se lavaron en una disolución de Tyrode 1X (su composición se muestra en la **Tabla 1**) para eliminar restos de sangre los tejidos grandes como el hígado y la grasa abdominal. Otros tejidos (**Figura 11**) como la arteria aorta, el músculo y el bulbo olfatorio se diseccionaron y limpiaron mediante cirugía bajo la lupa. Una vez terminada la extracción los tejidos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se guardaron en un congelador a -80°C para asegurar su correcta conservación.

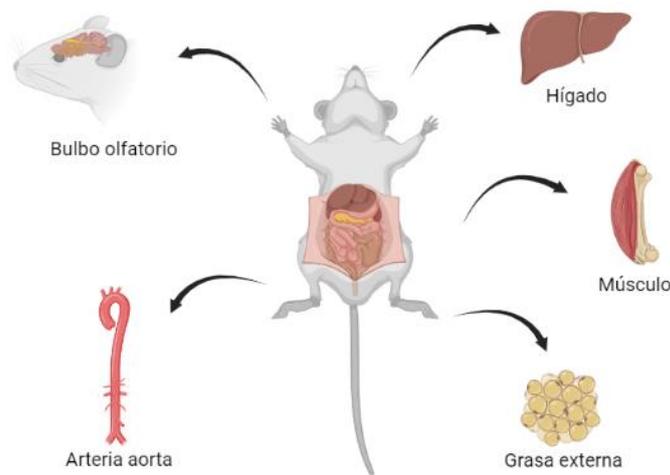


Figura 11. Esquema resumen de los tejidos extraídos del ratón sacrificado.

Tabla 1. Composición (mM) de la disolución Tyrode 1X.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN/mM
NaCl	140
KCl	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.1
Glucosa	5
Hepes (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	10

2.2. Macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM)

Para obtener los macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM, *Bone Marrow Derived Macrophages*), se separaron el fémur y la tibia del animal sacrificado, y se extrajo la cabeza del hueso a la altura de la rodilla. Los huesos se introdujeron en tubos de 0.5 mL con un pequeño orificio en el fondo, los cuales contenían 100 µL de medio RPMI con 10% de FBS (Suero Fetal Bovino), con la parte cortada hacia abajo. Luego, se introdujeron los tubos de 0.5 mL en tubos de 1.5 mL para recolectar la médula ósea por medio de una centrifugación a 3000 g durante 3 minutos. Con dicha centrifugación, se formó un sedimento en el fondo del tubo de 1.5 mL correspondiente a los glóbulos rojos y los huesos se volvieron blancos.

Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de células obtenido se resuspendió y se sembró en placas de cultivo en medio RPMI con FBS al 10 % acondicionado con sobrenadante de la línea

celular L-929 al 10%. La línea celular L-929 secreta el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) que es capaz de inducir la diferenciación a macrófagos.

Las células se mantuvieron a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de elevada humedad y con 5% de CO₂. Después de cinco días, se observó como las células comenzaron a adherirse a la placa, indicando que los precursores de la médula ósea empezaron a diferenciarse en el linaje de macrófagos. El medio se cambió en los días 5 y 7. Además, el día 8 se reemplazó el medio de cultivo por uno sin sobrenadante L-929.

El día 9, se aplicó a los ya diferenciados BMDM el tratamiento deseado, en este caso, LPS y se dejaron incubar. Al cabo de unos días, se recogió el sobrenadante y a las placas se les añadió 500 µL de TRizol®. Ambas muestras se guardaron en un congelador a -20 °C, en el caso de las que contenían TRizol®, para su posterior extracción de RNA. La cronología del protocolo se detalla en la **Figura 12**.

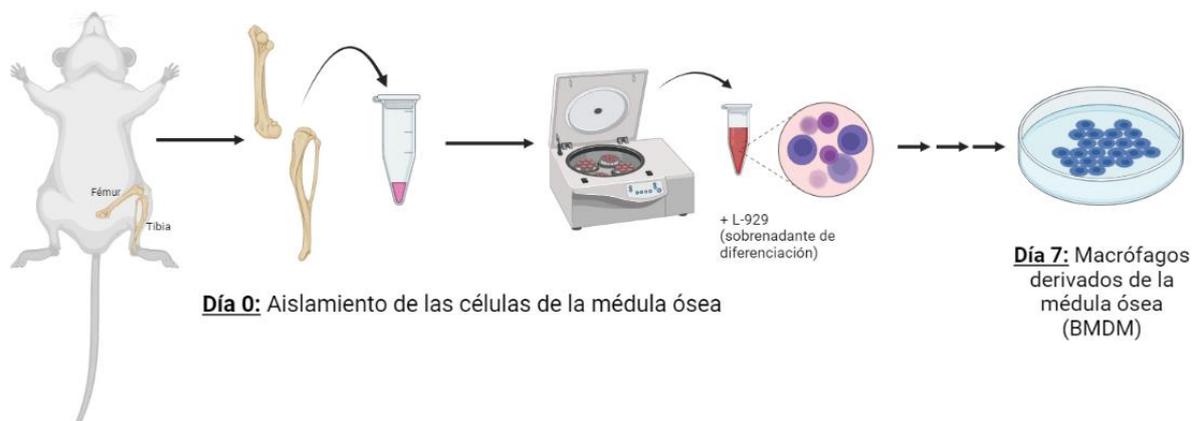


Figura 12. Esquema resumen de la obtención de BMDM.

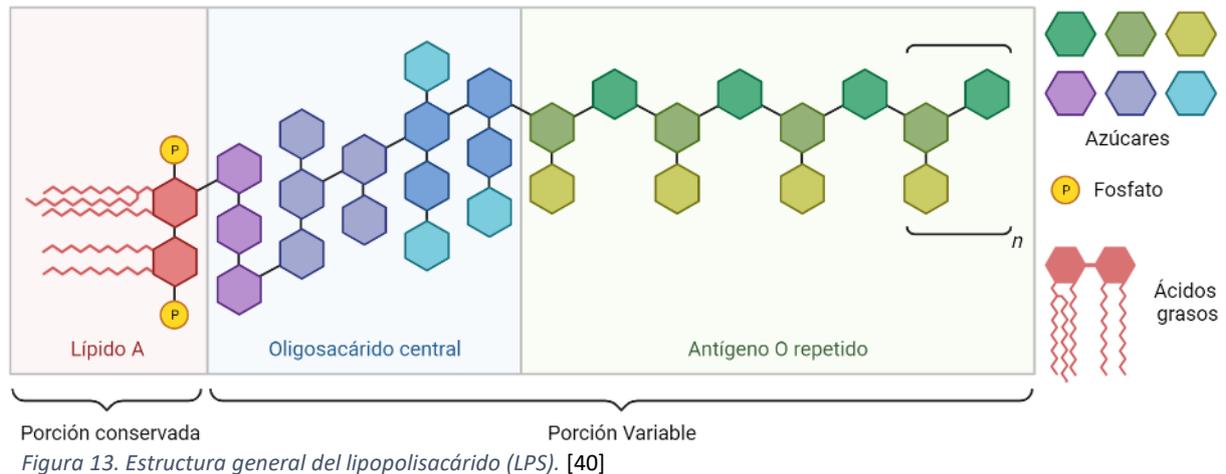
3. Tratamiento farmacológico

3.1. LPS

El lipopolisacárido (LPS) es un componente principal de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. Los LPS consisten en una porción de oligosacáridos o polisacáridos, el núcleo y el resto de antígeno O, anclados a la membrana externa de la bacteria por un resto hidrofóbico llamado lípido-A (**Figura 13**). [40]

El lípido-A se conserva estructuralmente entre las diferentes clases de bacterias y está formada por dos unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (GlcN) unidas por un enlace glucosídico β-(1→6) y fosforiladas en las posiciones 1 y 4'. El núcleo varía en la composición de

monosacáridos y, dentro de un género o familia, su estructura tiende a conservarse. La parte más externa del LPS, la cadena de polisacárido o antígeno O, se encuentra en la interfaz entre la bacteria y su entorno y es donde se encuentra la mayor heterogeneidad estructural. La enorme diversidad estructural de los antígenos O radica en la composición de los monosacáridos, la posición del enlace glucosídico, el tamaño de la unidad repetitiva y la longitud de la cadena. [40]



4. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

El estudio de la expresión génica del RNA se realizó a través de PCR cuantitativa (qPCR). El protocolo estaba formado por varios pasos consecutivos entre los que se incluían el aislamiento del RNA, la reacción de retrotranscripción o transcripción inversa para sintetizar el DNA complementario (cDNA) y la PCR cuantitativa para cuantificar la expresión.

4.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se siguió, en todos los casos, el protocolo de extracción de RNA con el reactivo TRIzol®. Dicho protocolo se basa en el aislamiento del RNA mediante un proceso de separación/extracción líquido-líquido empleando fenol-cloroformo e isocianato de guanidina.

4.1.1. Preparación de las muestras

Para las **BMDM cultivadas**, se retiró el medio y se añadieron 500 µL de TRIzol® a 4 °C.

En el caso de los **tejidos** se requiere de una homogenización física, la cual se lleva a cabo colocando las muestras en un tubo eppendorf, que contiene bolas de sílice, junto con 500 µL de TRIzol® utilizando un homogeneizador. En el caso de muestras con alto contenido en grasa, proteínas, polisacáridos o material extracelular, tras la homogenización física se requiere de

una centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C para que la muestra quede totalmente homogenizada.

Fase de separación

Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con el fin de conseguir la completa disociación de complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se añadieron 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de TRIzol®. Se agitó vigorosamente con la mano durante 15 segundos aproximadamente, se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y, por último se centrifugó durante 15 minutos a 12000 x g y a 4 °C.

La primera incubación de 5 minutos con TRIzol® permite que el isocianato de la solución fenol-isocianato conserve la integridad del RNA a la vez que rompe las células y disuelve sus componentes. La posterior adición de cloroformo consigue separar la solución en fase orgánica y acuosa, donde la fase orgánica (inferior) contiene las proteínas y la acuosa (superior) el RNA deseado. Además, se forma fase intermedia donde se encuentra el DNA.

Tras la centrifugación, la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se procedió al aislamiento de RNA.

4.1.2. Aislamiento de RNA

A la fase acuosa de cada muestra se le añadió 0.5 mL de isopropanol al 100% por cada mililitro de TRIzol® utilizado en la homogeneización. Se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 x g y 4 °C durante 10 minutos. El RNA no es soluble en isopropanol por lo que, al añadirlo y centrifugar, el RNA se deposita en el fondo del eppendorf. Tras la centrifugación, cuando el contenido de RNA en la muestra es elevado, es visible un pequeño pellet en el fondo del tubo.

4.1.3. Lavado de RNA

El sobrenadante que se formó tras la última centrifugación se retiró, con cuidado, por inversión y se añadió en torno a 1 mL de etanol al 75% por cada mililitro de TRIzol® utilizado. Se centrifuga durante 5 minutos a 7500 x g y 4 °C. Tras ello, de nuevo se retiró el sobrenadante por inversión y se dejó secar el tubo durante 1-2 horas, hasta que todo el etanol se evaporase. Por último, una vez que el RNA estaba seco, se resuspendió en agua libre de RNAsas y se incubó durante 5 minutos a 60 °C para medir su densidad óptica.

La cuantificación y verificación de la calidad del RNA se realizó mediante la medida de la densidad óptica a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific). La concentración de RNA se calcula utilizando la ley de Lambert-Beer, la cual permite correlacionar la absorbancia con la concentración a través de la expresión: $A = \varepsilon \cdot b \cdot c$ donde A es la medida de absorbancia, ε el coeficiente de absorción molar (en $M^{-1} cm^{-1}$), b el camino óptico (en cm) y c la concentración de RNA, en este caso (en mol/L). Para conseguir medir la concentración de ácidos nucleicos, la ecuación de Lambert-Beer se reorganiza quedando: $c = A \cdot \varepsilon / b$, donde ε tiene un valor de $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y $b = 1 \text{ cm}$.

