Pontificia Universidad Católica de Chile

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Fisiología

# MECANISMOS DE ACTIVACIÓN Y COORDINACIÓN DE LAS SEÑALES DE $Ca^{2+}$ INVOLUCRADAS EN LA MIGRACIÓN DE LAS CELULAS ENDOTELIALES Y LA ANGIOGÉNESIS

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ciencias Fisiológicas.

Por

HILDA ANDREA ESPINOZA AMADOR

Director de tesis: Xavier Figueroa

Co-director de tesis: Julio Amigo

Noviembre, 2020

# ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE TESIS

.

# DEDICATORIA

*Dimidium facti, qui coepit, habet: sapere aude, incipe.*

A mis padres, Alejandro e Hilda

# AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir estas líneas agradeciendo a mis padres Alejandro e Hilda quienes han sido los pilares fundamentales de mi desarrollo profesional y personal. Les agradezco no sólo su apoyo irrestricto y su amor incondicional sino además por estimular siempre mis ansias de aprender y de superar cada desafío que he decidido emprender. A mi hermano Alejandro y sus hijos Ángela y Alejandro Gabriel, quienes cada tanto me llevan a un mundo más cotidiano y reconfortante alejado del trabajo. A mi familia, mis tíos Elena, René y María y mis primos Jorge y Carolina, quienes con su constante apoyo me han dado una fuerza adicional para continuar en este viaje.

A Constanza por su paciencia durante las ausencias producto de todos estos años de estudio y a Paulina, agradezco las interminables conversaciones de ciencia y vida, su mirada racional y el apoyo mutuo para finalizar nuestras respectivas tesis. A mis compañeras y amigas, Andrea, Mariela, Pía y María Paz por sus consejos y críticas constructivas durante el desarrollo de mi tesis doctoral pero más relevante aún porque construimos una red de apoyo que traspasa los límites de la vida profesional, en un campo donde la racionalidad a veces nos hace olvidar lo importante que son los vínculos emocionales. A Manuel e Inés por su gran disposición y apoyo en los experimentos de mi tesis doctoral.

A la profesora Magdalena Cortés, con quien inicié mi camino en la investigación, gracias por verme crecer y ayudarme a emprender el vuelo; sin duda, sus consejos y la formación que obtuve bajo su alero es parte de lo que me permite hoy obtener este logro.

A mis tutor de tesis doctoral, el Dr. Xavier Figueroa le agradezco por permitirme formar parte de su laboratorio, compartir sus conocimientos, estimular mi análisis crítico y

por todas sus correcciones y a mi cotutor el Dr. Julio Amigo por sus correcciones y el apoyo durante mi pasantía doctoral, sin duda sus aportes contribuyeron significativamente al desarrollo de mi tesis doctoral. Al Dr Naoki Mochizuki por permitirme realizar mi pasantía doctoral en su laboratorio en el National Cerebral and Cardiovascular Center y a la Dra Ayano Chiba por su ayuda con los experimentos en peces cebra. Finalmente quisiera agradecer a mi comisión de tesis, el Dr. Alexis González, el Dr. Juan Carlos Sáez y el Dr. Gareth Owen por sus comentarios y correcciones durante las reuniones de avances de tesis que sin duda fueron de gran ayuda para mejorar mi tesis doctoral y mi formación académica.

## FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Beca de Ayudante Becario VRI (2016)

Beca CONICYT para estudios de Doctorado Nacional (2017-2020)

Gastos operacionales CONICYT (2018-2019)

Beca CONICYT de pasantía internacional (2019)

Fondos de la Dirección de Postgrado para eventos cortos (2019)

BECA ANID de Extensión de Beca para la redacción de tesis doctoral (2020)

Proyecto FONDECYT 1100850

# ÍNDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA ..... iii
AGRADECIMIENTOS ..... iv
FUENTES DE FINANCIAMIENTO ..... v
ÍNDICE DE MATERIAS ..... vi
LISTA DE ABREVIATURAS ..... x
RESUMEN ..... xii
ABSTRACT ..... xv
INTRODUCCIÓN ..... 1
1. Migración endotelial y angiogénesis. ..... 3
1.1. Señalización de $Ca^{2+}$ en la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 6
1.2. Compartimentalización de la señalización de $Ca^{2+}$ en caveolas durante la migración endotelial. ..... 8
1.3. Cambios en el potencial de membrana durante la migración endotelial. ..... 11
2. Participación de canales de $Na^{+}$ dependientes de voltaje en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 13
2.1. Participación de los canales $Na_v$ en la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 14
2.2. Canales $Ca_v$ en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial. ..... 15
2.3. NCX en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial. ..... 16
3. Participación de canales formados por conexinas en la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 18
3.1. Estructura y función de los canales formados por conexinas ..... 19
3.2. Expresión de Cxs en el endotelio y la participación de canales formados por Cxs en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 20
3.3. Regulación de los canales formados por conexinas durante la migración endotelial. ..... 23
3.3.1 Regulación de los canales formados por Cxs mediada por NO ..... 26
HIPÓTESIS ..... 28
OBJETIVOS ..... 29
MATERIALES ..... 31
MÉTODOS ..... 33
RESULTADOS ..... 49
1. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial. ..... 49
1.1. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, participan en la señalización de $Ca^{2+}$ asociada a la migración endotelial. ..... 53
1.2. El modo reverso del intercambiador NCX participa en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial. ..... 66
1.3. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la angiogénesis. ..... 69
2. Durante la migración endotelial las CEs del frente de migración se mantienen acopladas a través de GJs. ..... 70
3. La apertura de hemicanales formados por Cx43 participa en señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 74
3.1. Los hemicanales de Cx43 participan en la migración endotelial. ..... 74

3.2. La redistribución de la Cx43 se asocia con la señalización de $Ca^{2+}$ que media la migración endotelial. ..... 78
3.3. La S-nitrosilación de Cx43 es un potencial mecanismo de apertura de los hemicanales formados por esta Cx en las CEs del frente de migración. ..... 82
3.4. La vía de señalización $Na_v$-NCX media la apertura de los hemicanales formados por Cx43 en las células endoteliales del frente de migración. ..... 85
3.5. Los hemicanales de Cx43 participan en la formación de estructuras tubulares *in vitro*….. ..... 87
3.6. Los canales formados por Cx43 participan en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la angiogénesis *in vivo*. ..... 88
DISCUSIÓN ..... 97
1. Participación de los canales $Na_v$ en la señalización de calcio durante la migración endotelial y la angiogénesis ..... 98
2. Participación de conexinas en la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 108
CONCLUSIONES ..... 116
BIBLIOGRAFIA ..... 118

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Etapas del proceso angiogénico. ..... 3
**Figura 2.** Evaluación de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales (ISV) en embriones de peces cebra. ..... 45
**Figura 3.** Los canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ participan en la migración endotelial. ..... 50
**Figura 4.** Los canales $Na_v$ no participan en la proliferación de las células endoteliales. ... 52
**Figura 5.** En las células del frente de migración la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular incrementa durante la migración endotelial..... 54
**Figura 6.** El incremento de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración ocurre en un gradiente hacia la parte posterior. ..... 55
**Figura 7.** Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en el incremento de la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular en la parte posterior de las células endoteliales del frente de migración. ..... 57
**Figura 8.** Redistribución de caveolina 1 (cav-1) junto con $Na_v1.2$ en las células endoteliales del frente de migración. ..... 61
**Figura 9.** Redistribución de caveolina 1 (cav-1) y $Na_v1.6$ en las células endoteliales del frente de migración. ..... 62
**Figura 10.** Asociación espacial de los canales $Na_v1.2$, pero no los $Na_v1.6$, con cav-1 durante la migración de las células endoteliales..... 64
**Figura 11.** La señal de $Ca^{2+}$ asociada a la migración de las células endoteliales depende de la presencia de microdominios como las balsas lipídicas..... 65
**Figura 12.** Los canales $Ca_v3.2$ no participan en la migración endotelial. ..... 66
**Figura 13.** El incremento de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración depende de la activación del modo reverso del intercambiador $Na^{+}$-$Ca2^{+}$ (NCX). ..... 68
**Figura 14.** Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la formación de estructuras tubulares *in vitro*. ..... 69
**Figura 15.** Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la formación de los vasos sanguíneos. ..... 70
**Figura 16.** Acoplamiento vía uniones comunicantes de las células endoteliales en el frente de migración y la monocapa celular. ..... 71
**Figura 17.** La señalización purinérgica no participa en la reducción de la comunicación a través de uniones comunicantes en la monocapa endotelial posterior a la lesión. ..... 73
**Figura 18.** Activación de hemicanales formados por Cx43 en el frente de migración. ..... 75
**Figura 19.** La inhibición de los hemicanales formados por Cx43 reduce la migración endotelial. ..... 76
**Figura 20.** El efecto de los hemicanales formados por Cx43 en la migración es independiente de la proliferación de las células endoteliales. ..... 77
**Figura 21.** La apertura de los hemicanales de Cx43 participa en el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las células endoteliales del frente de migración. ..... 79
**Figura 22.** Redistribución de caveolina 1 (cav-1) junto con Cx43 en las células endoteliales del frente de migración. ..... 81
**Figura 23.** La apertura de hemicanales formados por conexinas y la migración endotelial se reducen en presencia del inhibidor de la eNOS y el agente reductor ácido ascórbico.... 83

