



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

***Caracterización dinámica de calcio por efecto del esfuerzo de
corte y la modificación del contenido de colesterol en la
membrana plasma de endotelio***

TESIS

Que presenta

M.C. Manuel Martínez Ruiz

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN INGENIERÍA Y FÍSICA BIOMÉDICAS

Director de tesis: **Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera**

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. Daniel P. Sánchez Herrera por su dirección en la realización de este proyecto.

A los Dr. Bruno A. Escalante Acosta y Dr. Moisés Santillán Zerón por sus contribuciones intelectuales al proyecto.

Al Dr. Jesus G. Rodríguez y Dra. Blanca E. Galindo por sus comentarios en lo personal y académico.

Al Dr. Ignacio López González por su amable participación en la revisión y evaluación de este proyecto.

A la comunidad de CINVESTAV Unidad Monterrey por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi madre Blanca E. Ruiz Arellano por su apoyo incondicional.

*A mis hermanos, Gael R. Ruiz Arellano por enseñarme a seguir mis sueños hasta el final,
Mynet y Marcelino Martínez Ruiz por ser mi soporte y no dejarme rendir.*

*A mi familia adquirida, Nubia I. Rivera por su apoyo y entusiasmo en todo momento. Adriana
López por su apoyo y comprensión. Cecile Bustamante, Diana Escalona, Aarón Vázquez,
Humberto Reyes, David Orozco, Ana Gámez, Pamela Vazquez, Ivonne Martínez, Claudia
Zaragoza, Eduardo Sosa y Ruben Martínez por compartir conmigo este camino.*

*A mis amigos de Cinvestav Sarahi, Rocio, Jorge, Alberto, Elisa, Daniel, Ricardo por toda su
motivación.*

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	Sistema cardiovascular.....	1
1.1.1	La sangre y su función.....	1
1.1.2	El corazón y su anatomía.....	2
1.1.3	Sistema eléctrico del corazón	6
1.1.4	Árbol vascular y la circulación.....	7
1.2	Estimulación mecánica vascular endotelial	11
1.2.1	Tensión de pared.....	13
1.2.2	Esfuerzo de corte	14
1.2.3	Respuestas fisiológicas por efecto del esfuerzo de corte.....	17
1.3	Mecanotransducción del esfuerzo de corte	22
1.3.1	Proteínas de unión	23
1.3.2	Glicocalix.....	24
1.3.3	Cilio primario	25
1.3.4	Citoesqueleto	26
1.3.5	Caveola	26
1.3.6	Receptores tirosina quinasas.....	27
1.3.7	Receptores acoplados proteínas g.....	28
1.3.8	Canales iónicos	29
1.3.9	Membrana plasmática.....	30
2	Hipótesis.....	35
3	Objetivo.....	37
3.1	Objetivos particulares	37
4	Metodología	39
4.1	Estandarización del proceso de extracción de células endoteliales de tejido primario de aorta de rata.	39
4.2	Cultivo e identificación de células endoteliales.....	39
4.3	Estudio y caracterización de la respuesta de calcio a esfuerzos de corte bajo.....	40
4.4	Modificación del contenido de colesterol de la membrana plasmática.	42
4.5	Inhibición de blancos moduladores de calcio de retículo endoplásmico.	43

4.6	Análisis De Datos.	43
5	Resultados	45
5.1	Extracción y cultivo de células endoteliales	45
5.2	Identificación inmunocitoquímica de células endoteliales	45
5.3	Respuesta de calcio intracelular a esfuerzos de corte bajo	47
5.4	Efecto de cambios en el contenido de colesterol en respuesta al esfuerzo de corte ...	52
5.5	Inhibición De Blancos Reguladores De Calcio De Retículo Endoplasmático	59
6	Discusión.....	69
7	Conclusiones	75
8	Perspectivas.....	77
9	Bibliografía.....	79
10	Apéndice.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Elementos figurados en sangre.....	2
Figura 1.2 Estructura de los tejidos del corazón.....	3
Figura 1.3 Anatomía general del corazón.....	4
Figura 1.4 Válvulas cardíacas.....	4
Figura 1.5 Ciclo cardíaco.....	6
Figura 1.6 Presión y volumen durante el ciclo cardíaco.....	6
Figura 1.7 Sistema eléctrico del corazón.....	7
Figura 1.8 Clasificación de vasos sanguíneos.	8
Figura 1.9 Circulación sistémica.	8
Figura 1.10 Circulación pulmonar.....	9
Figura 1.11 Estructura de los vasos sanguíneos	10
Figura 1.12 Densidad superficial de la vasculatura en un individuo.....	10
Figura 1.13 Gradiente de presión sanguínea. Modificado de Guyton	11
Figura 1.14 Tipos de flujo	12
Figura 1.15. Componentes de la tensión de pared.....	13
Figura 1.16 Representación gráfica de esfuerzo circunferencial y longitudinal.	14
Figura 1.17 Representación gráfica del esfuerzo radial	14
Figura 1.18 Perfil parabólico de velocidad de un fluido a lo largo de un tubo cilíndrico de radio r.....	15
Figura 1.19 Presión arterial y velocidad del flujo sanguíneo en varios puntos de la red arterial	15
Figura 1.20 Muestra de lesiones ateroscleróticas en arco aórtico y en la bifurcación del tronco braquiocefálico, las lesiones fueron teñidas con Aceite rojo. Imagen modificada de ⁷	16
Figura 1.21 Distribución de las principales de lesiones ateroscleróticas que requieren atención médica quirúrgica	16
Figura 1.22 Arco aórtico “En Face” con inmunofluorescencia para proteínas de unión.	17
Figura 1.23 Morfología de células endoteliales entre la aorta torácica y una ramificación de arteria intercostal, región donde se presenta una interfaz entre flujo laminar y turbulento.	18
Figura 1.24 Tinción de VE-Cadherinas de células endoteliales de arco aórtico.	18
Figura 1.25 Ensayo de inmunocitoquímica para eNOS..	19
Figura 1.26 Sistemas de estimulación “in vitro” para la aplicación de esfuerzo de corte.....	20
Figura 1.27 Tinción de fibras de actina de células endoteliales <i>in vitro</i> bajo diferentes tipos de flujo.....	20
Figura 1.28 Células endoteliales PAEC muestran alineación paralela a la dirección del flujo.....	21
Figura 1.29 Respuestas de células endoteliales producidas tras estimulación por esfuerzo de corte	21
Figura 1.30 Expresión de genética de proteínas de unión a bajo y alto esfuerzos de corte.....	22

Figura 1.31 Componentes celulares involucrados en el proceso de mecanotransducción del esfuerzo de corte en células endoteliales.....	23
Figura 1.32 Efecto en los niveles de fosforilación de Src y alineamiento de las células en dirección del flujo inducido por esfuerzo de corte en células carentes de VE-cadherina (VE-cadherina ^{-/-}) y PECAM-1 (PECAM-1 ^{-/-}).	24
Figura 1.33 Esquema de interacciones de glicocáliz con diferentes moléculas de las células endoteliales	25
Figura 1.34 Efectos en el aumento por estimulación de esfuerzo de corte de calcio y óxido nítrico citoplasmático tras la inhibición en la expresión de Policistina-2 (PC2).....	25
Figura 1.35 Efecto en la expresión de ICAM-1 inducida por esfuerzo de corte tras la fijación de las fibras de actina del citoesqueleto, observando una atenuación en la expresión de ICAM-1 en las células tratadas con Faloidina.....	26
Figura 1.36 Actividad vasodilatadora en arterias carótidas aisladas de ratones silvestres (WT), caveolina-1 ^{-/-} (Cav-1 KO) y caveolina-1 reconstituida (Cav-1 RC) por estimulación de esfuerzo de corte.....	27
Figura 1.37 Fosforilación de los receptores Tie2, IR y Flk1 tras la estimulación por esfuerzo de corte	28
Figura 1.38 Actividad GTPasa en respuesta a esfuerzo de corte de proteínas G reconstituidas en liposomas artificiales	29
Figura 1.39 Corrientes iónicas inducidas por estimulación mecánica.....	30
Figura 1.40 Efecto de la Lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) sobre el módulo de elasticidad de membrana de células endoteliales.	31
Figura 1.41 Efecto del tratamiento con MβCD y oxLDL en los niveles de ordenamiento lipídico.....	31
Figura 1.42 Cambios en los coeficientes de difusión en las regiones de bajo y alto ordenamiento lipídico por efecto de estimulación mecánica por estiramiento, choque osmótico y esfuerzo de corte.....	32
Figura 1.43 Efectos de alcohol bencílico (BA) y colesterol en los coeficientes de difusión lipídica (D) en células endoteliales.....	32
Figura 4.1 Extracción de células endoteliales de tejido primario de aorta.	39
Figura 4.2 Esquema de ensayo inmunocitoquímico para la detección de antígenos blanco.	40
Figura 4.3 Cámara de perfusión	41
Figura 4.4 Esquema de estimulación y toma de registro de fluorescencia.....	42
Figura 4.5 Estructura de la molécula de Metil-β-ciclodextrina.....	42
Figura 5.1 Resultado del ensayo de inmunocitoquímica para la identificación de fenotipo endotelial de la extracción de tejido primario de aorta.....	46
Figura 5.2 Montaje experimental para la generación de esfuerzo de corte.	47
Figura 5.3 Cambios en la intensidad de fluorescencia en respuesta a la estimulación con esfuerzo de corte.....	48
Figura 5.4 Ajustes del modelo de oscilador armónico con rozamiento para los cambios en la intensidad de fluorescencia obtenidos tras la aplicación de los esfuerzos de corte.....	50

Figura 5.5 Efecto de la aplicación de diferentes estímulos de bajo esfuerzo de corte.	50
Figura 5.6 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras realizar la remoción de calcio extracelular	51
Figura 5.7 Trazos representativos de la remoción de colesterol tratadas con 5 mM de M β CD durante 20 y 60 minutos.	52
Figura 5.8 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras el tratamiento durante 20 y 60 minutos para la remoción de colesterol con 5 mM de M β CD.....	53
Figura 5.9 Trazos representativos de la remoción de colesterol con concentraciones de 5 mM y 10 mM de M β CD.....	53
Figura 5.10 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras la remoción de colesterol aumentando la concentración de M β CD a 10 mM durante 20 minutos de tratamiento	54
Figura 5.11 Trazos representativos de la respuesta obtenida tras el depósito de colesterol con 5 mM de M β CD durante tiempos de tratamiento de 20 y 60 minutos.	55
Figura 5.12 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras el depósito de colesterol en la membrana con M β CD saturada con colesterol (M β CD+Chol) durante 20 y 60 minutos de tratamiento	55
Figura 5.13 Trazos representativos de la respuesta obtenida tras el depósito de colesterol con 5 y 10 mM de M β CD-saturado durante 20 minutos de tratamiento.....	56
Figura 5.14 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras el depósito de colesterol en la membrana aumentando la concentración de M β CD saturada con colesterol (M β CD+Chol) durante 20 minutos	56
Figura 5.15 Trazos representativos de la respuesta obtenida tras someter a las células en presencia de M β CD en condición de equilibrio para la remoción de colesterol durante 20 y 60 minutos de tratamiento.	57
Figura 5.16 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte bajo la condición de equilibrio en el intercambio de colesterol 1:1 (M β CD/M β CD+Chol).....	57
Figura 5.17 Esquema de inhibición de la bomba SERCA.....	59
Figura 5.18 Registro representativos tras la inhibición de la bomba SERCA comparado con un registro control.....	59
Figura 5.19 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras la inhibición de la bomba SERCA	60
Figura 5.20 Esquema de inhibición del receptor de Rianodina.....	60
Figura 5.21 Registro representativos tras la inhibición del receptor de rianodina comparado con un registro control.....	61
Figura 5.22 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición del receptor de rianodina	61
Figura 5.23 Esquema de inhibición del receptor de IP ₃	62
Figura 5.24 Registros representativos tras las inhibiciones del receptor de IP ₃ comparado con un registro control.....	62
Figura 5.25 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición del receptor de IP ₃	63
Figura 5.26 Esquema de estimulación simultanea del receptor de Rianodina e IP ₃	63

Figura 5.27 Registro representativo tras la inhibición simultánea de los receptores de IP ₃ y Rianodina comparado con un registro control.....	64
Figura 5.28 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición simultánea de los receptores de rianodina e IP ₃	64
Figura 5.29 Esquema de inhibición de la Fosfolipasa C.	65
Figura 5.30 Registro representativo tras la inhibición de la Fosfolipasa C comparado con un registro control.....	65
Figura 5.31 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición de la Fosfolipasa C.	66
Figura 6.1 Ajustes de la función del oscilador armónico con fricción	70
Figura 6.2 Expresión de PIP ₂ en células HUVEC	71
Figura 6.3 Efecto de esfuerzo de corte y agentes moduladores de fluidez de membrana sobre los niveles de ordenamiento lipídico en células endoteliales	72
Figura 6.4 Liberación de calcio de cuerpos acídicos inducida por NAADP	73
Figura 6.5 Incremento de calcio intracelular inducido por esfuerzo de corte es modulado por la inhibición de la vía de liberación de calcio de retículo endoplasmático y blancos moduladores de calcio mitocondrial.	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Ejemplos de estímulos y respuestas endoteliales. Modificado de ³	11
Tabla 5.1 Promedio de las respuestas obtenidas a diferentes intensidades de esfuerzo de corte.	51
Tabla 5.2 Promedio de las respuestas obtenidas a diferentes intensidades de esfuerzo de corte en ausencia de calcio extracelular.	51
Tabla 5.3 Promedio de las respuestas obtenidas tras la remoción de colesterol con 5mM M β CD durante 20 y 60 minutos.	57
Tabla 5.4 Promedio de las respuestas obtenidas tras la remoción de colesterol con 5 y 10mM M β CD durante 20 minutos.	58
Tabla 5.5 Promedio de las respuestas obtenidas tras el deposito de colesterol con 5mM M β CD saturado con colesterol durante 20 y 60 minutos.	58
Tabla 5.6 Promedio de las respuestas obtenidas tras el deposito de colesterol con 5 y 10mM M β CD saturado con colesterol durante 20 minutos.	58
Tabla 5.7 Promedio de las respuestas obtenidas en la condición de equilibrio del intercambio de colesterol utilizando 5mM M β CD y 5mM M β CD saturado con colesterol en una proporción 1:1 durante 20 y 60 minutos de tratamiento.	58
Tabla 5.8 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición de la bomba SERCA con 1 μ M de Tapsigargina.....	66
Tabla 5.9 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición del receptor RyR con 5 μ M de Rianodina.....	66
Tabla 5.10 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición del receptor IP ₃ R con 50 y 100 μ M de 2APB.....	66
Tabla 5.11 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición simultánea de los receptores RyR e IP ₃ R con 5 μ M de Rianodina y 100 μ M de 2APB.....	67
Tabla 5.12 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición de la PLC con 0.5 μ M de U73122.	67

RESUMEN

Durante el funcionamiento del sistema cardiovascular el corazón impulsa la sangre hacia la red de vasos sanguíneos manteniéndola en constante circulación, durante el movimiento de la sangre a través de los vasos sanguíneos se ejerce una fuerza de fricción paralela a la pared del vaso denominada esfuerzo de corte, esta estimulación es sentida directamente por la capa de células endoteliales las cuales responden ante esta estimulación modificando su morfología, funciones, expresión de genes.

Las células endoteliales han mostrado capacidades de mecanosensación sofisticadas para detectar características distintas de los perfiles de flujo y regular la fisiología de los vasos (auxiliando el control del tono vascular y presión sanguínea), el reordenamiento vascular (aterogénesis) y el mantenimiento correcto de la homeostasis del sistema circulatorio. Estas capacidades de mecanosensación incluyen la magnitud del flujo, la dirección y frecuencia del flujo pulsátil. Efectos ateroprotectores han sido observados en esquemas de estimulación de esfuerzo de corte alto (>6 dinas/cm²), mientras que con esfuerzos de corte bajo (<6 dinas/cm²) y flujos recirculantes se observan respuestas que predisponen al desarrollo de diversos padecimientos como hipertensión, aneurismas, aterosclerosis.

A pesar de los amplios estudios del fenómeno de mecanosensación se desconoce como las células endoteliales registran el esfuerzo de corte y lo transmiten al interior de la célula. Se han propuesto diferentes blancos sensoriales como canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G, cilio primario, citoesqueleto, etc.

En este trabajo exploramos la participación de la membrana plasmática en el fenómeno de mecanotransducción del esfuerzo de corte bajo en la respuesta de calcio intracelular alterando el contenido de colesterol de la membrana plasmática. Por otro lado, exploramos los posibles mecanismos de liberación de calcio intracelular que se encuentran participando en esta respuesta.

Como resultado obtuvimos que la remoción y el depósito de colesterol en la membrana plasmática modula la liberación de calcio inducida por la aplicación de esfuerzo de corte bajo y que el calcio liberado proviene parcialmente del retículo endoplasmático debido a la activación de receptor de IP₃ y un posible reclutamiento del receptor de Rianodina. Estos resultados nos permiten proponer la participación de una fuente de calcio intracelular alterna al retículo en la respuesta de calcio a esfuerzo de corte bajo.

ABSTRACT

In cardiovascular system the heart pumps the blood to the vessel network keeping it in constant circulation, the blood flow exerts a frictional force parallel to the wall of the vessel called shear stress, this mechanical stimulation is sensed directly by the layer of endothelial cells which respond modifying its morphology, functions and gene expression.

Endothelial cells have shown sophisticated mechanosensation abilities to detect distinct features of flow profiles and regulate vessel physiology (aiding in the control of vascular tone and blood pressure), vascular remodeling (atherogenesis) and homeostasis maintenance of the circulatory system. These mechanosensation abilities include the magnitude of the flow, the direction and frequency of the pulsatile flow. Atheroprotective effects have been observed in high-shear stress stimulation schemes (>6 dynes/cm²), while at low shear stresses (<6 dynes/cm²) and recirculating flows are observed responses that predispose to the development of various conditions such as hypertension, aneurysms, atherosclerosis.

Despite extensive studies of the phenomenon of mechanosensation, it is unknown how endothelial cells sense the shear stress and transmit it to the interior of the cell. Different sensory targets have been proposed as ion channels, G proteins coupled receptors, primary cilium, cytoskeleton, etc.

In this work we explore the participation of the plasma membrane and its impact on the intracellular calcium during a mechanotransduction phenomenon in response to low shear stress by altering the plasma membrane cholesterol content. On the other hand, we explore the possible mechanisms of intracellular calcium release that are participating in this response.

As a result, we observed that the cholesterol depletion and/or deposition in the plasma membrane modulates the calcium release induced by the application of low shear stress and we concluded that the recorded intracellular calcium increase partially comes from the endoplasmic reticulum due to IP₃ receptor activation and a possible recruitment of the Ryanodine receptor. These results allow us to propose the participation of an alternative intracellular calcium store in the low shear stress-induced intracellular calcium response.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema cardiovascular

Es un sistema de transporte constituido esencialmente por el corazón, vasos sanguíneos y la sangre cuya función principal es bombear sangre oxigenada y rica en nutrientes a través del árbol vascular o sistema circulatorio hacia todas las partes del cuerpo, a través de células sanguíneas como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, etc. También tiene como función recolectar desechos metabólicos y llevarlos a diferentes órganos para su eliminación. Ayuda en la regulación de la temperatura corporal, así como del pH. Es un sistema cerrado donde la sangre circula de forma cíclica y no sale de los vasos sanguíneos la cual se clasifica en dos componentes importantes, circulación pulmonar y circulación sistémica.

1.1.1 La sangre y su función

La sangre es un fluido de vital importancia para el cuerpo, cuyas principales funciones son el transporte de células, oxígeno, nutrientes y hormonas a los diferentes tejidos del cuerpo, así también, la remoción de residuos metabólicos de las células transportándolos a diferentes órganos como pulmones, riñones, hígado e intestinos para su desecho.

La sangre permite mantener un correcto balance de diferentes aspectos como la temperatura, la osmolaridad y el pH del cuerpo, cuya correcta regulación son de gran importancia para el funcionamiento adecuado del organismo.

Por otro lado, la sangre tiene un papel protector al ayudar en la reparación de vasos sanguíneos dañados, ya que diversos componentes de la sangre son esenciales para los procesos de coagulación lo cual permite sellar la lesión, también ayuda a hacer frente ante enfermedades o infecciones gracias a la presencia de leucocitos o glóbulos blancos y de segundos mensajeros que tienen un papel importante en el sistema inmunológico ((IQWiG), 2006).

La sangre se considera un tejido ya que está compuesto de células como eritrocitos, leucocitos, plaquetas y otras sustancias suspendidas en un fluido llamado plasma, 45% de la sangre son células y 55% es plasma, la mayor parte del plasma es agua 90% y el resto proteínas y electrolitos disueltos en él (Figura 1.1).

Los eritrocitos son las células de mayor presencia en la sangre, son células no nucleadas las cuales tienen forma de disco que presentan hendiduras en su centro, son flexibles lo cual les permite moldearse para viajar libremente en los vasos sanguíneos. Son capaces de transportar oxígeno gracias a la hemoglobina que contienen, también recolectan el dióxido de carbono y lo transportan a los pulmones para su expulsión.

Los leucocitos a diferencia de los eritrocitos son células nucleadas y no contienen hemoglobina, hay diferentes tipos de leucocitos y se clasifican de acuerdo con la forma que presente su núcleo en microscopio. Los granulocitos (basófilo, neutrófilo y eosinófilo) tienen núcleos multilobulados, caso contrario, los agranulocitos (monocitos y linfocitos) tienen núcleos excéntricos y riñonados. Tienen diversas funciones, como hacer frente ante la presencia de cuerpos extraños como bacterias, parásitos, virus y hongos ayudando en su neutralización y eliminación. Producir anticuerpos contra blancos específicos como virus o gérmenes y modular la respuesta alérgica inflamatoria.

Las plaquetas o trombocitos, al igual que los eritrocitos son células no nucleadas en forma de disco, pero de menor tamaño y tienen un papel importante en el proceso de coagulación ayudando a formar un sello temporal al interior del vaso sanguíneo dañado y liberando factores de crecimiento para la reparación del vaso.

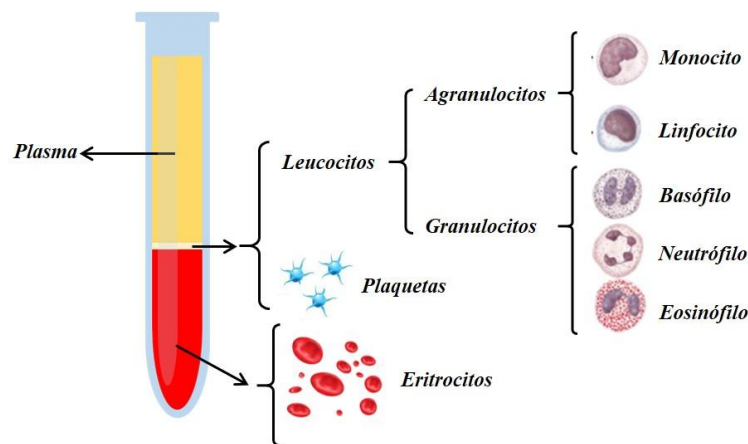


Figura 1.1 Elementos figurados en sangre.

1.1.2 El corazón y su anatomía

Es un órgano muscular que mantiene la sangre en movimiento a través del sistema circulatorio, se encuentra localizado dentro de la cavidad torácica envuelto en un tejido membranoso que mantiene el corazón en el mediastino. Esta membrana se conoce como pericardio. Protege, brinda un movimiento libre al corazón y lo mantiene lubricado para prevenir fricción durante proceso de contracción. El pericardio consta de dos partes principales: el pericardio fibroso y el pericardio seroso. El pericardio fibroso conforma la parte superficial o externa la cual envuelve al corazón y se encuentra sujeta al diafragma manteniendo en posición al corazón, está compuesto por tejido conectivo. El pericardio seroso se divide en dos partes, visceral y parietal, separadas por la cavidad pericárdica la cual contiene el fluido seroso quien funciona como lubricante. La capa visceral en contacto con el

fluido también se conoce como epicardio que junto con el miocardio y endocardio conforman la pared del corazón. Figura 1.2

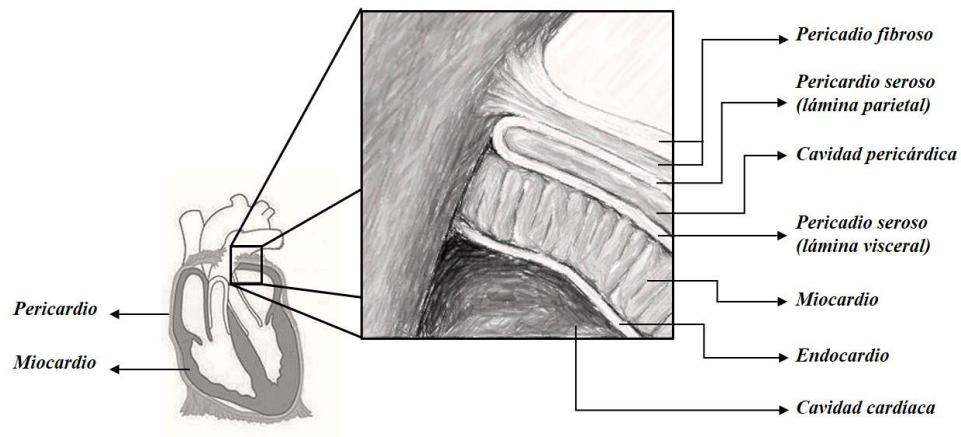


Figura 1.2 Estructura de los tejidos del corazón.

Por otra parte, el corazón también está constituido por otras dos capas intermedia e interna denominadas miocardio y endocardio. El miocardio es el tejido muscular del corazón, compuesto por células musculares especializadas que brindan la capacidad contráctil al corazón y que a diferencia de otras células musculares tiene la capacidad de conducir un impulso eléctrico. Para su correcto funcionamiento necesita de constante suministro de oxígeno y nutrientes, debido a esto se encuentra altamente irrigado por las arterias coronarias para brindarles oxígeno y eliminar los residuos metabólicos. El endocardio por su parte, es la capa interna del corazón la cual delimita las cámaras atrio-ventriculares (cavidades cardíacas) formadas por células tipo endotelio.

En mamíferos y en aves el corazón se encuentra dividido en cuatro cámaras; aurícula o atrio derecho e izquierdo y ventrículo derecho e izquierdo.

Mientras que la aurícula derecha alberga sangre pobre en oxígeno la aurícula izquierda es la que contiene sangre recién oxigenada y lista para ser enviada a todo el cuerpo. La aurícula derecha es alimentada por la vena cava (superior e inferior) mientras que la aurícula izquierda es alimentada por las venas pulmonares derecha e izquierda. (Figura 1.3)

Los ventrículos son las cámaras del corazón que colectan la sangre proveniente de las cámaras auriculares y la expulsan hacia fuera del corazón. El ventrículo derecho bombea la sangre hacia las arterias pulmonares haciéndola circular por el circuito pulmonar, mientras que el ventrículo izquierdo bombea la sangre hacia la arteria aorta la cual conduce la sangre por el circuito sistémico hacia todo el cuerpo. En los ventrículos las paredes del corazón son más gruesas proveyendo de mayor fuerza de contracción lo cual se traduce en el punto de mayor presión durante el ciclo cardíaco.

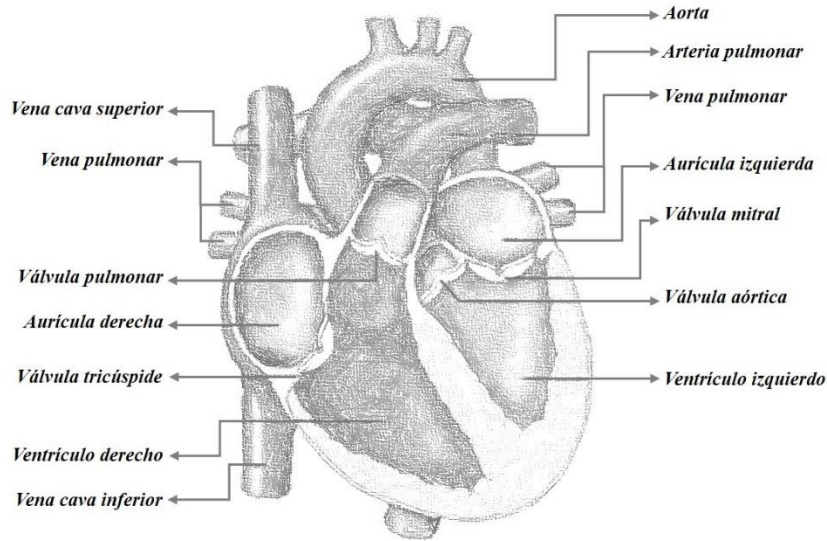


Figura 1.3 Anatomía general del corazón.

Las cámaras auriculares y ventriculares se encuentran separadas por las válvulas cardíacas, las cuales están formadas primordialmente de células endoteliales. Estas se clasifican en dos tipos:

- Válvulas atrioventriculares: Válvula bicúspide o mitral y válvula tricúspide ambas se encuentran entre los espacios auriculares y ventriculares e impiden el flujo retrogrado entre las cámaras auriculares y ventriculares.
- Válvulas semilunares: Válvula aórtica y válvula pulmonar las cuales controlan la salida de la sangre de las cámaras ventriculares hacia la arteria aórtica y pulmonar.

Las válvulas ejecutan su apertura y cierre de forma sincronizada y coordinada con los diferentes estadios del ciclo cardíaco (Figura 1.4).

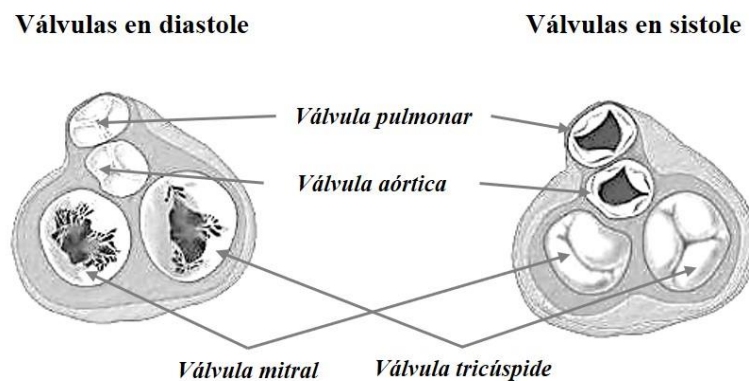


Figura 1.4 Válvulas cardíacas.