La calidad del RNA se determina a través de los ratios de absorbancias a A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , utilizando valores de absorbancia normalizada y corregida en línea de base a 230 nm y 280 nm. Los valores de absorbancia a 260 nm, 280 nm y 230 nm se utilizan para calcular los índices de pureza de los ácidos nucleicos medidos. Dichos índices de pureza son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra, como los disolventes y reactivos residuales que se utilizan en la purificación de la muestra; de forma que un valor próximo a 2.0 es considerado como RNA de alta pureza y valores por debajo de 2.0 indican contaminación por proteínas o compuestos fenólicos.

4.2. Síntesis de cDNA

Antes de proceder con la síntesis del DNA complementario (cDNA) se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa para eliminar los posibles restos contaminantes de DNA genómico presentes en las muestras. Para ello, las muestras de RNA se incubaron con la enzima DNAsa en el termociclador durante 30 minutos a 37°C . A continuación, la enzima se eliminó con DRR (*DNAsa Removal Reagent*) al 10% del volumen de reacción, un reactivo que se une a la DNAsa y permite eliminarla. Las muestras con el DRR se centrifugaron para que el DRR junto con la DNAsa precipitase y se recogió el sobrenadante que contiene el RNA libre de DNA y de DNAsa.

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de los sobrenadantes recogidos, utilizando un buffer 5X, dNTPs 10 mM, un inhibidor de RNAsa 20 U/ μL , random hexámeros 50 μM y la enzima retrotranscriptasa M-MLV 200 U/ μL . El cDNA producido con random hexámeros permite mantener la proporción de RNA presente en la reacción. El programa utilizado fue el que se muestra en el esquema de la **Figura 14**.

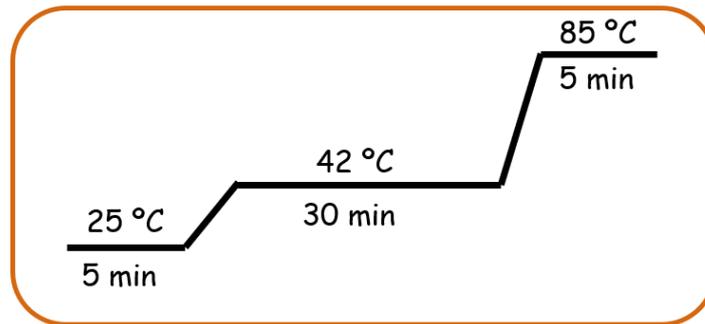


Figura 14. Programa seguido para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción.

4.3. PCR cuantitativa (qPCR)

Finalmente, el cDNA se utilizó como molde para la amplificación mediante qPCR para obtener los datos de expresión de RNA de los genes de interés.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, también llamada qPCR, permite determinar con precisión la concentración de los fragmentos moleculares objetivo. La amplificación del fragmento de DNA o RNA objetivo se detecta en tiempo real durante todo el proceso de PCR utilizando indicadores de fluorescencia.[41] Implica varias etapas, incluyendo la amplificación de la muestra, la detección de la fluorescencia y la cuantificación de la muestra.

A diferencia de las PCR convencionales, la qPCR monitoriza la amplificación de la molécula de ADN problema durante cada ciclo de amplificación y no al final. Esto se consigue mediante reactivos fluorescente, llamados fluorocromos, y termocicladores, los cuales poseen un sensor para medir la fluorescencia durante unos breves segundos en un momento concreto de cada ciclo, permitiendo ver cómo avanza la reacción en cada ciclo. Por el contrario, la PCR convencional es una técnica de punto final, es decir, solo puede verse el resultado una vez haya terminado la reacción.

Se aplican ciclos regulados de calentamiento y enfriamiento para permitir la amplificación de un fragmento de ácido nucleico, seguido de una detección cuantitativa de los productos mediante fluorescencia, para determinar la cantidad original de material genético en la muestra.

La PCR se lleva a cabo con ayuda de cebadores complementarios o “*primers*”, secuencias de ácidos nucleicos específicas que se unen al material genético sin amplificar. Coinciden específicamente con el fragmento a amplificar y establecen la dirección de replicación. Se

combinan con la enzima DNA polimerasa, permitiendo que la cadena de ácido nucleico aumente en forma de copias. Estas reacciones sucesivas se llevan a cabo en los denominados ciclos en los cuales, los productos de la PCR amplificados aumentan exponencialmente hasta alcanzar niveles significativos.

Dependiendo de los fluorocromos utilizados, puede distinguirse entre dos tipos de qPCR: TaqMan y SYBR Green.

4.3.1. qPCR con ensayo TaqMan

Los ensayos TaqMan utilizan un par de cebadores o *primers* y una sonda no extensible. La sonda es un oligonucleótido específico de secuencia corta, diseñada de manera que hibrida con una región específica de DNA que va a ser amplificada por un par de oligonucleótidos específicos denominados cebadores o *primers*. Un extremo de la sonda, normalmente en 5', se marca con un fluoróforo o tinte fluorescente, mientras que el otro extremo, el 3', se marca con un *quencher* o desactivador de fluorescencia. El fluoróforo y el *quencher* forman un par FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) donante-aceptor (**Figura 15**). [42]

A medida que avanza la amplificación, la sonda TaqMan se hibrida con la secuencia objetivo de uno de los *primers*, formando una unidad eficaz. [42] A medida que la Taq polimerasa sintetiza la cadena en sentido 5'-3', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda TaqMan ya hibridada al DNA. La degradación de la sonda separa el fluoróforo, rompiendo la unión de este con el *quencher*, permitiendo la emisión de fluorescencia. La señal de fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de producto qPCR acumulado. [42]

Por tanto, un ensayo TaqMan se trata de un sistema de tres oligonucleótidos donde la sonda, como tercer oligonucleótido, introduce un nivel adicional de especificidad en el ensayo. [42]

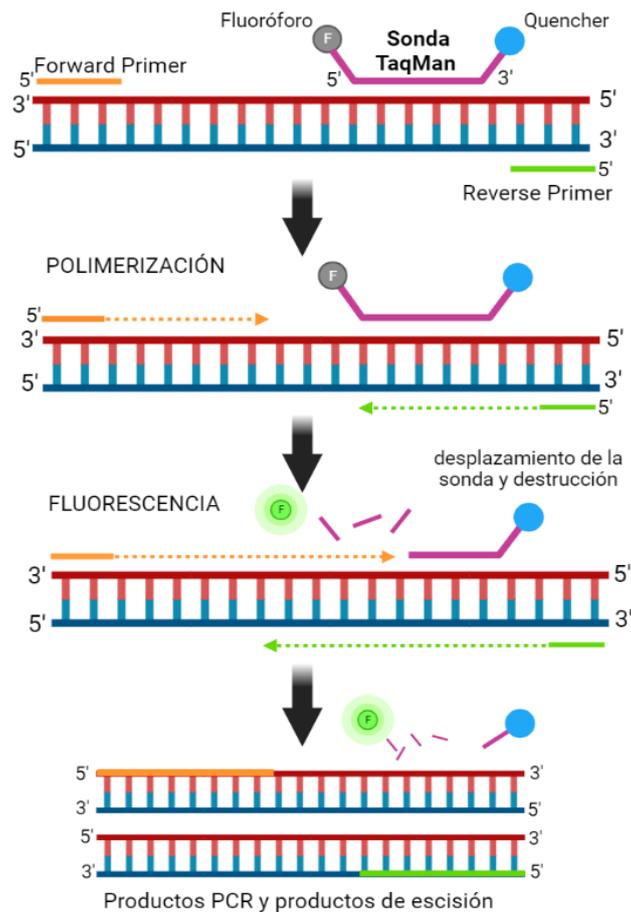


Figura 15. Esquema resumen del proceso de actuación de ensayo TaqMan.

Para llevar a cabo la preparación de la reacción de qPCR con ensayo TaqMan se mezclan la Master Mix (TaqMan™ Fast Advance Master Mix; Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), que contiene la polimerasa, los nucleótidos (dNTPS), el buffer y el MgCl₂ necesario para la reacción, los cebadores o *primers* (*Forward* y *Reverse*), la sonda TaqMan, la muestra de cDNA y agua libre de nucleasas en los volúmenes indicados en la **Tabla 2**. En todos los experimentos se incluyó un control negativo llamado “*No Template Control*” (NTC), que contenía todos los reactivos excepto cDNA.

Las reacciones qPCR con ensayo TaqMan siguieron un protocolo que consistía en 15 minutos a 95 °C donde se producía la activación de la enzima polimerasa, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C correspondientes con los pasos de desnaturalización del DNA y 60 segundos a 60 °C de hibridación y elongación. Al final de cada ciclo se hace una lectura de la señal emitida por el fluoróforo (**Figura 16**).

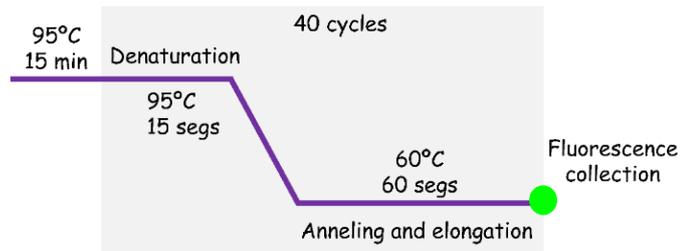


Figura 16. Esquema del protocolo qPCR con ensayo TaqMan.

4.3.2. qPCR con SYBR Green

Mientras que en los ensayos TaqMan la emisión de una señal fluorescente se produce únicamente cuando la sonda interactúa con la secuencia de nucleótidos específica, como ya se ha explicado en el apartado anterior, el ensayo SYBR Green emite una señal fluorescente cuando el fluoróforo, que en este caso no está unido a ninguna sonda, entra en contacto con cualquier secuencia de nucleótidos de doble cadena. Dado que el fluoróforo se intercala con cualquier secuencia de nucleótidos de doble cadena, pueden detectarse falsas señales que se producen por la presencia de dímeros de *primers*, bucles en la horquilla o por la amplificación de productos no específicos, disminuyendo la especificidad. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se sigue el protocolo de qPCR adecuado y los *primers* se diseñan cuidadosamente, los ensayos de detección basados en SYBR Green logran resultados con un rendimiento muy similar a los obtenidos con los ensayos TaqMan.[43]

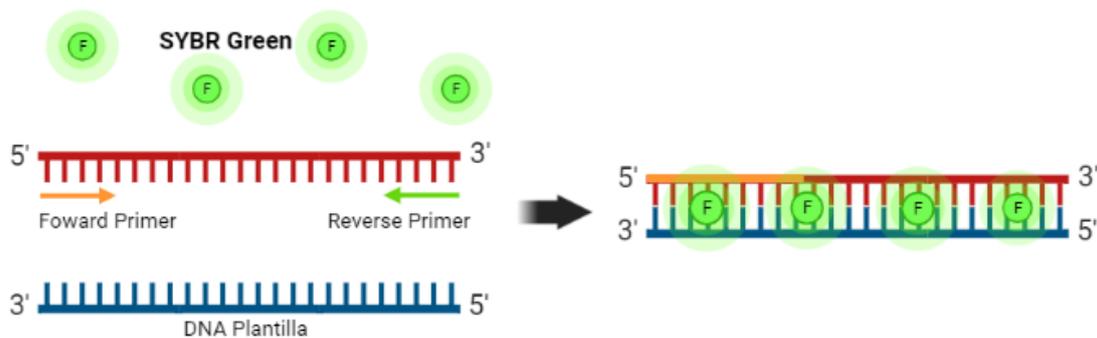


Figura 17. Esquema resumen del proceso de actuación de ensayo SYBR Green

Para realizar la qPCR con SybrGreen se utilizó la MasterMix (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix; Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) que contiene la enzima DNA polimerasa, los nucleótidos, el buffer de trabajo y el colorante SybrGreen; cada uno de los *primers* de cada gen a amplificar, la muestra de cDNA y agua libre de nucleasas en los volúmenes indicados en la **Tabla 2**. De nuevo, en este tipo de ensayos se utilizó un “No Template Control” (NTC), para

comprobar la no existencia de contaminantes durante la reacción. En la **Figura 18** que se muestra a continuación, se detalla el protocolo seguido para una qPCR con SybrGreen.