**Figura 24.** Las células endoteliales del frente de migración presentan una mayor S-nitrosilación (S-NOcys). ..... 84
**Figura 25.** La inhibición de los canales $Na_v$ sensibles a TTX reduce la apertura de hemicanales de conexinas en las células endoteliales del frente de migración. ..... 86
**Figura 26.** La inhibición del modo reverso del intercambiador $Na^+$-$Ca^{2+}$ (NCX) reduce la apertura de hemicanales de conexinas en las células endoteliales del frente de migración. 86
**Figura 27.** Los hemicanales de Cx43 participan en la formación de estructuras tubulares in vitro. ..... 88
**Figura 28.** La microinyección de un morfolino de Cx43 genera el fenotipo previamente descritas en este modelo. ..... 90
**Figura 29.** La reducción de la expresión de Cx43 reduce la formación de vasos sanguíneos intersegmentales en embriones de peces cebra. ..... 92
**Figura 30.** El número de células endoteliales en los vasos sanguíneos intersegmentales es similar en los embriones de peces cebra control y morfantes de Cx43. ..... 93
**Figura 31.** El knock-down de Cx43 reduce la frecuencia y amplitud de los incrementos de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales durante el inicio de la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales (22 hpf) y una vez ya formados (28 hpf). ..... 95
**Figura 32.** Mecanismo propuesto de señalización de $Ca^{2+}$ mediado por los canales $Na_v$ sensibles a TTX, el modo reverso del NCX y los hemicanales de Cx43 durante la migración endotelial y la angiogénesis. ..... 117

# LISTA DE ABREVIATURAS

β-GA: ácido 18-β-glicirretinico.
$[Ca^{2+}]_i$: concentración de $Ca^{2+}$ intracelular.
4,9-anh-TTX: 4,9-anhidro-tetrodotoxina.
AA: ácido L-ascórbico.
ATP: adenosin trifosfato.
BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina.
$Ca_V$: canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje.
Cav-1: caveolina 1.
CEs: células endoteliales.
CMLV: células musculares lisas vasculares.
CNG: canales catiónicos activados por nucleotidos cíclicos.
Ctrl MO: morfolino control.
Cx43 MO: morfolino de Cx43.
Cxs: conexinas.
DA: aorta dorsal.
DLAV: vasos anastomóticos dorsales longitudinales.
ECGS: suplemento de crecimiento de células endoteliales.
EGF: factor de crecimiento epidermal.
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.
FAK: quinasa de adhesión focal.
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.
GJs: uniones comunicantes, (gap junctions).
HCs: hemicanales de conexinas.
HMEC: células endoteliales microvasculares humanas.
Hpf: horas postfertilización.
HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana.
$I_{Na}$: corrientes de entrada de $Na^+$.
ISV: vasos sanguíneos intersegmentales, (intersegmental blood vessels).
L-NA: N-nitro-L-nitroarginina.
L-NAME: $N^G$-nitro-L-arginina metil éster.
LTG: lamotrigina.
MβCD: metil-β-ciclodextrina.
MLCK: quinasa de la cadena ligera de miosina.
MMP: metaloproteinasas de la matriz extracelular.
$Na_V$: canales de $Na^+$ dependientes de voltaje.
NCX: intercambiador de $Na^+$-$Ca^{2+}$.
$Ni^{2+}$: níquel.
NO: óxido nítrico.
Orai1: canal de $Ca^{2+}$ activado por la liberación de $Ca^{2+}$.
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PFA: paraformaldehído.
PLA: ensayo de ligación por proximidad.
PMCA: $Ca^{2+}$-ATPasa de la membrana plasmática.

PPADS: piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfónico sal tetrasodio.
SERCA: $Ca^{2+}$-ATPasa del retículo endoplásmico.
SFB: suero fetal bovino.
SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilamina.
SIN-1: 3-morfolinosidnonimina.
DETA: 2,2'-(hidroxinitrosohidrazono)bis-etanamina.
SNO-cys: S-nitrosilación.
TRP: canales catiónicos de potencial del receptor transitorio.
TTX: tetrodotoxina.
uPa: activador plasminógeno tipo uroquinasa.
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

## RESUMEN

La angiogénesis es un proceso fisiológico esencial en la función vascular. La migración endotelial es un evento crucial en la angiogénesis y depende de un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de las CEs, para desencadenar la reorganización del citoesqueleto de actina y de las uniones adherentes. Durante la migración, parte del $Ca^{2+}$ proviene de depósitos intracelulares, lo que ha sido ampliamente estudiado; y otra parte proviene de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular por un mecanismo que aun no se ha determinado. En paralelo al incremento de $Ca^{2+}$, las CEs se despolarizan, lo cual sugiere que mecanismos dependientes de voltaje participan en la migración. Consistente con ello, las CEs expresan canales de $Na^+$ dependientes de voltaje ($Na_v$) sensibles ($Na_v1.2$ y $Na_v1.6$) y resistentes ($Na_v1.9$) a TTX. La apertura de los $Na_v$ podría asociarse al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la activación del modo reverso del intercambiador $Na^+$-$Ca^{2+}$ (NCX). El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la migración endotelial se compartimentaliza en caveolas y es mayor en la parte posterior que la anterior de las CEs, lo cual se asocia con la correspondiente redistribución celular de las caveolas. Asimismo, las CEs se mueven de forma coordinada durante la migración y se ha reportado la participación de Cxs en la angiogénesis. Las CEs expresan las Cx37, Cx40 y Cx43, pero se desconoce si estas Cxs contribuyen a la coordinación de la migración endotelial a través de la formación de uniones comunicantes (GJs) o de hemicanales (HCs). Como la S-nitrosilación puede inducir la apertura de los canales formados por Cxs, la actividad de estos canales podría estar regulada por la producción de NO observada durante la migración endotelial y la angiogénesis. En base a estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis: “La señalización de $Ca^{2+}$ observada durante la migración en la angiogénesis es: 1) gatillada por el acoplamiento funcional de los canales $Na_v$ sensibles a TTX con la activación del modo reverso del NCX y 2)

Coordinada por la S-nitrosilación de las Cxs que forman las GJs y los HCs en las CEs del frente de migración. Los objetivos generales planteados fueron: 1) Determinar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial. 2) Determinar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX están involucrados en el inicio de la señalización de $Ca^{2+}$ observada en la migración endotelial. 3) Evaluar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el NCX participan en la angiogénesis. 4) Determinar la participación de los canales formados por Cxs en la señalización de $Ca^{2+}$ en el frente de migración endotelial. La estrategia experimental involucró el uso de cultivos primarios de CEs mesentéricas, junto al análisis de la migración a través del ensayo de lesión de monocapa, de la proliferación a través del ensayo de BrdU, y la angiogénesis por la formación de estructuras tubulares *in vitro*. A su vez, se registraron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y se analizó la distribución y asociación espacial de los canales $Na_v$, la Cx43 y caveolina-1 (cav-1) por inmunofluorescencia y el ensayo de ligación por proximidad, respectivamente. Además, se evaluó la actividad de GJs y HCs formados por Cxs mediante ensayos de transferencia y captación de etidio respectivamente. También se evaluó la angiogénesis *in vivo* usando embriones de peces cebra que expresan proteínas fluorescentes en las CEs, junto al sensor de $Ca^{2+}$ GCamp7a, en los cuales se redujo la expresión de Cx43 utilizando un morfolino. Los resultados muestran que los canales $Na_v$ sensibles a TTX, participan en la migración y la angiogénesis *in vitro,* pero no en la proliferación endotelial. Se encontró que la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, media la generación de incrementos de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración, lo que se asoció con una redistribución de los $Na_v1.2$, pero no los $Na_v1.6$, junto a cav-1. Esto sugiere que ambos canales participan por mecanismos diferentes en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial. Consistente con la participación de las caveolas, la desorganización de estos

microdominios con metil-β-ciclodextrina redujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la migración endotelial. A su vez, los incrementos de $Ca^{2+}$ observados en la parte posterior de las CEs del frente de migración se asociaron con la activación del modo reverso del NCX, lo que sugiere un acoplamiento funcional con los canales $Na_v$. Respecto a los canales formados por Cxs, se observó que aunque la lesión de la monocapa no afectó la comunicación mediada por GJs en el frente de migración, produjo la apertura de los HCs formados por Cx43 en estas células. Consistente con esto, la inhibición de estos canales redujo la migración y la angiogénesis *in vitro*, pero no la proliferación endotelial. A su vez, la apertura de HCs formados por Cx43 incrementó la $[Ca^{2+}]_i$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración, lo que se asoció con una redistribución de la Cx43 junto a cav-1. La inhibición de la eNOS o el agente reductor ácido ascórbico redujo la apertura de HC formados por Cxs en las CEs del frente de migración y se observó un aumento de la S-nitrosilación de proteínas en las CEs del frente de migración, lo cual sugiere que la S-nitrosilación de Cx43 podría mediar la apertura de HCs durante la migración. A su vez, se observó que la inhibición de los canales $Na_v$ sensibles a TTX o del modo reverso del NCX reduce la apertura de HC formados por Cxs en las CEs del frente de migración, mostrando que estas tres vías de señalización forman parte de un mismo mecanismo. Finalmente la reducción de la expresión de Cx43 en peces cebra redujo la señalización de $Ca^{2+}$ en las CEs durante la formación de vasos intersegmentales y la angiogénesis. En conclusión, estos resultados sugieren que el acoplamiento funcional entre los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el modo reverso del NCX induce la apertura de HCs formados por Cx43 en caveolas, esta vía de señalización media incrementos de $Ca^{2+}$ que participan en la migración endotelial y la angiogénesis.