Se denomina ciclo cardíaco a los diferentes eventos durante los procesos de relajación (diástole) y contracción del corazón (sístole) los cuales se ilustran en la Figura 1.5, mientras que, la frecuencia con que se repite el ciclo se denomina ritmo cardíaco el cual es uno de los principales signos vitales. El corazón puede aumentar el ritmo cardíaco bajo diferentes condiciones con el propósito de aumentar el volumen de sangre que expulsa el corazón, al cual se conoce como gasto cardíaco. Algunas de las condiciones donde se incrementa el ritmo cardíaco son: el ejercicio, estrés psicológico o estresores ambientales.

Los diferentes eventos que se producen durante el ciclo cardíaco se enlistan a continuación:

1. Contracción ventricular isovolumétrica. En este punto da inicio la contracción ventricular, por consiguiente, la presión ventricular aumenta abruptamente provocando el cierre de las válvulas atrio-ventriculares. Posterior al cierre, la presión aumenta lo suficiente para abrir las válvulas aórtica y pulmonar, este es el periodo donde ocurre la contracción de los ventrículos, sin embargo, aún no se expulsa la sangre.
2. Eyección. Cuando la presión ventricular aumenta lo suficiente para generar un gradiente de presión entre los ventrículos y las arterias, las válvulas semilunares se abren permitiendo la expulsión de la sangre. Este proceso ocurre en dos etapas denominadas periodo de eyección rápida donde se expulsa el 70% de volumen del ventrículo y periodo de eyección lenta donde se expulsa el 30% restante. El periodo rápido ocurre en el primer tercio de la duración del todo el proceso.
3. Relajación ventricular isovolumétrica. Posterior a la sístole comienza el proceso de relajación permitiendo que la presión en los ventrículos disminuya rápidamente, por lo que el gradiente de presión entre ventrículo y arteria se invierte, por lo tanto, la sangre al intentar regresar al ventrículo cierra las válvulas semilunares de la arteria aorta y pulmonar. Durante este periodo la presión regresa a los niveles de la presión diastólica.
4. Llenado auricular. La sangre fluye de forma continua de las venas hacia las aurículas lo que provocará un aumento en la presión auricular, al ser esta mayor que en la presión ventricular debido al proceso de relajación, las válvulas atrio-ventriculares mitral y tricúspide se abren, permitiendo el vaciado de las aurículas hacia los ventrículos, en este paso se llena el 80% del volumen contenido en las aurículas.
5. Sístole auricular. El inicio de esta etapa esta orquestado por el nodo sinoauricular, también conocido como marcapasos del corazón al generar un potencial de acción el cual produce la contracción auricular llenando el 20% restante del volumen total de los ventrículos, permitiendo el inicio de un nuevo ciclo de bombeo ventricular.

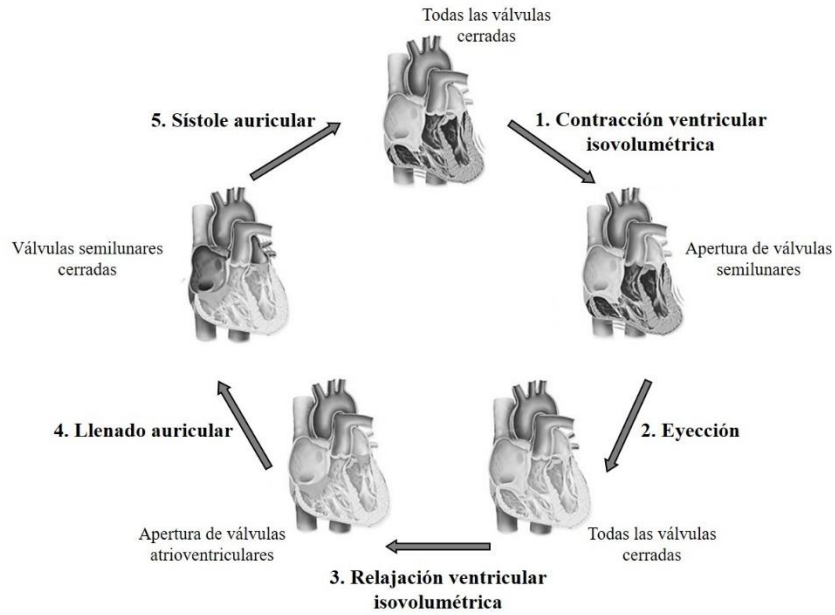


Figura 1.5 Ciclo cardíaco.

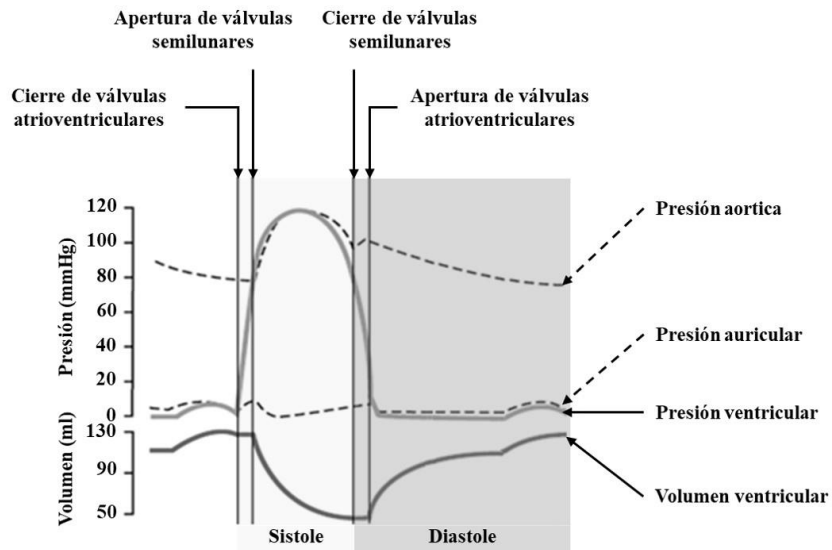


Figura 1.6 Presión y volumen durante el ciclo cardíaco.

1.1.3 Sistema eléctrico del corazón

También conocido como el sistema de conducción cardíaca (Figura 1.7), es quien controla cada uno de los eventos ocurridos durante el ciclo cardíaco. La actividad eléctrica del corazón comúnmente se ve reflejada gráficamente en un electrocardiograma.

El sistema eléctrico del corazón está compuesto de tres componentes principales:

Nodo sinoauricular o sinusal. Se encuentra localizado en la parte superior de la aurícula derecha.

Nodo atrio-ventricular. Este se localiza en la cruz cardiaca o cruce de los septos interatrial e interventricular con el septo atrioventricular.

Haz de His y fibras de Purkinje. Ubicado a lo largo de las paredes ventriculares.

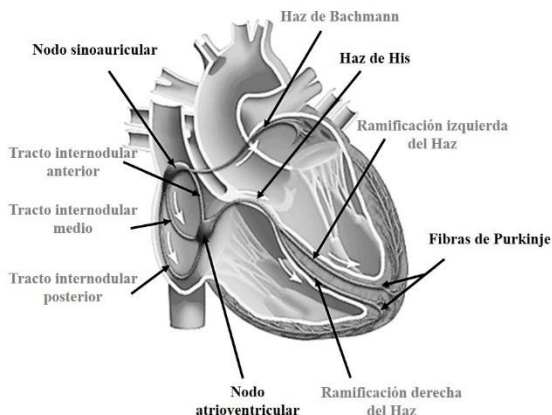


Figura 1.7 Sistema eléctrico del corazón.

Cada pulso cardíaco es puesto en marcha por una señal eléctrica desde el interior del músculo cardíaco, esta señal inicia en el nodo sinoauricular y se le conoce como el marcapasos natural del corazón. Cada pulso o ritmo cardíaco es el número de veces que el nodo sinoauricular se activa por minuto. Una vez que la vena cava ha llenado la aurícula derecha, la señal se activa y se propaga a través de la aurícula derecha e izquierda provocando la contracción de las aurículas para su vaciado. Posteriormente la señal llega al nodo atrio-ventricular donde la propagación de la señal se ralentiza hasta llegar al haz de His dando oportunidad para que los ventrículos se llenen. Una vez alcanzado el haz de His, la señal continúa su propagación rápidamente por sus ramificaciones derecha e izquierda, provocando la contracción de septo interventricular. Finalmente, la señal se propaga a través de las fibras de Purkinje recorriendo las paredes de los ventrículos para generar con ello la contracción ventricular.

1.1.4 Árbol vascular y la circulación

El árbol vascular o sistema circulatorio es la red de vasos sanguíneos por la cual se irriga la sangre desde el corazón hasta todo el cuerpo con el propósito de satisfacer las necesidades de los diferentes tejidos, acarreando nutrientes, gases, etc. y removiendo residuos para su eliminación, manteniendo el entorno adecuado para el óptimo mantenimiento y funcionamiento de las células. Los vasos que componen el sistema circulatorio se clasifican en arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas como se muestra en la Figura 1.8.

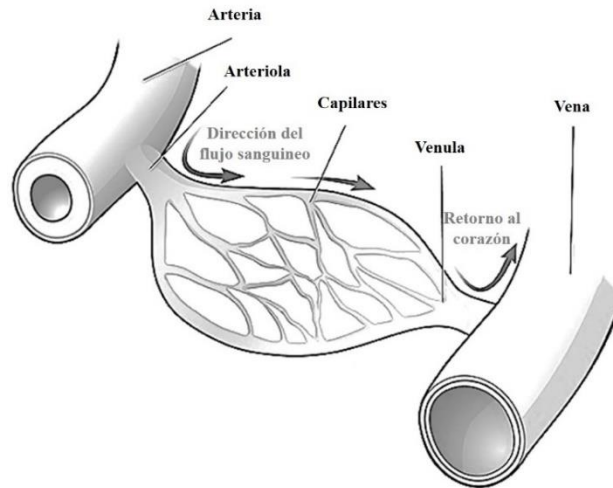


Figura 1.8 Clasificación de vasos sanguíneos.

La velocidad con la que la sangre fluye por los diferentes tejidos se encuentra en función de las necesidades nutritivas o excretoras de las diferentes partes del cuerpo, demandando mayor o menor flujo de sangre, para lo cual, el corazón y los vasos sanguíneos regulan su función para satisfacer esta demanda.

La circulación sanguínea inicia en los intervalos del pulso cardíaco, mientras el corazón se relaja, las aurículas se vacían hacia los ventrículos expandiéndolos seguido del periodo de eyección, donde los ventrículos se contraen expulsando la sangre hacia arterias mayores iniciando su distribución por todo el sistema circulatorio, el cual está clasificado en dos partes, circulación sistémica y circulación pulmonar. ((IQWiG), 2010)

La circulación sistémica también conocida como circulación periférica, provee sangre rica en oxígeno y otras sustancias vitales a los órganos y tejidos. Este circuito inicia en la arteria aorta donde la sangre expulsada del ventrículo izquierdo es distribuida hacia toda la red de vasos que lo comprenden, para finalmente retornar hasta la vena cava. La sangre al regresar al corazón presenta bajos niveles de oxígeno y alta en dióxido de carbono siendo necesaria su excreción a través de la circulación pulmonar (Figura 1.9).

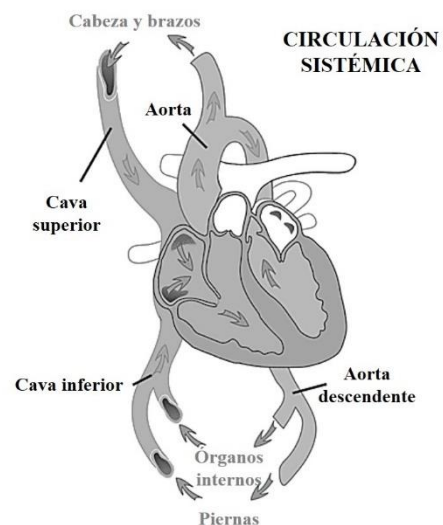


Figura 1.9 Circulación sistémica.

En la circulación pulmonar la sangre proveniente de la vena cava es impulsada por el corazón a través del ventrículo derecho hacia las arterias pulmonares quienes distribuyen la sangre a los pulmones para promover el intercambio gaseoso de dióxido de carbono por oxígeno. Posteriormente, la sangre oxigenada regresa por la vena pulmonar hasta la aurícula izquierda quien se vaciará hacia el ventrículo izquierdo para dar inicio a un nuevo ciclo de bombeo por la circulación sistémica (Figura 1.10).

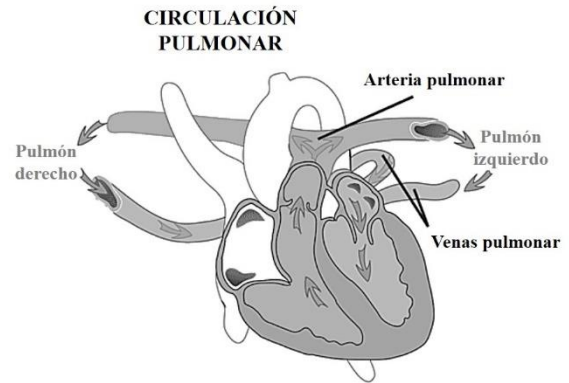


Figura 1.10 Circulación pulmonar.

Tanto las arterias, arteriolas, vénulas y venas se encuentran estructuradas por tres capas (Figura 1.11), las cuales se describen a continuación:

La primera capa denominada túnica adventicia es la capa externa de los vasos sanguíneos, esta capa es la de mayor tamaño en las venas. Está hecha de tejido conectivo la cual sirve como anclaje con los diferentes tejidos u órganos.

La segunda capa de los vasos en la túnica media, la cual conforma la parte intermedia de los vasos, esta consiste en un arreglo circulatorio de células de músculo liso, tejido conectivo y fibras de colágeno. Es la capa más gruesa de las arterias y es responsable de mantener el tono vascular permitiendo ajustar el diámetro de los vasos gracias a la capacidad de contracción y distensión que le brindan el arreglo de las células musculares.

Y finalmente la tercera capa es la túnica íntima, es la capa más interna de los vasos y está formada por una monocapa de células endoteliales, lámina basal y tejido conectivo. Esta capa se encuentra expuesta a los efectos del flujo sanguíneo y es la orquestadora de diversas funciones vasculares como modulación del tono vascular, angiogénesis, coagulación, entre otras.

Las arterias y venas aparte de llevar la sangre a todo el cuerpo tienen particularidades en su función. Las arterias ayudan principalmente en la regulación de la presión arterial al modificar su tono vascular, mientras que, las venas tienen como función almacenar más sangre gracias a que son los vasos de mayor diámetro, ayudan en la regulación de la temperatura corporal y en la migración de leucocitos, además, tienen presencia de válvulas con las cuales impiden que la sangre fluya en sentido contrario.¹

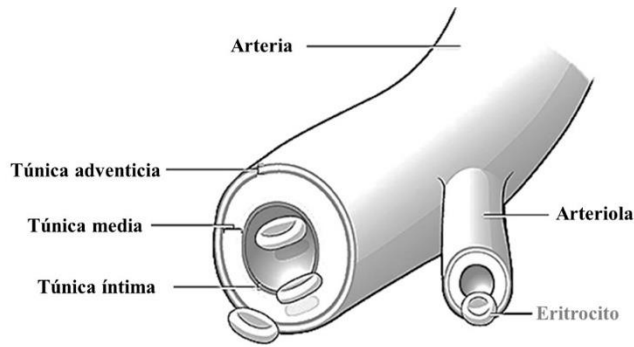


Figura 1.11 Estructura de los vasos sanguíneos

Por otra parte, los vasos a nivel capilar carecen de túnica adventicia y túnica media, ya que están formados únicamente por células endoteliales y tejido conectivo. Son macroscópicamente invisibles, permiten la interconexión entre arteriolas y vénulas creando un circuito cerrado, representan el “punto final” de la circulación en donde ocurre los procesos de intercambios gaseosos y nutrimentales hacia los tejidos circundantes. Los capilares representan la red de mayor densidad del todo el sistema vascular (Figura 1.12).

Las células endoteliales tienen un papel importante debido a que son la interfase directa entre la sangre en movimiento y los tejidos subyacentes, por ello es importante mantener su correcto funcionamiento para que el organismo tenga un óptimo desempeño. Fallas en su funcionamiento están relacionadas con enfermedades como la aterosclerosis, hipertensión pulmonar, asma, falla renal crónica, diabetes, derrame cerebral, esclerosis múltiple, etc.¹

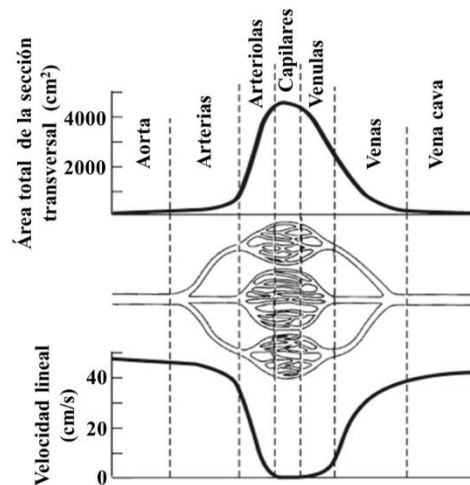


Figura 1.12 Densidad superficial de la vasculatura en un individuo.

Dependiendo de la localización del endotelio tendrá diversas respuestas, ya sea que presente diferente morfología y configuración o que tenga diferentes niveles de expresión genética, esto dependerá de las estimulaciones debidas al entorno las cuales pueden ser de naturaleza

bioquímica o biomecánica.¹ Ejemplos de ellos se muestran en la Tabla 1.1. lo que nos habla de una heterogeneidad fenotípica del endotelio.

Tabla 1.1 Ejemplos de estímulos y respuestas endoteliales. Modificado de ¹

Estímulos	Respuestas
Biomecánico	Nivel célula individual
Esfuerzo y tensión circunferencial	Morfología
Esfuerzo y tensión longitudinal	Flujo de calcio
Esfuerzo de corte	Traducción proteica
Bioquímicos	Modificaciones postraduccionales
Hipoxia	Expresión genética
Glucosa	Proliferación
Patogenos	Migración
Factores de crecimiento	Apoptosis
Hormonas sexuales	Nivel monocapa celular
Serina proteasas	Función de barrera
Quimiocinas	Adhesión leucocitaria
Citocinas	Nivel tejido (vaso, órgano u organismo)
Nucleotidos	Tono vascular
Esfingolípidos	Angiogénesis
Lipoproteínas	Inflamación
Heparán	Coagulación con depósito de fibrina
Óxido nítrico	
Interacciones célula-célula	
Hipertermia, hipotermia	
Balance ácido-base	

1.2 Estimulación mecánica vascular endotelial

El flujo de la sangre a través de los vasos sanguíneos va en sentido unidireccional de arteria-vena. Este se encuentra en función de dos factores, la diferencia de presión entre los extremos de un vaso en cualquier parte del sistema circulatorio y la resistencia vascular debida a la fricción entre el flujo de sangre y las células endoteliales la cual puede ser calculada de la siguiente forma:

$$F = \frac{\Delta P}{R}$$

A esta fórmula se le conoce como ley de Ohm, donde F es el flujo de sangre, ΔP es la diferencia de presión ($P_1 - P_2$) y R la resistencia. En la Figura 1.13 se muestra la representación gráfica de este principio.

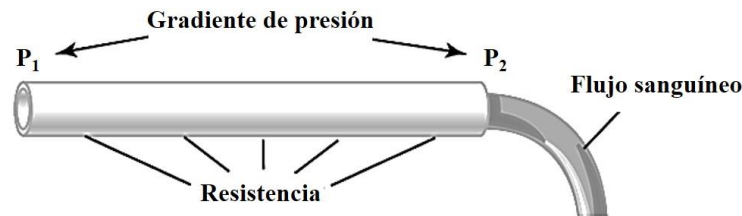


Figura 1.13 Gradiente de presión sanguínea. Modificado de Guyton

El flujo sanguíneo nos habla del volumen de sangre que pasa por un punto en un determinado intervalo de tiempo, este se puede ser en turbulento o laminar (Figura 1.14).

Un flujo turbulento se puede producir cuando la velocidad con que fluye la sangre es muy grande y las paredes de los vasos presentan rugosidades ya sea por presencia de depósitos de ácidos grasos en las paredes, bifurcaciones o curvas muy pronunciadas haciendo que las líneas de flujo de la sangre apunten en todas direcciones formando remolinos y con ello provocando mayor fricción sobre las paredes de los vasos.

En el flujo laminar, la velocidad con que se desplaza la sangre es estable, permitiendo que las líneas de flujo se mantengan paralelas a las paredes a lo largo del vaso, este tipo de flujo genera un perfil parabólico de velocidades siendo el centro del vaso donde se presenta la máxima velocidad ya que es el punto donde la resistencia ejercida por las paredes de los vasos es mínima.

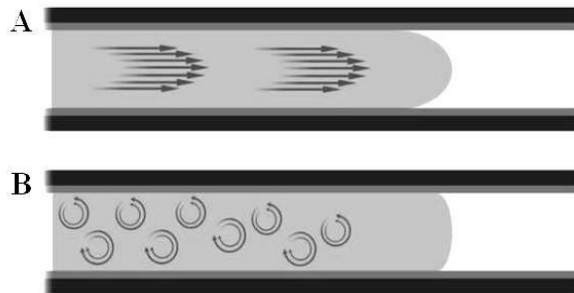


Figura 1.14 Tipos de flujo. A) Fluido con flujo laminar, las capas de flujo se desplazan unidireccionalmente de forma ordenada. B) Fluido con flujo turbulento o caótico, los elementos del fluido se mueven desordenadamente.

Para determinar si un flujo es laminar es necesario calcular el número de Reynolds que determina la relación entre el diámetro del vaso, la velocidad, la densidad (los cuales aumentan proporcionalmente la posibilidad de generar un flujo turbulento) y viscosidad de la sangre. Se puede calcular de la siguiente manera:

$$Re = \frac{v \cdot d \cdot \rho}{\eta}$$

Donde **Re** es el número de Reynolds, **v** es la velocidad promedio del flujo, **d** es el diámetro del vaso, **ρ** es la densidad y **η** es la viscosidad. Cuando el número de Reynolds es mayor a 2300 el flujo considera turbulento. En las porciones inmediatas al corazón de las arterias aorta y pulmonar el número de Reynolds se incrementa durante el proceso de expulsión de la sangre dándose las condiciones necesarias para que se genere un flujo turbulento. Sin embargo, en porciones longitudinales de los vasos como la porción torácica de la aorta el flujo permanece laminar.

Durante el proceso de circulación de la sangre, los vasos sanguíneos se encuentran sujetos a diferentes condiciones de estrés mecánico por efecto de la presión arterial y el flujo sanguíneo, se les conoce como tensión de pared y esfuerzo de corte.

1.2.1 Tensión de pared

La tensión de pared es el estrés generado por presión arterial al ejercer tensión a través de las paredes de los vasos, este tipo de estrés tiene componentes circunferencial, longitudinal y radial como se muestra en la Figura 1.15.

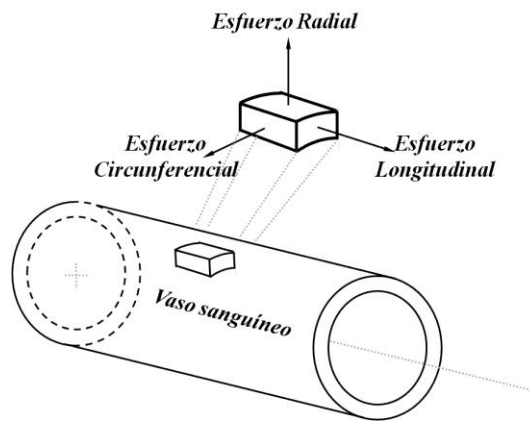


Figura 1.15. Componentes de la tensión de pared.

El esfuerzo circunferencial es una fuerza normal en dirección tangencial al radio del vaso (Figura 1.16), se calcula a partir de la ecuación de Young-Laplace, siempre que la pared del vaso sea muy delgada, esto quiere decir que tenga una relación mínima de 1:10 con relación al radio del vaso. Este tipo de estrés es el más predominante y puede ser estimado de la siguiente manera:

$$\sigma_1 = \frac{Pr}{t}$$

Donde P es la presión arterial, t es grosor de la pared del vaso, r es el radio interno del vaso y σ_1 es el esfuerzo circunferencial.

El esfuerzo longitudinal es la fuerza generada por la presión interna del vaso a lo largo del eje de simetría del vaso (Figura 1.16), y se calcula de la siguiente manera:

$$\sigma_2 = \frac{Pr}{2t}$$

Donde σ_2 es el esfuerzo longitudinal. Este resulta en aproximadamente la mitad del estrés circunferencial.

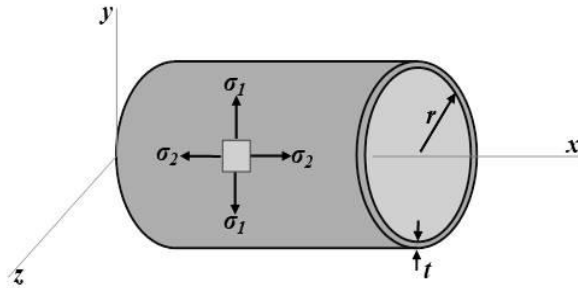


Figura 1.16 Representación gráfica de esfuerzo circunferencial y longitudinal.

El esfuerzo radial es la fuerza ejercida desde o hacia el eje central del vaso (Figura 1.17) y se calcula de la siguiente manera:

$$\sigma_3 = \frac{-P}{2}$$

Donde σ_3 es el estrés radial.

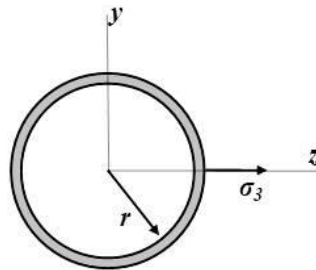


Figura 1.17 Representación gráfica del esfuerzo radial

Todos los componentes de los vasos se encuentran sometidos a los diferentes tipos de esfuerzos ya mencionados, lo que quiere decir que, tanto células musculares como endoteliales son estimuladas mecánicamente.

1.2.2 Esfuerzo de corte

La sangre al moverse a lo largo del interior de los vasos sanguíneos incurre en un esfuerzo de corte (τ) sobre la pared interna de los vasos producto del arrastre viscoso de la sangre produciendo un perfil parabólico de velocidad (Figura 1.18), dicho esfuerzo de corte es proporcional al gradiente de velocidad (\dot{v}) y a la viscosidad (μ), tiene una dirección opuesta a la dirección del flujo y se expresa de la siguiente manera:

$$\tau = -\mu\dot{v}$$

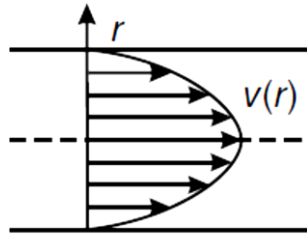


Figura 1.18 Perfil parabólico de velocidad de un fluido a lo largo de un tubo cilíndrico de radio r .

Esta expresión es válida para fluidos newtonianos, los cuales se caracterizan por tener una viscosidad constante, sin embargo, en fluidos biológicos no necesariamente se comportan como fluidos newtonianos, en particular, la sangre se comporta como fluido no-newtoniano una velocidad de corte $\dot{\nu}$ baja puesto que su viscosidad no es constante, sino que, está en función de la velocidad de corte.²

En el ser humano se llegan a experimentar esfuerzos de corte máximos de 10-70 dinas/cm² en arterias o 1-6 dinas/cm² en venas, sin embargo, debido a que el flujo de la sangre cambia en función de la actividad contráctil del corazón, el esfuerzo de corte aumenta y decrece en un mismo ciclo cardiaco, inclusive puede decrecer a cero o cambiar su dirección momentáneamente (Figura 1.19), a lo cual se le llama flujo retrógrado.³⁻⁶

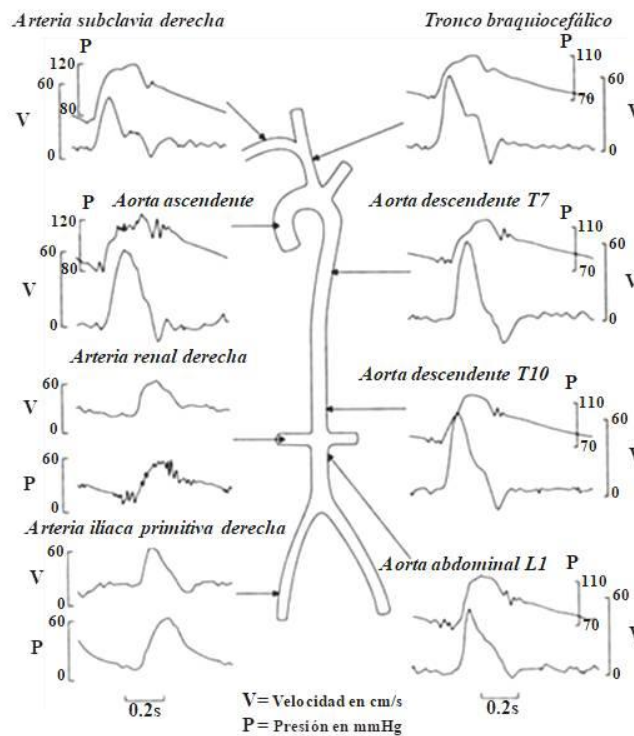


Figura 1.19 Presión arterial y velocidad del flujo sanguíneo en varios puntos de la red arterial. Modificado de ³.

El flujo de sangre en el sistema circulatorio presenta características de flujo laminar en porciones rectas de los vasos sanguíneos, este flujo cambia se vuelve turbulento cuando circula por vasos curvos y cuando se presenta una ramificación de los vasos, esto se debe a las zonas de estancamiento, recirculación y formación de remolinos en la sangre. La aparición de placa ateromatosa ocurre en zonas donde el esfuerzo de corte es bajo y donde la intensidad y dirección no son estables (Figura 1.20), por ello, se piensa que el esfuerzo de corte mayor a 1 dina/cm^2 tiene un efecto ateroprotector, mientras que el flujo turbulento se considera favorece la aparición de placas ateromatosas.^{4,5,7}

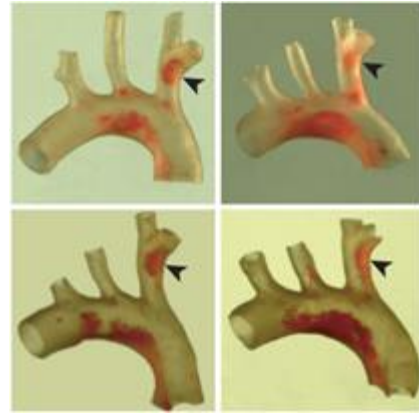


Figura 1.20 Muestra de lesiones ateroscleróticas en arco aórtico y en la bifurcación del tronco braquiocefálico, las lesiones fueron teñidas con Aceite rojo. Imagen modificada de ⁷.