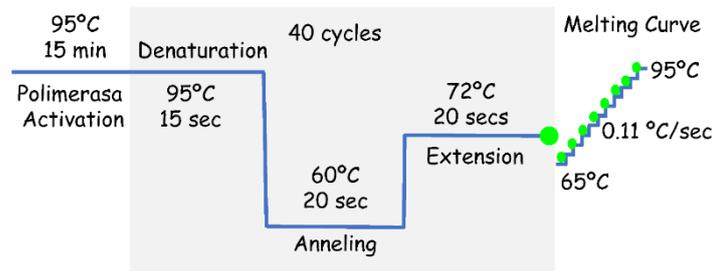


Figura 18. Esquema del protocolo qPCR con ensayo SybrGreen.

Tabla 2. Tabla resumen de los volúmenes necesarios para llevar a cabo una qPCR con cada uno de los ensayos.

VOLÚMENES PARA LA PREPARACIÓN DE UNA qPCR		
COMPONENTES	ENSAYO TaqMan	ENSAYO SYBR Green
MasterMix 10X	10 µL	10 µL
Primer Forward (10 µM)	1 µL	1 µL
Primer Reverse (10 µM)	1 µL	1 µL
Sonda TaqMan (4 µM)	1 µL	-
cDNA	1 µL	1 µL
Agua	6 µL	7 µL
Volumen total	20 µL	20 µL

El colorante SybrGreen es capaz de unirse a cualquier DNA de doble cadena, por tanto, al final de los ciclos de PCR se realizó una curva de *Melting*, como se muestra en la **Figura 18**, verificando así la especificidad de la reacción y descartar la amplificación de fragmentos no deseados.

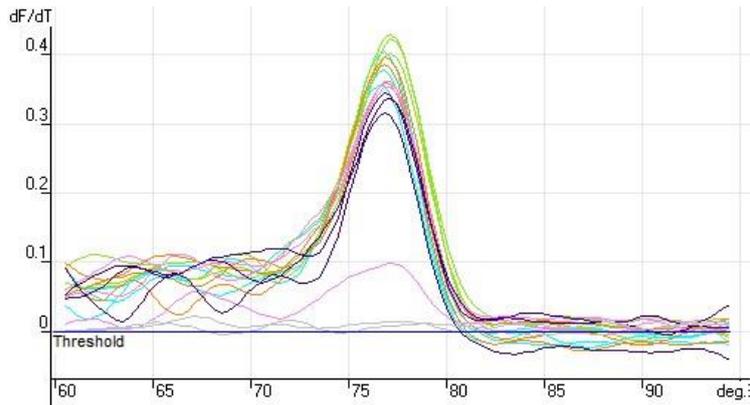


Figura 19. Ejemplo de una curva de Melting obtenida al final de una qPCR con SYBR Green.

En el gráfico de la **Figura 19** se muestra la primera derivada negativa del cambio de fluorescencia con respecto a la temperatura ($-dF/dt$). En la figura se observa un pico que destaca por encima del resto. Este pico se corresponde con la Temperatura de Melting (T_m), temperatura a la cual se emite una señal de fluorescencia que indica que el 50% del DNA se encuentra como DNA monocatenario, de una sola cadena; es decir, la mitad del DNA se ha desnaturalizado. La T_m es específica de cada ensayo y depende del tamaño del producto amplificado y de la temperatura a la que se lleva a cabo el anillamiento. Cuando la reacción con SybrGreen ha sido específica, dicho pico debe ser único ya que eso significa que solo existe un único producto de amplificación.

5. Método de cuantificación relativo y análisis estadístico

Los dos métodos más utilizados para analizar los datos de experimentos de qPCR son la cuantificación absoluta y la relativa. La cuantificación absoluta determina el número de copias de entrada (en valor absoluto) relacionando la señal de PCR con una curva estándar. Para obtener una curva estándar se necesitaría tener copias del gen para hacer diluciones seriadas, así como una curva patrón distinta para cada gen. Todo esto es difícil de conseguir, además del gasto económico y temporal que conlleva. La cuantificación relativa relaciona la señal de PCR del transcrito objetivo con la señal de otra muestra que se utiliza como control. Para la cuantificación relativa se utiliza el método del $\Delta\Delta C_t$ [44] que utiliza el valor de C_t (*Cycle Threshold* o ciclo en el umbral) para calcular los valores de expresión.

Al representar en un gráfico la fluorescencia emitida en función del número de ciclos de la reacción, el valor de C_t se corresponde con el número de ciclos en el que la fluorescencia

emitida supera el umbral marcado (**Figura 20**). Se obtiene a partir de las curvas de amplificación, estableciendo un umbral sobre la señal de fondo y dentro de la fase exponencial de la curva.

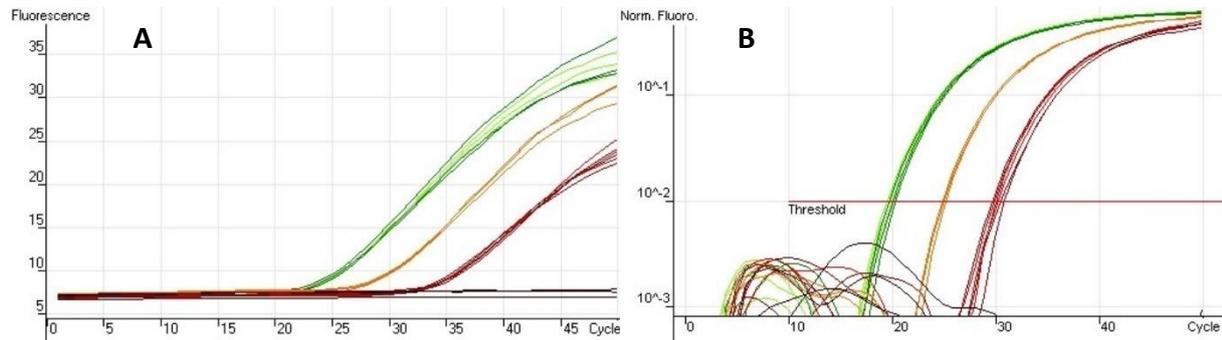


Figura 20. Ejemplos de gráficas de fluorescencia en función del tiempo obtenidas en qPCR. A) Fluorescencia absoluta. B) Normalización en escala logarítmica. La línea roja representa el umbral o threshold.

Aplicando el método $\Delta\Delta Ct$, la abundancia relativa se calcula a partir de $2^{-\Delta Ct}$ donde:

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

El control endógeno puede asemejarse con un blanco, su expresión no se ve afectada por la variable de estudio. Durante todo el estudio, como control endógeno se emplea el gen de la proteína ribosomal L18 (RPL18).

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

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

Para las comparaciones en este estudio, la mayoría de las veces se ha designado como muestra calibradora bien la condición "Control" a la hora de comparar la expresión de una muestra sin tratar y otra tratada con LPS, o bien la condición "Machos" a la hora de comparar la expresión de un gen en ratones macho y ratones hembra.

5.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel, comparando las diferencias entre grupos utilizando la prueba T-Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) o $p < 0.001$ (***)

Resultados

1. Obtención de un modelo de ratón con diabetes

Los pacientes diabéticos representan un grupo con alta incidencia de enfermedades cardiovasculares que presenta además un peor pronóstico en su evolución y tratamiento. Este pronóstico empeora cuando conviven, junto con la diabetes, otros factores de riesgo vascular como la obesidad y la hipertensión. Con el fin de cumplir con los objetivos propuestos en el trabajo, se busca desarrollar un modelo de ratón con diabetes acompañado de otros factores de riesgo vascular.

La cepa de ratones hipertensos (BPH) desarrolla una hipertensión leve similar a la hipertensión más común que afecta a la población. Se alimenta a los ratones BPH con una dieta rica en grasas (HFD) durante 12 semanas aumentando así su riesgo cardiovascular y se monitoriza a lo largo de las semanas (ver **Figura 8**) el aumento de peso, la presión arterial y ciertos parámetros metabólicos tales como los niveles de glucosa en sangre y pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina.

Aumento de peso: El diferente aumento de peso entre ambas condiciones se refleja de manera evidente en la **Figura 21.A**. Cuando se compara el peso de los ratones BPH alimentados con una dieta estándar (SD) y una dieta alta en grasa (HFD), entre la semana 0 y la semana 12, los ratones HFD consiguen un aumento de peso ($12,5 \pm \text{ESM g}$) mayor que los ratones SD ($5,0 \pm \text{ESM g}$).

Presión arterial: La presión arterial se midió periódicamente cada 6 semanas. En la **Figura 21.B** se observa que, en la semana 12, los valores BPH son significativamente mayores que los valores de presión arterial en ratones BPN. Además, no existen diferencias en la presión arterial entre dietas en ratones BPH.

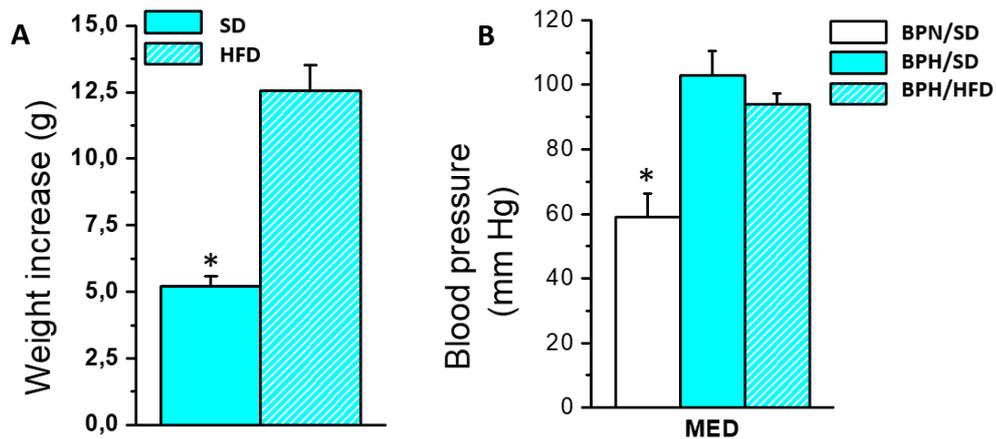


Figura 21. **A)** Gráfico que muestra el peso a las 12 semanas de ratones BPH alimentados con SD o HFD. Media \pm ESM. **B)** Gráfico que muestra la presión arterial inicial y a las 12 semanas de ratones BPN/SD, BPH/SD y BPH/HFD. Media \pm ESM. (*) $p < 0.05$ los ratones BPN/SD frente a los BPH/SD.

Metabolismo de la glucosa: La glucosa en sangre en ayunas se determina después de un ayuno de 18 horas a partir de una muestra de sangre obtenida de la vena de la cola. Los niveles de glucosa aumentan significativamente en ratones HFD en comparación con ratones SD a las 12 semanas, así como comparando con el valor tomado inicialmente (en la semana 0). **Figura 22.**

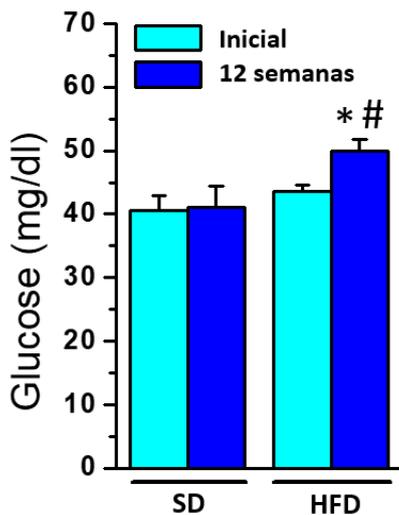


Figura 22. Glucosa en sangre en ayunas determinada al inicio de la HFD y a las 12 semanas, tras 18 horas de ayuno y mediante una gota de sangre de la vena de la cola. Los datos son la media \pm ESM. * $p < 0.05$ la medida a las 12 semanas respecto a la medida inicial. # $p < 0.05$ la medida a las 12 semanas de HFD con respecto a SD.

Ambos ratones HFD y SD, se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT). Después de una inyección intraperitoneal de carga de glucosa en animales en ayunas, se determinó la glucosa en sangre cada 20 minutos para explorar el curso del tiempo de eliminación de glucosa. Como se observa en la **Figura 23.A** En las curvas de ipGTT obtenidas a las 12 los ratones HFD tiene un pico más alto de concentración de glucosa en sangre después de las inyecciones de glucosa y necesitan más tiempo para bajar la glucosa en sangre. Estos datos muestran que los ratones HFD se vuelven intolerantes a la glucosa tras 12 semanas ingiriendo una dieta alta en grasa.