# ABSTRACT

Angiogenesis is an essential physiological process in vascular function. Endothelial migration is a crucial event in angiogenesis and depends on an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in ECs, that trigger the reorganization of actin cytoskeleton and adherent junctions. During migration, part of the $Ca^{2+}$ comes from intracellular deposits, which has been widely studied; and another part comes from the entry of $Ca^{2+}$ from extracellular medium by a mechanism that has not yet been determined. In parallel to the increase in $Ca^{2+}$, ECs depolarize, which suggests that voltage-dependent mechanisms participate in migration. Consistent with this, EC express voltage-gated $Na^+$ channels ($Na_v$) sensitive ($Na_v1.2$ and $Na_v1.6$) and resistant ($Na_v1.9$) to TTX. The opening of $Na_v$ channels could be associated with the increase in $[Ca^{2+}]_i$ through the activation of the reverse mode of the $Na^+$-$Ca^{2+}$ exchanger (NCX). The increase in $[Ca^{2+}]_i$ during endothelial migration is compartmentalized in caveolae and is greater in the posterior part than the anterior part of ECs, which is associated with the corresponding cellular redistribution of caveolae. Likewise, ECs move in a coordinated manner during migration and the participation of Cxs in angiogenesis has been reported. ECs express Cx37, Cx40 and Cx43, but it is unknown whether these Cxs contribute to the coordination of endothelial migration through the formation of gap junctions (GJs) or hemichannels (HCs). As S-nitrosylation can induce the opening of the channels formed by Cxs, the activity of these channels could be regulated by the production of NO observed during endothelial migration and angiogenesis. Based on these information, the following hypothesis is proposed: "The $Ca^{2+}$ signaling observed during migration in angiogenesis is: 1) Triggered by functional coupling of TTX-sensitive $Na_v$ channels with the activation of the reverse mode of NCX and 2) Coordinated by the S-

nitrosylation of Cxs that form GJs and HCs in ECs of the migration front. The general objectives were: 1) To determine if TTX-sensitive $Na_v$ channels participate in endothelial migration. 2) To determine if TTX-sensitive $Na_v$ channels are involved in the initiation of $Ca^{2+}$ signaling observed in endothelial migration. 3) To assess whether TTX-sensitive $Na_v$ channels and NCX participate in angiogenesis. 4) To determine the participation of Cx-based channels in $Ca^{2+}$ signaling in endothelial migration front. The experimental strategy involved the use of primary cultures of mesenteric ECs, along with the analysis of migration through the wounding healing assay; proliferation was evaluated through the BrdU assay, and angiogenesis through the formation of tubular structures *in vitro*. In turn, changes in $[Ca^{2+}]_i$ were recorded and the distribution and spatial association of $Na_v$ channels, Cx43 and caveolin-1 (cav-1) were analyzed by immunofluorescence and proximity ligation assay, respectively. In addition, the activity of GJs and HCs formed by Cxs was evaluated by ethidium transfer and ethidium uptake assays, respectively. Additionally, *in vivo* angiogenesis was evaluated using zebrafish embryos that express fluorescent proteins in ECs, together with the $Ca^{2+}$ sensor GCamp7a, in which the expression of Cx43 was reduced using a morpholino. The results show that TTX-sensitive $Na_v$ channels participate in migration and *in vitro* angiogenesis, but not in endothelial proliferation. It was found that the activation of TTX-sensitive $Na_v$ channels, $Na_v1.2$ and $Na_v1.6$, mediates the generation of $Ca^{2+}$ increases in the rear part of ECs of the migration front, which was associated with redistribution of $Na_v1.2$, but not $Na_v1.6$ channels, with cav-1. This suggests that both channels participate by different mechanisms in $Ca^{2+}$ signaling during endothelial migration. Consistent with the participation of caveolae, the disorganization of these microdomains with methyl-β-cyclodextrin reduced the increase in

$[Ca^{2+}]_i$ and endothelial migration. In turn, the $Ca^{2+}$ increases observed in the rear part of ECs of the migration front were associated with the activation of the reverse mode of the NCX, suggesting a functional coupling with $Na_v$ channels. Regarding the channels formed by Cxs, it was observed that although the damage to the monolayer did not affect the communication mediated by GJ in the migration front, it produced the opening of the HCs formed by Cx43 in these cells. Consistent with this, inhibition of these channels reduced migration and *in vitro* angiogenesis, but not the endothelial proliferation. In turn, the opening of HCs formed by Cx43 increased the $[Ca^{2+}]_i$ in the rear part of ECs of the migration front, which was associated with a redistribution of Cx43 together with cav-1. The inhibition of eNOS or the reducing agent ascorbic acid decreased the opening of HCs formed by Cxs in ECs of the migration front and an increase in protein S-nitrosylation was observed in ECs of the migration front, which suggests that S-nitrosylation of Cx43 could mediate the opening of HCs during migration. In turn, it was observed that the inhibition of TTX-sensitive $Na_v$ channels or the reverse mode of NCX reduces the opening of HCs formed by Cxs in ECs of the migration front, showing that these three signaling pathways are part of the same mechanism. Finally, the reduction of Cx43 expression in zebrafish reduced $Ca^{2+}$ signaling in ECs during intersegmental blood vessel formation and angiogenesis. In conclusion, these results suggest that the functional coupling between TTX-sensitive $Na_v$ channels and the reverse mode of NCX induces the opening of HCs formed by Cx43 in caveolae, this signaling pathway mediates increases in $Ca^{2+}$ that participate in endothelial migration and angiogenesis.

# INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y ocurre en condiciones fisiológicas como el desarrollo fetal, el ciclo menstrual y la regeneración de tejidos. Por otra parte, un incremento patológico de la angiogénesis se asocia al desarrollo de cáncer (Zuazo-Gaztelu y Casanovas, 2018), artritis reumatoide (Elshabrawy *et al.*, 2015) y retinopatía diabética (Capitão y Soares, 2016), mientras que su disminución se observa en enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardiaca (Gogiraju *et al.*, 2019) y la enfermedad arterial periférica (Inampudi *et al.*, 2018); en consecuencia, la modulación del proceso angiogénico podría representar una estrategia terapéutica relevante para el tratamiento de diversas condiciones patológicas (Deveza *et al.*, 2012; Yoo y Kwon 2013).

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales (CEs) son quiescentes y en la vasculatura existe un balance entre factores pro y antiangiogénicos; sin embargo, una vez que se rompe este balance en favor de los factores proangiogénicos se genera un estado denominado "proangiogénico" (Sund *et al.*, 2005). En estas condiciones, se desencadena la angiogénesis, un proceso que comprende la activación de las CEs por los factores proangiogénicos, lo cual lleva a la degradación de la membrana basal junto con la proliferación y migración de las CEs organizada en torno a la formación de un nuevo vaso sanguíneo. Luego, estos nuevos vasos se estabilizan tras el reclutamiento de pericitos y posteriormente de células musculares lisas vasculares (CMLV), las que en conjunto se denominan células murales. Si bien se han identificado numerosos factores proangiogénicos a la fecha, los más relevantes durante las distintas etapas del proceso angiogénico son: el factor

de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), este último participa principalmente en la estabilización de los vasos sanguíneos recién formados. Por otra parte, entre los principales factores antiangiogénicos se encuentran la angiostatina, la endostatina, la trombospondina-1/2 y la angiopoietina 2 (Bouïs *et al.*, 2006; Cross y Claesson-Welsh, 2001; Raica y Cimpean, 2010; Yoo y Kwon 2013). Durante el desarrollo de la angiogénesis, las CEs adquieren dos fenotipos según su funcionalidad, uno denominado célula "de punta" que sensa las señales proangiogénicas y migra de forma direccionada guiando el crecimiento del nuevo vaso sanguíneo y otro denominado célula "de tronco", cuya función es proliferar para elongar la estructura vascular (Gerhardt *et al*., 2003; Geudens y Gerhardt, 2011) (Figura 1). Esta diferenciación funcional se produce por un incremento inducido por VEGF de la expresión del ligando Dll4 en las células de punta, lo que genera la inhibición lateral de las CEs vecinas a través de la señalización de Notch e induce su funcionamiento como células de tronco. Sin embargo, el rol de célula de punta o de tronco es dinámico, es decir las CEs pueden cumplir una u otra función a lo largo del proceso angiogénico (Phng y Gerhardt, 2009). De las etapas de la angiogénesis, la migración de las CEs es fundamental para asegurar el correcto desarrollo de un nuevo vaso sanguíneo.