El esfuerzo de corte solo es aplicado sobre las células endoteliales a diferencia de la tensión de pared la cual es sentida en cada una de las capas de los vasos sanguíneos.

Se ha reportado que la aparición de lesiones ateroscleróticas está relacionada con las regiones donde se presentan esfuerzos de corte bajo o regiones de flujo turbulento producto de las bifurcaciones y de las curvaturas los vasos sanguíneos, esto lo podemos observar de forma clara en la Figura 1.21 donde se muestra las zonas de mayor incidencia en la aparición lesiones ateroscleróticas que requieren de cirugía.⁸

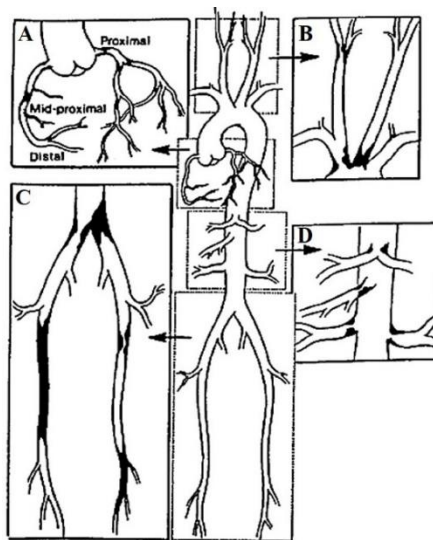


Figura 1.21 Distribución de las principales de lesiones ateroscleróticas que requieren atención medica quirúrgica. Imagen modificada de ⁸.

1.2.3 Respuestas fisiológicas por efecto del esfuerzo de corte

El flujo de la sangre a lo largo del sistema circulatorio predomina como laminar, sin embargo, como se mencionó anteriormente se generan flujos turbulentos en las diferentes regiones de la red vascular producto de su localización y de la morfología del vaso.

Los flujos laminares a través de los vasos hacen que la célula modifique su morfología tomando una forma alargada y alineada paralelamente con la dirección del flujo. Por el contrario, los flujos turbulentos permiten a las células mantener una morfología sin ninguna orientación preferente.

Por ejemplo, en el arco aórtico las células endoteliales mantienen una morfología característica dependiendo de la localización, en este caso, debido a la curvatura y el tamaño del vaso, el flujo producido en la parte superior del arco aórtico es laminar induciendo que las células endoteliales se alarguen y orienten en dirección de las líneas de flujo (Figura 1.22B), mientras que en la parte inferior del arco aórtico mantienen una morfología aleatoria la cual carece de una orientación particular, esto se debe a la formación de flujo turbulento en esa zona (Figura 1.22C). Otro caso se observa en las ramificaciones intercostales de la aorta donde se generan flujos recirculantes los cuales no inducen cambios en la morfología de las células endoteliales manteniendo su morfología poligonal esto lo podemos observar en la Figura 1.23 donde vemos que las células de la esquina superior izquierda se encuentran alineadas con la dirección del flujo, mientras que las células de la esquina inferior derecha no presentan una alineación o morfología específica.^{9,10}

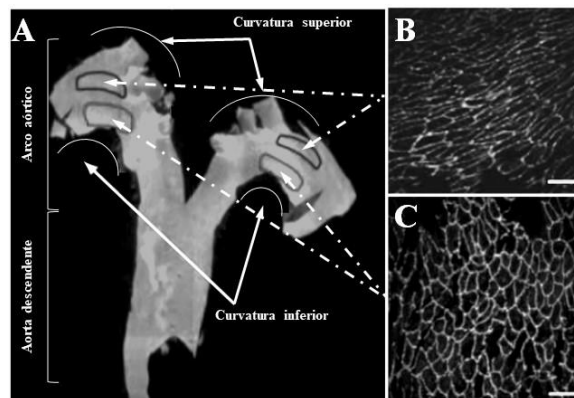


Figura 1.22 Arco aórtico “En Face” con inmunofluorescencia para proteínas de unión. A) Morfología del endotelio en regiones de flujo laminar y turbulento en arco aórtico. B) Endotelio de la curvatura superior del arco aórtico. C) Endotelio de la curvatura inferior del arco aórtico. Imagen modificada de KS Heo 2014.

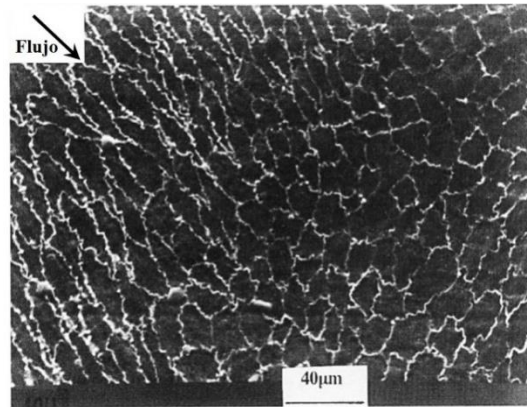


Figura 1.23 Morfología de células endoteliales entre la aorta torácica y una ramificación de arteria intercostal, región donde se presenta una interfaz entre el flujo laminar y el turbulento. Imagen modificada de ¹⁰

Además de modificar su morfología en respuesta a esfuerzos de corte, las células endoteliales han mostrado cambios a nivel molecular al incrementar la expresión de proteínas de unión como VE-Cadherina (Figura 1.24) donde se observó que en la curvatura inferior del arco aórtico las células endoteliales presentan contornos más marcados para la tinción de VE-Cadherina, su expresión se ve aumentada comparada con las regiones torácicas donde predomina los flujos laminares, esto a pesar de estar bajo la mismas condiciones químicas sugiriendo que es consecuencia del tipo de flujo al que se encuentran sometidos ¹¹. En otro estudio se documenta que las células endoteliales de arco aórtico localizadas en la curva externa (GC) muestran una mayor expresión de la sintasa del óxido nítrico (eNOS) comparadas con las células localizadas en el arco interno (LC) (Figura 1.25)⁷.

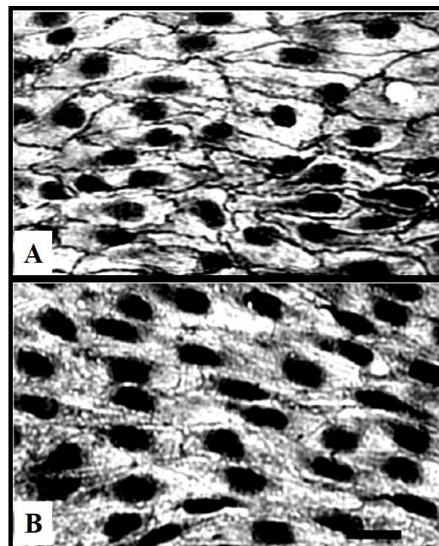


Figura 1.24 Tinción de VE-Cadherinas de células endoteliales de arco aórtico. A) Región inferior del arco aórtico. B) Región superior del arco aórtico. Imagen modificada de ¹¹.

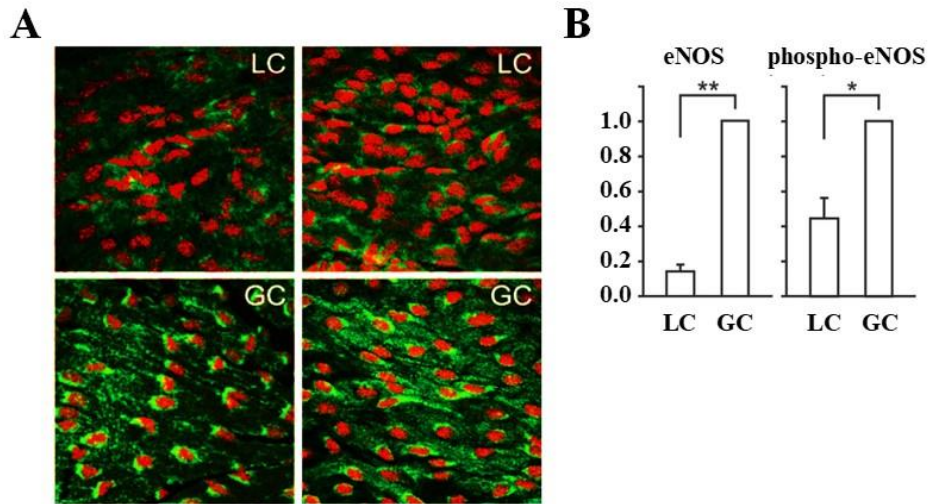


Figura 1.25 Ensayo de inmunocitoquímica para eNOS. A) Inmunofluorescencia de eNOS y phospho-eNOS en curvatura inferior (LC) y superior (GC) del arco aortico (fluorescencia en color verde, nucleos teñidos en rojo). B) Análisis comparativo de la expresión de eNOS entre las regiones LC y GC. Imagen modificada de ⁷.

Los reportes mostrados anteriormente fueron realizados en tejidos de vasos sanguíneos donde tiene predicho la formación de regiones de flujo turbulento y laminar respectivamente. Sin embargo, para la realización de estudios *in vitro* se han montado diferentes sistemas para la aplicación de esfuerzos de corte dentro de los cuales se encuentran el cultivo de endotelio en capilares de vidrio con perfusión (Figura 1.26A), agitación orbital (Figura 1.26D), viscosímetro de cono y plato (Figura 1.26B y C), viscosímetros de placas paralelas y cámaras de perfusión de placas paralelas (Figura 1.26E).

Las desventajas que muestran el uso de capilares recaen en la poca cantidad de células que se pueden obtener para la realización de diferentes bioensayos, los viscosímetros de placas paralelas y agitación orbital no generan un esfuerzo de corte uniforme sobre toda la muestra del cultivo. Los sistemas más utilizados para el estudio de la respuesta mecanosensible del endotelio por efecto del esfuerzos de corte son el viscosímetro de cono y plato y la cámara de perfusión de placas paralelas los cuales permiten la aplicación de diferentes intensidades esfuerzo de corte uniforme sobre las muestras de cultivo y la posibilidad de obtener cantidades suficientes de células para su análisis permitiendo el estudio de vías de señalización y expresión genética.^{5,6}

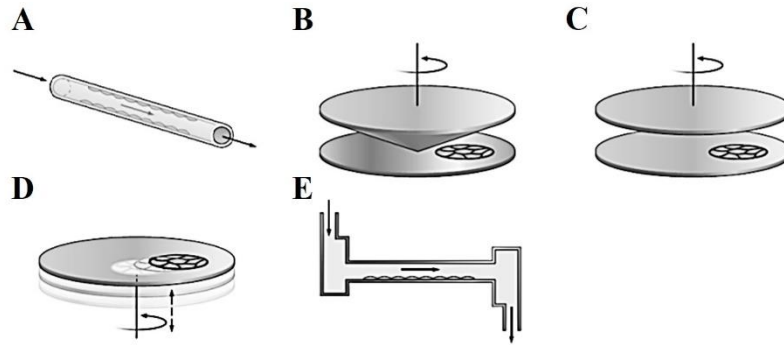


Figura 1.26 Sistemas de estimulación “in vitro” para la aplicación de esfuerzo de corte. Imagen modificada de ⁵.

El uso de estos sistemas de estimulación ha aportado información mostrando diferentes respuestas fisiológicas ante la estimulación con esfuerzo de corte. Al igual que las células mostradas *En Face* anteriormente, las células endoteliales en cultivo son capaces de modificar su morfología al ser sometidas a esfuerzo de corte acompañados de un reordenamiento del citoesqueleto donde los filamentos de actina se arreglan en manojos alineados paralelamente (0°) (Figura 1.27C) en la dirección del flujo,¹²⁻¹⁴ sin embargo, en endotelio extraído de válvulas aórticas presentan un comportamiento particular al alinearse de forma perpendicular (90°) (Figura 1.28D) a la dirección del flujo tras ser sometido a esfuerzo de corte.^{15,16}

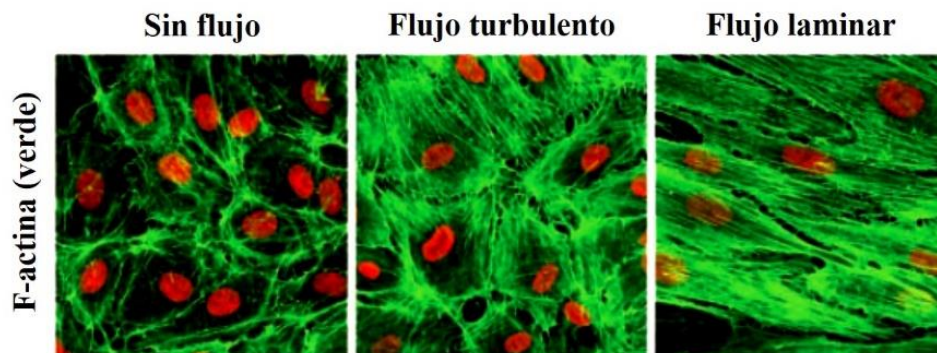


Figura 1.27 Tinción de fibras de actina de células endoteliales in vitro bajo diferentes tipos de flujo. (Verde para fluorescencia de actina y rojo para tinción de núcleos). Imagen modificada de ¹².

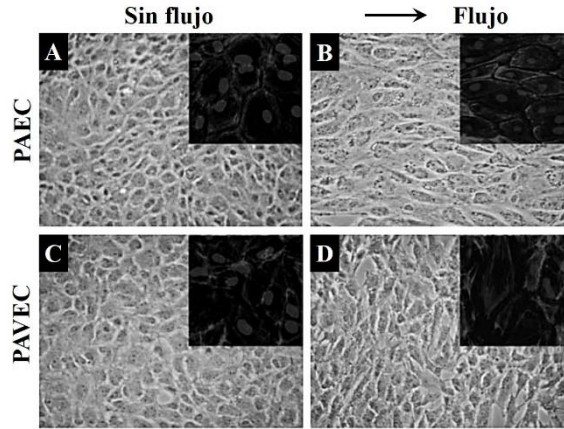


Figura 1.28 Células endoteliales PAEC muestran alineación paralela a la dirección del flujo (A y B) y células endoteliales PAVEC muestran alineación perpendicular a la dirección del flujo (C y D). Imagen modificada de.¹⁶

Otras respuestas documentadas de la estimulación por esfuerzo de corte (Figura 1.29) son el incremento en la síntesis de óxido nítrico (NO) vía la activación de la sintasa del óxido nítrico (eNOS) así como el aumento de su expresión genética.¹⁷⁻²⁰ Proteínas como Trombomodulina (TM), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína de unión celular (ICAM-1) y la enzima superóxido dismutasa (SOD) ven aumentada su expresión, mientras que las proteínas de unión como VCAM-1 y VE-Cadherina disminuyen su expresión.

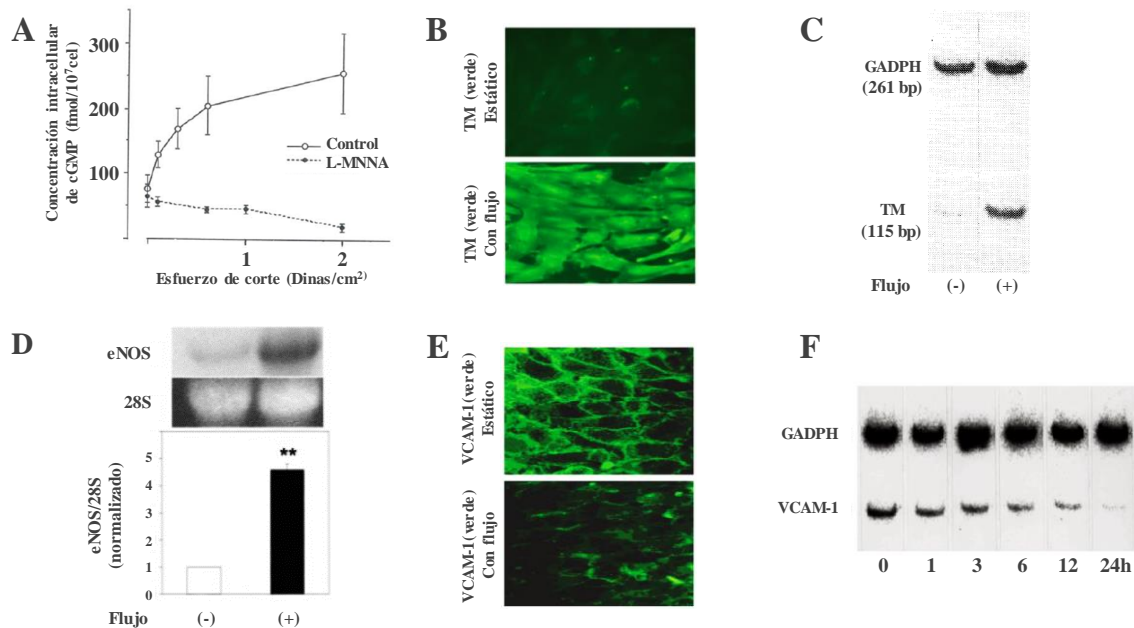


Figura 1.29 Respuestas de células endoteliales producidas tras estimulación por esfuerzo de corte. A) Medición indirecta de la producción de ON a través de cambios en los niveles de cGMP. B) Tinción inmunofluorescente de la proteína TM. C) Western blot para la expresión de TM. D) Northern blot para la expresión de eNOS. E) Tinción inmunofluorescente para la proteína VCAM-1. F) Cambios temporales de la expresión de mRNA de VCAM-1. Imágenes modificadas de^{17,18,21}.

La expresión genética en las células endoteliales se ven influenciadas en función de la magnitud del estímulo, ya que a esfuerzos de corte bajo ($<1 \text{ dina/cm}^2$) proteínas como VCAM-1 aumentan su expresión, por el contrario, a esfuerzos de corte altos ($10\text{-}20 \text{ dinas/cm}^2$) su expresión disminuye. Otras proteínas también aumentan su expresión al ser estimuladas con bajos esfuerzo de corte, entre ellas se encuentran las citocinas (IL6 Y IL8), quimiocina (CCL2), factor tisular y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB).²²

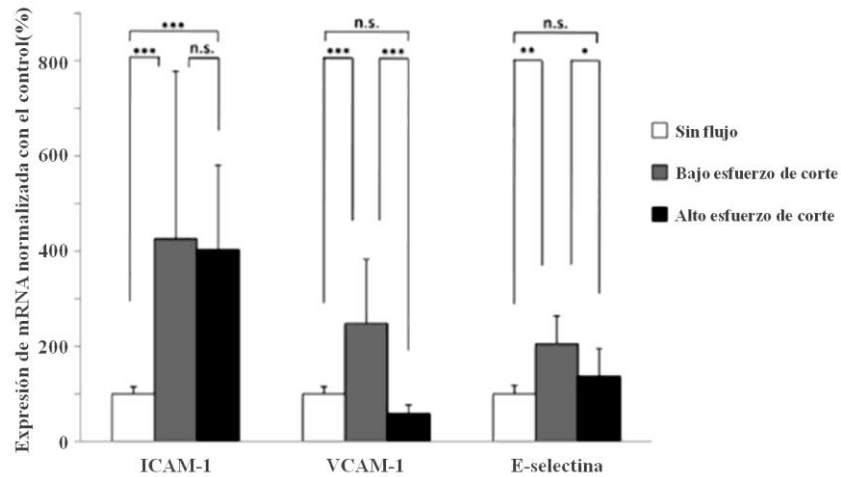


Figura 1.30 Expresión de genética de proteínas de unión a bajo y alto esfuerzos de corte. Imagen modificada de ²².

En resumen, la estimulación por esfuerzo de corte induce cambios en la morfología de las células, el tono vascular, efectos vasoprotectores y puede modificar expresión genética de algunas proteínas. Con esto podemos pensar que las células son capaces de regular su función en respuesta al esfuerzo de corte, teniendo la capacidad de distinguir entre tipo de esfuerzo, tiempo e intensidad del estímulo.

1.3 Mecanotransducción del esfuerzo de corte

Durante el estudio del fenómeno de estimulación por esfuerzo de corte se ha documentado cómo las células endoteliales son capaces de modificar o modular algunas de sus funciones, por ello, grupos de investigación se encuentran estudiando posibles mecanotransductores del esfuerzo de corte, sin embargo, el mecanismo sensor por el cual las células transducen el estímulo mecánico en una señal química intracelular sigue sin ser elucidado. Se han propuesto varias teorías las cuales incluyen participación de canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G, receptor tirosina quinasa, proteínas de unión, glicocáliz, cilio primario, caveolas, citoesqueleto y recientemente la membrana plasmática, en la Figura 1.31 se encuentran ilustrados algunos de ellos.

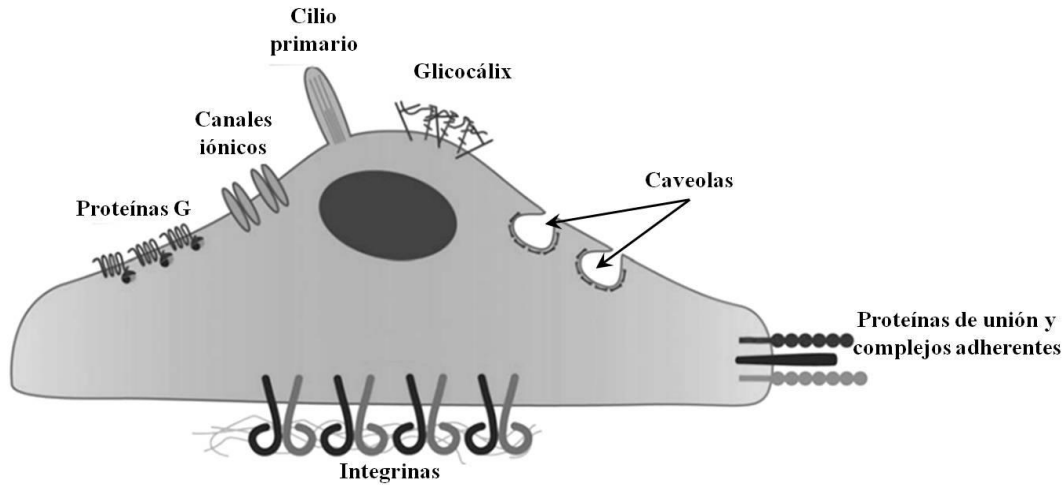


Figura 1.31 Componentes celulares involucrados en el proceso de mecanotransducción del esfuerzo de corte en células endoteliales.

A continuación, revisaremos más a detalle cada uno de estos posibles mecanotransductores del esfuerzo de corte.

1.3.1 Proteínas de unión

Diversas proteínas de unión han sido asociadas a la respuesta mecanosensible. Las integrinas que son un tipo de glicoproteína transmembranal cuyo dominio extracelular se encuentra asociado a proteínas de la matriz extracelular y en su dominio citoplasmático interactúa con diversas proteínas adheridas en sus contactos focales entre las que se encuentran la quinasa de adhesión focal (FAK), la familia de quinasas Src y proteínas de citoesqueleto como α -actina, vinculina, talina, tensina y paxillina.²³⁻²⁶ Se ha observado la activación de integrinas tras la estimulación mecánica por choque-hiperosmótico (HOS) lo que subsecuentemente condujo a la activación de la vía de señalización de Ras-ERK, inducida tras la fosforilación de PECAM-1 en las uniones celulares.^{27,28} Las Cadherinas son las proteínas más abundantes presentes en las uniones estrechas en cuyos dominios citoplasmáticos están ligadas a las fibras de actina del citoesqueleto vía proteínas cateninas como β -catenina y γ -catenina. VE-cadherina que es específica de endotelio forma un complejo proteico con PECAM-1 y VEGFR2 se propone tiene un papel importante en la traducción de esfuerzo de corte puesto que en ratones *VE-cadherina*^{-/-} y *PECAM-1*^{-/-} se ve inhibida la activación de las Src-quinadas (Figura 1.32A), PI3-quinasas, integrinas y la alineación de las fibras de actina en la dirección del flujo (Figura 1.32B).^{14,29}

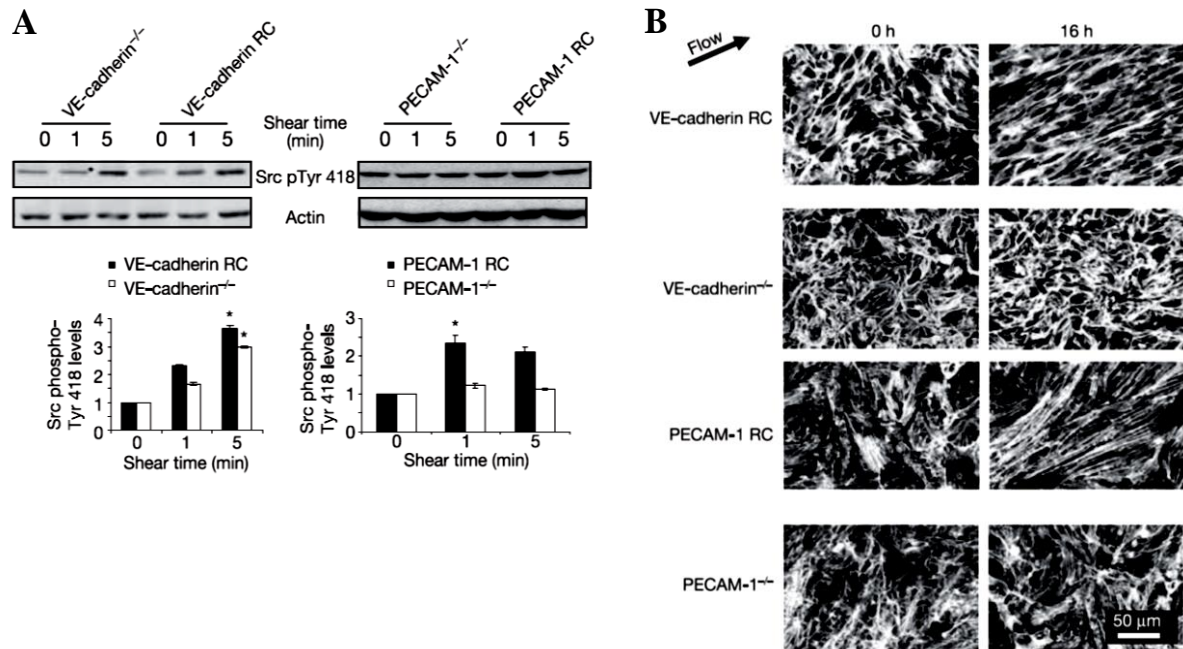


Figura 1.32 Efecto en los niveles de fosforilación de Src y alineamiento de las células en dirección del flujo inducido por esfuerzo de corte en células carentes de VE-cadherina (VE-cadherina^{-/-}) y PECAM-1 (PECAM-1^{-/-}). **A**) Western blot para Src fosforilada a diferentes tiempos de estimulación por esfuerzo de corte en células VE-cadherina^{-/-} y PECAM-1^{-/-}, viéndose atenuada la fosforilación en células VE-cadherina^{-/-} a 5 min de estimulación, mientras que las células PECAM-1^{-/-} presentan inhibición en los niveles de fosforilación en ambos tiempos de estimulación. **B**) Células control y células sometidas a estimulación por esfuerzo de corte durante 16 horas fueron fijadas y teñidas con faloidina rodamina observando que las células VE-cadherina^{-/-} y PECAM-1^{-/-} pierden su capacidad de alinearse con la dirección de flujo, la cual se ve recuperada al reconstituir ambas proteínas respectivamente. Imagen modificada de ²⁹.

1.3.2 Glicocalix

La glicocalix es la capa polimérica que recubre la superficie de la membrana plasmática de las células endoteliales en el lumen de los vasos (Figura 1.33). Está formada por carbohidratos y glicoproteínas que se encuentran aglomerados entre sí en ausencia de flujo. Conforme el flujo aumenta, la glicocalix se comienza a desenrollar en dirección de flujo exponiendo sitios de unión a Na⁺ iniciando las cascadas de señalización. Por otro lado, se propone que los glicoproteicos que constituyen parte de la glicocalix sienten el esfuerzo de corte transmitiéndolo directamente a las caveolas, en las cuales se lleva a cabo el proceso de fosforilación de eNOS que comúnmente es activada por la vía Src.³⁰⁻³⁴

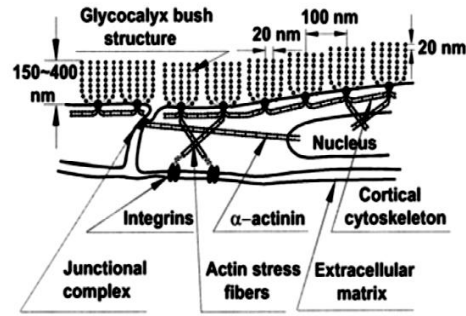


Figura 1.33 Esquema de interacciones de glicocálix con diferentes moléculas de las células endoteliales. Imagen modificada de ³¹.