Por otro lado, también se realiza la prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (ipITT). A los animales que no estaban en ayunas, se les inyectó insulina intraperitonealmente y se midieron los niveles de glucosa en sangre a tiempo cero y cada 20 minutos tras la inyección de insulina. En la curva ipITT (**Figura 23.B**) se observa que los ratones HFD presentan una mayor resistencia a la insulina en comparación a los ratones SD, puesto que los niveles de glucosa no disminuyeron al nivel de los BPH/SD.

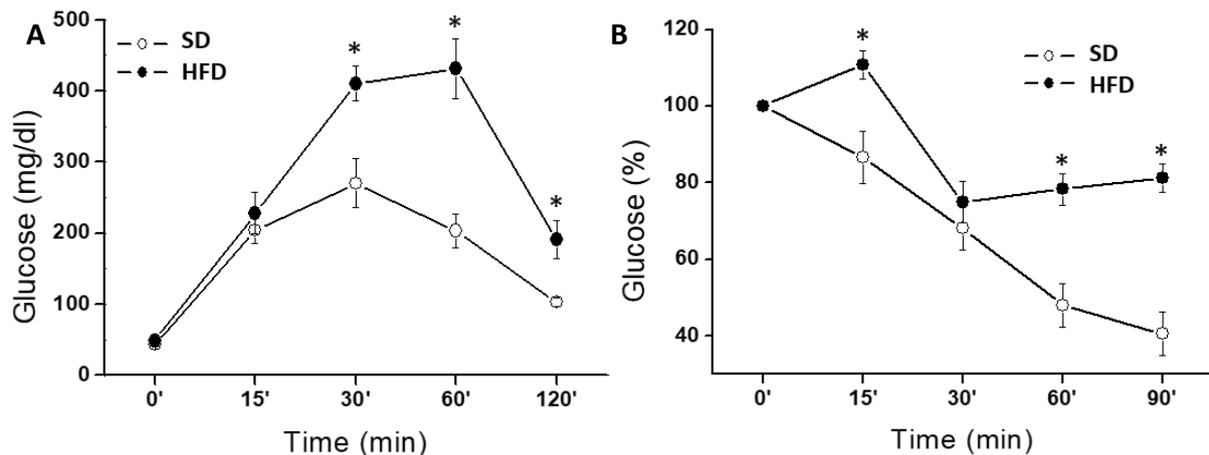


Figura 23. A) Curva de ipGTT a las 12 semanas de ratones BPH SD y HFD. B) Curva de ipITT a las 12 semanas de ratones BPH SD y HFD. Los gráficos muestran el transcurso del tiempo del nivel de glucosa en sangre después de una inyección de glucosa en animales en ayunas. * $p < 0.05$ medida en ratones HFD con respecto a ratones SD.

En conjunto, todos estos datos muestran que los ratones BPH en HFD se vuelven obesos y diabéticos (muestran niveles altos de glucosa basal, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina) y permanecen hipertensos.

2. La expresión de marcadores metabólicos en macrófagos

Los macrófagos juegan un papel fundamental en muchos procesos inmunológicos, orquestan la inflamación en muchas enfermedades y contribuyen de manera clave a la inflamación y la resistencia a la insulina inducida por la obesidad. Según su función inmunológica, los macrófagos se pueden dividir en un subtipo M0, no activados; un subtipo M1 proinflamatorio, activados clásicamente; y M2 antiinflamatorio, activados alternativamente. Se ha observado que, durante el aumento de peso, los macrófagos experimentan un “cambio fenotípico” de un fenotipo M2 a un estado M1, una conversión que se ha relacionado con la aparición de resistencia sistémica a la insulina. [45], [46]

La eficacia de diferenciación se analiza a través de los marcadores M1 establecidos como TNF- α (factor de necrosis tumoral) y NOS2 (óxido nítrico sintasa 2), así como los marcadores

M2 Arg1 (arginasa-1) o Irf4 (factor regulador de interferón 4). [46] En este contexto, estímulos proinflamatorios como el LPS promueven la polarización M1, mientras que estímulos como la interleucina-4 (IL-4) promueven la polarización antiinflamatoria M2. Los mecanismos que subyacen a la transición entre un fenotipo y otro y la firma correspondiente de los marcadores de superficie celular no son muy conocidos. Además, varios estudios describen un fenotipo M1/M2 “mixto” para ratones obesos, lo que sugiere que los macrófagos adoptan estados más complejos *in vivo*. [45]

Estudios han demostrado que los macrófagos con dicho fenotipo mixto no son capaces de expresar los marcadores típicos de los macrófagos activados clásicamente. Sin embargo, ciertas proteínas de la superficie celular, incluyendo CD36, ABCA1, PLIN2, fueron sobreexpresadas por estos macrófagos con fenotipo mixto. [45]

De acuerdo con toda esta evidencia, se lleva a cabo el estudio de la expresión de los marcadores de fenotipo M1 típicos, TNF- α y NOS2. Además, se propone a la proteína CD36, un transportador de ácidos grasos de macrófagos, como posible marcador metabólico del fenotipo mixto anteriormente mencionado.

Para ello, se han realizado una serie de qPCR con muestras de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) provenientes de ratones y ratonas SD y HFD. Para cada muestra, se han estudiado dos condiciones: una condición control donde los BMDM no han sido estimulados (M0) y una segunda condición donde los BMDM han sido tratados y activados con LPS (M1). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

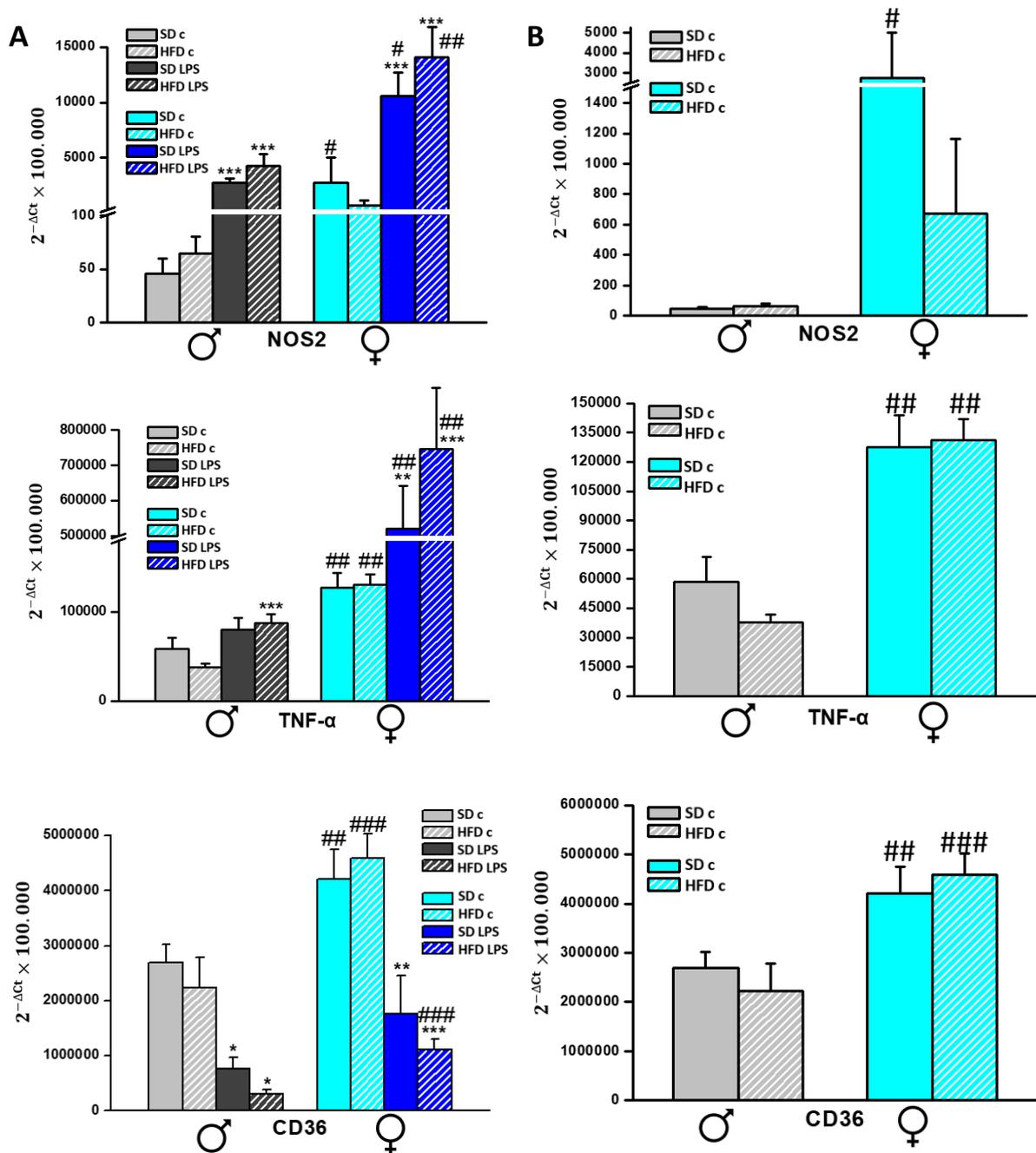
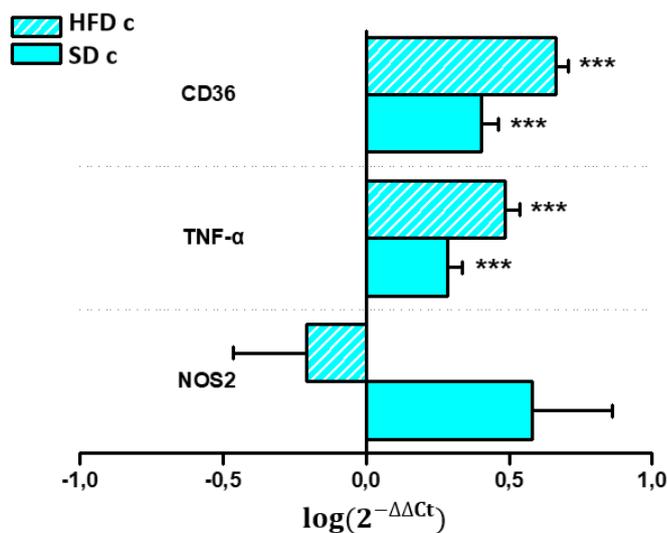


Figura 24. Abundancia relativa de los marcadores de fenotipo metabólico. (A) Expresión de los marcadores en ratones y ratonas BPH/SD y BPH/HFD en condición control y con LPS. Los datos son la media \pm ESM. (B) Expresión de los marcadores en ratones y ratonas BPH/SD y BPH/HFD en condición control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ HFD con respecto a la dieta SD. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ o ### $p < 0.001$ hembras con respecto a machos.

En la **Figura 24.A** se observa que, de acuerdo con lo descrito en la literatura [45] la estimulación de los macrófagos con LPS aumenta significativamente la expresión de la citoquina (proinflamatoria) TNF- α y de la enzima NOS2. Esto sucede tanto en SD como en HFD y no hay diferencias entre dietas en este cambio. Esto apoya el empleo de estos genes como marcadores de M1. Sin embargo, con la expresión de CD36 ocurre lo contrario; la activación

con LPS conlleva una disminución significativa de su expresión [47] y en este cambio no hay diferente entre dietas. En la **Figura 23.B** están representados solo los datos de macrófagos sin estimular de machos y hembras con las distintas dietas y de, esta forma, se evidencia que no se observan diferencias significativas entre dietas, pero sí una expresión significativamente mayor en hembras con respecto a machos, tanto en SD como en HFD. Esto nos lleva a comparar las diferencias en la expresión relativa entre machos y hembras, que se muestra a continuación.