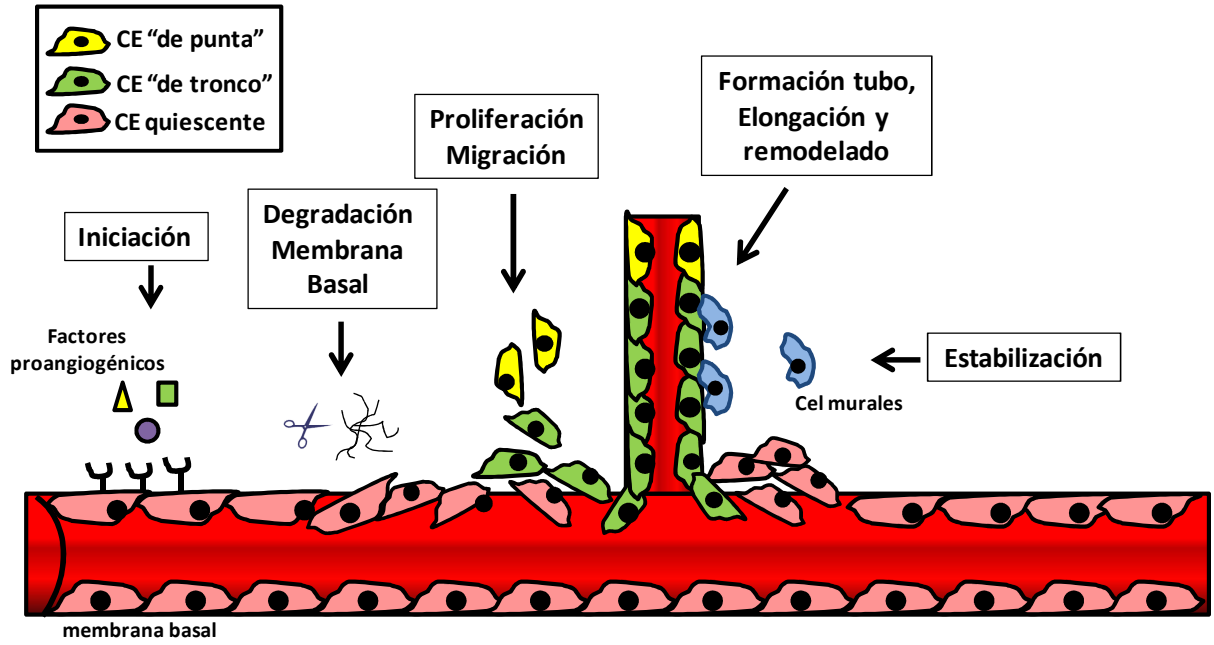


**Figura 1. Etapas del proceso angiogénico.** Los factores proangiogénicos se unen a sus receptores en las células endoteliales (CEs) e inducen su diferenciación funcional en células de punta que migran y dirigen la angiogénesis y células de tronco que proliferan para elongar la estructura del nuevo vaso sanguíneo. En paralelo, la membrana basal es degradada por metaloproteinasas de la matriz extracelular. Una vez que se forma la estructura tubular vascular es estabilizada por las células murales.

## 1. Migración endotelial y angiogénesis.

En ausencia de un estímulo angiogénico, las CEs se mueven lentamente a distancias cortas y con igual probabilidad en todas las direcciones, lo que se define como una "caminata aleatoria"; sin embargo, la presencia de señales quimiotácticas o el incremento de fuerzas mecánicas externas determina un sentido de la migración endotelial e incrementa su velocidad. La migración endotelial durante la angiogénesis involucra tres mecanismos principales: 1) la quimiotaxis o migración direccionada a través de un gradiente de factores quimioatrayentes, en este caso los factores proangiogénicos; 2) la haptotaxis o migración dirigida a través del

gradiente de componentes inmovilizados en la matriz extracelular (fibronectina y colágeno principalmente) y de las integrinas que regulan la conexión entre las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina y 3) la mecanotaxis en respuesta a la fuerza mecánica generada por la tensión de roce que guía a las CEs a través de los túneles intersticiales e induce la disociación de los contactos célula-célula y el remodelamiento del citoesqueleto de actina (Lamalice *et al.*, 2007). En respuesta a los estímulos proangiogénicos, la activación de las GTPasas de la familia Rho (RhoA, Rac y Cdc42) median la reorganización del citoesqueleto de actina e inducen la formación de protrusiones de la membrana celular en la parte anterior; es decir, la zona que se proyecta hacia la dirección de la migración. Adicionalmente, la activación de GTPasas también participa en la formación de fibras de estrés en la parte posterior de las células (contraria a la dirección de migración) y el recambio de las adhesiones focales, lo cual genera una polarización de las CEs que es clave para la migración endotelial. De esta forma, en la parte anterior de las CEs que migran, la activación de Cdc42 induce la formación de filopodias y la activación de Rac induce la formación de lamelipodias. Las filopodias son pequeñas proyecciones de la membrana plasmática con largos filamentos de actina empaquetados de forma paralela y, a su vez, las lamelipodias son protrusiones citoplasmáticas que contienen una red cortical gruesa de filamentos de actina. Por otro lado, la activación de RhoA en la parte posterior de las CEs induce la formación y contracción de fibras de estrés compuestas por filamentos de actina unidos por α-actinina y miosina distribuidos a lo largo de las fibras contráctiles (Hall A., 1998; Ridley A., 2015). La activación de las GTPasas de la familia Rho induce además la formación de adhesiones focales, mientras que la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) las elimina (Timpson *et al.*, 2001). La migración se inicia una vez que las filopodias detectan el estímulo motil que guía la migración y las CEs forman

lamelipodias en la parte anterior, lo cual extiende a las células en la dirección de la migración y permite su interacción con la matriz extracelular por medio de las adhesiones focales. Posterior a ello, la formación de fibras de estrés contráctiles y el recambio de adhesiones focales de forma localizada en la parte posterior permite la contracción de la parte posterior de las CEs. Este es un proceso dinámico de elongación y contracción del citoesqueleto de actina y de la formación y eliminación de las adhesiones focales que permite el movimiento de las CEs en la dirección de la migración (Lamalice *et al.*, 2007; Michaelis U., 2014). Los cambios en el reordenamiento del citoesqueleto de actina y el recambio de las adhesiones focales en la migración celular dependen de incrementos localizados de la señalización de $Ca^{2+}$. La señalización de $Ca^{2+}$ presenta patrones temporales y espaciales definidos que permiten la activación de numerosas proteínas de forma localizada durante la migración entre ellas, la activación de PKC que fosforila la cadena pesada de miosina e inhibe la contracción de miosina permitiendo la elongación de las células, la activación de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que induce la contracción de la miosina en las fibras de estrés, la activación de la quinasa II dependiente de $Ca^{2+}$/calmodulina (CaMKII) que participa en la polimerización de actina, la activación de la proteasa calpaína que participa en el recambio de las adhesiones focales y la activación de las GTPasas de la familia Rho, Cdc42 y Rac mediada por las proteínas de unión a $Ca^{2+}$ cadherinas (Fogh *et al.*, 2014; Fukata y Kaibuchi, 2001; Martin-Romero *et al.*, 2017; Tsai *et al.,* 2015).

## 1.1.Señalización de $Ca^{2+}$ en la migración endotelial y la angiogénesis.

En las CEs en condiciones de reposo, la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) se mantiene en niveles bajos (~100 nM) gracias a la expulsión de $Ca^{2+}$ hacia el medio extracelular por la $Ca^{2+}$-ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador $Na^{+}$-$Ca^{2+}$ (NCX). Además, la $Ca^{2+}$-ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) transporta $Ca^{2+}$ desde el citoplasma al retículo endoplasmático. Sin embargo, la estimulación de las CEs con los factores proangiogénicos, entre ellos VEGF, FGF y EGF, incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ a un nivel cercano a ~1 μM, este incremento de $Ca^{2+}$ es necesario para la proliferación y migración endotelial durante la angiogénesis (Moccia *et al.*, 2012; Munaron y Fiorio Pla, 2009). De estos factores, VEGF ha concitado mayor atención en las últimas décadas en el estudio de la señalización de $Ca^{2+}$ durante la angiogénesis. Es así como la estimulación de CEs en cultivo con VEGF induce un incremento bifásico de $Ca^{2+}$, caracterizado por un "peak" inicial corto seguido de un incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$. El "peak" inicial depende de la activación de los receptores de $IP_3$ y la liberación de $Ca^{2+}$ desde el retículo endoplasmático, mientras el incremento sostenido depende de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular, lo que se atribuyó a la entrada capacitativa de $Ca^{2+}$ (Dawson *et al.*, 2006). Consistente con esto, la inhibición de la liberación de $Ca^{2+}$ desde los almacenes intracelulares o de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular reduce la migración endotelial (Banumathi *et al.,* 2011; Faehling *et al.*, 2002; Kohn *et al.*, 1995), lo que indica que ambos mecanismos son necesarios para que ocurra este proceso. Es ampliamente reconocida la participación de la liberación de $Ca^{2+}$ desde los almacenes intracelulares en la migración endotelial y la angiogénesis; sin embargo, los mecanismos que median la entrada de $Ca^{2+}$ no han sido dilucidados. A la fecha se ha

demostrado la participación en la angiogénesis de numerosos canales de la membrana que son permeables a $Ca^{2+}$, entre ellos, las isoformas TRPC1, TRPC6, TRPV4 de los canales catiónicos de potencial de receptor transitorio (TRP) (Hamdollah Zadeh *et al.*, 2008; Thodeti *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010), el canal de $Ca^{2+}$ activado por la liberación de $Ca^{2+}$ (Orai1) (Li *et al.*, 2011), los canales catiónicos activados por nucleotidos cíclicos (CNG) (Naito *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2000) y otros. Sin embargo, no se han determinado los mecanismos involucrados en la señalización del $Ca^{2+}$ observada durante la angiogénesis.