1.3.3 Cilio primario

El doblamiento de cilio primario localizado en la superficie de las células endoteliales se piensa permite el influjo de Ca^{2+} activando la cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} . Se proponen como mecanotransductores a los receptores policistina-1 (PC1) y policistina-2 (PC2) que pertenece a la familia de canales TRP permeables a Ca^{2+} , ambos se localizan en el cilio primario e interactúan a través de sus dominios citoplasmáticos. En ratones $PC1^{-/-}$ y $PC2^{-/-}$ el influjo de calcio y la producción de óxido nítrico inducido por esfuerzo de corte se vieron suprimidos (Figura 1.34). Sin embargo, los cilios primarios parecen ser desensamblados bajo la aplicación de esfuerzo de corte y han sido observados *in vivo* en regiones propensas a la formación de ateromas, lo cual sugiere su participación en el sentido de esfuerzos de corte bajos.³⁵⁻⁴⁰

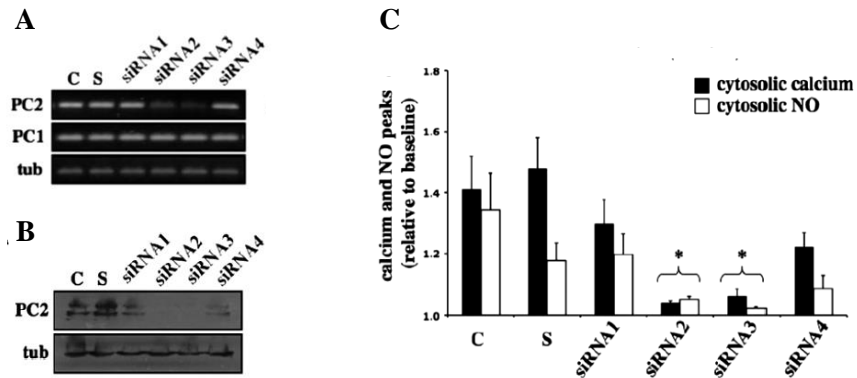


Figura 1.34 Efectos en el aumento por estimulación de esfuerzo de corte de calcio y óxido nítrico citoplasmático tras la inhibición en la expresión de Policistina-2 (PC2). A) Análisis en los niveles de transcritos de PC2, PC1 y tubulina de células transfectadas con interferentes contra PC2. B) Western blot para ver los niveles de expresión PC2. C) Cambios en los niveles de calcio y óxido nítrico citoplasmático inducido por esfuerzo de corte (7 dinas/cm²) en células control (C) células transfectadas con interferente desordenado (S), y células transfectadas con los cuatro interferentes (siRNA1-4) del receptor PC2, observando una disminución en la respuesta en las células transfectadas con siRNA2 y 3. Imagen modificada de ⁴⁰.

1.3.4 Citoesqueleto

El citoesqueleto es la red estructural o andamiaje de la célula, se encuentra formado por diferentes componentes entre los que se encuentran microfilamentos, microtubulos, y filamentos intermedios. El cual se ha propuesto como mecanismo transductor del esfuerzo mecánico. Se ha propuesto un modelo de tensegridad en la célula para explicar el proceso de transducción de una fuerza física en una señal biológica.

El modelo consiste en un arreglo de eslabones rodeados e interconectados con elementos tensores que dan equilibrio a la estructura, cuando dicho arreglo es sometido a un esfuerzo externo los elementos estructurales del modelo se rearreglan sin experimentar ningún tipo de ruptura topográfica o pérdida en la continuidad tensora lo que podría activar moléculas asociadas a citoesqueleto. El citoesqueleto como se ha mencionado anteriormente ha sido asociado a diferentes respuestas como la producción de óxido nítrico y la expresión de ICAM-1 inducido por esfuerzo de corte (Figura 1.35).^{41,42}

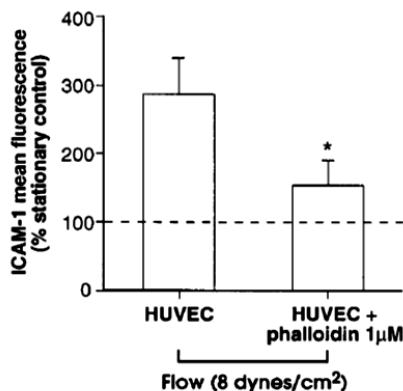


Figura 1.35 Efecto en la expresión de ICAM-1 inducida por esfuerzo de corte tras la fijación de las fibras de actina del citoesqueleto, observando una atenuación en la expresión de ICAM-1 en las células tratadas con Faloidina. Imagen modificada de ⁴².

1.3.5 Caveola

Las caveolas son microdominios de membrana en forma de invaginaciones que albergan tanto a receptores, canales iónicos, proteínas quinasa y otras moléculas activadoras de vías de señalización. Han sido implicadas en la respuesta mecanosensible debido a la observación de ondas de calcio que tienen inicio en los espacios caveolares y se propaga a lo largo de la célula, es sabido que, los incrementos de calcio en la vecindad caveolar producen una rápida liberación de eNOS al citoplasma permitiendo catalizar la síntesis de óxido nítrico. Por otro lado, se ha documentado que las células endoteliales de ratones *caveolina-1^{-/-}* pierden la vaso-reestructuración dependiente de flujo y ven afectada su capacidad vasodilatadora en comparación con ratones silvestres (Figura 1.36).⁴³⁻⁴⁶

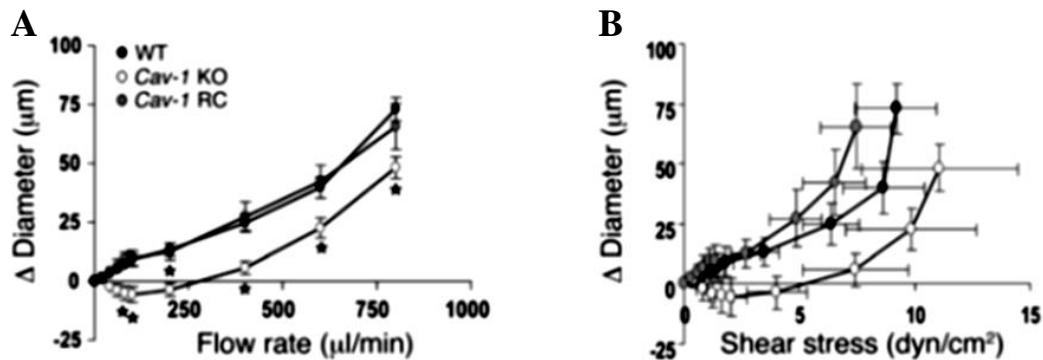


Figura 1.36 Actividad vasodilatadora en arterias carótidas aisladas de ratones silvestres (WT), caveolina-1^{-/-} (Cav-1 KO) y caveolina-1 reconstituida (Cav-1 RC) por estimulación de esfuerzo de corte. A) Relajación del vaso en función de la velocidad de flujo, mostrando una disminución en la capacidad de relajación en el grupo carente de caveolina-1. B) Relajación del vaso en función del esfuerzo de corte aplicado. Imagen modificada de ⁴⁶.

1.3.6 Receptores tirosina quinasas

Se ha documentado la activación de receptores tirosina quinasas como VEGFR2 y Tie-2 (Figura 1.37) en ausencia de su ligando luego de la aplicación de esfuerzo de corte, para lo cual se han sugerido posibles mecanismos de activación. El primero de ellos propone que esfuerzo de corte puede estar favoreciendo la dimerización de los monómeros de VEGFR2 al alterar su distribución espacial en la membrana plasmática. El segundo mecanismo propuesto es el cambio conformacional del receptor por efecto del esfuerzo de corte promoviendo con ello la unión de otras tirosinas quinasas como Src la cual es capaz de fosforilar al receptor. Un tercer mecanismo sugiere que la fosforilación de VEGFR2 podría ser provocada por la liberación de ATP a través de la ATP-sintasa superficial localizada en balsas. Diversas vías de señalización son activadas por efecto de la fosforilación de estos receptores permitiendo la activación de proteínas quinasas como ERK, PI3-Kinasa y Akt, lo que resulta en la activación de eNOS y subsecuentemente en la producción de ON.^{18,47-50}

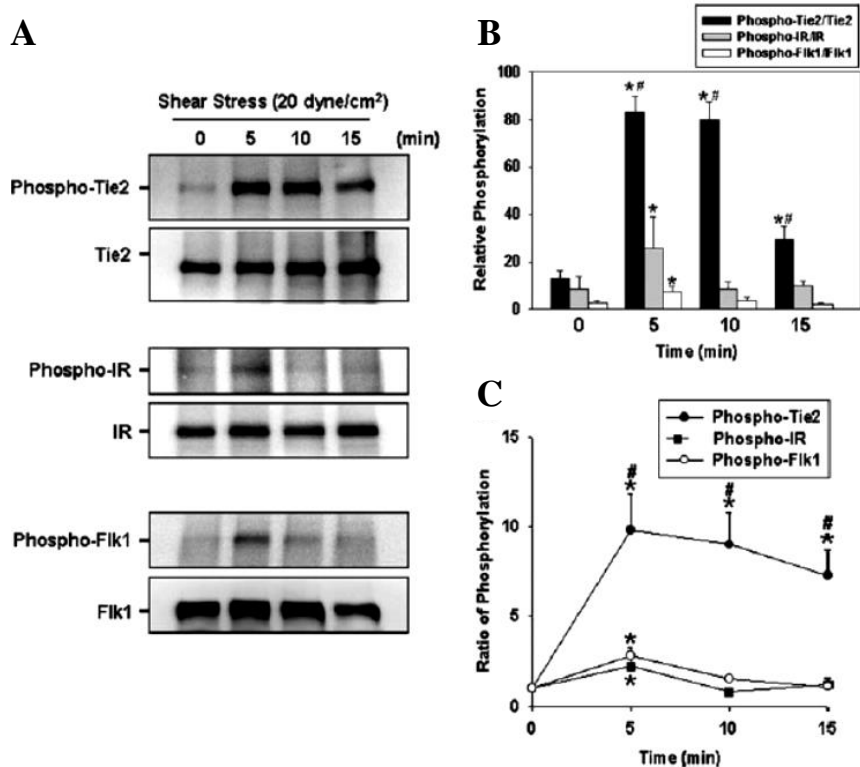


Figura 1.37 Fosforilación de los receptores Tie2, IR y Flk1 tras la estimulación por esfuerzo de corte. A) Western blot para proteínas fosforiladas (paneles superiores) en muestras con diferentes tiempos de estimulación por esfuerzo de corte, como controles de cargas (paneles inferiores) se desnudaron las membranas y se reincubaron con anticuerpos del receptor correspondiente. B) Análisis de densitometría en función del control de su control de carga. C) Proporción de los niveles de fosforilación del receptor relativa al tiempo cero. Imagen modificada de ⁴⁸.

1.3.7 Receptores acoplados proteínas g

Los receptores acoplados a proteínas G han sido implicados en el proceso de mecanotransducción del esfuerzo de corte debido a la activación del receptor bradikinin-B2 la cual se sugiere es inducida por un cambio conformacional, siendo facilitado posiblemente por cambios en la fluidez de la membrana plasmática. Por otro lado, se encontró que proteínas G reconstituidas en liposomas son activadas al ser sometidas a esfuerzo de corte aun cuando carecen del su receptor asociado, sugiriendo que las proteínas G pueden sentir el esfuerzo de corte de forma independiente (Figura 1.38).⁵¹⁻⁵³

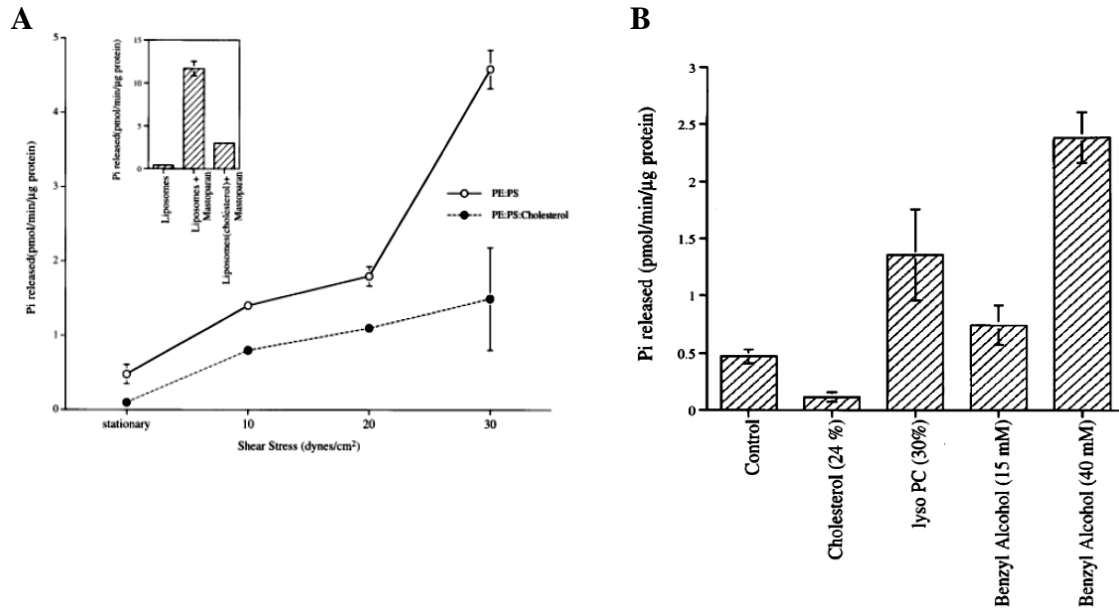


Figura 1.38 Actividad GTPasa en respuesta a esfuerzo de corte de proteínas G reconstituidas en liposomas artificiales. A) Proteínas G reconstituidas en liposomas cargados con [γ -³²P]GTP mostraron actividad GTPasa, medida por la cuantificación de fosfato inorgánico (Pi) en el sobrenadante, dicha actividad se vio estimulada cuando los liposomas fueron sometidos a esfuerzo de corte en un viscosímetro de cono-placa, no obstante, se observó una atenuación de la respuesta en liposomas con colesterol incorporado. B) Efecto de la incorporación moduladores de la fluidez de la membrana en la actividad GTPasa basal, en liposomas con colesterol incorporado se observó una disminución en la actividad mientras que liposomas con lyso-PC presentan una mayor actividad. Los liposomas control al agregarles alcohol bencílico también aumentan su actividad catalítica. Imagen modificada de ⁵³.

1.3.8 Canales iónicos

Los canales iónicos han sido propuestos como traductores del esfuerzo de corte debido a reportes donde se ha documentado la activación de corrientes rectificadoras entrantes de K⁺ (Figura 1.39A, B y C), corrientes rectificadoras salientes de Cl⁻ (Figura 1.39D, E y F) y la entrada de Ca²⁺ a la célula producto de la aplicación de esfuerzo de corte. El calcio participa en diferentes procesos, como estabilizador de algunas proteínas de unión intercelulares, como segundo mensajero en procesos intracelulares, ejemplo de ello se encuentra que unido con calmodulina catalizan la síntesis de óxido nítrico que como vimos anteriormente tiene un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular.⁵⁴⁻⁵⁸

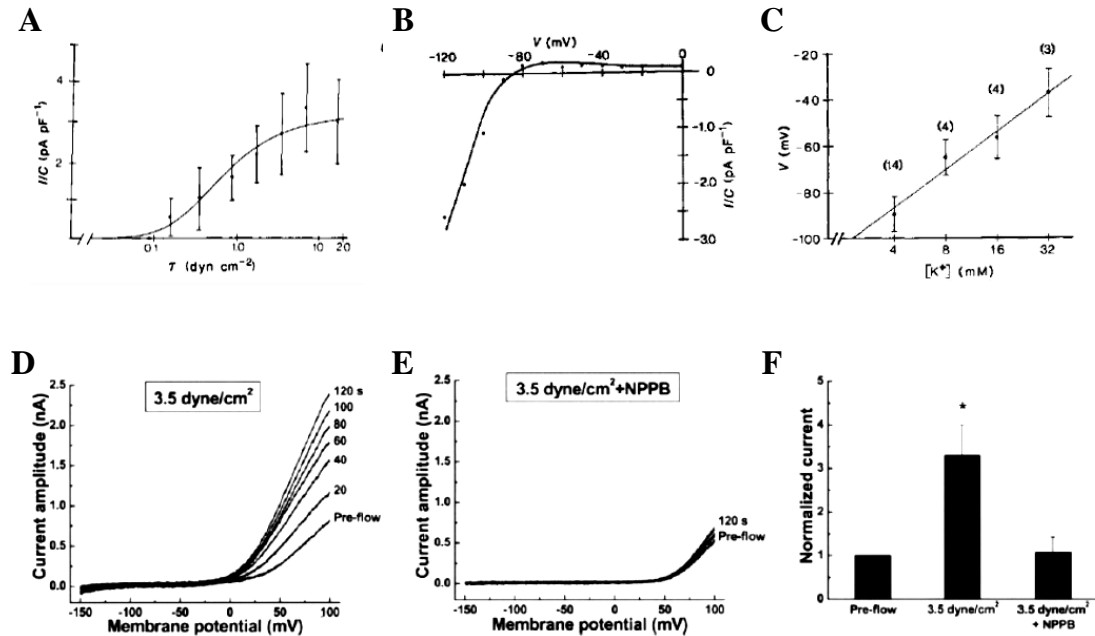


Figura 1.39 Corrientes iónicas inducidas por estimulación mecánica. A) B) y C) Se muestran corrientes entrantes rectificadoras selectivas a K^+ en respuesta a estimulación por esfuerzo de corte. D) E) y F) Se muestran corrientes salientes rectificadoras dependientes del tiempo de estimulación e inhibidas por la presencia de NPPB, un inhibidor de canales de Cl^- . Imagen modificada de ^{56,57}.

1.3.9 Membrana plasmática

La membrana plasmática es una bicapa lipídica la cual está formada por una variedad de lípidos, proteínas y esteroides que mantienen una estructura dinámica y fluida debido a la capacidad de sus componentes de moverse rotacional y lateralmente en la membrana. La dinámica de la membrana es dependiente de diferentes factores como la composición lipídica, la densidad de empaquetamiento, el contenido de colesterol, el contenido relativo de agua, la concentración iónica, el pH y la temperatura.

Se ha supuesto que la membrana plasmática está en un estado de agregación cristal-líquido y, además, se ha descrito que tiene dos estados de ordenamiento lipídico coexistiendo en la membrana plasmática, dichos estados son denominados “líquido-ordenado” y “líquido-desordenado”. Se sabe que las propiedades físicas de la membrana plasmática afectan la función de las diferentes moléculas que se encuentran asociadas o embebidas en ella, por lo tanto, es posible que la aplicación de esfuerzo de corte active diferentes moléculas en la membrana y desencadene una respuesta producto de un cambio en las propiedades físicas de la membrana plasmática de las células endoteliales (Figura 1.40).^{59,60}

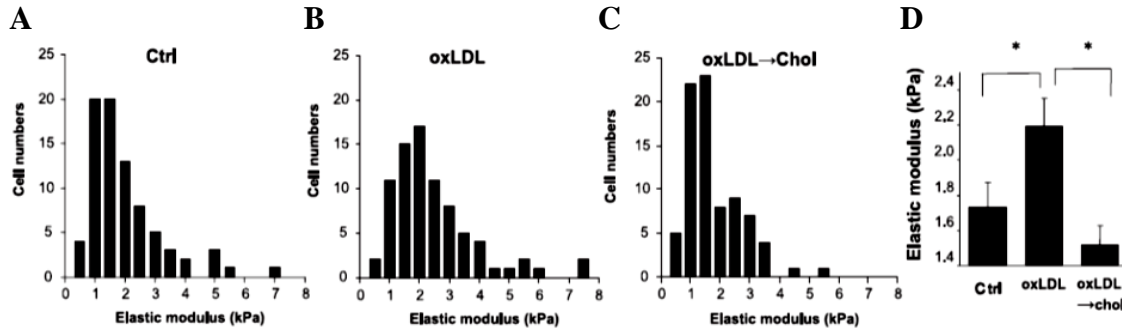


Figura 1.40 Efecto de la Lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) sobre el módulo de elasticidad de membrana de células endoteliales. A) Histograma de módulos de elasticidad de membrana obtenidos de células control. B) Histograma de módulos de elasticidad de membrana obtenidos de células tratadas con oxLDL. C) Histograma de módulos de elasticidad de membrana obtenidos de células tratadas con oxLDL y M β CD saturada con colesterol. D) Comparación de los módulos de elasticidad promedio obtenidos de los tratamientos con oxLDL, se encontró que el módulo de elasticidad de la membrana plasmática de las células tratadas solo con oxLDL aumentaron su módulo de elasticidad significativamente, mientras que las células tratadas con oxLDL+Chol se revierte el efecto de solo oxLDL. Imagen modificada de ⁶⁰.

Técnicas de fluorescencia como FRAP han mostrado como la fluidez de la membrana se aumenta por efecto del esfuerzo de corte aplicado. Con fluorescencia Laurdan y microscopia de dos-fotones se han descrito una disminución en los estados de ordenamiento lipídico por efecto de la aplicación de esfuerzo de corte (Figura 1.41 y Figura 1.42). Por otro lado, el uso de agentes fluidizantes como el alcohol bencílico han mostrado efectos comparables con los obtenidos por la aplicación de esfuerzo de corte mostrando con esto que cambios en la fluidez de la membrana pueden activar funciones celulares (Figura 1.38B y Figura 1.43). ^{51,61-63}

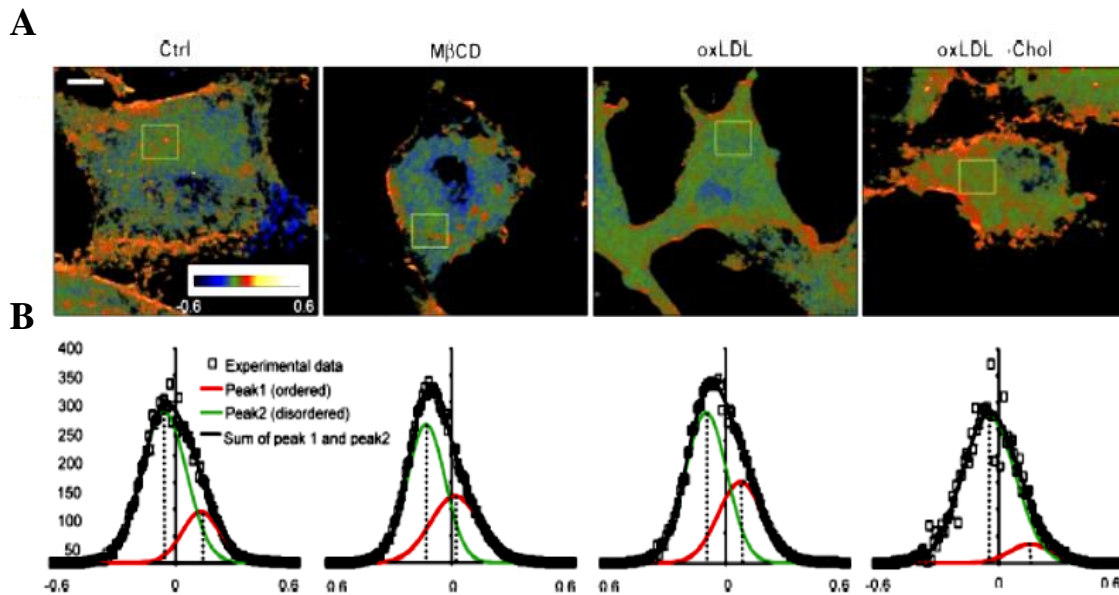


Figura 1.41 Efecto del tratamiento con M β CD y oxLDL en los niveles de ordenamiento lipídico. A) Imagen de polarización generalizada (GP) obtenidas por fluorescencia Laurdan de células control y en tratamiento. B) Histogramas de GP correspondientes a los diferentes tratamientos, ajustados a dos distribuciones

gaussianas, donde la curva roja representa el estado “lípidico-ordenado” (high GP), mientras que la curva en verde representa el estado “lípidico-desordenado” (low GP) encontrando un mayor desordenamiento lipídico en ambos estados de las células tratadas con M β CD (desplazamiento significativo de la curva verde y roja), para las células tratadas con oxLDL solo se encontró un mayor desordenamiento en el estado desordenado (desplazamiento significativo de la curva verde) y finalmente, las células tratadas con oxLDL+Chol no presentaron cambios en sus estados de ordenamiento. Imagen modificada de ⁶⁰.

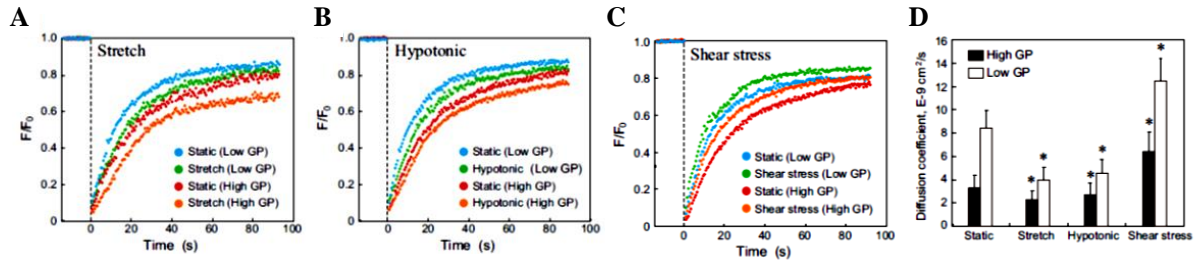


Figura 1.42 Cambios en los coeficientes de difusión en las regiones de bajo y alto ordenamiento lipídico por efecto de estimulación mecánica por estiramiento, choque osmótico y esfuerzo de corte. A) Curvas de FRAP tras la estimulación por estiramiento. B) Curvas de FRAP tras estimulación por choque osmótico. C) Curvas de FRAP tras estimulación por esfuerzo de corte. D) Comparación de los coeficientes de difusión obtenidos de las curvas de FRAP para las diferentes formas de estimulación mecánica, se encontró que las membranas de las células endoteliales se rigidizan al ser sometidas a estiramiento o choque osmótico, mientras que las células sometidas a esfuerzo de corte se fluidizan. Imagen modificada de ⁶³.

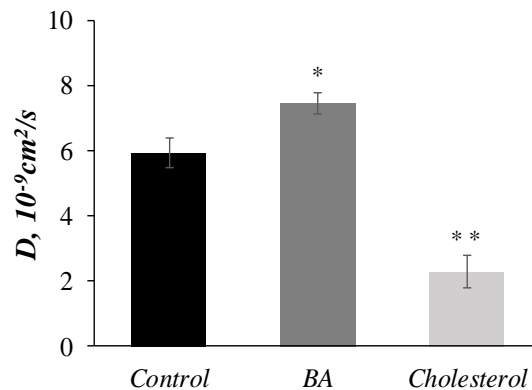


Figura 1.43 Efectos de alcohol bencílico (BA) y colesterol en los coeficientes de difusión lipídica (D) en células endoteliales. Se encontró que tras el tratamiento con BA los lípidos se fluidizan, mientras que al agregar colesterol a las células produce un efecto de rigidización lipídica. Imagen generada de ⁶¹.

Basado en los diferentes hallazgos que implican a las moléculas en el proceso de mecanotransducción del esfuerzo de corte se han planteado algunas teorías que intentan explicar este proceso en las células endoteliales.

Se han planteado tres teorías de como los canales iónicos son activados en respuesta a esfuerzo de corte. La primera implica la activación de canales iónicos de la membrana, donde se propone que se trata de una interacción física directa entre el flujo aplicado y el canal iónico forzando al canal a cambiar su conformación a su estado de apertura debido a la fuerza de

arrastre ejercida por el flujo. Sin embargo, modelos matemáticos que exploran esta teoría concluyen que la energía producto de las fuerzas de arrastre del medio son mucho menores a las necesarias para forzar la apertura de un canal iónico.⁶⁴

La segunda teoría propone que la activación de estos canales se lleva a cabo por posibles interacciones entre el citoesqueleto y los canales iónicos, debido a que el esfuerzo de corte cambia la tensión mecánica del citoesqueleto produciendo con esto que el o los canales unidos a citoesqueleto se activen y permitan el flujo iónico a través de la membrana. Un dato para considerar es que las células endoteliales se encuentran sometidas no solo al esfuerzo de corte por el flujo sanguíneo, sino también, al esfuerzo circunferencial por la presión arterial provocando en ambos casos tensión mecánica en el citoesqueleto lo que dificulta discernir la fuente de la deformación del citoesqueleto en la activación de los canales iónicos.

La última teoría, que propone que la activación de los canales iónicos y de los receptores de membranales se debe a cambios en la fluidez de la membrana debido a que el esfuerzo de corte es capaz de modificar la viscosidad de la membrana permitiendo con esto su activación.

Resulta atractivo pensar a la membrana como el mecanismo responsable de la mecanotransducción debido a que todos los mecanismos antes mencionados se encuentran embebidos o ligados a esta. Siguen los esfuerzos de diferentes grupos de investigación que buscan elucidar el fenómeno de mecanotransducción del esfuerzo de corte en las células endoteliales. Se comienza a plantear la posibilidad de un solo mecanismo sensor que pueda explicar todas las respuestas ya descritas.

2 HIPÓTESIS

Los cambios en el contenido de colesterol de la membrana plasmática influyen en la modulación de la respuesta de calcio inducida por la estimulación con esfuerzos de corte en las células endoteliales.

3 OBJETIVO

Estudiar el efecto de los cambios en el colesterol de membrana plasmática de células endoteliales de aorta de rata en la respuesta de calcio a esfuerzos de corte, así como posibles vías de liberación de calcio.

3.1 Objetivos particulares

- Estandarizar el proceso de extracción y cultivo de células endoteliales a partir de tejido primario de aorta de rata.
- Estudiar y caracterizar de la respuesta de calcio a esfuerzos de corte en células endoteliales.
- Modificar del contenido de colesterol de la membrana plasmática de las células endoteliales y estudiar su efecto en respuesta a la aplicación del esfuerzo de corte.
- Estudiar de los efectos inhibitorios de blancos intracelulares moduladores calcio en respuesta a la aplicación de esfuerzo de corte.

4 METODOLOGÍA

4.1 Estandarización del proceso de extracción de células endoteliales de tejido primario de aorta de rata.

Las células endoteliales fueron obtenidas de la porción torácica de aorta de ratas *wistar* macho (300g a 350g) de aproximadamente 6 semanas de edad. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la norma establecida por el comité de ética del Cinvestav-IPN, en la Figura 4.1 se esquematiza el proceso de extracción descrito a continuación: para extraer el tejido arterial la rata es anestesiada con pentobarbital sódico (65mg/kg) vía intraperitoneal, se inyecta lidocaína (7mg/kg) subcutánea en tórax como anestesia local previo a la disección, una vez anestesiada se accedió a la región torácica para extraer la porción correspondiente de la aorta.

Una vez extraída la aorta se lavó con etanol y se perfundió con solución salina para remover los residuos de sangre en su interior. La arteria fue abierta longitudinalmente y sujeta sobre una superficie con el lumen expuesto, se realizó el proceso de digestión para disgregar el tejido en células individuales, pasado el tiempo de incubación se detiene la digestión y se lavan las células con medio fresco.