*Figura 25. Diferencias en la expresión relativa en hembras con respecto a machos en macrófagos M0. Los datos son la media ± ESM. Las barras hacia la derecha indican un aumento (hacia la izquierda indicarían disminución) en la expresión de los marcadores en hembras con respecto a machos tanto en dieta SD como HFD. Un valor de 1.0 indica un aumento de 10 veces la expresión de mRNA en hembras con respecto a machos, y un valor de 0.5 un aumento de 3.2 veces. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ cambio en la expresión en hembras con respecto a machos.*

En la **Figura 25** puede apreciarse un aumento significativo en la expresión de TNF- α y CD36 en hembras con respecto a machos. Además, se observa una tendencia mayor en HFD que en SD. Por el contrario, en NOS2 los cambios no son significativos, además de observar que la expresión en HFD disminuye (en torno a 0.2) con respecto a los machos, algo contradictorio en comparación con los datos que se muestran en las Figuras 22.A y 22.B. Esta contradicción puede deberse al gran error que acarrearán estos datos debido a la enorme variabilidad en los resultados obtenidos entre muestras.

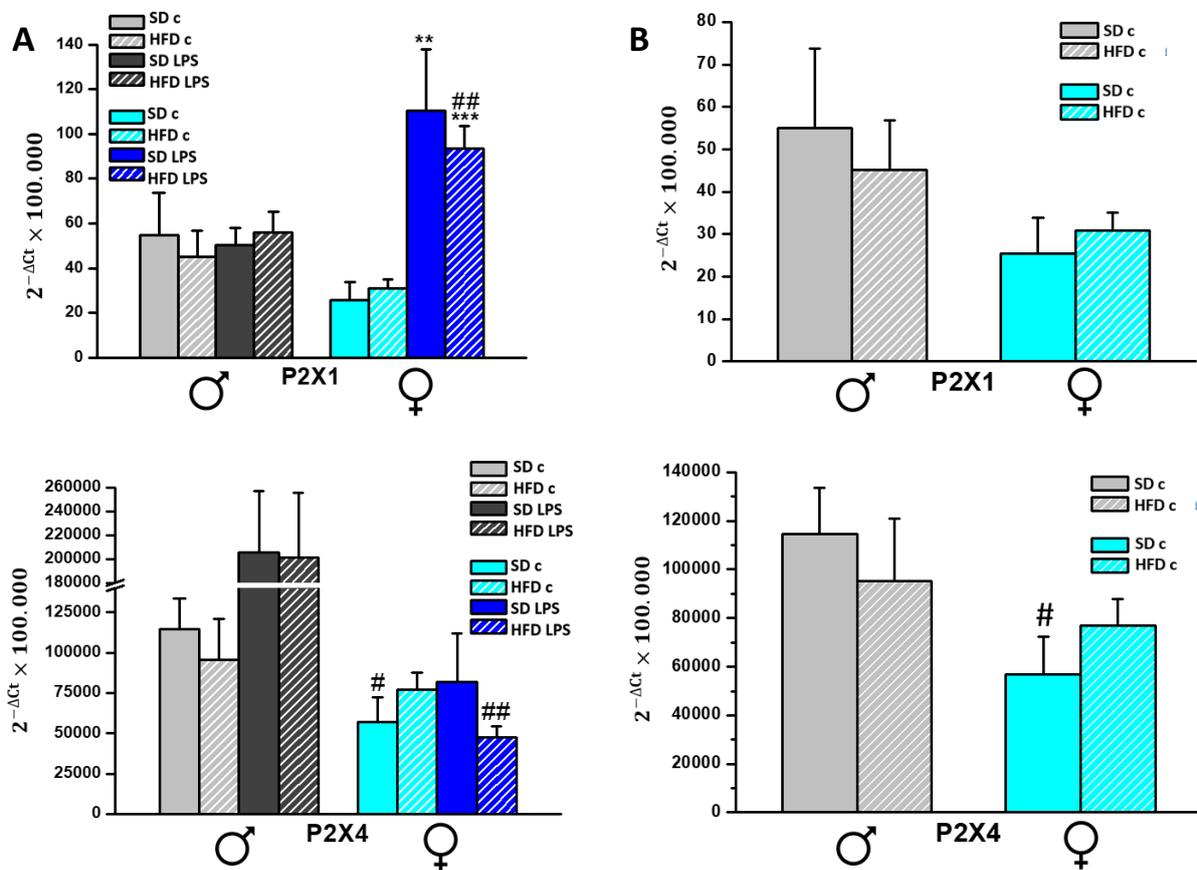
3. La expresión de canales iónicos en macrófagos

3.1. Receptores purinérgicos, P2X

Diferentes estímulos dentro de la matriz extracelular promueven a los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio. Los nucleótidos extracelulares, como el ATP, actúan como señales de daño, organizando una respuesta inflamatoria a través de los receptores purinérgicos. El perfil de expresión de estos receptores en macrófagos define de forma única su respuesta frente a los nucleótidos del entorno celular. [46]

Varios estudios demuestran que los BMDM expresan un repertorio único de receptores purinérgicos, el cual es muy flexible y se adapta rápidamente a la diferenciación de macrófagos pro y antiinflamatorios. Además, se destaca el potencial del receptor purinérgico P2X₇ como posible nuevo marcador de polarización de macrófagos. [46]

Conociendo estos datos, se propone el estudio de la expresión de mRNA de ciertos receptores purinérgicos (P2X₄, P2X₇ y P2X₁) en BMDM de ratones macho y hembras SD y HFD a través de la técnica molecular qPCR. De nuevo, para cada muestra, se han estudiado la condición control donde los BMDM no han sido estimulados y la condición donde los BMDM han sido tratados y activados con LPS.



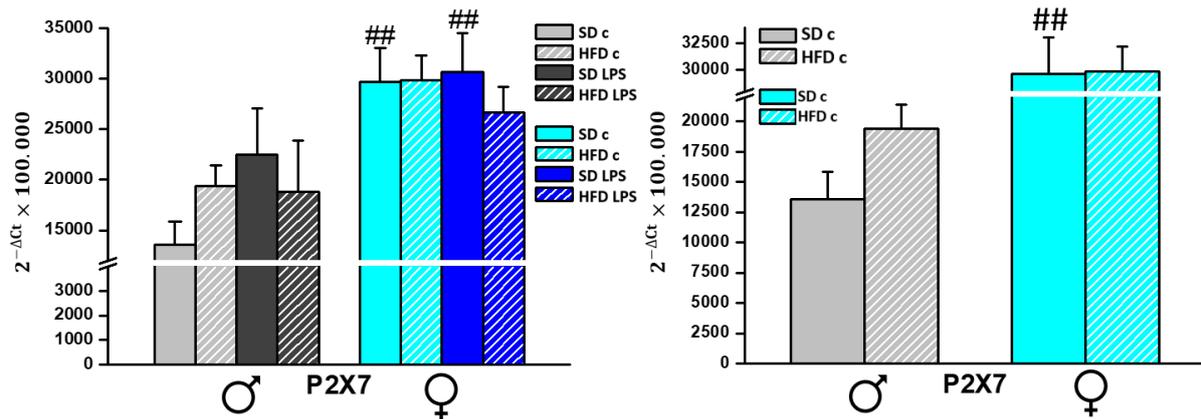


Figura 26. **Abundancia relativa de los receptores purinérgicos.** (A) Expresión de los receptores purinérgicos en ratones y ratonas BPH/SD y BPH/HFD en condición control y con LPS. (B) Expresión de los receptores purinérgicos en ratones y ratonas BPH/SD y BPH/HFD en condición control. Los datos son la media \pm ESM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ HFD con respecto a la dieta SD. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ hembras con respecto a machos.

Observando la **Figura 26.A** se aprecia que la estimulación con LPS no provoca ningún efecto significativo a excepción del P2X₁, donde el aumento de su expresión en hembras es grande y significativo. En el caso de la **Figura 26.B**, de nuevo no se aprecia ningún cambio significativo entre dietas.

De nuevo, al igual que sucedía en el caso de los marcadores, las únicas diferencias a remarcar son las que existen en la expresión de los receptores entre machos y hembras, por lo que se estudian, a continuación, las diferencias en la expresión relativa entre machos y hembras.

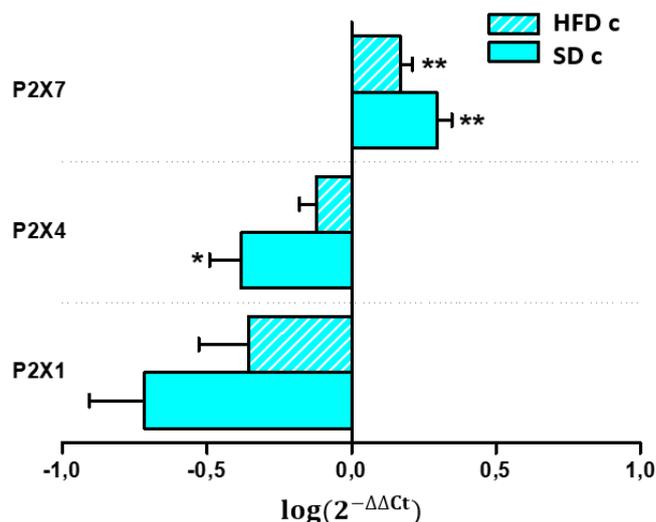


Figura 27. **Diferencias en la expresión relativa de receptores purinérgicos en hembras con respecto a machos en macrófagos M0.** Los datos son la media \pm ESM. Las barras hacia la derecha indican un aumento (hacia la izquierda indicarían disminución) en la expresión de los marcadores en hembras con respecto a machos tanto en dieta SD como HFD. Un valor de 1.0 indica un aumento de 10 veces la expresión de mRNA en hembras con respecto a machos, y un valor de 0.5 un aumento de 3.2 veces. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ cambio en la expresión en hembras con respecto a machos.

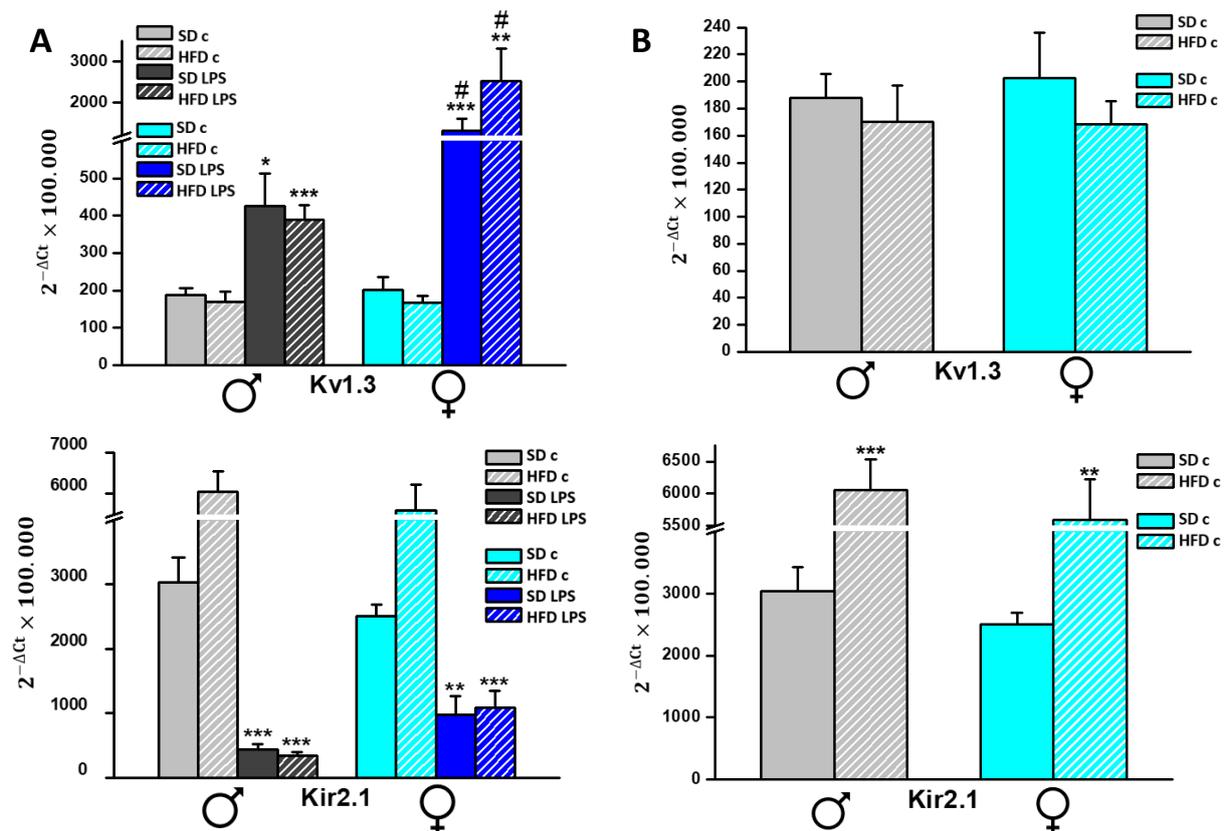
Con relación a la **Figura 27**, se observa que la expresión de los receptores P2X₁ y P2X₄ tiende a disminuir en hembras con respecto a los machos, siendo la disminución mayor en ratonas SD que HFD, aunque el cambio solo es significativo en el caso de P2X₄ con dieta SD. En cambio, en

el caso del receptor P2X₇, la expresión en hembras aumenta de forma significativa con ambas dietas.