Consistente con la polarización de las CEs durante la migración se ha descrito que la señalización de $Ca^{2+}$ ocurre de forma diferenciada en la parte anterior y posterior de las CEs. Es así como durante la migración de CEs de vena umbilical humana (HUVEC) estimulada con FGF se generan pequeños pulsos de $Ca^{2+}$ en la parte anterior de las CEs, los cuales desencadenan la activación de MLCK y la miosina II e inducen la retracción de las lamelipodias, así como el fortalecimiento de las adhesiones focales en la parte anterior. Se atribuyó la generación de estos pulsos de $Ca^{2+}$ a la liberación de $Ca^{2+}$ desde el retículo endoplasmático y la posterior activación de STIM-Orai1 en las CEs. Coincidente con esto, durante la migración también se puede observar en la parte anterior de las células: el retículo endoplásmico, los receptores tirosina quinasa, fosfolipasa C y STIM. Este es un proceso cíclico en el cual mientras la $[Ca^{2+}]_i$ en la parte anterior se mantiene en niveles basales, los filamentos de actina en las lamelipodias se extienden en la dirección de la migración y una vez que se generan los pulsos de $Ca^{2+}$ y se activa la miosina II, esta "tira" de la parte posterior de la red cortical de actina induciendo la retracción de las lamelipodias. De esta manera, este ciclo de extensión-contracción de las lamelipodias permite el desplazamiento de las CEs en la dirección de la migración (Tsai y Meyer, 2012; Tsai *et al.*, 2014). Sumado a ello, se ha

descrito que durante la migración el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ es mayor en la parte posterior que en la parte anterior de las CEs, lo que se atribuyó a una mayor actividad de la PMCA en la parte anterior de las CEs (Tsai *et al.*, 2015). Interesantemente, durante la migración de HUVEC inducida por la estimulación del receptor de FGF se generan ondas de $Ca^{2+}$ restringidas a la parte posterior de las CEs, las cuales se asociaron con la activación localizada de la MLCK y la contracción de las fibras de estrés de actinomiosina, la retracción de la parte posterior de las CEs y la migración endotelial. Estos pulsos de $Ca^{2+}$ dependen de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular, lo que se atribuyó a la activación de canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje tipo L (Kim *et al*., 2016). En conjunto estos antecedentes muestran que la señalización de $Ca^{2+}$ en la parte anterior depende de la liberación de $Ca^{2+}$ desde retículo endoplasmático y la entrada capacitativa de $Ca^{2+}$ y es necesaria para los ciclos de elongación-retracción de las lamelipodias mientras que el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior depende de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular y es necesario para la contracción de las fibras de estrés y la retracción de la parte posterior de las CEs. Por lo tanto, la señalización de $Ca^{2+}$ restringida a espacios subcelulares específicos es vital para una adecuada migración endotelial.

### 1.2. Compartimentalización de la señalización de $Ca^{2+}$ en caveolas durante la migración endotelial.

Las caveolas, un tipo de balsas lipídicas, son invaginaciones de la membrana plasmática de 60 a 80 nm de diámetro, enriquecidas en colesterol y esfingolípidos que se forman en prácticamente todos los tipos celulares; sin embargo, son particularmente abundantes en las CEs donde se distribuyen de forma individual o formando agrupaciones

denominadas “clusters”. El principal componente estructural de las caveolas son las proteínas denominadas caveolinas; de las cuales a la fecha se conocen tres subtipos en mamíferos, caveolina 1 (cav-1) y caveolina 2 que forman parte de la estructura caveolar en adipocitos, fibroblastos, células musculares lisas y CEs, y caveolina 3 que se expresa principalmente en células musculares esqueléticas y cardiacas. De estas proteínas, la expresión de cav-1 es esencial para la formación de las caveolas y su anclaje al citoesqueleto de actina (Stan R., 2005; Parton y Simons, 2007).

Las caveolas son microdominios de señalización que compartimentalizan diversos componentes moleculares claves en la migración endotelial y el desarrollo de la angiogénesis, como los receptores de VEGF, FGF y PDGF (VEGFR, FGFR y PDGFR respectivamente). Además, estos microdominios proveen proximidad espacial entre estos receptores y vías de señalización de $Ca^{2+}$ como los canales TRPC1 y TRPC4, Orai1, los canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje, entre otros (Frank *et al.*, 2003; Hashad *et al.*, 2018; Pani y Singh, 2009; Sayner *et al.*, 2011), lo cual sugiere que las caveolas podrían constituir una plataforma de señalización que sustente la restricción espacial de la señalización de $Ca^{2+}$ observada en las CEs durante la migración endotelial.

En relación a la participación de balsas lipídicas y en particular de caveolas en la migración endotelial y la angiogénesis, se demostró que tanto la reducción del contenido de colesterol de la membrana plasmática con metil-β-ciclodextrina como la reducción de la expresión de cav-1 disminuyó la migración endotelial y la formación de estructuras tubulares de CEs (Gálvez *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002). A su vez, la eliminación de la expresión de cav-1 redujo la formación de nuevos vasos sanguíneos inducida por VEGF de anillos aórticos dispuestos sobre matrigel y en la córnea murina (Morais *et al.*, 2012), estos antecedentes

muestran que las caveolas tienen un rol relevante en la migración endotelial durante la angiogénesis.

Consistente con un rol de las caveolas en la migración endotelial, en la migración de HUVEC y CEs de aorta bovina inducida por la lesión de la monocapa se observó que cav-1 se excluye de las adhesiones focales formadas entre las lamelipodias y la matriz extracelular en la parte anterior y se relocaliza en la parte posterior de las CEs del frente de migración donde forman caveolas y que la reducción de la expresión de cav-1 o una substitución del aminoácido tirosina por alanina en la región N terminal de cav-1 reduce la polarización de las células y la migración endotelial (Beardsley *et al.*, 2005; Parat *et al.*, 2003). Interesantemente, al eliminar la expresión de cav-1 en fibroblastos se reduce la actividad de RhoA y la formación de fibras de estrés y se incrementa la actividad de Rac y Cdc42, este efecto se atribuyó a que la fosforilación de un residuo tirosina en la región N terminal de cav-1 media la activación de la quinasa Csk que a su vez inhibe a la quinasa Src, esta última activa a las GTPasas Rac y Cdc42 e inhibe a RhoA (Grande-García *et al.*, 2007). Consistente con un rol regulador de cav-1 sobre la actividad de las GTPasas de la familia Rho, se ha descrito en células β pancreáticas que la unión de cav-1 a Cdc42 inhibe su actividad (Nevins y Thurmond, 2006), mientras que en fibroblastos cav-1 inhibe la localización en la membrana de Rac y la subsecuente activación de la quinasa PAK que regula la reorganización del citoesqueleto de actina (del Pozo *et al.*, 2005). Por otra parte en CEs y arterias mesentéricas se ha descrito que RhoA se localiza en caveolas y que la interacción con cav-1 es necesaria para su actividad (Dubroca *et al.*, 2007; Gingras *et al.*, 1998). En base a estos antecedentes, es posible que la redistribución de cav-1 a la parte posterior de las células durante la migración permita por una parte mantener la inhibición de la quinasa Src de forma localizada y así estimular la actividad

de RhoA y la formación de fibras de estrés en la parte posterior; y por otra, la ausencia de cav-1 en la parte anterior de las CEs libera a Src, y por ende, a Rac y Cdc42 de su efecto inhibitorio y con ello estimula la formación de filopodias y lamelipodias, permitiendo así la migración endotelial.

Sumado a lo anterior, la redistribución de cav-1 junto con la localización de mecanismos de señalización de $Ca^{2+}$ en las caveolas, sugiere que estos microdominios podrían jugar un papel central en la compartimentalización de la señalización de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs durante la migración. Consistente con esto, se observó en CEs de aorta bovina que durante la migración inducida por la lesión de la monocapa, cav-1 colocaliza con las fibras de estrés en la parte posterior de las células y esta redistribución de cav-1 coincide con la generación de ondas de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs durante la migración endotelial (Isshiki *et al.*, 2002). Esto apoya la noción que la compartimentalización de la señalización de $Ca^{2+}$ en caveolas en la parte posterior de las CEs del frente de migración es necesaria para la migración endotelial.