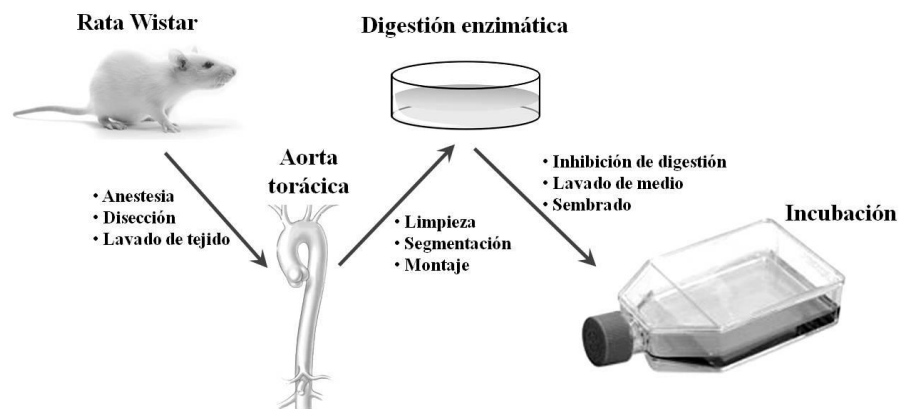


Figura 4.1 Extracción de células endoteliales de tejido primario de aorta.

4.2 Cultivo e identificación de células endoteliales.

Una vez que las células fueron suspendidas en DMEM son sembradas en cajas de cultivo en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 0.1% penicilina-estreptomicina y 35µg/ml

de suplemento para crecimiento endotelial (ECGS) a 37°C y 5% de CO₂. Se les realizó cambios de medio de cultivo por medio fresco cada tercer día hasta que el cultivo llega a confluencia, posteriormente se realizó un pase para mantener el cultivo en crecimiento, las células utilizadas fueron tomadas a partir del segundo pase.^{65,66}

A fin de corroborar que las células en cultivo correspondían a un fenotipo endotelial se realizó un ensayo de inmunocitoquímica, el cual se esquematizado en la Figura 4.2, utilizando anticuerpos contra el factor Von Willebrand (vWF) el cual es ampliamente utilizado como marcador de células endoteliales,⁶⁷⁻⁶⁹ seguido de la incubación de un anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente que reconoce el anticuerpo primario permitiendo la identificación indirecta del antígeno blanco tras detectar la fluorescencia de emisión del fluoróforo conjugado en el anticuerpo secundario.

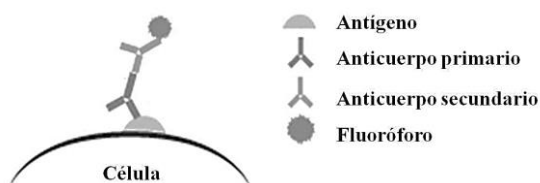


Figura 4.2 Esquema de ensayo inmunocitoquímico para la detección de antígenos blanco.

Las muestras para este ensayo fueron preparadas utilizando cultivos en segundo pase. Las células fueron suspendidas y sembradas en medio de cultivo suplementado en una concentración de 500k células sobre cubreobjetos de 10x10mm dentro de cajas petri de 35mm de diámetro a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas para su posterior manipulación. Se probaron en triplicado las siguientes condiciones:

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Control negativo	—	—
Control positivo	—	+
Condición experimental	+	+

Las imágenes de fluorescencia y campo claro se obtuvieron haciendo uso de un microscopio invertido de fluorescencia *NIKON-TE2000-U*.

4.3 Estudio y caracterización de la respuesta de calcio a esfuerzos de corte bajo.

Para medir los cambios en el calcio citoplasmático producido por la aplicación de esfuerzo de corte se utilizó el fluoróforo sensible a calcio *Fluo-4* (Ex494nm/Em506nm) el cual permite monitorear los cambios en la concentración de calcio de forma cualitativa

registrados en los cambios de la intensidad de fluorescencia. Para cargar el fluoróforo en las células es necesario incubarlo por un tiempo no mayor a una hora.

Las muestras para aplicación de esfuerzo de corte fueron tomadas de cultivos entre los pases dos a seis. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de 12mm de diámetro en una concentración de 150k células e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal, antibióticos y factores de crecimiento. Una vez listas las muestras se montaron en la cámara de perfusión colocándolas en la parte inferior y fijada a la placa de calentamiento como se muestra en la Figura 4.3.

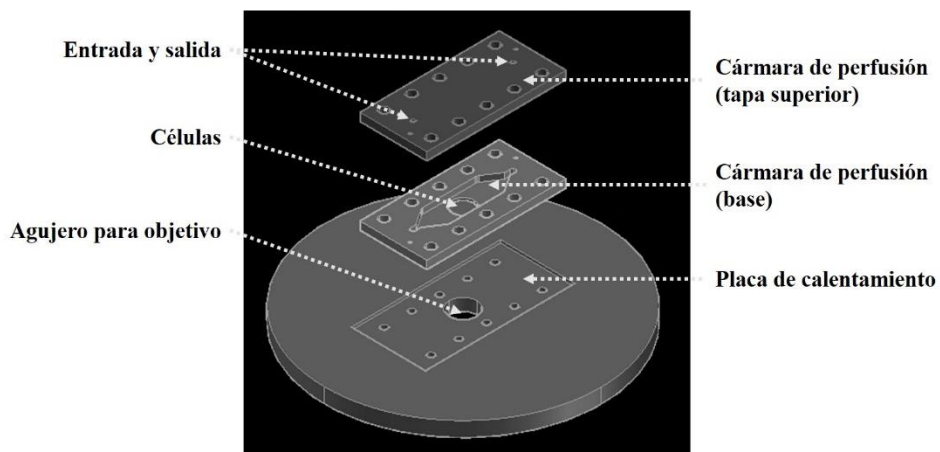


Figura 4.3 Cámara de perfusión

Para generar el esfuerzo de corte se utilizó una bomba de jeringa *kd-Scientific* la cual nos permitió aplicar diferentes velocidades de perfusión para producir el de esfuerzo de corte deseado. Con ayuda de la bomba de jeringa se hizo fluir el medio salino a través de la cámara de perfusión perimiendo estimular mecánicamente a las células con esfuerzo de corte. La muestra se observó en un microscopio invertido de fluorescencia *NIKON-TE2000-U* para monitorear la respuesta de calcio durante el proceso de estimulación. Para estudiar la respuesta producida por la aplicación de esfuerzo de corte se tomaron videos de fluorescencia durante la estimulación, dichos videos fueron analizados con ayuda del software *NIS-ELEMENT*. Se obtuvieron los registros individuales de fluorescencia de cada una de las células estimuladas. En la Figura 4.4 se muestra el esquema de estimulación que se utilizó para obtener los registros de fluorescencia de las células endoteliales.

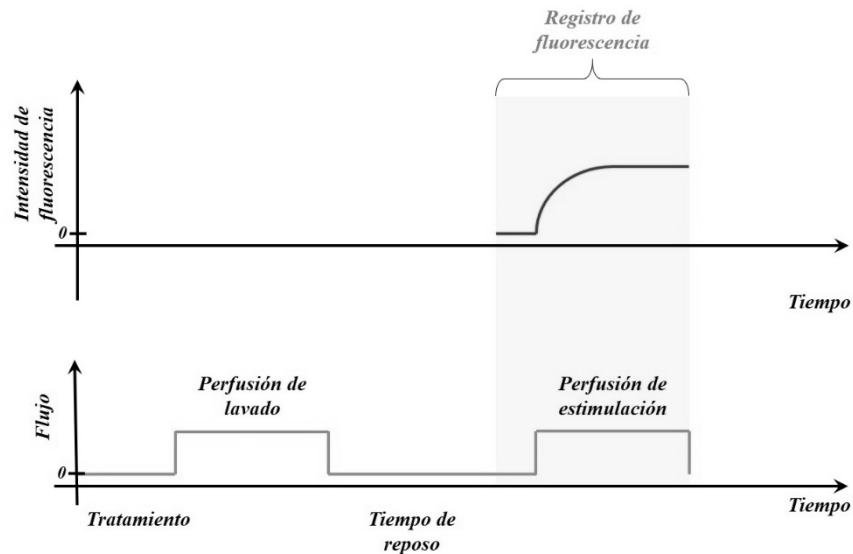


Figura 4.4 Esquema de estimulación y toma de registro de fluorescencia.

4.4 Modificación del contenido de colesterol de la membrana plasmática.

Para estudiar el efecto de los cambios en el colesterol de la membrana plasmática se realizaron ensayos de remoción, depósito de colesterol. Para estos ensayos se utilizó la molécula de Metil- β -ciclodextrina (M β CD) la cual es ampliamente utilizada para dicho propósito, la cual es un oligosacárido cíclico de 7 unidades (Figura 4.5) cuya cavidad tiene naturaleza menos hidrofílica que los medios acuosos lo que le permite albergar preferentemente moléculas de colesterol.

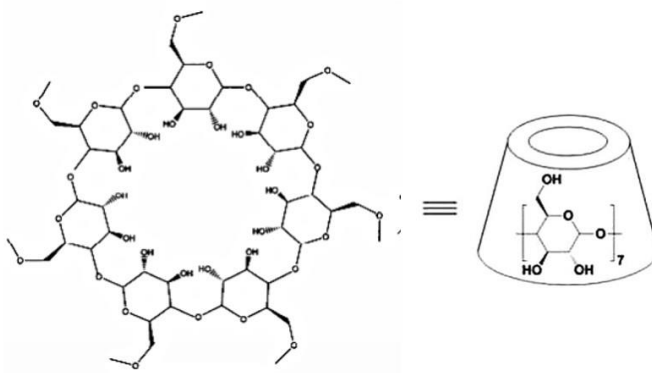


Figura 4.5 Estructura de la molécula de Metil- β -ciclodextrina

La M β CD es utilizada en concentraciones en el orden de milimolar, su capacidad de remoción y depósito de colesterol es dependiente de la concentración y el tiempo de tratamiento, esto puede variar para diferentes tipos celulares. Para realizar la remoción de

colesterol solo es necesario incubar a las células con M β CD en solución salina, mientras que para lograr el depósito de colesterol en la membrana es necesario llevar a cabo previamente un protocolo de saturación de la M β CD con colesterol.⁷⁰ Como una condición control se neutraliza la actividad de la M β CD mezclando soluciones salinas con M β CD sin colesterol y M β CD saturada con colesterol.^{71,72}

4.5 Inhibición de blancos moduladores de calcio de retículo endoplásmico.

Para determinar la participación de retículo endoplasmático en la respuesta de calcio observada a bajo esfuerzo de corte se realizó un estudio inhibitorio de blancos moduladores de calcio en el retículo endoplásmico. Los encargados de la liberación de calcio son el receptor de IP₃ (IP₃R) y el receptor de rianodina (RyR), mientras que, la bomba SERCA es la responsable de la recaptura de calcio hacia el retículo.

4.6 Análisis De Datos.

Los registros de fluorescencia fueron previamente procesados para eliminar la contribución de la fluorescencia de fondo y el decaimiento de fluorescencia por efecto del fotoblanqueamiento.

Los registros fueron ajustados a un modelo de oscilador armónico amortiguado para mejorar el análisis y eliminar efectos de ruido observado en los registros. La ecuación de movimiento que describe el sistema se obtiene aplicando la segunda ley de Newton al sistema y se expresa de la siguiente manera:

$$\sum F_y = -ky - \gamma\dot{y} = m\ddot{y}$$

$$\ddot{y} + \frac{\gamma}{m}\dot{y} + \frac{k}{m}y = 0 \quad \text{Ec. de movimiento}$$

Cuya solución general estaría dada por la combinación de las soluciones particulares tomando la siguiente forma:

$$y = C_1e^{r_1t} + C_2e^{r_2t}$$

Dichas soluciones particulares pueden presentar tres casos, donde se pueden tener raíces reales y diferentes (comportamiento sobreamortiguado), raíces reales e iguales (comportamiento crítico) y raíces complejas (comportamiento subamortiguado).

Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante la aplicación de pruebas *paired t-test* o *one-way ANOVA Tukey* previa verificación de normalidad e igualdad de varianzas respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Extracción y cultivo de células endoteliales

Una vez extraída la porción torácica de la aorta se lavó con etanol y se coloca en solución salina amortiguada con HEPES (SSH) que contiene (en mM): 137 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosa, a pH 7.3 y se canuló para realizar una perfusión con el propósito de remover residuos de sangre. La grasa y el tejido circundante se removieron, la aorta se abrió longitudinalmente y fue extendida con el lumen expuesto sobre un filtro de papel previamente hidratado en solución salina suplementada con 1% de albumina de suero bovino (BSA), posteriormente se colocó un segundo filtro de papel en la parte superior de la aorta hidratado con 150 µL de solución digestiva que contiene (en mM): 137 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosa, Papaína (0.62 mg/ml), Colagenasa (1.5 mg/ml), 1,4-dithioerytritol (1.0 mg/ml), BSA 0.5%, a pH 7.3. Se incubó durante 10 minutos a 37°C y 5% de CO₂. La digestión se detuvo con 4 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y se removió el filtro superior. Las células suspendidas en el medio se sembraron en tubos de cultivo de 25 cm² e incubadas a 37°C y 5% de CO₂, 24 horas después el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco, las células se monitorearon diario y se les realizó cambio de medio cada tercer día. Una vez que el cultivo alcanzaba la confluencia se les realizaba un pase de cultivo.

5.2 Identificación inmunocitoquímica de células endoteliales

Para el proceso de identificación del fenotipo endotelial las muestras se prepararon de la siguiente manera: una vez alcanzado el segundo pase de cada cultivo se tomó una muestra con 150k células para resembrarlas sobre cubreobjetos de dimensiones 10x10mm los cuales previamente fueron esterilizados y tratados con gelatina al 2% como sustrato de adhesión. Las muestras se incubaron a 37°C a 5% de CO₂ durante un periodo de 24 horas antes de ser utilizadas.

El fenotipo fue confirmado usando anticuerpos contra el factor Von-Willenbrand (vWF) bajo el siguiente protocolo:

Las células fueron fijadas con acetona 90% y 100% en hielo durante quince minutos respectivamente, seguido de tres lavados de cinco minutos con solución PBS-Tween. Se bloqueó la muestra con 1% de BSA a temperatura ambiente en agitación durante un periodo de dos horas seguido de tres Lavados con PBS-Tween de diez minutos respectivamente. Se

incubó la muestra con el anticuerpo primario anti-vWF (*ab6994*) hecho en conejo en una dilución 1:1000 en PBS durante noventa minutos seguido de tres lavados con PBS-tween de diez minutos cada uno. Seguido de esto se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa-594 (*ab150088*) en una dilución 1:2000 en PBS por un periodo de una hora, posteriormente se le realizaron cinco lavados de veinte minutos cada uno con PBS-tween. Finalmente, la muestra se montó en portaobjetos con 50 μ l de Vectashield/Dapi como preservador y marcador de núcleos.

Las imágenes resultantes del ensayo se obtuvieron con un microscopio invertido de fluorescencia utilizando un objetivo de 10X y se presentan de forma ordenada en la Figura 5.1. En ella se observan las imágenes de campo claro (CC) y de fluorescencia individual para el factor von Willebrand (vWF) y el marcador de núcleos (DAPI), así como, la sobreposición de las dos imágenes de fluorescencia anterior (vWF/DAPI) para observar la correspondencia en la fluorescencia. El arreglo de imágenes se obtuvo para las condiciones control y la condición de evaluación para la determinación del fenotipo celular.

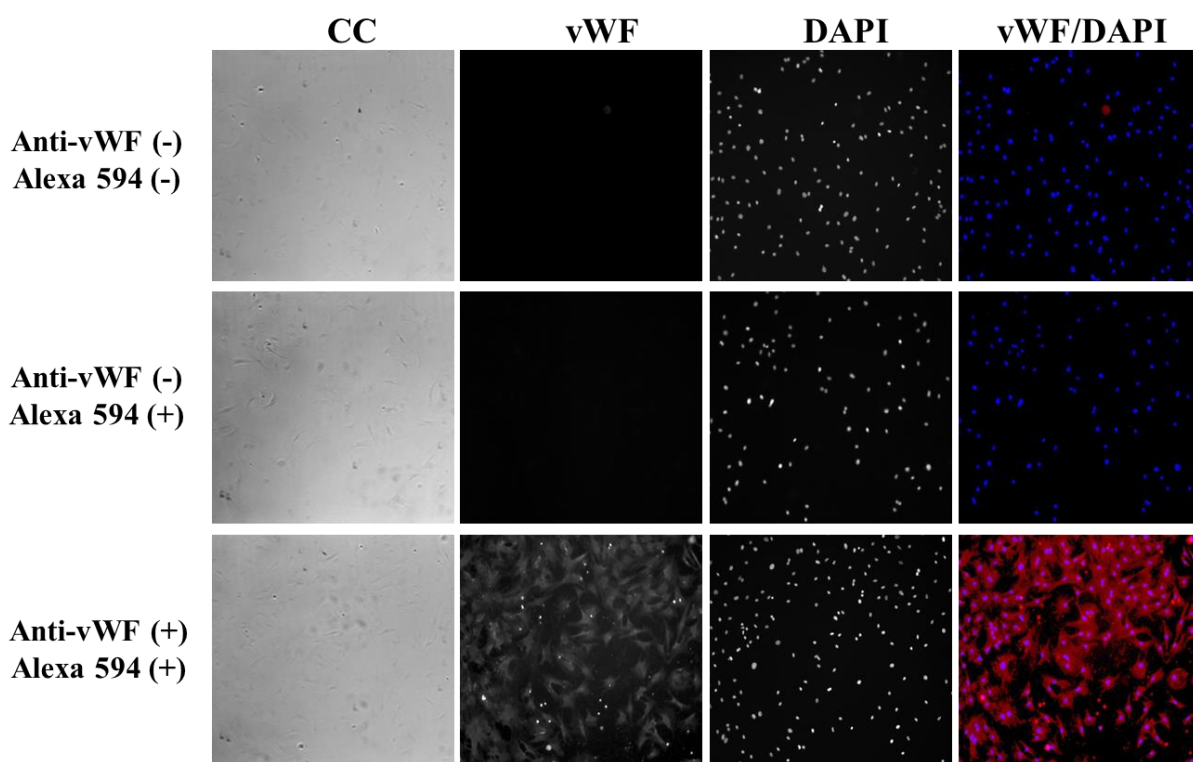


Figura 5.1 Resultado del ensayo de inmunocitoquímica para la identificación de fenotipo endotelial de la extracción de tejido primario de aorta. Imágenes de campo claro y fluorescencia. En la imagen inferior derecha se observa la sobreposición de fluorescencia de vWF y DAPI que nos indica positivo para el fenotipo endotelial en nuestras células de cultivo.

5.3 Respuesta de calcio intracelular a esfuerzos de corte bajo

Para el monitoreo de los cambios en los niveles de calcio intracelular de las células endoteliales se utilizó el fluoróforo *Fluo-4* que reporta los cambios en el calcio intracelular como cambios en la intensidad de fluorescencia. *Fluo-4* fue incubado en las células por un periodo de cuarenta minutos en medio DMEM a una concentración de 5 μ M y 0.06% de plurónico para facilitar su introducción a la célula.

Para ejercer esfuerzo de corte sobre las células se maquinó en acrílico una cámara de perfusión de placas paralelas de acuerdo con las dimensiones mostradas en la sección de Apéndice, se montó sobre una placa de aluminio conectado a un dispositivo termoelectrónico (Peltier) y ayudado de un controlador de temperatura PID que nos permitió mantener la temperatura de la muestra a 37°C durante el proceso de estimulación. La cámara de perfusión fue conectada a una bomba de jeringa programable permitiendo ajustar diferentes velocidades de perfusión para la aplicación de bajos niveles de esfuerzo de corte sobre las células. El montaje completo se puede observar en la Figura 5.2.

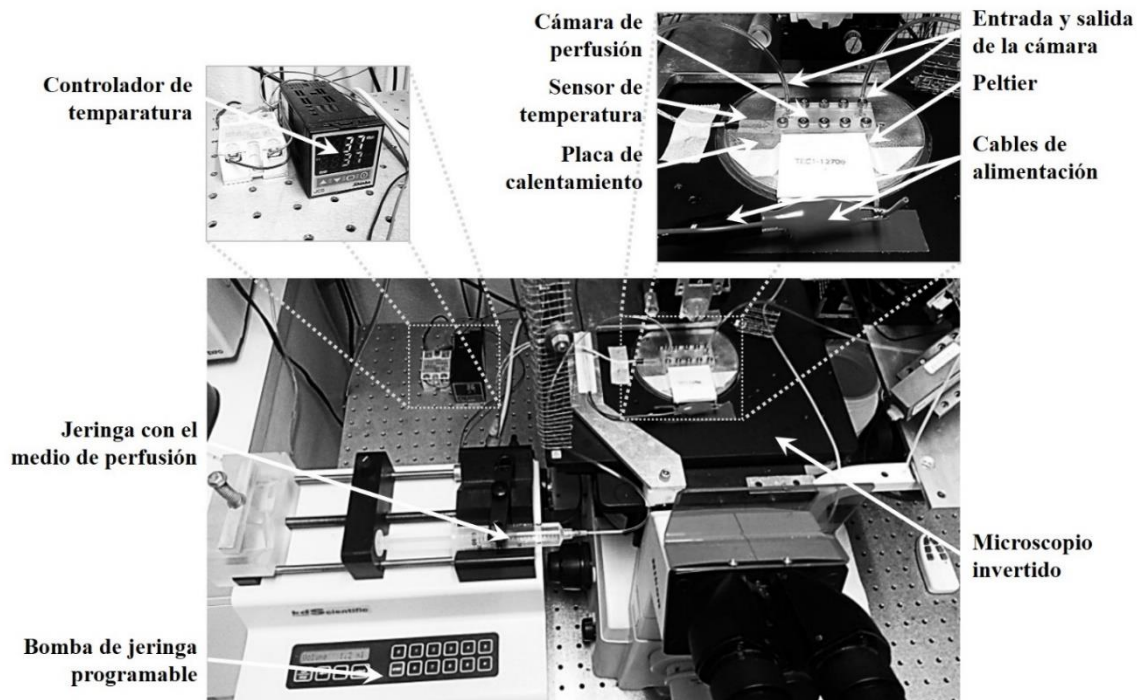


Figura 5.2 Montaje experimental para la generación de esfuerzo de corte.

Los videos de fluorescencia se obtuvieron en un microscopio invertido de fluorescencia *NIKON ECLIPSE TE2000-U* con un objetivo de 20X y haciendo uso software de adquisición *NIS-Element AR* con una frecuencia de adquisición de 5 Hz. Los videos fueron

adquiridos de forma simultánea a la aplicación de esfuerzo de corte bajo el esquema de estimulación ilustrado en la Figura 4.4: en cada registro se tomó el nivel de fluorescencia durante 30 segundos previo a la aplicación de esfuerzo de corte seguido de 50 segundos bajo perfusión del medio salino.

Los videos fueron analizados para obtener los registros de fluorescencia de células individuales. Dichos registros fueron procesados para eliminar la contribución de la fluorescencia de fondo y para corregir la curva de decaimiento de fluorescencia debida al fotoblanqueamiento, la curva de decaimiento de la fluorescencia fue estimada a partir de un ajuste exponencial del período inicial sin estimulación de los registros. Las células que presentaban cambios en su fluorescencia previo al inicio del flujo fueron omitidas del análisis.

Las células endoteliales fueron sometidas a esfuerzos de corte bajo en rango de 0.0125-0.1 dinas/cm² utilizando un medio de perfusión SSH. En la Figura 5.3 podemos observar las respuestas de las células a las diferentes intensidades de esfuerzo de corte.²⁸

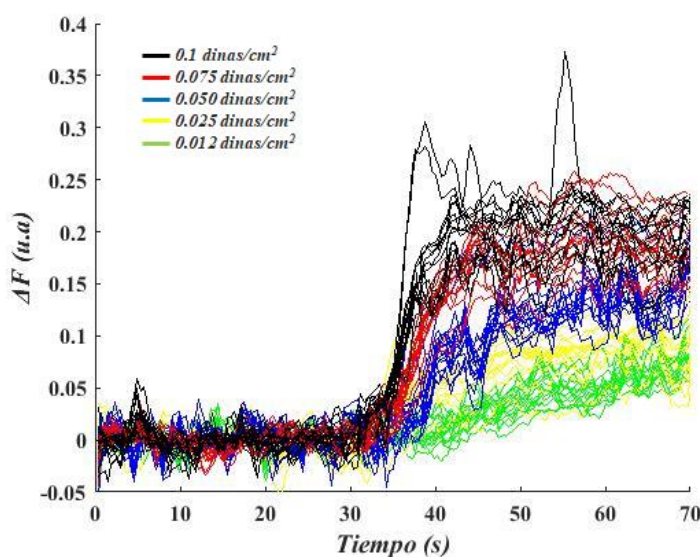


Figura 5.3 Cambios en la intensidad de fluorescencia en respuesta a la estimulación con esfuerzo de corte.

Se utilizó un modelo de oscilador armónico con amortiguamiento como función de ajuste para los registros de fluorescencia cuya solución nos permitió caracterizar los registros que presentaban una respuesta con oscilación amortiguada (caso subamortiguado) y los registros que presentaban un transiente sin oscilación (casos subamortiguado y crítico) con el propósito de eliminar la contribución del ruido en los registros de fluorescencia el cual se puede observar en los registros mostrados en la Figura 5.3.

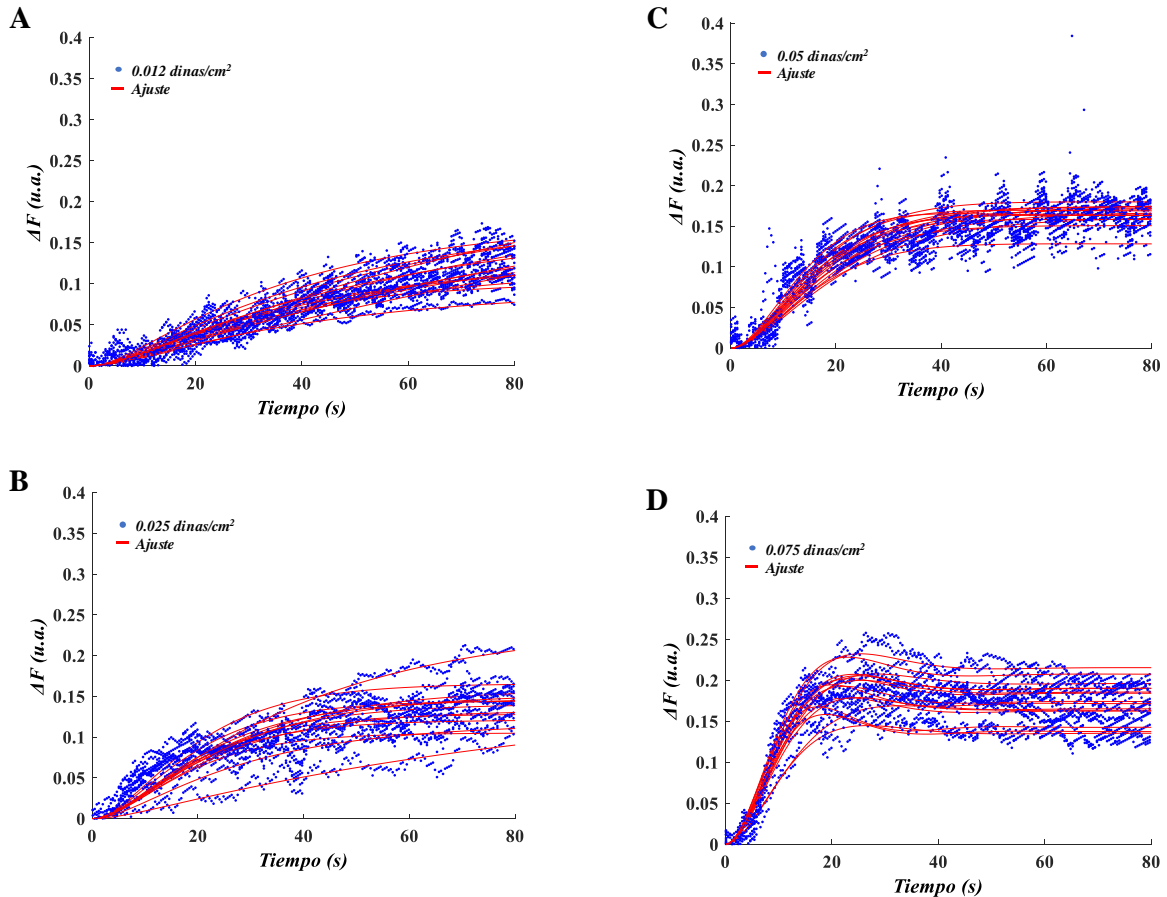
Para ajustar los registros de fluorescencia con sobreamortiguamiento o amortiguamiento crítico se utilizó la siguiente expresión:

$$y = \alpha \left(1 - \left(\frac{\frac{1}{2}(\sqrt{1-4m}-1)}{\sqrt{1-4m}} \right) e^{-\left(\frac{x}{10}(\sqrt{1-4m}+1)\right)} - \left(\frac{\frac{1}{2}(\sqrt{1-4m}+1)}{\sqrt{1-4m}} \right) e^{\left(\frac{x}{10}(\sqrt{1-4m}-1)\right)} \right)$$

Mientras que para los registros con subamortiguamiento se ajustaron a la siguiente expresión:

$$y = \alpha \left(1 - \left(e^{\left(-\frac{x}{10}\right)} \left(\frac{\sin\left(\frac{x}{10}\sqrt{-(1-4m)}\right)}{\sqrt{-(1-4m)}} \right) \right) - \left(e^{\left(-\frac{x}{10}\right)} \left(\cos\left(\frac{x}{10}\sqrt{-(1-4m)}\right) \right) \right) \right)$$

Cuyos parámetros α corresponde a la amplitud y el parámetro m está asociado a la rapidez de la respuesta. En la Figura 5.4 observamos ajustes correspondientes a cada una de las intensidades de esfuerzo de corte. Los trazos en línea continua corresponden a los ajustes obtenidos con el modelo descrito anteriormente mientras que los trazos punteados corresponden a los registros de fluorescencia obtenidos experimentalmente.



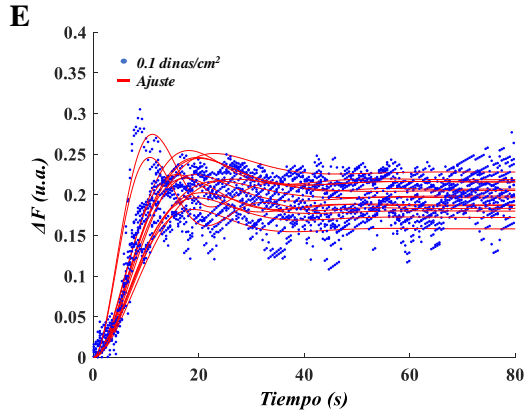


Figura 5.4 Ajustes del modelo de oscilador armónico con rozamiento para los cambios en la intensidad de fluorescencia obtenidos tras la aplicación de los esfuerzos de corte (en dinas/cm²): A) 0.012. B) 0.025. C) 0.05. D) 0.075. E) 0.1.