3.2. Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de potasio dependientes de voltaje están asociados con funciones de macrófagos tales como la migración, proliferación, activación y producción de citoquinas. Estudios anteriores evidencian que los BMDM expresan, entre otros, los canales Kv1.3, K_{ir}2.1 e IK1 [19], [48] que han sido relevantes en la función de este tipo de células, por lo que en este trabajo se estudia cuál es su expresión en el modelo de ratón diabético obtenido.

Al igual que en los apartados anteriores, se lleva a cabo el estudio de la expresión de mRNA de los canales iónicos dependientes de voltaje Kv1.3, K_{ir}2.1 e IK1 en BMDM de ratones macho y hembras SD y HFD mediante qPCR. En cada muestra se han estudiado la condición control (M0) donde los BMDM no han sido estimulados y la condición M1, donde los BMDM han sido tratados y activados con LPS.



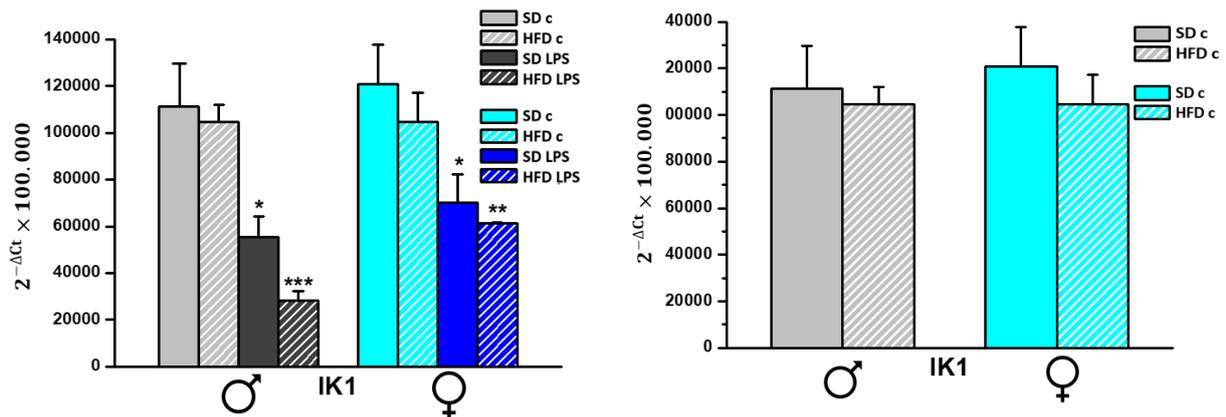


Figura 28. **Abundancia relativa de los canales iónicos dependientes de voltaje.** (A) Expresión de los canales iónicos en ratones y ratonas BPH/SD y BPH/HFD en condición control y con (B) Expresión de los canales iónicos en ratones y ratonas SD y HFD en condición control. Los datos son la media \pm ESM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ HFD con respecto a la dieta SD. # $p < 0.05$ hembras con respecto a machos.

En la **Figura 28.A** se muestra que la estimulación de los BMDM con LPS aumenta la expresión del canal Kv1.3 de manera significativa tanto en machos como en hembras, mientras que disminuye significativamente la expresión de Kir2.1 e IK1, tanto en machos como en hembras respectivamente.

Atendiendo a la **Figura 28.B**, donde se encuentran representadas las expresiones de los canales en las situaciones control, se percibe que el único cambio destacable es el que se produce en la expresión del Kir2.1, donde se observa una diferencia significativa entre dietas. La expresión de dicho canal es significativamente mayor en ratones y ratonas HFD que en ratones y ratonas SD. Mientras tanto, la expresión de los canales Kv1.3 e IK1 parece tender a la baja en ratones HFD, pero no son diferencias significativas.

En cuanto a la diferencia entre sexos, no parece existir una expresión diferente de los canales entre machos y hembras. Aun así, se representan las diferencias en la expresión relativa entre ellos, siguiendo el esquema de apartados anteriores.

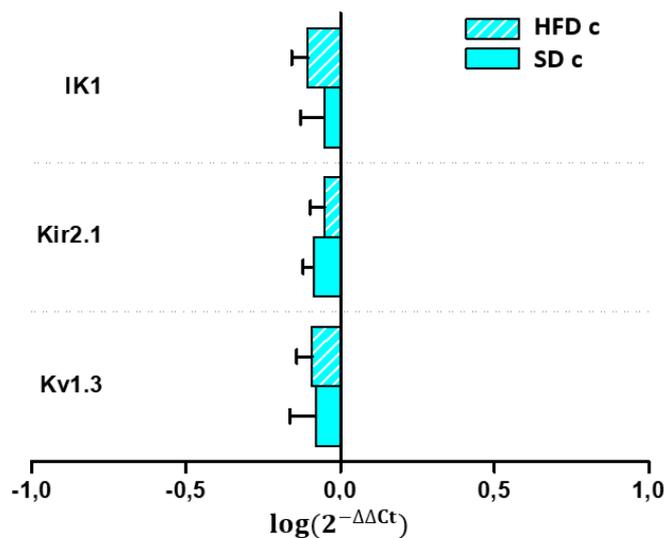


Figura 29. *Diferencias en la expresión relativa de canales iónicos en hembras con respecto a machos en macrófagos M0. Los datos son la media ± ESM. Las barras hacia la derecha indican un aumento (hacia la izquierda indicarían disminución) en la expresión de los marcadores en hembras con respecto a machos tanto en dieta SD como HFD. Un valor de 1.0 indica un aumento de 10 veces la expresión de mRNA en hembras con respecto a machos, y un valor de 0.5 un aumento de 3.2 veces. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ cambio en la expresión en hembras con respecto a machos.*

Como ya se podía observar en la **Figura 28.B**, la **Figura 29** muestra que no existen diferencias significativas en la expresión de los canales iónicos estudiados entre machos y hembras. Es decir, Kv1.3, Kir2.1 e IK1 se expresan de igual manera en machos que en hembras, con ambas dietas.

4. Expresión del Kv1.3 en diferentes tejidos de modelo de murino diabético

En los últimos años, el conocimiento sobre la cascada de señalización de insulina ha crecido rápidamente. Estudios previos en roedores indican que el canal de potasio Kv1.3, se expresa en tejidos sensibles a insulina, como son el tejido adiposo, el hígado, el músculo esquelético y el bulbo olfatorio. Además, el bloqueo farmacológico del canal en tejidos sensibles a insulina aumenta la captación de glucosa, aumentando la sensibilidad a insulina, y el ratón Knock-out (ratón modificado genéticamente para que uno o varios genes estén inactivado) para este canal tiene un peso corporal más bajo, una mayor sensibilidad a insulina y niveles más bajos de glucosa en plasma. [49], [50]

Estas evidencias sugieren que el canal Kv1.3 tiene un papel importante tanto en los vasos, como en tejidos relevantes en el estado metabólico a nivel sistémico, por lo que resulta especialmente interesante en un modelo de animal diabético como el empleado en este trabajo... Por tanto, se estudia la expresión del canal Kv1.3 en diferentes tejidos (aorta, bulbo olfatorio, músculo, hígado y grasa) en el modelo murino con diabetes y otros factores de riesgo vascular.

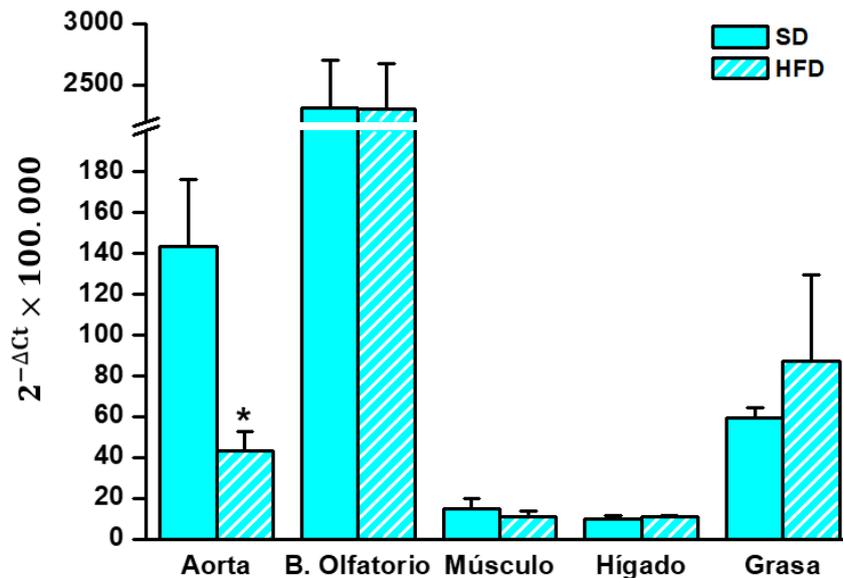


Figura 30. Abundancia relativa del canal Kv1.3 en diferentes tejidos. Expresión del canal iónico en diferentes tejidos extraídos de ratonas BPH/SD y BPH/HFD. Los datos son la media \pm ESM. * $p < 0.05$ HFD con respecto a la dieta SD.

En la **Figura 30** puede observarse que la expresión es especialmente alta en bulbo olfatorio y que en la mayoría de los tejidos no existe ninguna diferencia significativa entre ratonas SD y HFD. Por otro lado, se observa que, mientras que en el hígado y el músculo la abundancia relativa del Kv1.3 no es muy alta, dicha abundancia aumenta enormemente en el caso del bulbo olfatorio.

La única diferencia significativa se observa en aorta, donde la abundancia relativa del canal Kv1.3 disminuye de manera significativa en ratonas HFD. Puesto que es el único tejido en el que se perciben dichas diferencias, suscita mayor interés, por lo que se procede a un estudio más completo en las arterias aortas.

4.1. Estudio de la expresión de Kv1.3 y Kv1.5 en aortas

En la mayoría de los sistemas, las células expresan varios canales de la familia Kv1, cuya expresión también se remodela tras la activación y/o cambio fenotípico. En particular, en las VSMCs, está descrito que los canales Kv1.5 disminuyen su expresión con el cambio fenotípico dejando al canal Kv1.3 como el canal predominante en las VSMCs de los vasos y permitiendo que lleve a cabo sus funciones de proliferación y migración. [24]

En preparaciones de VSMCs de estudios anteriores, la modulación fenotípica no cambia la expresión de mRNA de Kv1.3. Sin embargo, todos los demás mRNAs de Kv1.x disminuyeron, en particular se produce una drástica disminución para Kv1.5. Como ya se ha comentado anteriormente, las subunidades α de Kv1.3 y Kv1.5 pueden ensamblarse formando complejos

heterotetraméricos. En estos casos, la proporción relativa de ambos canales controla la tasa de proliferación puesto que los canales tienen un papel proliferativo y antiproliferativo, respectivamente. Las subunidades Kv1.5 tendrán un efecto negativo que dominará sobre la proliferación inducida por Kv1.3. [24]

Debido a las evidencias anteriores en la relación entre Kv1.3 y Kv1.5 en VSMCs, se procede al estudio y comparación de la expresión de ambos canales en las aortas de machos y hembras SD y HFD.