### 1.3. Cambios en el potencial de membrana durante la migración endotelial.

Sumado a lo anterior, se ha descrito que variaciones en el potencial de membrana de las CEs pueden generar cambios relevantes en la arquitectura del citoesqueleto de actina y las adhesiones focales durante la migración endotelial. Es así como en CEs aórticas y de córnea bovina se observó que la despolarización de la membrana indujo la reorganización de los filamentos de actina a lo largo del citoplasma celular y redujo la formación de las uniones adherentes lo que se asoció a un incremento de los espacios intercelulares (Callies *et al.*, 2011;

Chifflet *et al.*, 2003). Sumado a ello, se ha descrito que la aplicación de campos eléctricos que despolarizan la membrana de las CEs (Trivedi *et al.*, 2013) inducen la formación de lamelipodias y la migración de CEs microvasculares humanas (HMEC), HUVEC y CEs de la arteria pulmonar (Bai *et al.*, 2004). Esto último se asoció a un incremento en la activación de RhoA (Bai *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2004), lo que es consistente con lo descrito en células tubulares renales donde la depolarización de la membrana induce la activación de RhoA y MLCK (Szászi *et al.*, 2005; Waheed *et al.*, 2010). Estos antecedentes indican que la despolarización de la membrana endotelial estimula la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por la activación de GTPasas de la familia Rho durante la migración endotelial.

Adicionalmente, se ha descrito en HUVEC estimuladas con VEGF que en paralelo al incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ ocurre una despolarización de la membrana endotelial (Dawson *et al.*, 2006); esto también se observó en CEs de aorta bovina durante la migración inducida por la lesión de la monocapa en las que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la despolarización se restringió a las CEs del frente de migración, es decir las primeras filas de células adyacentes al área lesionada, lo que se asoció a una redistribución de los filamentos de actina y la generación de lamelipodias en éstas células durante la migración. Esta despolarización de la membrana de las CEs, la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodias se asoció con un incremento de la concentración de $Na^+$ intracelular ($[Na^+]_i$) de forma localizada en las CEs del frente de migración (Chifflet *et al*., 2005), lo cual sugiere que la despolarización de la membrana endotelial observada durante la migración endotelial es mediada por una corriente de $Na^+$. En este contexto, es importante notar que se ha encontrado que las células endoteliales expresan canales de $Na^+$ dependientes

de voltaje, lo cual, en conjunto con la participación de la despolarización de las células endoteliales en la migración endotelial, sugiere que estos canales podrían estar involucrados en el proceso angiogénico.

## 2. Participación de canales de $Na^+$ dependientes de voltaje en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis.

Los canales de $Na^+$ dependientes de voltaje ($Na_v$) se componen de una subunidad α asociada a una o más subunidades β (β1, β2 y/o β3) reguladoras. La subunidad α está formada por cuatro dominios homólogos (I-IV) cada uno con seis segmentos transmembrana α-hélice (S1-S6), un asa intracelular entre los segmentos S5 y S6 que forma el poro del canal y dominios N- y C-terminal citoplasmáticos. Por otra parte, las subunidades β se componen de 2 láminas β unidas por interacciones hidrofóbicas. A la fecha, se han caracterizados nueve isoformas de canales $Na_v$ ($Na_v1.1$ a $Na_v1.9$), y una décima isoforma ($Na_x$) que corresponde a un canal de $Na^+$ atípico poco caracterizado. De éstas isoformas, las $Na_v1.1$ al $Na_v1.3$ y el $Na_v1.6$ se expresan predominantemente en el sistema nervioso central, el $Na_v1.4$ en el músculo esquelético, el $Na_v1.5$ en el músculo cardiaco y las del Nav1.7 al Nav1.9 en el sistema nervioso periférico (Catterall W., 2000; Goldin A., 2001). Las diferentes isoformas de $Na_v$ se pueden clasificar según su sensibilidad a tetrodotoxina (TTX), siendo desde el $Na_v1.1$ al $Na_v1.4$, el $Na_v1.6$ y el $Na_v1.7$ sensibles a TTX, pues se inhiben con concentraciones del orden nanomolar de esta toxina ($IC_{50}$ ~ 30 nM); el $Na_v1.5$ es considerado insensible a TTX, con una

$IC_{50}$ de ~6 μM y los $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ son resistentes a TTX, con una $IC_{50}$ de ~60 μM (Lee y Ruben, 2008; Zimmer T., 2010).

## 2.1. Participación de los canales $Na_v$ en la migración endotelial y la angiogénesis.

Las CEs se consideran eléctricamente no excitables, sin embargo a la fecha se ha descrito la expresión de canales $Na_v$ en el endotelio de los vasos sanguíneos de la circulación periférica. De forma general, la expresión de canales $Na_v$ se corroboró en CEs de vena safena, HUVEC y CEs de aorta bovina (Andrikopoulos *et al.*, 2011; Gosling *et al.*, 1998; Traub *et al.*, 1999) y de estos canales, la expresión de dos isoformas sensibles a TTX $Na_v1.2$ y $Na_v$ 1.6 y una isoforma resistente a TTX, $Na_v1.9$, se corroboró en el endotelio de arteriolas de cremáster de ratón (Figueroa *et al.*, 2007).

Las CEs microvasculares en cultivo e *in situ* presentan potenciales de membrana en reposo aproximado de -40 mV (Daut *et al.*, 1988; Gordienko y Tsukahara, 1994; Olschewski *et al.*, 2001) y una despolarización a -30 mV resulta en la activación de $I_{Na}$, las que se inhiben con TTX 50 nM (Walsh *et al.*, 1998); esto indica que parte de la población de los canales $Na_v$ sensibles a TTX que se expresan en las CEs pueden activarse al potencial de membrana en que se encuentran estas células.

La participación de canales $Na_v$ en la migración se ha investigado principalmente en células de cáncer colorrectal y gástrico, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T (Anderson *et al.*, 2019; Black y Waxman 2013; Pappalardo *et al.*, 2014); sin embargo, a la fecha sólo existe una investigación de su participación en la migración endotelial y la angiogénesis *in vitro*. (Andrikopoulos *et al.*, 2011) mostraron en HUVEC que el tratamiento

con TTX 1 μM reduce la formación tubular mientras que el tratamiento con TTX 200 nM o la reducción de la expresión de canales $Na_v1.7$ reduce la migración inducida por VEGF, esto sugiere la participación del canal $Na_v$ sensible a TTX, $Na_v1.7$, en el proceso. Si bien, a la fecha se desconocen los mecanismos por los cuales los canales $Na_v$ sensibles a TTX podrían participar en la migración endotelial durante la angiogénesis, es posible que los canales $Na_v$ contribuyan al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ durante el proceso, ya sea por medio de la activación de canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje ($Ca_v$) o mediante la activación del modo reverso del intercambiador de $Na^+$-$Ca^{2+}$ (NCX) a través de un incremento localizado en la $[Na^+]_i$ en la vecindad del intercambiador.

## 2.2. Canales $Ca_v$ en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial.

Los canales $Ca_v$ son una vía de entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular en variados tipos celulares y participan en procesos claves como la liberación de neurotransmisores, la secreción de hormonas, y el acoplamiento excitación-contracción. A la fecha se han descrito diez isoformas de $Ca_v$ según sus características electrofisiológicas: cuatro de tipo L o ($Ca_v1.1$ a $Ca_v1.4$), uno de tipo N ($Ca_v2.1$), uno de tipo P/Q ($Ca_v2.2$), uno de tipo R ($Ca_v2.3$) y tres de tipo T ($Ca_v3.1$ a $Ca_v3.3$) (Catterall 2012). De éstos canales, se ha corroborado la expresión del $Ca_v$ tipo T $Ca_v3.2$ en el endotelio de vasos sanguíneos pulmonares, de arteriolas mesentéricas de rata y de vasos sanguíneos del miometrio humano (Blanks *et al.*, 2007; Braunstein *et al.*, 2009; De Proost *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2016).

En relación a la participación de los canales $Ca_v$ en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis, se describió que la inhibición de canales $Ca_v$ tipo L y T

con efonidipino reduce el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en HUVEC estimuladas con angiotensina, mientras que la inhibición de los canales $Ca_v$ tipo T con mibefradil en HUVEC o con NNC55-0396 en CEs pulmonares redujo la migración endotelial y la formación de estructuras tubulares (Martini *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2019). Sin embargo, no se ha descrito todavía los mecanismos involucrados en la activación de estos canales durante la migración endotelial.