Observado un correcto ajuste a los datos experimentales se utilizaron los parámetros α y m obtenidos del ajuste para analizar la respuesta del sistema.

En la Figura 5.5 se muestran graficados los promedios de los parámetros α y m de las respuestas obtenidas de todas las células estimuladas para cada una de las intensidades de esfuerzo de corte aplicado. En los resultados obtenidos (Tabla 5.1) se observa una respuesta dosis dependiente a la intensidad del esfuerzo de corte utilizado. El parámetro m (Figura 5.5A) presenta una dependencia lineal a la magnitud del estímulo aplicado, de igual forma la amplitud α (Figura 5.5B). Los valores fueron comparados contra el mínimo estímulo aplicado para buscar significancia estadística.

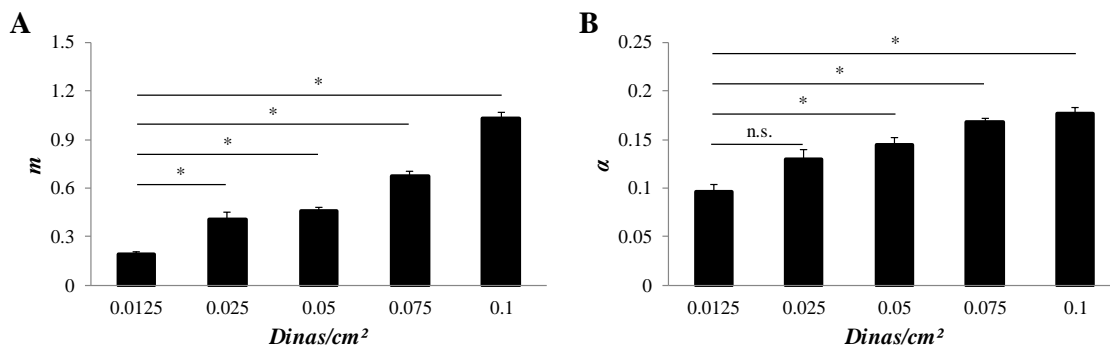


Figura 5.5 Efecto de la aplicación de diferentes estímulos de bajo esfuerzo de corte. A) Muestra el promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” de la respuesta de fluorescencia a la estimulación por esfuerzos de corte. B) Muestra el promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” de la fluorescencia tras la estimulación por diferentes intensidades de esfuerzo de corte. * $P < 0.01$.

Para caracterizar la respuesta de las células endoteliales en ausencia de calcio extracelular a bajos esfuerzos de corte se repitió la estimulación utilizando un medio SSH sin calcio y adicionado con 1mM EGTA para eliminar posibles efectos de calcio residual en el medio. En este experimento solo se aplicaron los estímulos de 0.05, 0.075 y 0.1 dinas/cm² (Tabla 5.2).

Como resultado se observó que el parámetro m no se vio afectada en las 0.05 y 0.075 dinas/cm², sin embargo, a 0.1 dinas/cm² la rapidez de la respuesta se vio disminuida de manera significativa al ser comparada con la respuesta obtenida en medio SSH con calcio (Figura 5.6A). Por su parte la amplitud α no se vio afectada a pesar de no haber calcio en el medio extracelular, esto en cada una de las intensidades de esfuerzo de corte aplicado observando con esto una consistencia en la respuesta a pesar de la ausencia de calcio en el medio extracelular (Figura 5.6B).

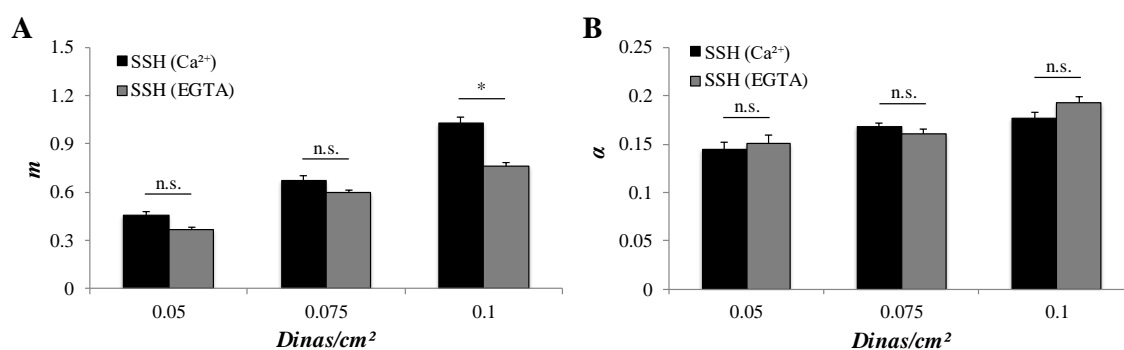


Figura 5.6 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras realizar la remoción de calcio extracelular. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Tabla 5.1 Promedio de las respuestas obtenidas a diferentes intensidades de esfuerzo de corte

Esfuerzo de corte	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
0.012 dinas/cm ²	0.095	0.043	0.007	0.191	0.095	0.017
0.025 dinas/cm ²	0.129	0.067	0.009	0.407	0.323	0.048
0.05 dinas/cm ²	0.144	0.050	0.007	0.459	0.138	0.020
0.075 dinas/cm ²	0.168	0.031	0.004	0.674	0.195	0.025
0.1 dinas/cm ²	0.176	0.037	0.005	1.031	0.247	0.036

Tabla 5.2 Promedio de las respuestas obtenidas a diferentes intensidades de esfuerzo de corte en ausencia de calcio extracelular.

Esfuerzo de corte	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio(m)	DE (\pm)	EE (\pm)
0.05 dinas/cm ²	0.150	0.060	0.008	0.364	0.123	0.016

0.075 dinas/cm ²	0.160	0.046	0.005	0.594	0.148	0.017
0.1 dinas/cm ²	0.192	0.050	0.006	0.760	0.209	0.027

5.4 Efecto de cambios en el contenido de colesterol en respuesta al esfuerzo de corte

Para modificar el contenido de colesterol de las células endoteliales se realizaron ensayos con Metil- β -Ciclodextrina. Para logra remover colesterol, las células se someten a un tratamiento en presencia de M β CD disuelta en solución salina en el rango de milimolar, en cambio, para realizar el depósito colesterol en la membrana plasmática es necesario realizar previamente al tratamiento sobre las células un proceso de saturación con colesterol de las moléculas de M β CD. Los protocolos y los resultados tras la estimulación con esfuerzo de corte se describen más adelante.

Para remover el colesterol de la membrana plasmática se sometieron a un tratamiento con M β CD previo a la estimulación con esfuerzo de corte.^{71,73} Las células fueron tratadas con 5 mM de M β CD en DMEM por periodos de 20 y 60 minutos para determinar el efecto del nivel de remoción de colesterol debido al tiempo de incubación, ya que la remoción de colesterol es dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento. Se utilizó el esfuerzo de corte de 0.1 dinas/cm² con solución SSH (EGTA) buscando posibles efectos inhibitorios debido a la remoción de colesterol (Tabla 5.3), en la Figura 5.7 se muestran trazos representativos de fluorescencia.

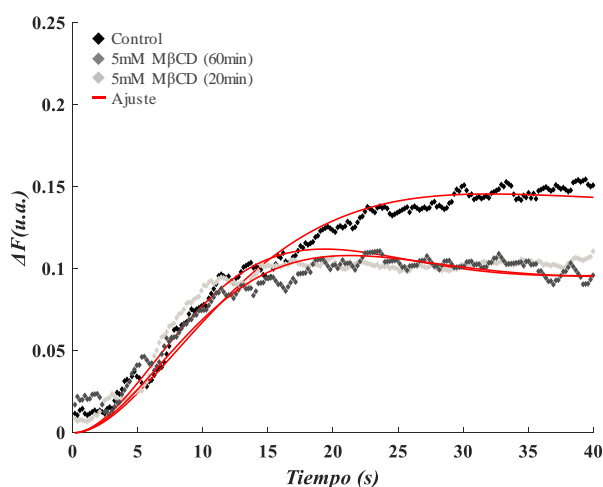


Figura 5.7 Trazos representativos de la remoción de colesterol tratadas con 5 mM de M β CD durante 20 y 60 minutos.

El parámetro m aumentó significativamente tras 20 minutos de tratamiento, lo cual no se observa en las células que tienen 60 minutos de tratamiento (Figura 5.8A). La amplitud α

obtenida tras 20 y 60 minutos de tratamiento se vio disminuida significativamente en ambas condiciones comparadas contra la respuesta control. No obstante, no se encontró diferencia entre ellas (Figura 5.8B).

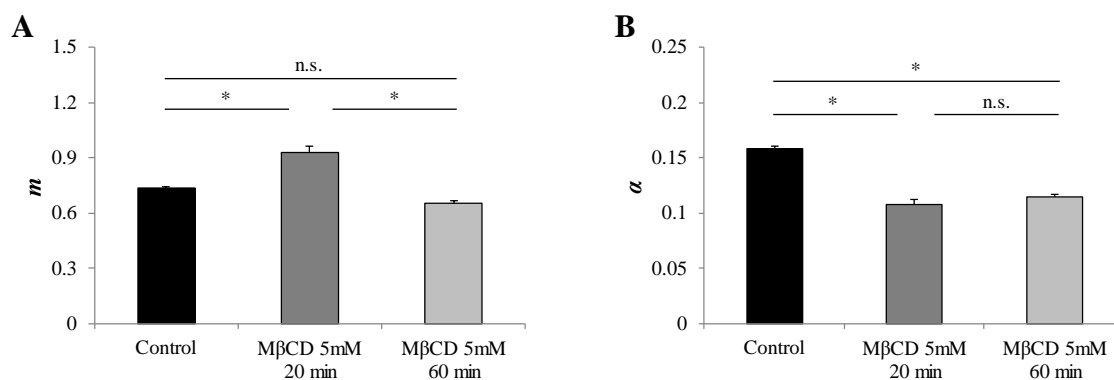


Figura 5.8 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras el tratamiento durante 20 y 60 minutos para la remoción de colesterol con 5 mM de MβCD. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Con el propósito de evaluar si una concentración más elevada de MβCD producía mayor efecto en la respuesta tras la estimulación con esfuerzo de corte se sometió a unas células a un tratamiento con 10 mM de MβCD durante 20 minutos (Tabla 5.4). La Figura 5.9 muestra trazos representativos de fluorescencia obtenidos en este experimento.

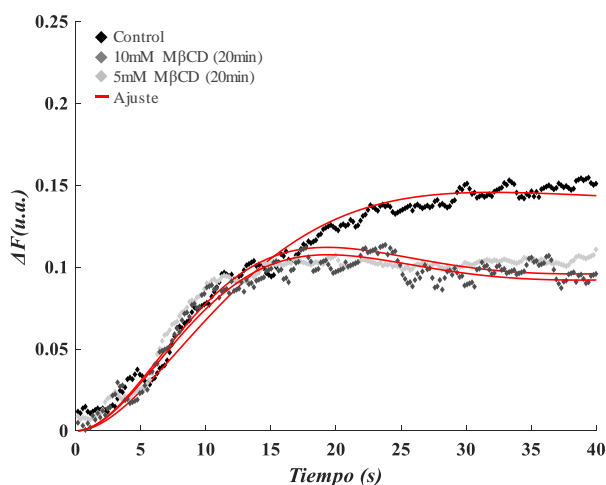


Figura 5.9 Trazos representativos de la remoción de colesterol con concentraciones de 5 mM y 10 mM de MβCD.

De este experimento se observó que, al realizar una comparación contra el control y contra la respuesta obtenida con 5 mM MβCD tanto el parámetro m (Figura 5.10A) y la amplitud α (Figura 5.10B) presenta una respuesta similar a las células tratadas con 5 mM de MβCD.

En el caso del parámetro m incrementó, mientras que, la amplitud α presento una disminución en la respuesta comparada contra la respuesta control.

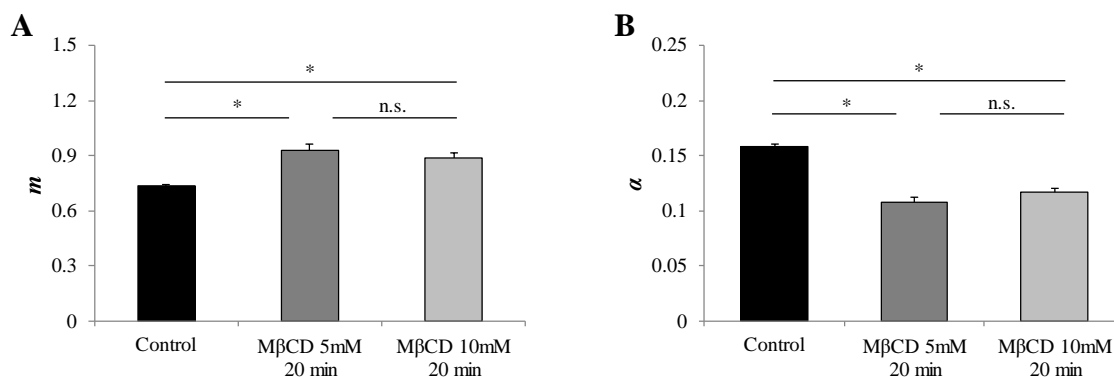


Figura 5.10 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras la remoción de colesterol aumentando la concentración de MβCD a 10 mM durante 20 minutos de tratamiento. A) Promedio \pm E.E. del parámetro "m" tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud "α" tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Para realizar el depósito de colesterol en la membrana plasmática se utilizó MβCD saturada con colesterol bajo el siguiente protocolo: para preparar una solución de 50 ml el colesterol es solubilizado en cloroformo y metanol en una relación 1:1 a una concentración de 50 mg/ml, un bolo de 80 μ L de dicha solución es sometida a corrientes de nitrógeno para eliminar los solventes utilizados, adicionalmente se dejan las muestras en cámara de vacío por al menos 30 minutos a una presión de -20 inHg para posteriormente añadirles 50 ml de solución DMEM adicionada con 5 mM MβCD, dicha solución fue sometida a sonicación durante 5 minutos, el colesterol excedente (no solubilizado) se remueve mediante centrifugación a 1200 rps durante 15 minutos decantando la solución, finalmente la solución se hace pasar por un filtro con poros de 0.25 μ m.

Una vez preparada la solución las células endoteliales son incubadas con el medio saturado de colesterol, en nuestro caso se probaron tiempos de incubación de 20 y 60 minutos en condiciones controladas de temperatura a 37°C y 5% de CO₂ antes de aplicar el esfuerzo de corte.^{73,74}

De este experimento obtuvimos que la respuesta fluorescencia de calcio se vio modificada tras el tratamiento y la aplicación del esfuerzo de corte (Tabla 5.5), en la Figura 5.11 se muestran trazos representativos de fluorescencia de este experimento.

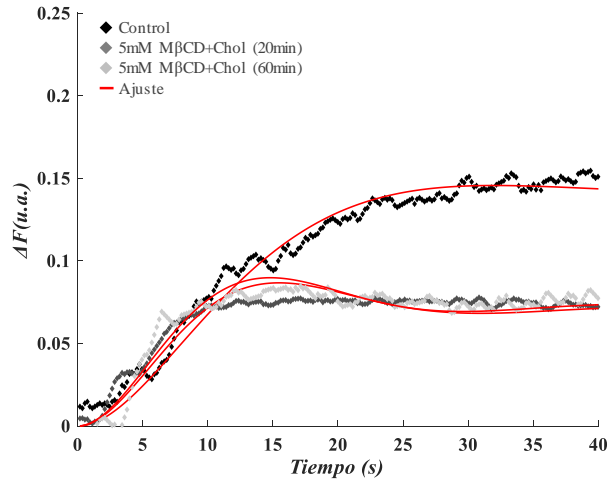


Figura 5.11 Trazos representativos de la respuesta obtenida tras el depósito de colesterol con 5 mM de MβCD durante tiempos de tratamiento de 20 y 60 minutos.

Para el parámetro m se vio aumentada significativamente con respecto al control sin encontrar diferencias entre los 20 y 60 minutos de tratamiento (Figura 5.12A). Por otra parte, la amplitud α se vio significativamente disminuida respecto al control (Figura 5.12B), sin embargo, se observó la misma respuesta tanto en las células tratadas durante 20 y 60 minutos.

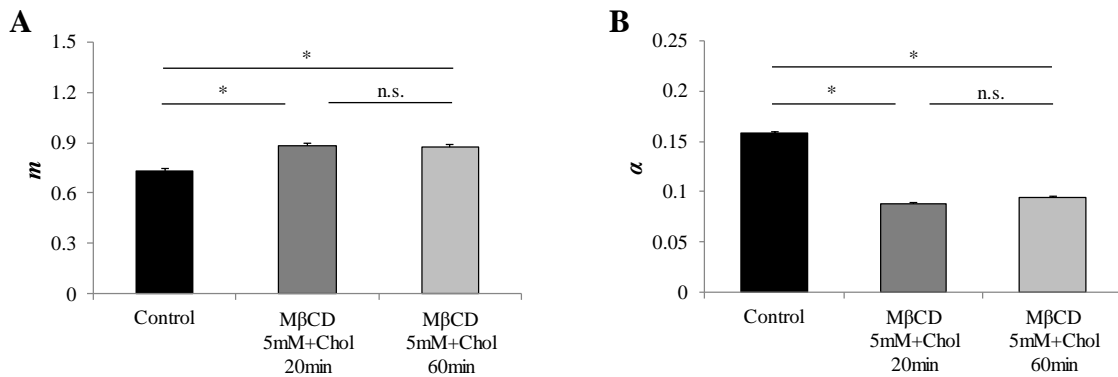


Figura 5.12 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras el depósito de colesterol en la membrana con MβCD saturada con colesterol (MβCD+Chol) durante 20 y 60 minutos de tratamiento. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Por otro lado, se decidió probar una concentración mayor de MβCD saturada con colesterol y repetir el experimento por lo que se sometió a las células a un tratamiento con 10 mM de MβCD+Chol durante un periodo de 20 minutos, registros representativos se muestran en la Figura 5.13.

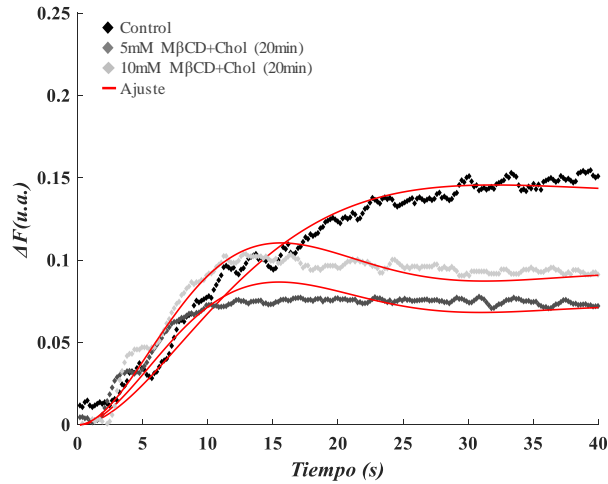


Figura 5.13 Trazos representativos de la respuesta obtenida tras el depósito de colesterol con 5 y 10 mM de MβCD-saturado durante 20 minutos de tratamiento.

Se encontró que los parámetros α y m se vieron significativamente disminuidos respecto a control, sin embargo, esta disminución no fue diferente a la obtenida con el tratamiento de 5 mM de MβCD+Chol.

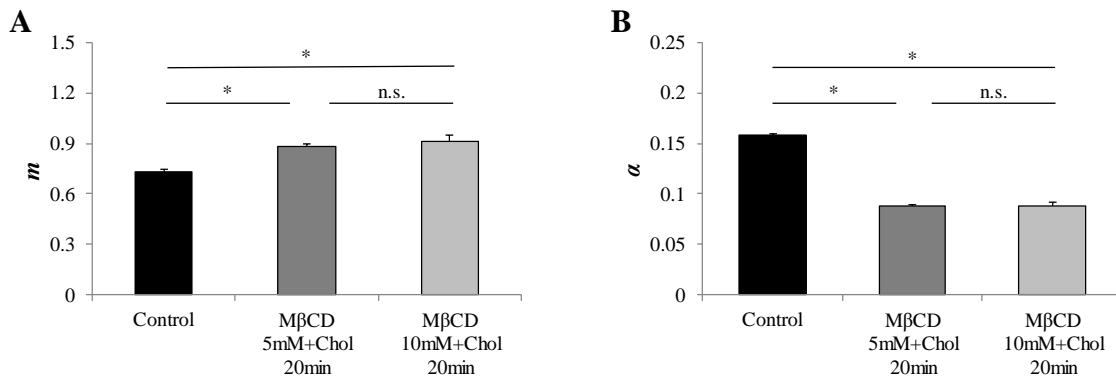


Figura 5.14 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras el depósito de colesterol en la membrana aumentando la concentración de MβCD saturada con colesterol (MβCD+Chol) durante 20 minutos. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “m” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Como control negativo para los experimentos de remoción de colesterol las células fueron expuestas a una solución compuesta de medio DMEM con MβCD y medio DMEM con MβCD saturada con colesterol en una proporción 1:1.^{71,72} Bajo esta condición el contenido de colesterol de la membrana para el caso de endotelio de aorta permanece en equilibrio aún en presencia de MβCD siendo una aproximación a la condición control. En este experimento se exploraron dos tiempos de incubación, 20 y 60 minutos previo a la aplicación del esfuerzo de corte obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 5.7. En la Figura 5.15 se muestran trazos representativos de las respuestas tras someter a la condición de equilibrio de la MβCD comparadas con un trazo control.

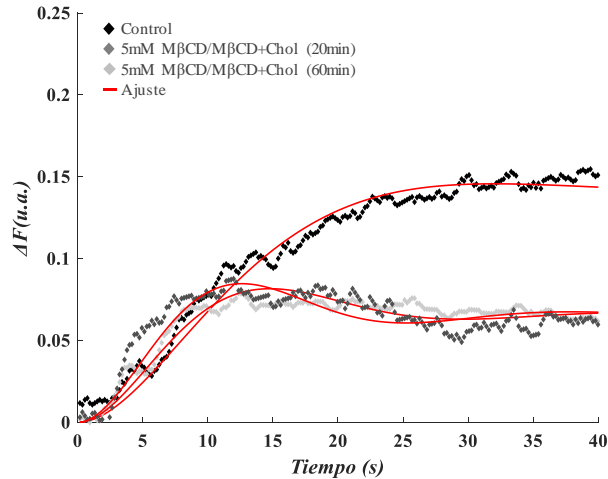


Figura 5.15 Trazos representativos de la respuesta obtenida tras someter a las células en presencia de MβCD en condición de equilibrio para la remoción de colesterol durante 20 y 60 minutos de tratamiento.

Contra intuitivamente encontramos que el parámetro m presentó un aumento significativo en ambos tiempos de incubación (Figura 5.16A). La amplitud α se vio disminuida significativamente comparada con el control, esto tanto para las células expuestas a 20 y 60 minutos de tratamiento (Figura 5.16B).

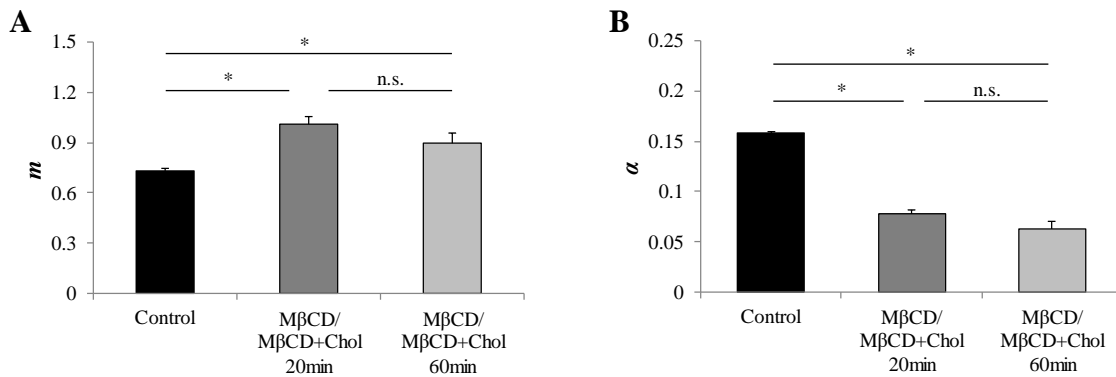


Figura 5.16 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte bajo la condición de equilibrio en el intercambio de colesterol 1:1 (MβCD/MβCD+Chol). A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Tabla 5.3 Promedio de las respuestas obtenidas tras la remoción de colesterol con 5 mM MβCD durante 20 y 60 minutos.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
5mM MβCD (20min)	0.107	0.041	0.004	0.929	0.317	0.033
5mM MβCD (60min)	0.113	0.040	0.002	0.650	0.294	0.018

Tabla 5.4 Promedio de las respuestas obtenidas tras la remocion de colesterol con 5 y 10 mM M β CD durante 20 minutos.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
5mM M β CD (20min)	0.107	0.041	0.004	0.929	0.317	0.033
10mM M β CD (20min)	0.117	0.032	0.003	0.887	0.312	0.029

Tabla 5.5 Promedio de las respuestas obtenidas tras el deposito de colesterol con 5 mM M β CD saturado con colesterol durante 20 y 60 minutos.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
5mM M β CD+Chol (20min)	0.087	0.034	0.002	0.878	0.295	0.018
5mM M β CD+Chol (60min)	0.094	0.029	0.001	0.871	0.268	0.016

Tabla 5.6 Promedio de las respuestas obtenidas tras el deposito de colesterol con 5 y 10 mM M β CD saturado con colesterol durante 20 minutos.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
5mM M β CD+Chol (20min)	0.087	0.034	0.002	0.878	0.295	0.018
10mM M β CD+Chol (20min)	0.088	0.035	0.003	0.914	0.351	0.035

Tabla 5.7 Promedio de las respuestas obtenidas en la condicion de equilibrio del intercambio de colesterol utilizando 5 mM M β CD y 5 mM M β CD saturado con colesterol en una proporción 1:1 durante 20 y 60 minutos de tratamiento.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
5mM M β CD/M β CD+Chol (20min)	0.075	0.027	0.044	1.012	0.281	0.042
5mM M β CD/M β CD+Chol (60min)	0.063	0.042	0.07	0.898	0.363	0.061

5.5 Inhibición De Blancos Reguladores De Calcio De Retículo Endoplasmático

Para determinar si los cambios en la concentración de calcio observados tras la estimulación con esfuerzo de corte son producto de calcio proveniente del retículo endoplasmático, se realizó la inhibición en el mecanismo de recaptura de calcio, el cual es llevado a cabo a través de la bomba SERCA. Para ello las células fueron tratadas con Tapsigargina (TGN) en una concentración de $1 \mu\text{M}$ con un tiempo de incubación de 15 minutos previo a la aplicación del esfuerzo de corte (Figura 5.17). Se utilizó el mismo esquema de estimulación de los experimentos con $\text{M}\beta\text{CD}$.

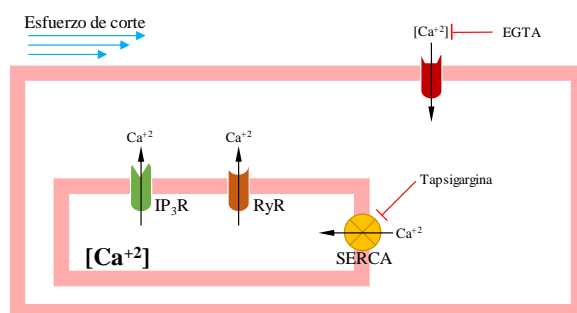


Figura 5.17 Esquema de inhibición de la bomba SERCA.

Como resultado obtuvimos que tras inhibir con TGN la respuesta a la estimulación de corte mostró un incremento lento de la intensidad de fluorescencia de calcio, el cual se puede observar en la Figura 5.18. Del análisis de los datos obtenidos (

Tabla 5.8) se encontró una disminución significativa en el parámetro m comparadas contra la respuesta control (Figura 5.19A), en cambio, para la amplitud α no se observó una diferencia significativa llegando los mismos niveles que el control (Figura 5.19B).

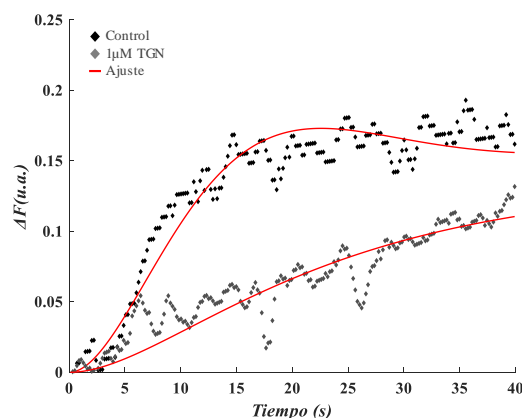


Figura 5.18 Registro representativos tras la inhibición de la bomba SERCA comparado con un registro control.

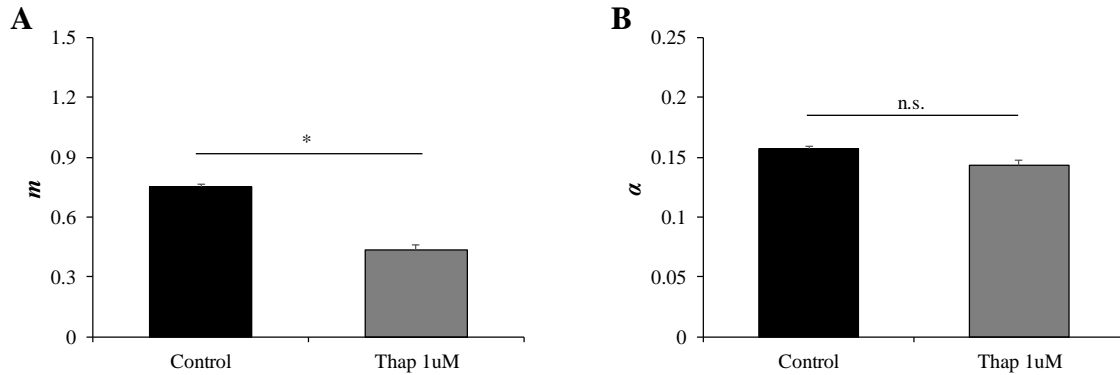


Figura 5.19 Efecto de la aplicación de bajo esfuerzo de corte tras la inhibición de la bomba SERCA. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “m” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Al observar que la respuesta tras la inhibición con TGN se vio modificada con respecto al control, se decidió inhibir los receptores de Rianodina (RyR) y de IP₃ (IP₃R) para determinar si alguno de estos mecanismos liberadores de calcio del retículo participa en la respuesta encontrada. El esquema de inhibición de RyR se muestra en la Figura 5.20.