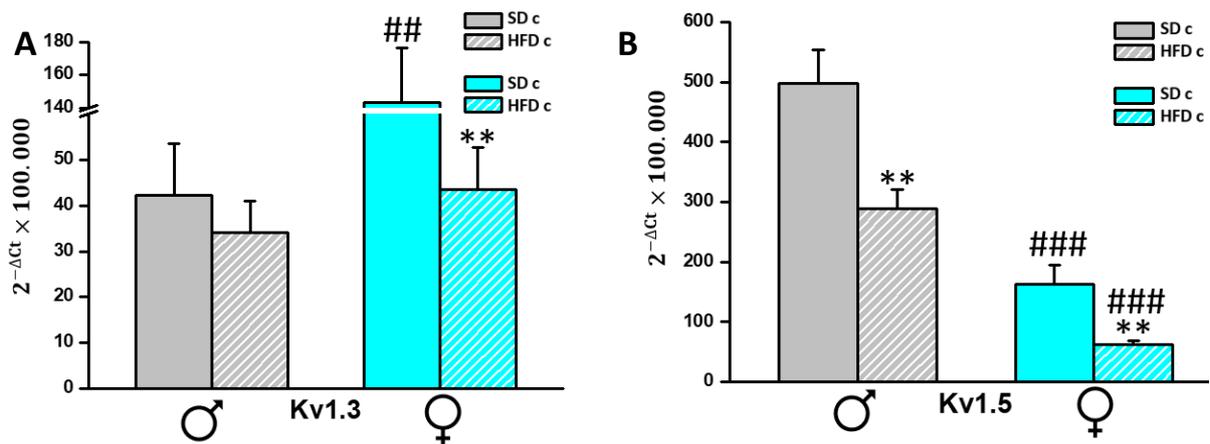


Figura 31. **Abundancia relativa de los canales Kv1.3 y Kv1.5 en aorta.** A) Expresión del canal iónico Kv1.3 en aorta extraída de ratonas SD y HFD. B) Expresión del canal iónico Kv1.5 en aorta extraída de ratonas SD y HFD. Los datos son la media \pm ESM. ** $p < 0.01$ HFD con respecto a la dieta SD. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ o ### $p < 0.001$ hembras con respecto a machos.

La **Figura 31.A** revela una mayor expresión del canal Kv1.3 en hembras que en machos además de ser mayor en el caso de ratones SD. En cuanto a la dieta, se observa que la expresión del canal disminuye significativamente en hembras. En la **Figura 31.B** se observa que el canal Kv1.5 se expresa significativamente menos en hembras que en machos, tanto en SD como en HFD. Además, la dieta hace que la expresión disminuya significativamente en HFD, tanto en hembras como en machos.

Estudiada la expresión de ambos canales en aorta, se estudia el ratio Kv1.3/Kv1.5 para conocer el fenotipo de las VSMCs en las muestras de aorta; de manera que un mayor ratio Kv1.3/Kv1.5 sugiere un fenotipo más desdiferenciado y, un menor ratio Kv1.3/Kv1.5, sugiere un fenotipo más diferenciado (más células contráctiles).

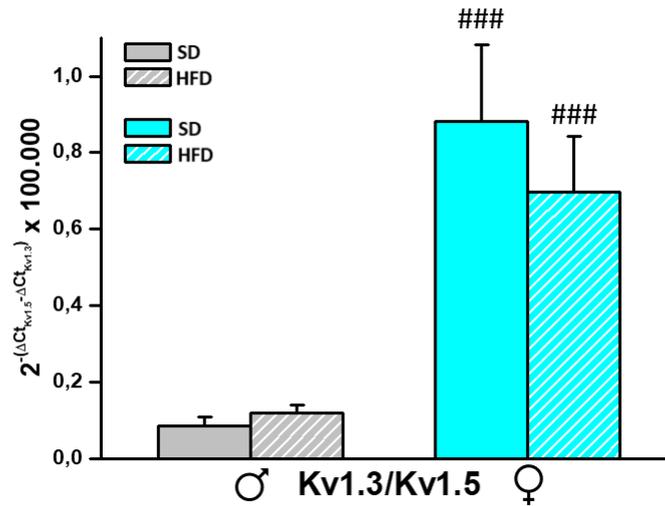


Figura 32. **Ratio Kv1.3/Kv1.5 en aorta.** Representación del ratio Kv1.3/Kv1.5 en muestras de aorta de ratones macho y hembras SD y HFD. Los datos son la media \pm ESM. ### $p < 0.001$ hembras con respecto a machos.

La **Figura 32** muestra que el ratio Kv1.3/Kv1.5 es significativamente mayor en hembras que en machos, lo que sugiere que las aorta de hembras tienen un fenotipo diferente, más desdiferenciado, que los machos, que no se ve alterado por la dieta.

Discusión

En primer lugar, se consigue con éxito generar un ratón diabético que, además, posee otros factores de riesgo vascular (obesidad, hipertensión, hiperglucemia, resistencia a insulina...) los cuales empeoran el pronóstico de los pacientes con diabetes. El modelo murino logrado se trata de un modelo adecuado para poder estudiar enfermedades cardiovasculares puesto que es muy parecido al modelo de enfermo humano que hay en la sociedad actual.

Teniendo en cuenta la importancia de los macrófagos en los procesos inflamatorios que suceden en enfermedades como la diabetes o la aterosclerosis, se pretendía buscar cambios reseñables en algún marcador, que permitiesen definir el cambio de fenotipo en los macrófagos. En respuesta a los resultados obtenidos, los marcadores propuestos no parecen ser los adecuados para constatar dicho cambio de fenotipo. Con los marcadores clásicos de M1, TNF- α y NOS2, sí que se consigue un cambio desde M0 a M1 al activar los BMDM con LPS, sin embargo, las diferencias que se esperaban entre SD y HFD no se han observado ya que no se consigue encontrar el cambio en los genes que se buscaba, por lo que la dieta no les afecta.

En cuanto a la proteína de superficie celular CD36, la literatura consultada [47] explica que su expresión disminuye al activarlo con LPS en M1, hecho que en este estudio ha podido comprobarse. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas entre dietas, resultado que lleva a concluir que CD36 no puede considerarse un marcador de fenotipo metabólico. El no haber conseguido demostrar el papel de CD36 como tal tipo de marcador puede deberse al tipo de macrófagos ya que, en los estudios que se han consultado se estudiaban otro tipo de macrófagos [43] como, por ejemplo, macrófagos de tejido adiposo, y en este trabajo se han utilizado BMDM.

Como ya se ha comentado a lo largo de todo el trabajo, el canal Kv1.3 tiene gran importancia en células de músculo liso vascular (VSMC) por lo que suscita gran interés el papel que pueda llevar a cabo en diferentes tipos de células, como en macrófagos. Por ello, se lleva a cabo el estudio de este y otros canales iónicos que también pueden ser relevantes en macrófagos. De nuevo, ocurre algo parecido que en el estudio de los marcadores metabólicos; no se encuentran cambios aparentemente importantes entre dietas. Se consiguen cambios en la expresión al activar a los BMDM con LPS, excepto en P2X₄ y P2X₇ donde la expresión no varía, pero no los cambios esperados entre dietas.

En la literatura consultada se explica que la expresión de P2X₁ es bastante menor que en el caso de P2X₇, algo que en este estudio se corrobora. [46] También se habla de que la expresión de P2X₄ y P2X₇ disminuye al activar a los BMDM con LPS hasta M1, sin embargo, esta disminución de la expresión no ha podido comprobarse.

Los cambios obtenidos en la expresión en los canales de potasio dependiente de voltaje con la activación con LPS coinciden con estudios electrofisiológicos encontrados en la literatura, donde también confirman que la expresión del Kv1.3 con LPS aumenta y en el caso del K_{ir}2.1 disminuye. [17] El único cambio reseñable relacionado con las dietas es el del canal K_{ir}2.1 cuya expresión aumenta significativamente en BMDM de ratones HFD, cuyas implicaciones aún están por conocer y pueden ser relevantes en el contexto de diabetes.

Por otro lado, estudios electrofisiológicos, aún sin publicar, realizados por el grupo de investigación con los mismos canales iónicos, coinciden en algunos casos con los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de mRNA, como por ejemplo, los resultados obtenidos al estudiar la expresión de Kv1.3, K_{ir}2.1 o IK1 (una mayor expresión en hembras que en machos en los tres canales o ninguna diferencia significativa entre dietas excepto en K_{ir}2.1).

El canal Kv1.3, además de ser importante en el cambio de PM en VSMC también tiene efectos positivos en el metabolismo de elementos glucídicos. La literatura consultada sugiere que el bloqueo o inhibición de dicho canal consigue la reducción de la obesidad, así como una mejora en la resistencia a insulina. [45], [46] En el trabajo realizado se observa que la expresión del Kv1.3 en diferentes tejidos no cambia significativamente entre dietas a excepción de la aorta, donde la expresión disminuye significativamente en ratones HFD.

El posterior estudio más en profundidad de las aortas muestra un remodelado o cambio de PM en los vasos en función de la dieta. En este caso, destaca especialmente canal Kv1.5 puesto que se produce una disminución significativa en HFD tanto en hembras como en machos además de que su expresión es significativamente menor en hembras. A la hora de estudiar el ratio Kv1.3/Kv1.5 se observa que no hay diferencias entre dietas y destaca la diferencia tan significativa que existe entre machos y hembras. Dicho ratio es mayor en hembras, es decir, la proporción de Kv1.3 con respecto a Kv1.5 es mayor y, por tanto, existe mayor número de células desdiferenciadas; lo que sugiere que las hembras tienen un fenotipo diferente a los machos.

El hecho de que no se hayan encontrado diferencias en la expresión de mRNA del canal Kv1.3 en los diferentes tejidos entre ratones SD y HFD no significa que estas no existan a otros niveles ya que se ha descrito en algunos trabajos. Es decir, este estudio se ha centrado tan solo en la expresión del mRNA, por lo que se desconocen los cambios que puedan existir a nivel de la expresión o regulación de la función proteica.

Por último, a lo largo de todo el estudio los cambios que han destacado notablemente han sido los observados entre machos y hembras. Estos cambios abren una nueva puerta al estudio e investigación de tratamientos para la diabetes específicamente dirigidos a mujeres u hombres.

Conclusiones

1. La dieta alta en grasa administrada a la cepa de ratón hipertenso utilizada ha permitido generar un modelo de ratón diabético con factores de riesgo vascular adicionales como la obesidad y la hipertensión.
2. En macrófagos, los marcadores de inflamación, TNF- α y NOS2, aumentan su expresión cuando se activa con LPS, pero no cambian su expresión con la dieta en el modelo de ratón diabético generado.
3. En macrófagos, la expresión de CD36 disminuye con LPS pero no cambia con la dieta en el modelo de ratón diabético utilizado. En este modelo, CD36, no puede considerarse como un marcador de fenotipo metabólico. Además, la expresión de TNF- α y CD36 es mayor en hembras que en machos.
4. En macrófagos, la expresión de los receptores purinérgicos estudiados, P2X₁, P2X₄ y P2X₇, no cambian con la dieta. La expresión de P2X₄ y P2X₇ cambia con el sexo en direcciones opuestas, disminuye en P2X₄ y aumenta P2X₇.
5. En macrófagos, la expresión de los canales Kv1.3 e IK1 aumenta con LPS y no cambia con la dieta ni con el sexo. La expresión del canal de potasio K_{ir}2.1 disminuye con LPS, aumenta con la dieta y no cambia con el sexo. La expresión de este canal es el único cambio asociado a la dieta que se observa.

6. En otros tejidos estudiados en hembras como bulbo olfatorio, músculo esquelético, hígado y grasa; no se detectan cambios en la expresión del canal Kv1.3 con la dieta. Solo en aorta se observa una disminución en la expresión de Kv1.3 con la dieta.
7. En aortas, la expresión de Kv1.3 con dieta estándar es mayor en hembras que en machos. La dieta alta en grasa disminuye la expresión en hembras, pero no la cambia en machos.
8. En aortas, la expresión de Kv1.5 disminuye con la dieta y es menor en hembras. El ratio Kv1.3/Kv1.5 es mayor en hembras y no cambia con la dieta.
9. Los resultados de este trabajo destacan la existencia de dimorfismo sexual en el modelo estudiado puesto que la expresión de mRNA tanto de los marcadores como de los canales cambia fundamentalmente entre machos y hembras. Esto puede ser relevante para tratar de estudiar tratamientos personalizados en función del sexo.