Respecto a la activación de estos canales en el endotelio, se ha descrito en CEs de medula adrenal bovina que presentan un potencial de reposo de aproximadamente -50 mV que la despolarización de la membrana a -20 mV induce corrientes de $Ca^{2+}$ ($I_{Ca}$) mediadas por los $Ca_v$ tipo T (Bossu *et al.*, 1989). A su vez, se ha demostrado que la activación de canales $Na_v$ en neuronas piramidales induce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que depende de la activación de canales $Ca_v$ (Fekete *et al.*, 2009) y se ha sugerido que la activación secuencial de canales $Na_v$ y canales $Ca_v$ tipo T de la isoforma $Ca_v3.2$ en las CEs incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ y participa en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio (Figueroa *et al.*, 2007). En base a ello, es posible que la activación de los $Na_v$ despolarice la membrana de las CEs y active a los canales $Ca_v$ incrementando así la $[Ca^{2+}]_i$ durante la migración, mecanismo que ha sido propuesto durante la migración de células cancerígenas (Angus y Ruben, 2019); sin embargo, a la fecha no ha sido demostrado.

### 2.3. NCX en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial.

Otro posible mecanismo de participación de los canales $Na_v$ en la señalización de $Ca^{2+}$durante la migración endotelial es que la $I_{Na}$ generada por la activación de estos canales se asocie a la activación del modo reverso del NCX. El NCX media el intercambio de 3 $Na^+$ por

1 $Ca^{2+}$ y su actividad depende del potencial de membrana y de las gradientes electroquímicas de los iones $Na^{+}$ y $Ca^{2+}$. Normalmente, el NCX funciona en modo "directo"; es decir, sacando $Ca^{2+}$ desde el espacio intracelular, lo cual es favorecido cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta o la $[Na^{+}]$ intracelular ($[Na^{+}]_i$) se reduce. Por otro lado, el NCX también puede funcionar en modo "reverso", ingresando $Ca^{2+}$ a la célula desde el medio extracelular. Esto ocurre cuando las células se despolarizan, la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye o la $[Na^{+}]_i$ aumenta (Blaustein y Lederer, 1999). A la fecha se conocen 3 isoformas de NCX (NCX1, NCX2 y NCX3), de las cuales NCX1 se expresa en cardiomiocitos y en el endotelio de arterias de resistencia mesentéricas, donde se localiza en caveolas en asociación con caveolina 3 y cav-1, respectivamente (Bossuyt *et al.*, 2002; Lillo *et al*., 2018).

Se ha descrito que la activación del modo reverso del NCX en HUVEC participa en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, la proliferación, la migración endotelial y la formación de estructuras tubulares inducida por VEGF (Andrikopoulos *et al.*, 2011). Si bien los mecanismos involucrados en la activación del modo reverso de este intercambiador durante la migración de CEs no ha sido del todo dilucidados, en CEs aórticas se demostró que la entrada de $Na^{+}$ desde el medio extracelular induce la entrada de $Ca^{2+}$ mediada por NCX en caveolas y la subsecuente activación de la eNOS y se ha sugerido que si el incremento de $Na^{+}$ se restringe a espacios subcelulares sería posible duplicar la $[Na^{+}]_i$ e inducir la activación del modo reverso del NCX (Lederer *et al.,* 1990; Teubl *et al*., 1999). Esto sugiere que si la entrada de $Na^{+}$ mediada por la activación de canales $Na_v$ incrementa de forma localizada la $[Na^{+}]_i$ en la vecindad del NCX, posiblemente en caveolas, podria activar el modo reverso del NCX e incrementar la $[Ca^{+}]_i$, estableciendo así un acoplamiento funcional entre ambos canales durante la migración endotelial. Este acoplamiento funcional entre los canales $Na_v$ y el NCX

ha sido demostrado en cardiomiocitos donde los canales $Na_v$ se localizan en caveolas y el NCX colocaliza con los $Na_v$ (Gershome *et al.*, 2011; Larbig *et al.*, 2010; Yarbrough *et al.,* 2002). Por lo que, si los $Na_v$ y el NCX se localizan próximos entre sí durante la migración endotelial – posiblemente en caveolas – se podría generar la entrada de $Ca^{2+}$ a través de la activación del modo reverso del NCX. Sin embargo, no se ha demostrado que esto ocurra a la fecha.

## 3. Participación de canales formados por conexinas en la migración endotelial y la angiogénesis.

Durante la angiogénesis, la migración endotelial ocurre de manera coordinada, esto se ha demostrado en la migración de CEs inducida por la lesión de la monocapa en los cuales se observa que las células del frente de migración se mueven de forma direccionada y son seguidas por las CE de la monocapa a fin de repoblar la zona previamente lesionada (Herbert y Stainier, 2011; Vitorino y Meyer 2008). En este sentido, la comunicación a través de canales formados por conexinas es clave para la coordinación de variadas funciones celulares, entre ellas la regulación del tono vasomotor y la coordinación de la migración de células tumorales, astrocitos y CEs (Dbouk *et al.*, 2009; Haefliger *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2014; Pogoda *et al.*, 2019; Zhou y Jiang, 2014).

### 3.1. Estructura y función de los canales formados por conexinas

Las conexinas (Cxs) son proteínas formadas por 4 segmentos transmembrana, 2 loops extracelulares, 1 loop intracelular y extremos amino y carboxilo terminal citoplasmáticos. A la fecha se han descrito 21 isoformas de Cxs en humanos. Las Cxs se ensamblan en hexámeros y forman hemicanales (HCs), denominados homoméricos si están formados por sólo un tipo de Cxs o heteroméricos si están formados por más de una Cxs; a su vez, la unión de dos HC entre células vecinas forma las uniones comunicantes (gap junctions, GJs), las cuales pueden ser homotípicas cuando los dos hemicanales que las forman son idénticos o heterotípicas si los hemicanales que las forman son diferentes entre sí. Las primeras en ser descritas fueron las GJs que conectan el citoplasma de células vecinas y permiten la transmisión de corriente y el intercambio de moléculas pequeñas (<1,4 nm de diámetro), iones y segundos mensajeros, como $Ca^{2+}$ e $IP_3$. Sin embargo, a partir de la década de los 90 se reconoció que los HCs también podían ser funcionales y conectar el interior de las células con el medio extracelular, permitiendo la liberación de moléculas de señalización celular autocrina y paracrina como ATP, $PGE_2$, glutamato y además el ingreso de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular (De Bock *et al.*, 2012; Evans y Martin 2002; Sáez *et al.*, 2005; Schalper *et al*, 2010).

### 3.2. Expresión de Cxs en el endotelio y la participación de canales formados por Cxs en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis.

La expresión de Cxs ha sido ampliamente descrita en el endotelio de diversos territorios vasculares (Pohl U., 2020). En particular la expresión de las Cxs 37, 40 y 43 se ha corroborado en el endotelio de aorta, arterias pulmonares, arterias coronarias, arteriolas y arterias mesentéricas, arteriolas de mejilla de hámster y arteriolas cerebrales de rata, las que forman GJs entre las CEs (Gustafsson *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 1999; Little *et al.*, 1995; Yeh *et al.* 1998). Por otra parte, respecto a los HCs, se ha descrito la presencia de HCs formados por Cx43 funcionales en células HeLa transfectadas con Cx43, CEs de córnea bovina, la línea de CEs EAhy 926 y la línea de CEs cerebrales de rata GP8 (Braet *et al.*, 2003; D'Hondt *et al.*, 2014; Delvaeye *et al.*, 2019; Gomes *et al.* 2005; Sáez *et al.*, 2018).

La eliminación de la expresión de Cxs ha evidenciado la relevancia de estas proteínas en el sistema vascular. En ratones en los que se eliminó la expresión de Cx37 y Cx40 se observó hemorragias en la piel, tejidos gastrointestinales, pulmones y testículos, dilatación y congestión de los vasos sanguíneos y finalmente la muerte en el periodo perinatal (Simon y McWhorter, 2003). Además, la eliminación de la expresión de Cx43 de forma específica en el endotelio generó hipotensión y bradicardia (Liao *et al.*, 2001). Respecto a la participación de las Cxs en la migración endotelial y la angiogénesis, se ha descrito que la reducción de la expresión de forma individual de las Cx37, 40 o 43 reduce la formación de estructuras tubulares en cultivos de HUVEC, siendo el mayor efecto inhibitorio el observado al silenciar la Cx43 (Gärtner *et al.*, 2012). En relación a la participación de Cx40, se demostró que la eliminación de la expresión de Cx40 reduce la proliferación de las CEs en cultivo y la