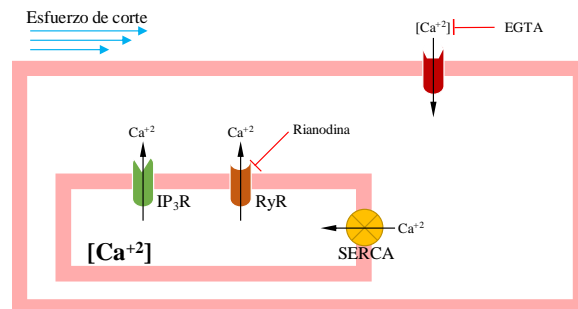


Figura 5.20 Esquema de inhibición del receptor de Rianodina.

Para la inhibición de RyR se utilizó una concentración de 5 μ M de rianodina (Ry) con el que inducimos estado cerrado del receptor, lo cual se logra utilizando una concentración de Ry en el orden de micromolar.⁷⁵⁻⁷⁷ La muestra fue preincubada con Ry durante un periodo de 15 minutos previo a la aplicación del esfuerzo de corte. De esta inhibición obtuvimos los datos mostrados en la Tabla 5.9. En la Figura 5.21 se muestran los trazos representativos.

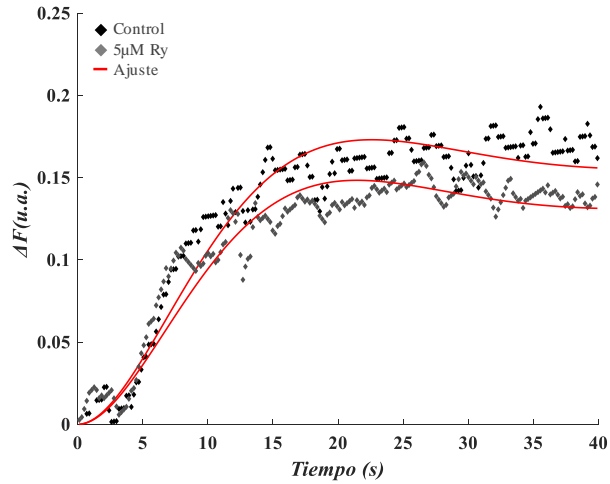


Figura 5.21 Registro representativos tras la inhibición del receptor de rianodina comparado con un registro control.

Del análisis de los resultados se encontró que la respuesta obtenida tras aplicar la estimulación no mostró diferencias significativas tanto en la amplitud α como en la pendiente el parámetro m al compararlas contra la respuesta control (Figura 5.22A y B).

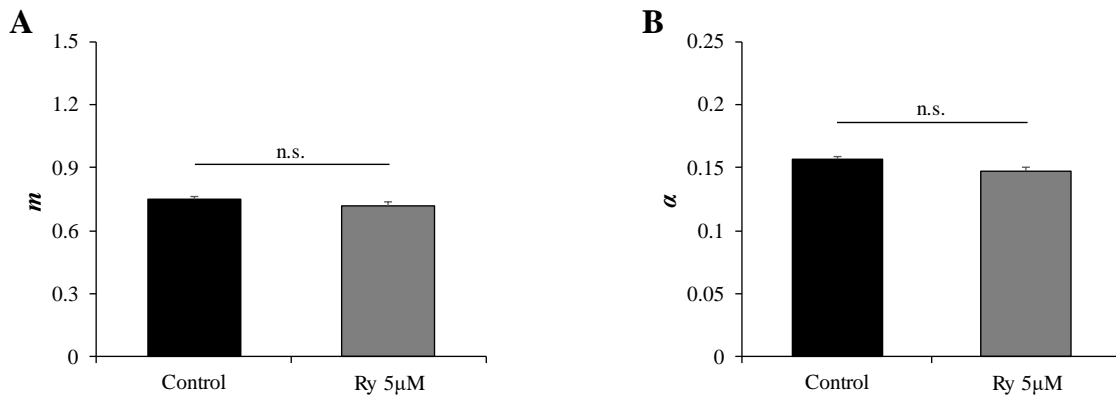


Figura 5.22 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición del receptor de rianodina. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular.

Para la inhibición de IP₃R se utilizaron 50 y 100 μ M de 2APB, concentraciones que se han utilizado para dicho propósito en diferentes tipos celulares.⁷⁸⁻⁸⁰ El esquema de inhibición del receptor de IP₃ se muestra en la Figura 5.23.

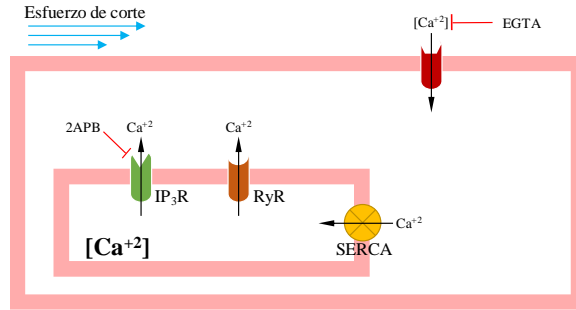


Figura 5.23 Esquema de inhibición del receptor de IP₃.

La incubación del inhibidor se realizó por un periodo de 15 minutos previo a la estimulación con esfuerzo de corte. En la Figura 5.24 se muestran trazos representativos de las inhibiciones con 2APB.

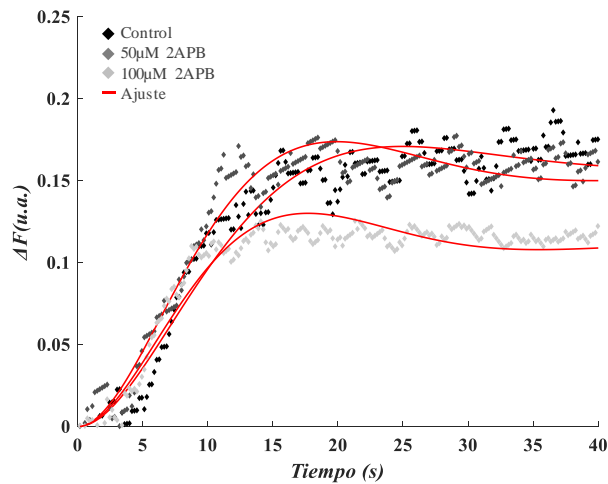


Figura 5.24 Registros representativos tras las inhibiciones del receptor de IP₃ comparado con un registro control.

Tras realizar la inhibición con 50 μM de 2APB no se encontró significativas en la pendiente m y la amplitud α con respecto al control, sin embargo, al aumentar la concentración de 2APB a 100 μM encontramos que el parámetro m aumentó mientras que la amplitud α se vio disminuida, ambas diferencias resultaron significativas (Figura 5.25A y B).

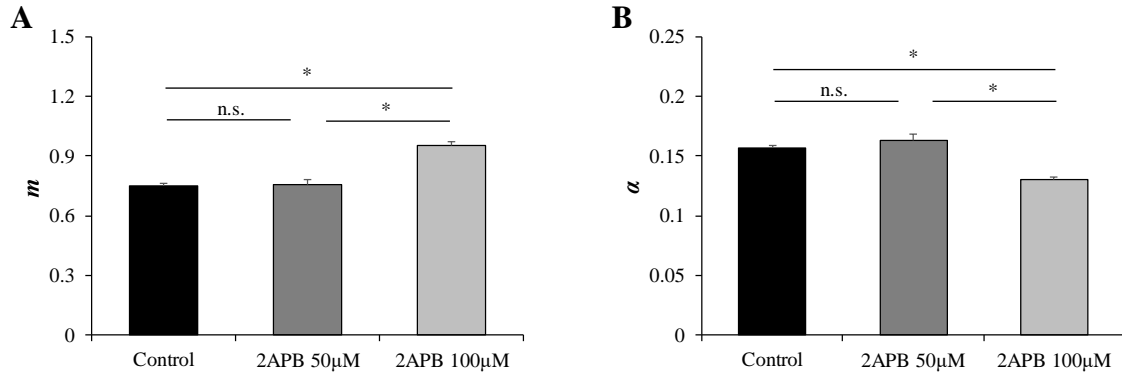


Figura 5.25 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición del receptor de IP_3 . A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

A pesar de encontrar disminución en la amplitud de la respuesta tras la inhibición con 2APB, se sigue observando una liberación de calcio al retículo, por lo cual se decidió probar la inhibición simultanea de ambos receptores para ver si existe algún tipo de interacción (Figura 5.26).

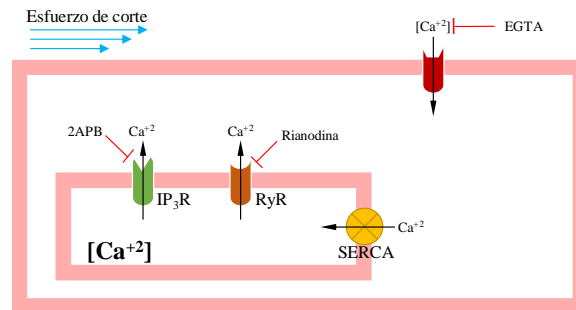


Figura 5.26 Esquema de estimulación simultanea del receptor de Rianodina e IP_3 .

Los inhibidores fueron incubados simultáneamente durante 15 minutos previos a la aplicación del esfuerzo de corte. Del análisis de este experimento se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 5.11. En la Figura 5.27 muestra un trazo representativo de la inhibición simultánea de ambos receptores. Se pudo observar una disminución en ambos parámetros, tanto en la amplitud α como en el parámetro m que resultaron significativamente diferentes comparadas contra el control (Figura 5.28A y B).

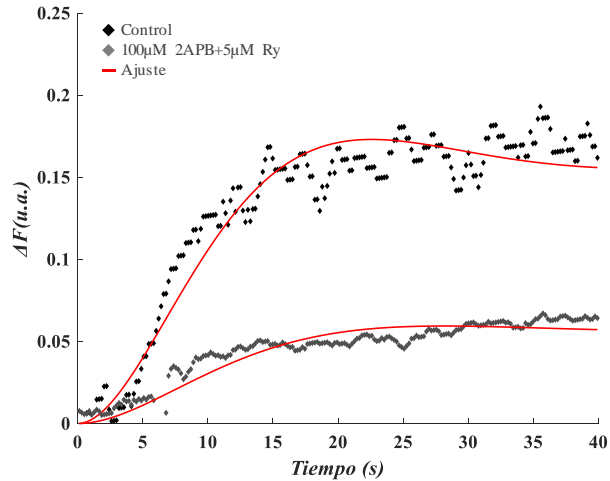


Figura 5.27 Registro representativo tras la inhibición simultánea de los receptores de IP_3 y Rianodina comparado con un registro control.

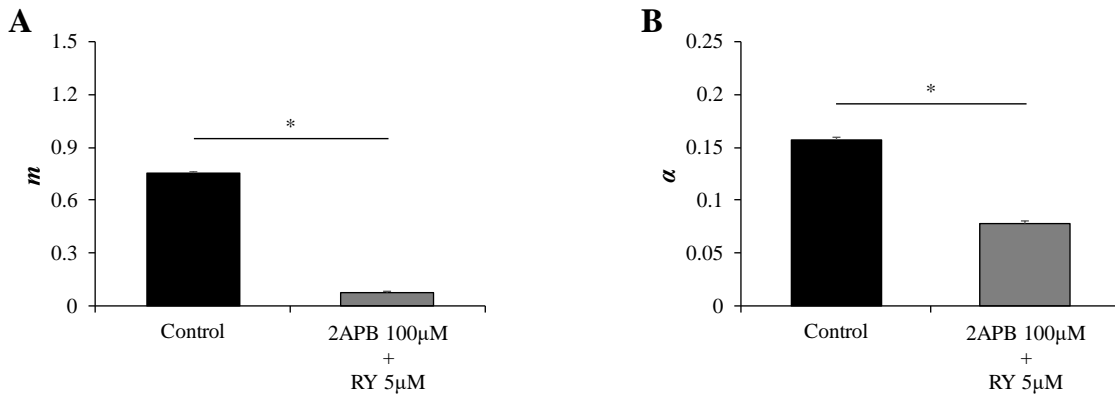


Figura 5.28 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición simultánea de los receptores de rianodina e IP_3 . A) Promedio \pm E.E. del parámetro “ m ” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Se puede observar que la disminución en la respuesta fue mayor al inhibir simultáneamente ambos receptores que las respuestas obtenidas tras la inhibición individual de ambos receptores, al compararlas esta disminución resultó significativamente diferente en ambos casos.

Finalmente, al observar la participación del receptor IP_3R se decidió probar la inhibición de la fosfolipasa-C (PLC) mecanismo por el cual se cataliza la producción de IP_3 el cual activa la liberación de calcio a través del receptor IP_3R (Figura 5.29).

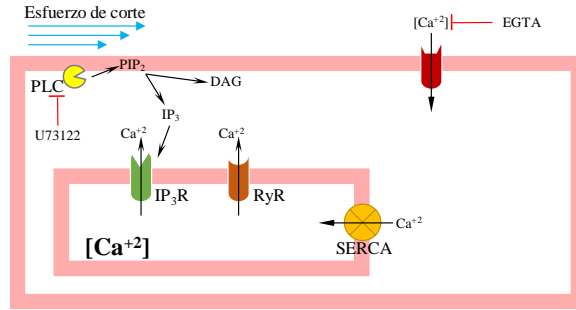


Figura 5.29 Esquema de inhibición de la Fosfolipasa C.

Para este experimento se utilizó el inhibidor U73122 a una concentración de 0.5 μM el cual se incubó 5 minutos previo a la aplicación de esfuerzo de corte. Los resultados de esta inhibición se muestran en la Tabla 5.12. En la Figura 5.30 se muestra un trazo representativo de esta inhibición.

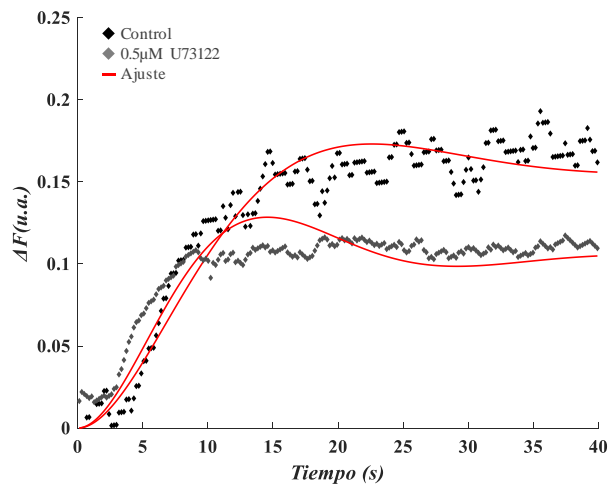


Figura 5.30 Registro representativo tras la inhibición de la Fosfolipasa C comparado con un registro control.

El parámetro m tuvo un incremento significativo con respecto al control, en cambio, la amplitud α disminuyó significativamente (Figura 5.31A y B).

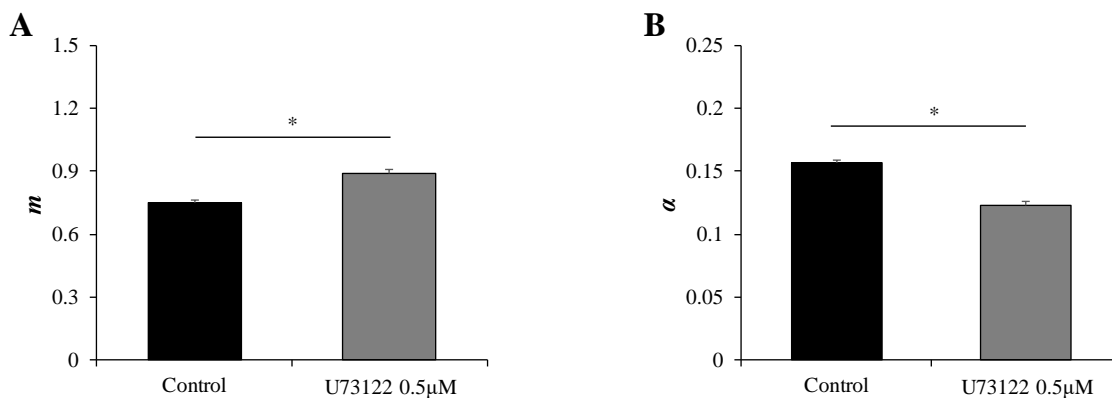


Figura 5.31 Efecto del esfuerzo de corte tras la inhibición de la Fosfolipasa C. A) Promedio \pm E.E. del parámetro “m” tras la remoción del calcio extracelular. B) Promedio \pm E.E. de la amplitud “ α ” tras la remoción del calcio extracelular. * $P < 0.01$.

Tabla 5.8 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición de la bomba SERCA con 1 μ M de Tapsigargina.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
Tapsigargina 1 μ M	0.142	0.068	0.004	0.436	0.302	0.022

Tabla 5.9 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición del receptor RyR con 5 μ M de Rianodina.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
Rianodina 5 μ M	0.147	0.051	0.003	0.719	0.309	0.020

Tabla 5.10 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición del receptor IP₃R con 50 y 100 μ M de 2APB.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
2APB 50 μ M	0.162	0.081	0.005	0.758	0.315	0.022
2APB 100 μ M	0.130	0.033	0.002	0.956	0.246	0.014

Tabla 5.11 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición simultánea de los receptores RyR e IP₃R con 5 μ M de Rianodina y 100 μ M de 2APB.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
2APB 100 μ M + Rianodina 5 μ M	0.078	0.020	0.002	0.078	0.020	0.002

Tabla 5.12 Promedio de las respuestas obtenidas tras la inhibición de la PLC con 0.5 μ M de U73122.

Tratamiento	Promedio (α)	DE (\pm)	EE (\pm)	Promedio (m)	DE (\pm)	EE (\pm)
Control	0.158	0.056	0.002	0.733	0.320	0.010
U73122 0.5 μ M	0.123	0.046	0.002	0.889	0.309	0.019

6 DISCUSIÓN

El Protocolo de extracción de células endoteliales estandarizado para este proyecto se estructuro basado en protocolos previamente descritos^{53,66-69,81-83}, el cual se adecuo para realizar la extracción de células endoteliales de arterias mayores en un modelo de rata, en nuestro caso la arteria a ocupar fue la aorta brindándonos mayores facilidades para su manipulación, dicho protocolo nos permitió realizar con éxito la extracción de las células endoteliales para su posterior estudio. Sin embargo, actualmente existen protocolos que permiten la extracción de las células de interés de forma específica utilizando perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos de identificación específicos para el tipo celular de interés⁸⁴, en este caso, hablando de diversidad vascular es posible realizar extracciones de endotelio de arterias mayores hasta endotelio de microvasculatura, lo cual con nuestro protocolo no es posible ya que las condiciones estandarizadas fueron adecuadas para nuestro caso donde hacemos uso de arterias mayores en un modelo de rata. Sin embargo, no todo es bondad con el uso de las perlas magnéticas como Dynabead ya que se ha reportado que el uso de altas concentraciones de estas repercute en la proliferación de las células y muestran una reducción en su metabolismo⁸⁵.

Al realizar los ensayos estimulación por esfuerzo de corte pudimos observar en nuestros trazos de fluorescencia de calcio que las células presentaban un aumento en la intensidad de fluorescencia la cual mostraba una dependencia con la magnitud del estímulo por esfuerzo de corte, esta respuesta se observaba en forma de transiente el cual tenía una amplitud aproximada del 20% de la fluorescencia basal para los casos de esfuerzo de corte máximo aquí utilizados. En reportes como el de *Scheitlin et al.*⁸⁶ donde hacen uso del mismo método de monitoreo de calcio intracelular (Fluo-4) se observan en sus trazos esta respuesta inicial a la aplicación del esfuerzo de corte (Figura 6.5A), sin embargo, ellos caracterizan parámetros como porcentaje de respuesta poblacional, tiempo al pico, frecuencia de oscilación, porcentaje de células oscilantes, debió a que en sus trazos observaron oscilaciones de calcio dependientes de la magnitud de su estímulo en una ventana de observación de siete minutos de registro.

En nuestro estudio, observamos que esta respuesta inicial se atenúa dependiendo de la intensidad del esfuerzo de corte en magnitudes bajas. Para realizar la caracterización de la respuesta se utilizó una función de ajuste de un oscilador armónico con rozamiento para eliminar el ruido observado en nuestros registros. El uso de esta función nos permitió ajustar las respuestas que mostraban amortiguamiento o sobreamortiguamiento (Figura 6.1).

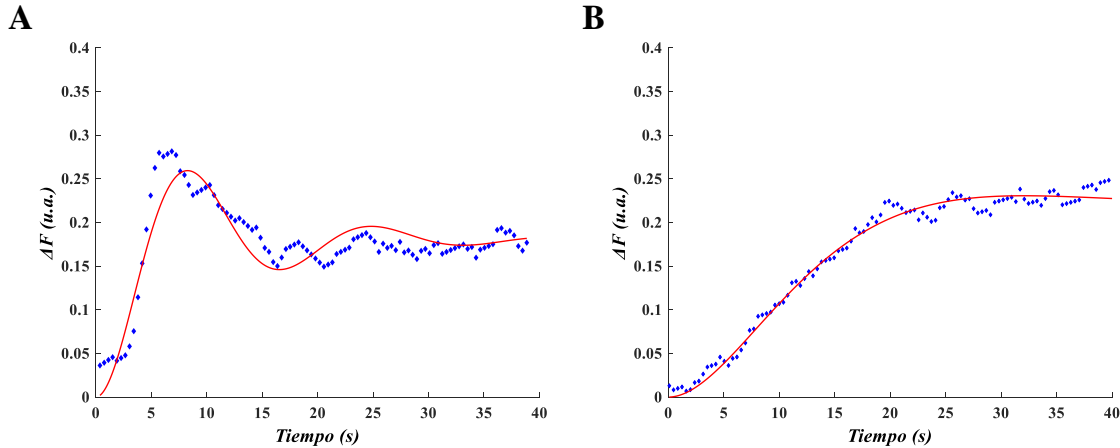


Figura 6.1 Ajustes de la función del oscilador armónico con fricción. A) Registro con respuesta subamortiguada. B) Registro con respuesta sobreamortiguada.

La función de ajuste para cada uno de los casos muestra dos términos que están en función del parámetro m lo cual se puede interpretar que hay dos contribuciones en la liberación de calcio. Al eliminar la contribución del calcio extracelular encontramos que la respuesta no se vio modificada, únicamente se encontró que el parámetro m al estimular con 0.1 dinas/cm^2 de lo cual podemos pensar que el calcio extracelular ingresa a la célula y esta entrada es rápidamente regulada por mecanismos de la membrana plasmática o por elementos de recaptura de calcio por lo cual no se ve reflejada esta diferencia en la magnitud α .

En nuestro estudio abordamos los efectos de la remoción de colesterol de la membrana plasmática en células endoteliales en la respuesta temprana de calcio intracelular inducida por la estimulación con esfuerzo de corte bajo. Nuestros resultados mostraron un efecto modulador en la amplitud α sin encontrar diferencias entre los tiempos de tratamiento o concentración de $M\beta CD$, a pesar de que se ha reportado que la remoción de colesterol produce una disminución en los niveles de ordenamiento en ambas fases lipídicas caracterizadas por Low GP y High GP y el aumento en el coeficiente de difusión lipídica por el esfuerzo de corte.⁶² Estos resultados fueron contraintuitivos ya que esperábamos que con la remoción de colesterol se favoreciera el proceso de mecanotransducción. Sin embargo, estos resultados podrían explicarse con base en las observaciones que han reportado que la remoción de colesterol durante solo 30 minutos con 10 mM de $M\beta CD$ produce una disminución en la expresión de proteínas como Caveolina, ICAM-1 y particularmente el fosfolípido PIP_2 (Figura 6.2) el cual es un precursor del segundo mensajero IP_3 que induce la liberación de calcio del retículo a través de IP_3R .⁸⁷ Podríamos descartar que esto se pudiera deber a la acción inespecífica de la $M\beta CD$ y su capacidad de remover fosfolípidos ya que se encuentra reportado que en tratamientos de 60 minutos con

hasta 15mM de M β CD no muestran cambios en el contenido de ácidos grasos lipídicos de la membrana plasmática.⁸⁸

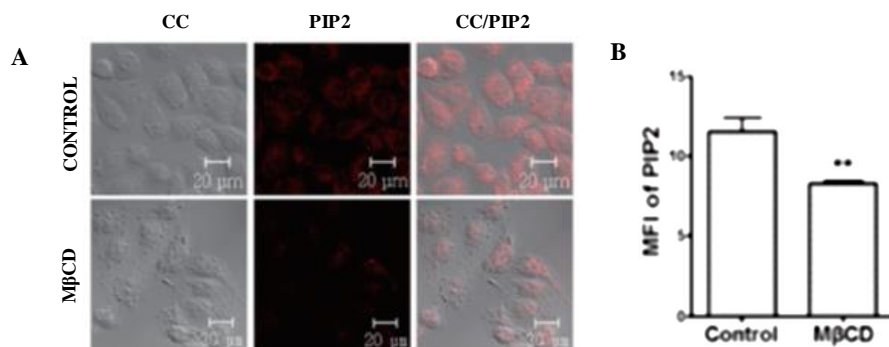


Figura 6.2 Expresión de PIP₂ en células HUVEC. A) Ensayo de inmunofluorescencia para PIP₂ en células endoteliales control y células tratadas con 10mM de M β CD. B) Análisis comparativo de niveles de fluorescencia de PIP₂ de células control y células tratadas con 10mM de M β CD. Imagen modificada de ⁸⁷.

Por otra parte, en nuestros experimentos donde realizamos el depósito de colesterol en la membrana plasmática, obtuvimos que, al igual que los experimentos con las células tratadas únicamente con M β CD se obtuvo una modulación en la amplitud α con respecto al control lo cual esperábamos observar asumiendo que la disminución del coeficiente de difusión lipídica por efecto del depósito de colesterol en la membrana tuviera un efecto inhibitorio el proceso de mecanotransducción responsable del aumento de calcio citoplasmático, suponiendo que las interacciones en los componentes de la membrana que desencadenan la liberación de calcio producida por el esfuerzo de corte se vieran disminuidas.

Se ha reportado que como consecuencia del depósito de colesterol en la membrana plasmática los niveles de ordenamiento lipídico Low y High GP (Figura 6.3) se ven incrementados tras la aplicación de esfuerzo de corte relativamente alto llevándolo a niveles comparables con los observados en condiciones control en reposo.⁶²

En nuestro caso al estimular con esfuerzo de corte bajo probablemente estemos produciendo niveles de ordenamiento lipídico menores a los reportados en condiciones de reposo y mayores a los generados por solo la aplicación de esfuerzo de corte lo cual nos permite observar una disminución en la respuesta de calcio citoplasmático.

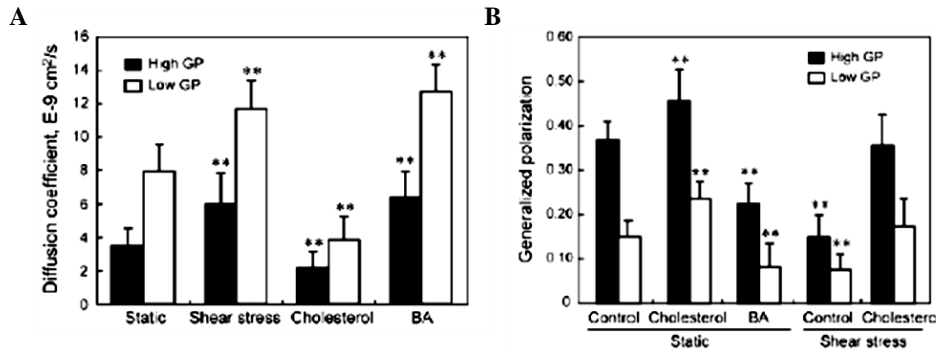


Figura 6.3 Efecto de esfuerzo de corte y agentes moduladores de fluidez de membrana sobre los niveles de ordenamiento lipídico en células endoteliales. A) Coeficientes de difusión por efecto del esfuerzo de corte, colesterol y alcohol bencílico. B) Niveles de polarización generalizada en regiones de alto y bajo ordenamiento lipídico por efecto de colesterol, alcohol bencílico y esfuerzo de corte sobre células adicionadas con colesterol. Imagen modificada de ⁶².

Para neutralizar el efecto de la remoción de colesterol por la presencia de M β CD se ha reportado que en las células endoteliales es necesario realizar una difusión de M β CD y M β CD saturada con colesterol (1:1) al observar que el contenido de colesterol no cambia comparado con las células sin tratamiento.⁷¹ Por ello, esperábamos que la respuesta de calcio inducida por esfuerzo de corte no se viera modificado.

Sin embargo, obtuvimos que la amplitud α se vio disminuida. Podríamos especular de este resultado que a pesar de que el contenido de colesterol en la membrana plasmática se mantiene en presencia de M β CD, la integridad de las balsas lipídicas se ve modificada debido a una redistribución de colesterol en la membrana y con esto el proceso de mecanotransducción del esfuerzo de corte este siendo modulado.

Para determinar la fuente de calcio observado en la respuesta inducida por el esfuerzo de corte se exploró la vía de regulación de calcio de retículo endoplasmático, de lo cual encontramos que a pesar de la inhibición de la bomba SERCA con Tapsigargina seguimos observando una respuesta cuya respuesta es más lenta pero que eventualmente llega a niveles de la respuesta control, de esto podríamos pensar que durante el proceso de lavado de las células, previo a la estimulación, el calcio disponible en el retículo no sale en su totalidad haciendo que el calcio disponible en el momento de la estimulación sea menor, por lo tanto, la fuerza de la respuesta se vea disminuida.