Bibliografía

- [1] R. E. Klabunde, *Fisiología cardiovascular: fundamentos*/ Richard E. Klabunde, 3a ed. Barcelona: Wolters Kluwer, 2022.
- [2] W. Pawlina, *Ross histología : texto y atlas : correlación con biología molecular y celular* , 8a ed. L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona): Wolters Kluwer, 2019.
- [3] Y. Zhou et al., "SMYD2 Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Intimal Hyperplasia via Interaction with Myocardin", doi: 10.21203/rs.3.rs-2721176/v1.
- [4] G. K. OWENS, "Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation," *Acta Physiol Scand*, vol. 164, no. 4, pp. 623–635, 1998, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.1998.tb10706.x>.
- [5] C. B. Neylon, R. J. Lang, Y. Fu, A. Bobik, and P. H. Reinhart, "Molecular Cloning and Characterization of the Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K Channel in Vascular Smooth Muscle Relationship Between K⁺ Ca Channel Diversity and Smooth Muscle Cell Function," *Circulation Research*, vol. 85, no. 9, pp. 33-43, 1999, doi: <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.9.e33>
- [6] J. R. López-López, P. Ciudad, and M. T. Pérez-García, "Kv channels and vascular smooth muscle cell proliferation," *Microcirculation*, vol. 25, no. 1, p. e12427, 2018, doi: <https://doi.org/10.1111/micc.12427>.
- [7] I. Balderas Renteria, *Diabetes, obesidad y síndrome metabólico: un abordaje multidisciplinario*. Editorial El Manual Moderno, 2015.
- [8] Q. Yang, A. Vijayakumar, and B. B. Kahn, "Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 19, no. 10, pp. 654–672, 2018. doi: 10.1038/s41580-018-0044-8.
- [9] E. Cipriani Thorne, "Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina". *Revista Medica Herediana*, vol. 21, no. 3, pp. 160-170, 2010. Universidad Peruana Cayetano Heredia, p. 12, 2011.
- [10] J. Carlos and L. Robles, "artículo de revisión Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica," *An. Fac. Med.*, vol. 74, no. 4, 2013, doi: 4(4):315-20

- [11] J. E. Kanter, C. C. Hsu, and K. E. Bornfeldt, "Monocytes and Macrophages as Protagonists in Vascular Complications of Diabetes," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 7, 2020. doi: 10.3389/fcvm.2020.00010.
- [12] K. J. Moore, F. J. Sheedy, and E. A. Fisher, "Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance," *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, no. 10. pp. 709–721, 2013. doi: 10.1038/nri3520.
- [13] C. Lahoz, J. M. Mostaza, and C. Lahoz, "La aterosclerosis como enfermedad sistémica," *Revista Española de Cardiología*, vol. 60, no. 2, pp. 184-195, 2007, doi: <https://doi.org/10.1157/13099465>
- [14] P. Libby et al., "Atherosclerosis," *Natural Reviews Disease Primers*, vol. 5, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0106-z.
- [15] P. Marchio, S. Guerra-Ojeda, J. M. Vila, M. Aldasoro, V. M. Victor, and M. D. Mauricio, "Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, 2019. doi: 10.1155/2019/8563845.
- [16] H. Goikuria, K. Vandebroek, and I. Alloza, "Inflammation in human carotid atheroma plaques," *Cytokine Growth Factor Reviews*, vol. 39, pp. 62–70, 2018, doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.01.006.
- [17] C. Varol, A. Mildner, and S. Jung, "Macrophages: Development and tissue specialization," *Annual Review of Immunology*, vol. 33., pp. 643–675, 2015. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
- [18] T. A. Wynn, A. Chawla, and J. W. Pollard, "Macrophage biology in development, homeostasis and disease," *Nature*, vol. 496, no. 7446. pp. 445–455, 2013. doi: 10.1038/nature12034.
- [19] R. Vicente et al., "Differential Voltage-dependent K⁺ Channel Responses during Proliferation and Activation in Macrophages," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 47, pp. 46307–46320, 2003, doi: 10.1074/jbc.M304388200.

- [20] R. Vicente et al., "Association of Kv1.5 and Kv1.3 contributes to the major voltage-dependent K⁺ channel in macrophages," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 49, pp. 37675–37685, 2006, doi: 10.1074/jbc.M605617200.
- [21] W. Zhang, X. J. Lei, Y. F. Wang, D. Q. Wang, and Z. Y. Yuan, "Role of Kir2.1 in human monocyte-derived foam cell maturation," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 20, no. 3, pp. 403–412, 2016, doi: 10.1111/jcmm.12705.
- [22] A. Kondratskyi, K. Kondratska, R. Skryma, D. J. Klionsky, and N. Prevarskaya, "Ion channels in the regulation of autophagy," *Autophagy*, vol. 14, no. 1., pp. 3–21, 2018, doi: 10.1080/15548627.2017.1384887.
- [23] S. K. Bagal et al., "Ion channels as therapeutic targets: A drug discovery perspective," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 56, no. 3, pp. 593–624, 2013. doi: 10.1021/jm3011433.
- [24] M. Teresa Pérez-García, P. Ciudad, and J. R. López-López, "The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 314, pp. 27–42, 2018, doi: 10.1152/ajpcell.00136.2017.-Kv1.3.
- [25] P. Ciudad et al., "Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 30, no. 6, pp. 1203–1211, 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.205187.
- [26] B. Hille, "Potassium channels and chloride channels. In *Ionic Channels of Excitable Membrane*," Edited by Hill B, pp. 130–133, 1992.
- [27] D. J. Snyders, M. M. Tamkun, and P. B. Bennett, "A Rapidly Activating and Slowly Inactivating Potassium Channel Cloned from Human Heart Functional Analysis after Stable Mammalian Cell Culture Expression," *Journal of General Physiology*, vol. 101, pp. 513–543, 1993, doi: 10.1085/jgp.101.4.513
- [28] R. Vicente et al., "Kv1.5 association modifies Kv1.3 traffic and membrane localization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 13, pp. 8756–8764, 2008, doi: 10.1074/jbc.M708223200.

- [29] Y. Fang et al., "Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 289, no. 5, pp. 1134–1144, 2005, doi: 10.1152/ajpcell.00077.2005.-Inward.
- [30] Y. Kubo, T. J. Baldwin, Y. Nung Jan, and L. Y. Jan, "Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel," *Nature*, vol. 362, pp. 127-133, 1993, doi: <https://doi.org/10.1038/362127a0>
- [31] D. Bichet, F. A. Haass, and L. Y. Jan, "Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, no. 12, pp. 957–967, 2003. doi: 10.1038/nrn1244.
- [32] X. Tao, J. L. Avalos, J. Chen, and R. MacKinnon, "Crystal Structure of the Eukaryotic Strong Inward-Rectifier K⁺ Channel Kir2.2 at 3.1 Å Resolution," *Science* (1979), vol. 326, no. 5960, pp. 1668–1674, 2009, doi: 10.1126/science.1180310.
- [33] C. Moreno et al., "Modulation of Voltage-Dependent and Inward Rectifier Potassium Channels by 15-Epi-Lipoxin-A4 in Activated Murine Macrophages: Implications in Innate Immunity," *The Journal of Immunology*, vol. 191, no. 12, pp. 6136–6146, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1300235.
- [34] H. Hibino, A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay, and Y. Kurachi, "Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles," *Physiological Reviews*, vol. 90, no. 1, pp. 291-366, 2010, doi: 10.1152/physrev.00021.2009.-Inwardly.
- [35] N. Mehta et al., "Purinergic receptor P2X7: A novel target for anti-inflammatory therapy," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 22, no. 1, pp. 54–88, 2014, doi: 10.1016/j.bmc.2013.10.054.
- [36] G. E. Torres, T. M. Egan, and M. M. Voigt, "Hetero-oligomeric Assembly of P2X Receptor Subunits," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 10, pp. 6653-6659, 1999, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6653>
- [37] B. S. Khakh, "Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 2, pp. 165-174, 2001, doi: <https://doi.org/10.1038/35058521>

- [38] F. M. Bennetts, J. I. Mobbs, S. Ventura, and D. M. Thal, "The P2X1 receptor as a therapeutic target," *Purinergic Signalling*, vol. 18, no. 4, pp. 421–433, 2022. doi: 10.1007/s11302-022-09880-4.
- [39] B. S. Khakh and R. Alan North, "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease," *Nature*, vol. 442, no. 7102, pp. 527–532, 2006. doi: 10.1038/nature04886.
- [40] R. V Serrato, "Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00119.
- [41] Y. Cao, M. Yu, G. Dong, B. Chen, and B. Zhang, "Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation," *Molecules*, vol. 25, no. 3, 2020. doi: 10.3390/molecules25030706.
- [42] A. Nagy et al., "Evaluation of TaqMan qPCR system integrating two identically labelled hydrolysis probes in single assay," *Scientific Reports*, vol. 7, 2017, doi: 10.1038/srep41392.
- [43] B. Thornton and C. Basu, "Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design," *PCR Primer Design*, C. Basu, Ed., New York, pp. 173–179, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2365-6_13.
- [44] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [45] M. Kratz et al., "Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages," *Cell Metabolism*, vol. 20, no. 4, pp. 614–625, 2014, doi: 10.1016/j.cmet.2014.08.010.
- [46] J. Merz et al., "Pro- and anti-inflammatory macrophages express a sub-type specific purinergic receptor profile," *Purinergic Signal*, vol. 17, pp. 481-492, doi: 10.1007/s11302-021-09798-3/Published.
- [47] S. Pennathur et al., "The Macrophage Phagocytic Receptor CD36 Promotes Fibrogenic Pathways on Removal of Apoptotic Cells during Chronic Kidney Injury," *American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 8, pp. 2232–2245, 2015, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.04.016.

[48] E.-P. Reich et al., "Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice," *European Journal of Immunology*, vol. 35, no. 4, pp. 1027–1036, 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/eji.200425954>.

[49] S. V Straub et al., "Pharmacological inhibition of Kv1.3 fails to modulate insulin sensitivity in diabetic mice or human insulin-sensitive tissues," *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 301, pp. 380–390, 2011, doi: [10.1152/ajpendo.00076.2011](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00076.2011).-Genetic.

[50] O. Tschritter et al., "A New Variant in the Human Kv1.3 Gene Is Associated with Low Insulin Sensitivity and Impaired Glucose Tolerance," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 91, no. 2, pp. 654–658, 2006, doi: [10.1210/jc.2005-0725](https://doi.org/10.1210/jc.2005-0725).

Anexo I

ENSAYOS TaqMan

Tabla.A.I. Ensayos TaqMan comerciales y personalizados usados.

NOMBRE DEL GEN	PROTEÍNA	ENSAYO (Applied Biosystem)
CD36	CD36	mCD36_F: 5'- ATGGGCTGTGATCGGAACTG-3' mCD36_R: 5'-GTCTTCTCAATAAGCATGTCTCC-3'
KCNA3	Kv1.3	mK3_3utr_F: 5'-CCACGAACAATAACCCCAAC-3' mK3_3utr_R: 5'-AGGGCATACACAGACCAAGG-3' mK3_3utr_Sonda: 5'-TGTCTAATATATGATACGGTTGCCA-3'
KCNA5	Kv1.5	mK5_F2174: 5'-GGACACTAGCCGGGAAACAG-3' mK5_R2318: 5'-TCCGGACTTTGATGGGTGAC-3' mK5_Sonda: 5'-ACCGGTTCTCTTGAGCTTGCT-3'
KCNJ2	K _{ir} 2.1	Mm00434616_m1
KCNN4	IK1	Mm00464586_m1
NOS2	NOS2	mNOSi_F: 5'-CCAAGCCCTCACCTACTTCC-3' mNOSi_R: 5'-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'
P2RX1	P2X ₁	Mm00435460_m1
P2RX4	P2X ₄	Mm00501787_m1
P2RX7	P2X ₇	Mm01199500_m1
RPL18	RPL18	F: 5'-AAGACTGCCGTGGTTGTGG-3' R: 5'-AGCCTTGAGGATGCGACTC-3' Sonda: 5'-FAM-TTCCAAGCTGAAGGTGTGTGCA-BHQ1-3'
TNF- α	TNF- α	F: 5'-AGCCGATGGGTTGTACCTTGTCTA-3' R: 5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT-3'