Por otro lado, podríamos pensar también en la participación de una fuente de calcio alterna al retículo sea la responsable de esa liberación de calcio, se ha reportado la movilización de calcio de cuerpos acídicos inducida por dinucleótido de adenina fosfato-acido nicotínico (NAADP), mecanismo originalmente descrito en óvulos de erizo de mar y el cual está presente en células de mamífero. En 2010, *Brailoiu et al.* demostraron que la liberación de calcio inducida por NAADP en células endoteliales de aorta era bloqueada mediante la

inhibición de los mecanismos reguladores de calcio de los cuerpos acídicos (Figura 6.4) y que la respuesta no se veía modificada aún tras inhibición de IP₃R mientras que la inhibición de RyR solo presentaba una modulación de la respuesta. Adicional a esto, demostraron que este mecanismo tenía actividad vasoactiva mediante ensayos de capacidad de contracción en anillos de aorta.⁸⁹

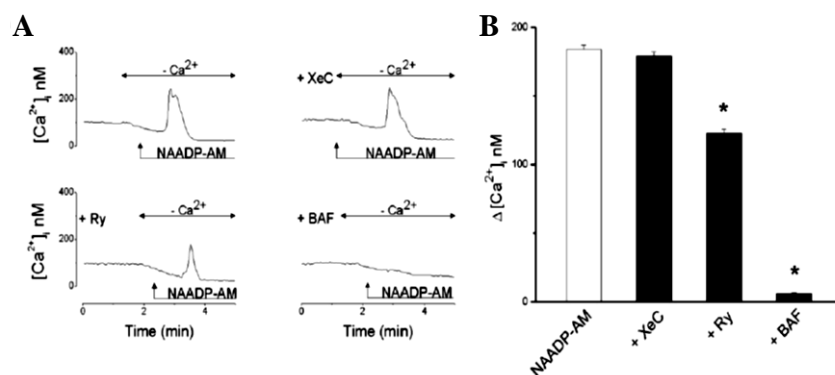


Figura 6.4 Liberación de calcio de cuerpos acídicos inducida por NAADP. A) El efecto de la inhibición de IP₃R con Xestospongina C (XeC), RyR con Rianodina (Ry) y ATPasa con Bafilomicina A1 (BAF). B) Análisis comparativo de la liberación de calcio inducida por NAADP tras la inhibición de IP₃R, RyR y ATPasa. Imagen modificada de ⁸⁹.

En nuestras condiciones de inhibición de los dos mecanismos de liberación de calcio del retículo obtuvimos que al inhibir al receptor RyR con 5 μM de rianodina no observamos disminución en la respuesta mientras que al inhibir del receptor de IP₃ (IP₃R) con una concentración del 100 μM no obtuvimos una inhibición total de la respuesta. Sin embargo, obtuvimos una disminución significativa en la amplitud de la respuesta, dicho efecto se vio potenciado al realizar la inhibición simultánea de ambos receptores de tal forma que tanto la fuerza de liberación como la amplitud de la respuesta se vieron disminuidas.

Los mecanismos de liberación de calcio han sido ampliamente descritos en células musculares debido a que la liberación de calcio sarcoplasmático es crítico para la activación del proceso de contracción muscular. Se ha descrito la función del RyR como un mecanismo de amplificación de la respuesta de calcio, el cual es orquestado por la entrada de calcio extracelular vía canales voltaje dependientes aumentando la probabilidad de apertura del RyR en lo que se conoce como mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio.

Este mecanismo es similar en el músculo cardíaco, teniendo como diferencias la participación adicional de IP₃R en la liberación de calcio sarcoplasmático y siendo necesaria la activación de ambos mecanismos para lograr la dinámica de calcio característica.

Probablemente en nuestro caso el calcio liberado por IP₃R esté reclutando la actividad del RyR mediante el mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio. Por otro lado, no se han reportado interacciones proteína-proteína entre ambos receptores, sin embargo, estos receptores forman complejos de señalización macromoleculares que pueden ver regulada su función por múltiples proteínas en común como Calmodulina, Bcl-2 o Homer.

Finalmente, al bloquear la síntesis de IP₃ mediante la inhibición de la Fosfolipasa-C (PLC) con U73122 obtuvimos que la amplitud de la respuesta se vio disminuida, lo cual nos confirma que la liberación de calcio activada por IP₃ se encuentra participando en respuesta a esfuerzos de corte bajo.

En el trabajo de Scheitlin *et al.* reportan que la inhibición de la PLC con U73122 tiene efectos principalmente en la amplitud de los picos de calcio, en el porcentaje de células oscilantes y en la frecuencia de oscilación; sin observar efecto en el porcentaje de células que responden al esfuerzo de corte. Sin embargo, este tipo de respuesta fue obtenida con la aplicación de esfuerzo de corte relativamente alto. De esto ellos observaron que la inhibición de la PLC con U73122 no eliminó la respuesta de calcio (Figura 6.5B), pero tuvo mayor impacto en la parte oscilatoria de la respuesta.

También encontraron que un desacoplamiento mitocondrial con Antimicina A (Figura 6.5C) y la inhibición de la cadena de transporte de electrones con CGP37157 (Figura 6.5D) previene la ocurrencia de los transientes y oscilaciones de calcio lo que les permite implicar la participación del calcio mitocondrial en el aumento de calcio citoplasmático en la respuesta a esfuerzo de corte. Sin embargo, como podemos ver en la Figura 6.5C y D se sigue presentando un pico de calcio al inicio de la aplicación del esfuerzo de corte la cual es rápidamente regulada.

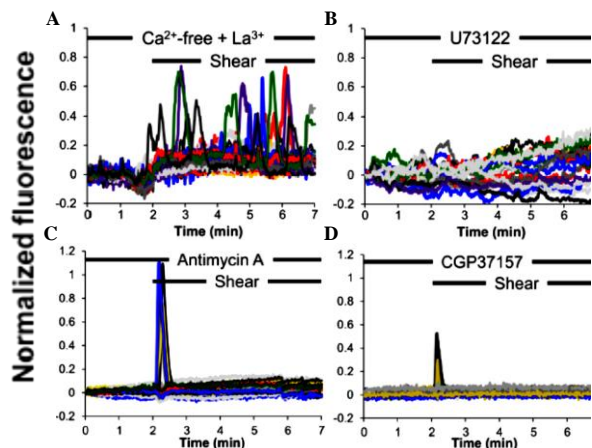


Figura 6.5 Incremento de calcio intracelular inducido por esfuerzo de corte es modulado por la inhibición de la vía de liberación de calcio de retículo endoplasmático y blancos moduladores de calcio mitocondrial. A) Respuesta de calcio intracelular en respuesta a esfuerzo de corte en ausencia de calcio extracelular. B) Respuesta de calcio intracelular tras la inhibición de la PLC con U73122. C) Respuesta de calcio intracelular tras la inhibición del transporte de protones con Antimicina A. D) Respuesta de calcio intracelular tras la inhibición del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ con CGP3757. Imagen modificada de 86

7 CONCLUSIONES

Las células endoteliales de aorta responden de forma dependiente a esfuerzos de corte bajo incrementando el calcio intracelular en presencia y ausencia de calcio extracelular.

Las células endoteliales ven modulada su respuesta de calcio a esfuerzos de corte bajo tras modificar el contenido de colesterol de la membrana plasmática (depósito y remoción).

El calcio en la respuesta a esfuerzo de corte bajo es liberado del retículo endoplasmático de forma parcial debido a la activación de la vía de señalización de IP_3 y reclutando la activación del receptor de Rianodina.

Una fuente de calcio alterna al retículo endoplasmático participa en la respuesta de calcio inducida por esfuerzos de corte bajo.

El protocolo de aislamiento de células endoteliales de aorta es apropiado para ratas o modelos animales con dimensiones superiores.

8 PERSPECTIVAS

Realizar un estudio inhibitorio de los mecanismos reguladores de calcio mitocondrial.

Realizar el estudio inhibitorio de los mecanismos reguladores de calcio en cuerpos acídicos.

Realizar ensayos de cuantificación de colesterol en los tratamientos con M β CD para la remoción y depósito de colesterol.

Implementar el estudio proteómico de blancos mecanosensibles localizados en balsas lipídicas durante los tratamientos con M β CD.

Determinar el umbral de esfuerzo de corte donde las células endoteliales diferencian entre bajo y alto esfuerzos de corte.

Realizar estudio de liberación de calcio inducido por estimulación con esfuerzo de corte bajo en tejido aórtico.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1392-1406. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01328.x
2. Secomb TW. Hemodynamics. *Compr Physiol.* 2016;6(2):975-1003. doi:10.1002/cphy.c150038
3. Ku DN. Blood flow in arteries. *Annu Rev Fluid Mech.* 1997;29(1):399-434. doi:10.1146/annurev.fluid.29.1.399
4. Ando J, Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2013;99(2):260-268. doi:10.1093/cvr/cvt084
5. Chiu J-J, Chien S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol Rev.* 2011;91(1):327-387. doi:10.1152/physrev.00047.2009
6. Sonoqui L, Moreno MR, Anumolu P, Davis CA, Zambrano S, Allen ACB. Device-Based In Vitro Techniques for Mechanical Stimulation of Vascular Cells: A Review. *J Biomech Eng.* 2014;137(4):040801. doi:10.1115/1.4029016
7. Won D, Zhu S-N, Chen M, et al. Relative Reduction of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression and Transcription in Atherosclerosis-Prone Regions of the Mouse Aorta and in an in Vitro Model of Disturbed Flow. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1691-1704. doi:10.2353/ajpath.2007.060860
8. Group FS, Sys- M. The role of haemodynamic forces in the localization of atherosclerotic lesions. 1994:347-362.
9. Heo K-S, Fujiwara K, Abe J. Shear Stress and Atherosclerosis. *Mol Cells.* 2014;37(6):435-440. doi:10.14348/molcells.2014.0078
10. Davies PF. Flow-Mediated Mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75(3):519-560.
11. Miao H, Hu Y-L, Shiu Y-T, et al. Effects of Flow Patterns on the Localization and Expression of VE-Cadherin at Vascular Endothelial Cell Junctions: In vivo and in vitro Investigations. *J Vasc Res.* 2005;42(1):77-89. doi:10.1159/000083094
12. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(41):14871-14876. doi:10.1073/pnas.0406073101
13. Dewey CF, Bussolari SR, Gimbrone MA, Davies PF. The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress. *J Biomech Eng.* 1981;103(3):177. doi:10.1115/1.3138276

14. Ando J, Yamamoto K. Vascular Mechanobiology - Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. *Circ J*. 2009;73(11):1983-1992. doi:JST.JSTAGE/circj/CJ-09-0583 [pii]
15. Butcher JT, Penrod AM, García AJ, Nerem RM. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1429-1434. doi:10.1161/01.ATV.0000130462.50769.5a
16. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2007;362(1484):1445-1457. doi:10.1098/rstb.2007.2127
17. Korenaga R, Ando J, Tsuboi H, et al. Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(1):213-219.
18. Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J*. 2009;73(11):1983-1992. doi:10.1253/circj.CJ-09-0583
19. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Through c-Src by Divergent Signaling Pathways. *Circ Res*. 2001;89(11):1073-1080. doi:10.1161/hh2301.100806
20. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(3):C499-508. doi:10.1152/ajpcell.00122.2003
21. Takada Y, Shinkai F, Kondo S, et al. Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205(2):1345-1352. doi:10.1006/bbrc.1994.2813
22. Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Ono S, Yoshida A. Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2013;116:308-311. doi:10.1016/j.exer.2013.10.001
23. Zaragoza C, Márquez S, Saura M. Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(5):446-452. doi:10.1097/MOL.0b013e328357e837
24. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal Adhesions, Contractility, and Signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002; 12(1): 463-519. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.463
25. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991;87(January):1-5.
26. Asparuhova MB, Gelman L, Chiquet M. Role of the actin cytoskeleton in tuning cellular responses to external mechanical stress. *Scand J Med Sci Sport*. 2009;19(4):490-499. doi:10.1111/j.1600-0838.2009.00928.x

27. Hu Y-L, Hunter T, Kim M, et al. Fluid Shear Stress Activation of Focal Adhesion Kinase. *J Biol Chem.* 2002;272(48):30455-30462. doi:10.1074/jbc.272.48.30455
28. Osawa M, Masuda M, Kusano KI, Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: Is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol.* 2002;158(4):773-785. doi:10.1083/jcb.200205049
29. Kiosses WB, Cao G, Schwartz MA, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005;437(7057):426-431. doi:10.1038/nature03952
30. Johnson BD, Mather KJ, Wallace JP. Mechanotransduction of shear in the endothelium: Basic studies and clinical implications. *Vasc Med.* 2011;16(5):365-377. doi:10.1177/1358863X11422109
31. Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: Permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(4):828-839. doi:10.1007/s10439-011-0429-8
32. Siegel G, Malmsten M, Klüßendorf D, Walter A, Schnalke F, Kauschmann A. Blood-flow sensing by anionic biopolymers. *J Auton Nerv Syst.* 1996;57(3):207-213. doi:10.1016/0165-1838(95)00071-2
33. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med.* 2006;259:351-363. doi:doi.org/10.1364/OL.14.000618
34. Tarbell JM, Ebong EE. The endothelial glycocalyx: a mechano-sensor and -transducer. *SciSignal.* 2008;1(40):t8.
35. Iomini C, Tejada K, Mo W, Vaananen H, Piperno G. Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress. *J Cell Biol.* 2004;164(6):811-817. doi:10.1083/jcb.200312133
36. DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC, Alkemade FE, et al. Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007;196(2):542-550. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.030
37. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003;33(2):129-137. doi:10.1038/ng1076
38. Wideman TH, Zautra AJ, Edwards RR. NIH Public Access. 2014;154(11):2262-2265. doi:10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking
39. Zhou J, Kawanabe Y, Pearce WJ, Ingber DE, Kaminski JJ, Nauli SM. Endothelial Cilia Are Fluid Shear Sensors That Regulate Calcium Signaling and Nitric Oxide Production Through Polycystin-1. *Circulation.* 2008;117(9):1161-1171. doi:10.1161/circulationaha.107.710111

40. Kolb RJ, Mell BR, Nauli SM, et al. Ciliary Polycystin-2 Is a Mechanosensitive Calcium Channel Involved in Nitric Oxide Signaling Cascades. *Circ Res.* 2009;104(7):860-869. doi:10.1161/circresaha.108.192765
41. Knudsen HL, Frangos JA. Role of cytoskeleton in shear stress-induced endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2017;273(1):H347-H355. doi:10.1152/ajpheart.1997.273.1.h347
42. Remuzzi A, Morigi M, Angioletti S, et al. Shear Stress-Induced Cytoskeleton Rearrangement Mediates NF- κ B-Dependent Endothelial Expression of ICAM-1. *Microvasc Res.* 2002;60(2):182-188. doi:10.1006/mvre.2000.2260
43. Isshiki M, Ando J, Korenaga R, et al. Endothelial Ca²⁺ waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(April):5009-5014.
44. Anderson RGW. Review Caveolae: Where incoming and outgoing messengers meet. *Rev Lit Arts Am.* 1993;90(December):10909-10913.
45. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem.* 1998;273(52):34724-34729. doi:10.1074/jbc.273.52.34724
46. Yu J, Bergaya S, Murata T, et al. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1284-1291. doi:10.1172/JCI27100
47. Lungu AO, Tanimoto T, Berk BC, Jin Z-G, Ueba H, Frame MD. Ligand-Independent Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 by Fluid Shear Stress Regulates Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circ Res.* 2003;93(4):354-363. doi:10.1161/01.res.0000089257.94002.96
48. Jong Lee H, Young Koh G. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(2):399-404. doi:10.1016/S0006-291X(03)00592-8
49. Shimizu N, Yamamoto K, Kumagaya S, et al. Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2007;293(3):H1646-H1653. doi:10.1152/ajpheart.01385.2006
50. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-605. doi:10.1038/21224
51. Chachisvilis M, Zhang Y-L, Frangos JA. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(42):15463-15468. doi:10.1073/pnas.0607224103
52. Bergaya S, Meneton P, Bloch-Faure M, et al. Decreased flow-dependent dilation in

- carotid arteries of tissue kallikrein-knockout mice. *Circ Res.* 2001;88(6):593-599. doi:10.1161/01.RES.88.6.593
53. Gudi S, Nolan JP, Frangos JA. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2515-2519. doi:10.1073/pnas.95.5.2515
 54. Cabello OA, Schilling WP. Vectorial Ca²⁺ flux from the extracellular space to the endoplasmic reticulum via a restricted cytoplasmic compartment regulates inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated Ca²⁺ release from internal stores in vascular endothelial cells. *Biochem J.* 2015;295(2):357-366. doi:10.1042/bj2950357
 55. Dzau VJ, Cooke JP, Rossitch E, Andon N, Loscalzo J. Flow activates a specific endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Am Coll Cardiol.* 2010;15(2):A1. doi:10.1016/0735-1097(90)91734-c
 56. Olesen S-P, Clapham D, Davies P. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;331(6152):168-170. doi:10.1038/331168a0
 57. Shen Y, Gautam M, Barakat AI, Thirkill TL, Douglas GC. Flow-activated Chloride Channels in Vascular Endothelium. *J Biol Chem.* 2006;281(48):36492-36500. doi:10.1074/jbc.m605866200
 58. Yamamoto K, Korenaga R, Ando J, Kamiya A. Fluid shear stress activates Ca²⁺ influx into human endothelial cells via P2X₄ purinoceptors. *Circ Res.* 2000;87(5):385-391.
 59. Ayee MAA, Levitan I. Paradoxical impact of cholesterol on lipid packing and cell stiffness. *Front Biosci.* 2016;21(6):1245-1259. doi:10.2741/4454
 60. Cho M, Levitan I, Singh DK, et al. oxLDL-induced decrease in lipid order of membrane domains is inversely correlated with endothelial stiffness and network formation. *Am J Physiol Physiol.* 2010; 299(2): C218 - C229. doi:10.1152/ajpcell.00383.2009
 61. Butler PJ, Norwich G, Weinbaum S, Chien S. Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity. *Am J Physiol Physiol.* 2017;280(4):C962-C969. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.4.c962
 62. Yamamoto K, Ando J. Endothelial cell and model membranes respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases. *J Cell Sci.* 2013;126(5):1227-1234. doi:10.1242/jcs.119628
 63. Yamamoto K, Ando J. Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015:ajpheart.00241.2015. doi:10.1152/ajpheart.00241.2015
 64. Barakat AI, Lieu DK, Gojova A. Secrets of the code: Do vascular endothelial cells use ion channels to decipher complex flow signals? *Biomaterials.* 2006;27(5):671-

678. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.036

65. Koo A, Dewey CF, García-Cardena G. Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Physiol.* 2012;304(2):C137-C146. doi:10.1152/ajpcell.00187.2012
66. Socha MJ, Segal SS. Isolation of Microvascular Endothelial Tubes from Mouse Resistance Arteries. *J Vis Exp.* 2013;(81):1-9. doi:10.3791/50759
67. Hewett PW. *Angiogenesis Protocols.* 2009;467:61-76. doi:10.1007/978-1-59745-241-0
68. Ismail JA, Poppa V, Kemper LE, et al. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol.* 2003;12(2):82-90. doi:10.1016/S1054-8807(02)00166-7
69. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller K-M, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol.* 2002;72(3):221-229. doi:10.1006/exmp.2002.2424
70. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for cholesterol content. *J Lipid Res.* 1997;38(11):2264-2272.
71. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2007; 1768(6): 1311 - 1324. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.026
72. Byfield FJ, Aranda-Espinoza H, Romanenko VG, Rothblat GH, Levitan I. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys J.* 2004;87(5):3336-3343. doi:10.1529/biophysj.104.040634
73. Haynes MP, Phillips MC, George H. Use of cyclodextrins for cholesterol content. *J Lipid Res.* 1997;38(11):2264-2272.
74. Levitan I, Christian AE, Tulenko TN, Rothblat GH. Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *J Gen Physiol.* 2000;115(4):405-416. doi:10.1085/jgp.115.4.405
75. Van Petegem F. Ryanodine receptors: Structure and function. *J Biol Chem.* 2012;287(38):31624-31632. doi:10.1074/jbc.R112.349068
76. Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1986;261(14):6300-6306.
77. Sutko JL, Airey JA, Welch W, Ruest L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev.* 1997;49(1):53-98.
78. Diver JM, Sage SO, Rosado JA. The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-

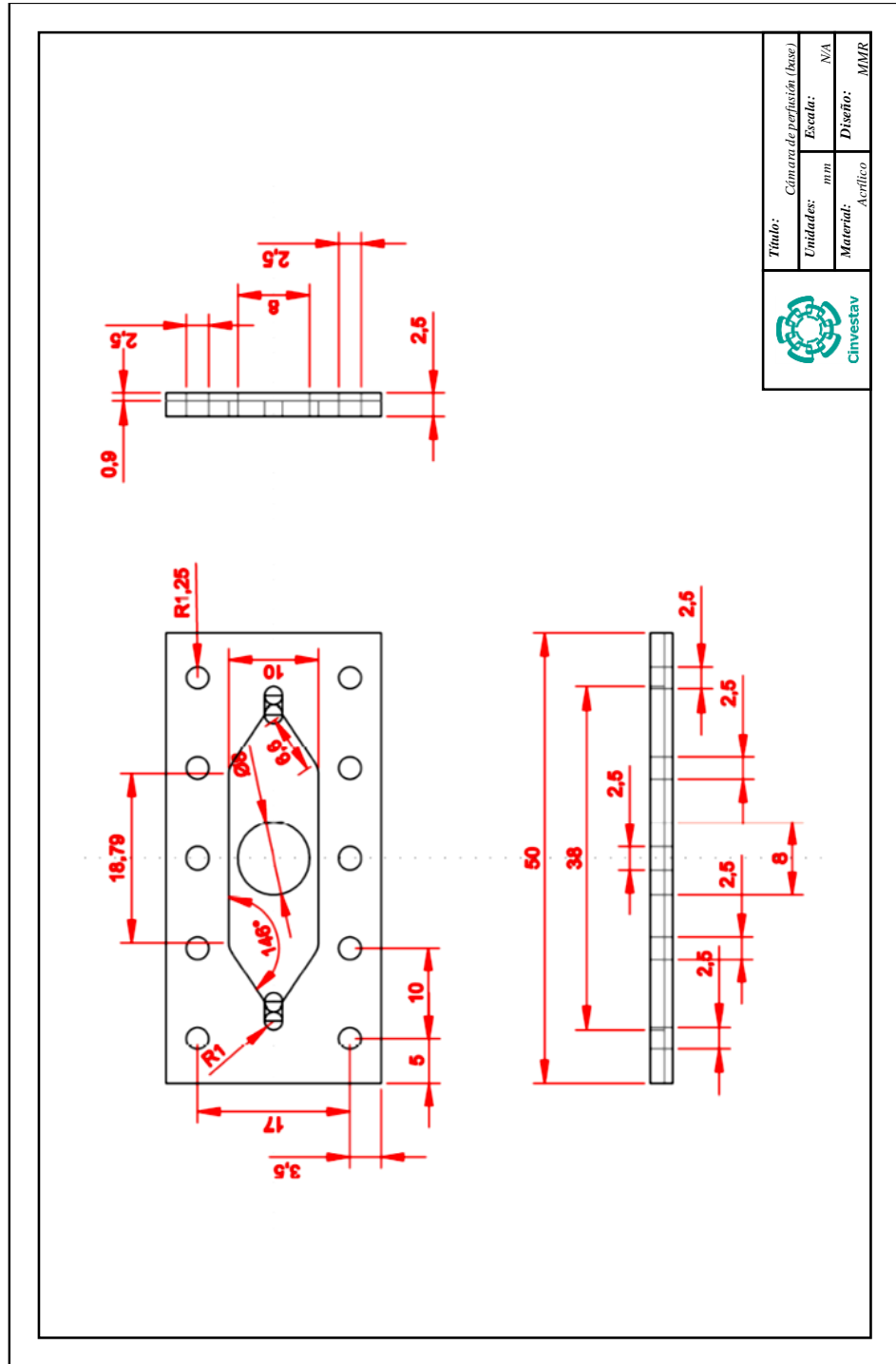
aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca²⁺ entry channels in human platelets: Cautions for its use in studying Ca²⁺ influx. *Cell Calcium*. 2001;30(5):323-329. doi:10.1054/ceca.2001.0239

79. Peters SC, Piper HM. Reoxygenation-induced Ca²⁺ rise is mediated via Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in cardiac endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2007;73(1):164-171. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.015
80. Ewart MA, Ugunjan A, Vishwanath A, et al. Changes in IP₃ receptor expression and function in aortic smooth muscle of atherosclerotic mice. *J Vasc Res*. 2017;54(2):68-78. doi:10.1159/000461581
81. Marelli-Berg FM, Peek E, Lidington EA, Stauss HJ, Lechler RI. Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J Immunol Methods*. 2000;244(1-2):205-215. doi:10.1016/S0022-1759(00)00258-1
82. Kajimoto K, Hossen MN, Hida K, et al. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine inguinal and epididymal adipose tissues. *J Immunol Methods*. 2010;357(1-2):43-50. doi:10.1016/j.jim.2010.03.011
83. Middleton J, Americh L, Gayon R, et al. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol*. 2005;206(3):260-268. doi:10.1002/path.1788
84. Wang J, Niu N, Xu S, Jin ZG. A simple protocol for isolating mouse lung endothelial cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-018-37130-4
85. Tiwari A, Punshon G, Kidane A, Hamilton G, Seifalian AM. Magnetic beads (DynabeadTM) toxicity to endothelial cells at high bead concentration: Implication for tissue engineering of vascular prosthesis. *Cell Biol Toxicol*. 2003;19(5):265-272. doi:10.1023/B:CBTO.0000004929.37511.ed
86. Scheitlin CG, Julian JA, Shanmughapriya S, Madesh M, Tsoukias NM, Alevriadou BR. Endothelial mitochondria regulate the intracellular Ca²⁺ response to fluid shear stress. *Am J Physiol Physiol*. 2016;310(6):C479-C490. doi:10.1152/ajpcell.00171.2015
87. Ao M, Wu L, Zhou X, Chen Y. Methyl-β-Cyclodextrin Impairs the Monocyte-Adhering Ability of Endothelial Cells by Down-Regulating Adhesion Molecules and Caveolae and Reorganizing the Actin Cytoskeleton. *Biol Pharm Bull Pharm Bull*. 2016;39(6):1029-1034. doi:10.1248/bpb.b16-00047
88. Hinzey AH, Kline MA, Kotha SR, et al. Choice of cyclodextrin for cellular cholesterol depletion for vascular endothelial cell lipid raft studies: Cell membrane alterations, cytoskeletal reorganization and cytotoxicity. *Indian J Biochem Biophys*. 2012;49(5):329-341.
89. Brailoiu GC, Gurzu B, Gao X, et al. Acidic NAADP-sensitive calcium stores in the endothelium: Agonist-specific recruitment and role in regulating blood pressure. *J*

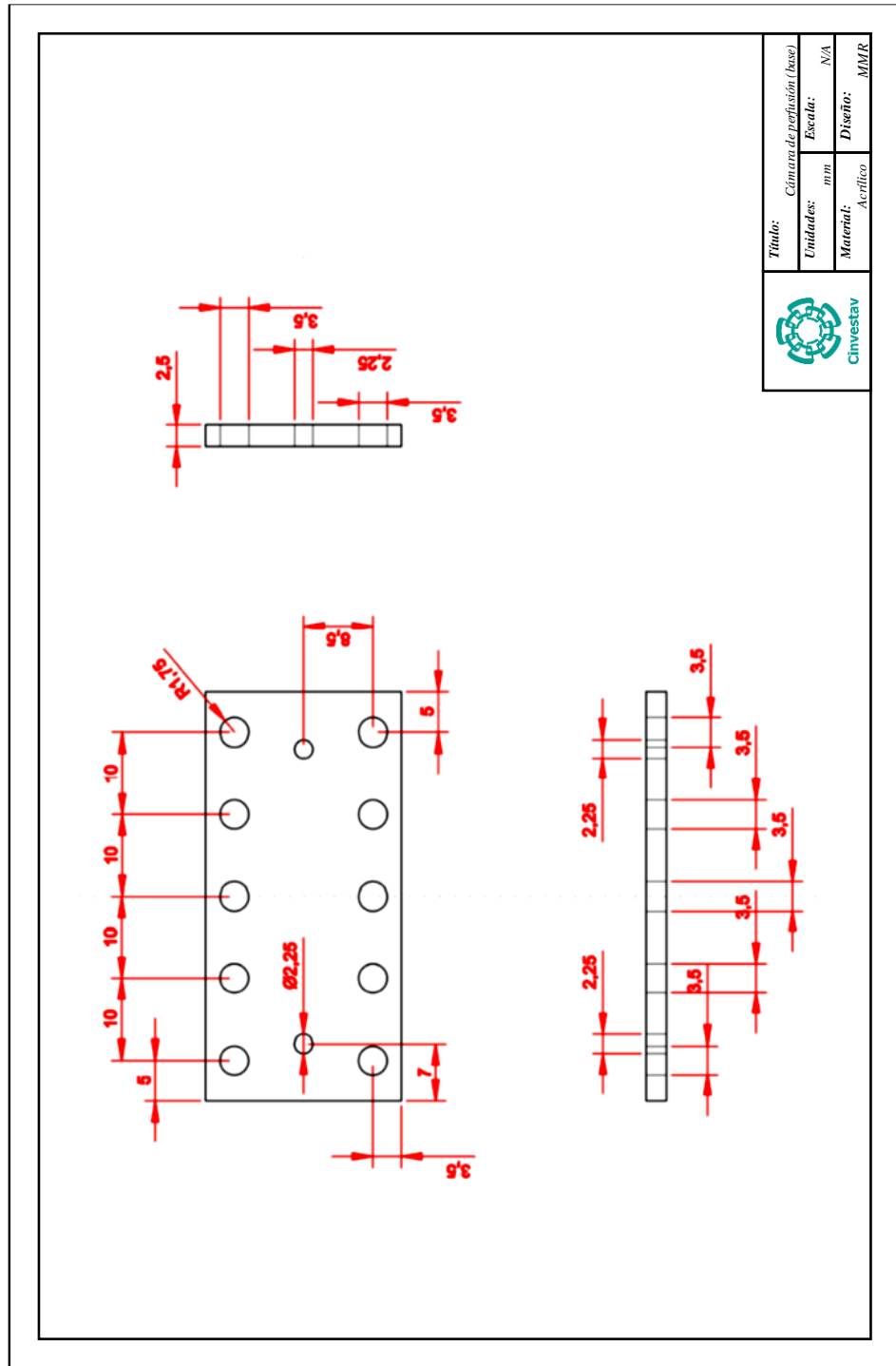
Biol Chem. 2010;285(48):37133-37137. doi:10.1074/jbc.C110.169763

10 APÉNDICE

Apéndice 10.1



Apéndice 10.2



Apéndice 10.3