angiogénesis en el modelo de neovascularización de retina de ratón y el modelo de isquemia inducida por la ligación de la arteria femoral (Fang *et al.*, 2012; Haefliger *et al.*, 2017). Interesantemente, al eliminar la expresión de Cx40 se observó un incremento en la producción de PDGF en las CEs y en el reclutamiento de células murales a los vasos recién formados (Haefliger *et al.*, 2017). Esto es interesante en el contexto que se ha descrito que un exceso de PDGF podría reducir la cantidad de vasos sanguíneos funcionales (Au *et al.*, 2009), por lo que Cx40 podría tener un rol relevante durante la proliferación endotelial y la estabilización de los vasos sanguíneos por células murales durante la angiogénesis. Por otro lado, se determinó que la supresión de la expresión de la Cx37 se asoció con un aumento de la angiogénesis en el modelo de retina murina y en la extremidad inferior de ratón observada durante la isquemia inducida por la ligación de la arteria femoral. Sin embargo, también se observó una reducción en el reclutamiento de células murales, lo que se asoció con el establecimiento de un plexo vascular hiperdenso y poco remodelado. Un análisis más detallado de la localización de Cx37 en los vasos sanguíneos de la retina de ratones control mostró que la expresión de Cx37 se redujo en los vasos no estabilizados por células murales e incrementó de forma importante en las CEs de los vasos sanguíneos ya estabilizados, lo cual es consistente con lo observado durante la migración de HUVEC inducida por la lesión de la monocapa. En este modelo experimental, la expresión de Cx37 se redujo en las CEs del frente de migración e incrementó en la monocapa endotelial (Fang *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2017; Kwak *et al.*, 2001). Estos antecedentes muestran que Cx37 es relevante para la correcta estabilización de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Finalmente, consistente con el rol de Cx43 en la formación de estructuras tubulares mencionado anteriormente, se observó que la formación de estructuras tubulares inducida por el agonista de los receptores β-adrenérgicos, isoprenalina,

en HUVEC se asocia con un aumento en la expresión de Cx43 (Dhein *et al.*, 2015). Además, la deleción heterocigota del gen de Cx43 (*Gja1*) redujo la angiogénesis inducida por una lesión en la córnea de ratón (Rodrigues *et al.*, 2010). Esto sugiere que Cx43 es relevante para la migración de las CEs durante la angiogénesis.

A la fecha se desconoce si la participación de éstas Cxs en la angiogénesis se debe a su actividad como HCs o GJs; de este modo, debido a que los canales formados por Cxs son permeables a $Ca^{2+}$, es posible que la apertura de HCs participe en la entrada de $Ca^{2+}$ y/o que las GJs entre las CEs participen en la coordinación de la señalización de $Ca^{2+}$ durante la angiogénesis. Durante la migración inducida por la lesión del endotelio aórtico se generan incrementos de $Ca^{2+}$ restringidos a las células del frente de migración, es decir las tres primeras filas de células desde la zona lesionada, los que se caracterizan por un peak inicial dependiente de la liberación de $Ca^{2+}$ desde los almacenes intracelulares seguido por una fase sostenida que depende del ingreso de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular, como fue anteriormente descrito. Interesantemente, el tratamiento con los inhibidores no selectivos de GJs y HCs, ácido palmitoléico, heptanol, octanol y ácido 18-β-glicirretínico redujeron el incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ en las CEs del frente de migración (Berra-Romani *et al.*, 2008). A su vez, en CEs microvasculares de la corteza suprarrenal bovina se demostró que, posterior a la lesión de la monocapa, la difusión del colorante amarillo Lucifer a través de GJs se mantiene en las células del frente de migración pero disminuye en la monocapa endotelial (Pepper *et al.*, 1989; Pepper *et al.*, 1992). Si bien esto se atribuyó a cambios en la expresión de las Cx37 y Cx43 en las CEs durante la migración endotelial (Kwak *et al.*, 2001), la reducción del acoplamiento a través de GJs en la monocapa endotelial se generó inmediatamente posterior a la lesión, por lo que es probable que se deba a cambios en la funcionalidad de los

canales formados por estas conexinas y no a un cambio en su expresión. Estos antecedentes muestran que la mantención de GJs en las CEs del frente de migración es relevante para la señalización de $Ca^{2+}$ en la migración endotelial durante la angiogénesis.

Sin embargo, también es posible que la apertura de HCs formados por Cxs participe en la entrada de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración. Si bien esto no ha sido determinado a la fecha, en células epiteliales de riñón se demostró que el tratamiento con bradicinina genera oscilaciones de $Ca^{2+}$ intracelulares que dependen de la entrada de $Ca^{2+}$ mediada por la apertura de HCs formados por Cx43. Además, se observó que la estimulación mecánica de CEs de córnea bovina indujo la liberación de ATP a través de HCs formados por Cx43, lo cual llevó a la subsecuente activación de receptores P2Y y la propagación de ondas de $Ca^{2+}$ desde la CEs estimulada a las células vecinas (De Bock *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2005). Considerando estos antecedentes, es posible que la apertura de HCs formados por Cx43 incremente la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis, ya sea de forma directa a través del ingreso de $Ca^{2+}$ a través de HCs o indirectamente a través de la señalización de ATP.

### 3.3. Regulación de los canales formados por conexinas durante la migración endotelial.

Si bien, se desconocen los mecanismos involucrados en los cambios de la comunicación intercelular entre las CEs durante la migración endotelial, una posibilidad es que el óxido nítrico (NO) participe en la regulación de GJs y HCs durante el proceso.

En las CEs la síntesis de NO a partir de L-arginina depende de la activación de la enzima dependiente de $Ca^{2+}$ y calmodulina, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). En

condiciones basales, las CEs de los vasos sanguíneos producen y liberan NO, lo que se incrementa en presencia de variados estímulos entre ellos acetilcolina, trombina, bradicinina noradrenalina, ADP, y la lesión del endotelio. El NO participa en diversas funciones vasculares, entre ellas la regulación del tono vascular, la función plaquetaria, la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Jin y Loscalzo 2010; Tousoulis *et al.*, 2012).

En relación a su participación en la angiogénesis, se ha descrito que la estimulación de HUVEC con VEGF primero (~30 min) aumenta la producción de NO de las CEs, mientras que a largo plazo (~24 h) no sólo incrementa la producción de NO, sino además la expresión de eNOS. Sumado a ello, la inhibición de la eNOS con $N^G$-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) reduce la proliferación y formación de estructuras tubulares inducida por VEGF en HUVEC (Papapetropoulos *et al.*, 1997). A su vez, el suprimir la expresión de eNOS se inhibe la angiogénesis *ex vivo* de segmentos aórticos dispuestos sobre matrigel y también de insertos de matrigel inyectados *in vivo* en el tejido subcutáneo de ratón y en la retina de ratón. Esto se atribuyó a una reducción en la proliferación de las CEs, a un menor número de células de punta y una disminución en el reclutamiento de células murales en los vasos sanguíneos recién formados (Lee *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 2016).

A la fecha, diversos mecanismos de participación del NO en la angiogénesis han sido propuestos, por una parte el tratamiento de CMLV de rata con los donadores de NO, SNAP, SIN- 1 o DETA incrementó la expresión y liberación de VEGF y el tratamiento de HUVEC con el medio condicionado de éstas CMLV indujo la proliferación endotelial (Jozkowicz *et al.*, 2001), esto sugiere que un aumento en la producción de NO en las CEs podría incrementar la producción de VEGF en las CMLV, el cual a su vez actuaría en las CEs, generando así un sistema de retroalimentación positiva que estimula la angiogénesis. Además, en CEs de

vénulas coronarias, el tratamiento con el donador de NO, nitroprusiato de sodio, incrementó la expresión de FGF, la actividad proteolítica del activador plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) inducida por FGF y la proliferación de las CEs, lo que se previno usando anticuerpos contra FGF (Ziche *et al.*, 1997). Esto sugiere que el NO también podría tener un rol sobre la proliferación endotelial estimulada por VEGF y FGF durante la angiogénesis. A su vez, la perfusión de arterias coronarias con el inhibidor de la eNOS, L-NAME, incrementó la actividad de las metaloproteinasas de la matriz extracelular MMP-2 y MMP9 y la producción del factor antiangiogénico angiostatina (Matsunaga *et al.*, 2002), mientras que el donador de NO, DETA/NO, redujo la expresión del factor antiangiogénico trombospondina-1 (Ridnour *et al.*, 2005). Esto sugiere que el NO endotelial participa en la angiogénesis regulando además el balance entre factores pro y antiangiogénicos. Finalmente, consistente con el incremento de la actividad proteolítica de uPA mediada por FGF e inducida por NO, en BAEC tratadas con el inhibidor de la eNOS, $N^{\omega}$-monometil-L-arginina, se observó una reducción en la expresión de $\alpha_v\beta_3$, una integrina que participa en la interacción del citoesqueleto de actina y la matriz extracelular, mientras que en HUVEC el tratamiento con SNAP incrementó la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la angiogénesis (Lee *et al.*, 2000; Murohara *et al.*, 1998), esto sugiere que parte de los mecanismos por los cuales NO media la migración endotelial se asocian a cambios en la interacción entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina de las CEs.

### 3.3.1 Regulación de los canales formados por Cxs mediada por NO

Sumado a los mecanismos anteriormente descritos por los que el NO participa en la migración endotelial, se ha observado que la lesión mecánica del endotelio aórtico incrementa la producción de NO de forma restringida en las CEs del frente de migración, lo que depende de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular (Berra-Romani *et al.*, 2013). En este contexto, es posible que el NO participe en el control de la actividad de los HCs y GJs formadas por Cxs en las CEs del frente de migración, ya que la actividad de los canales formados por Cxs puede ser regulada por NO a través de la activación de proteínas fosfatasas y quinasas involucradas en las modificaciones post-traduccionales de las Cxs o directamente a través de la S-nitrosilación de Cxs (Hess y Stamler, 2012; Pogoda *et al.*, 2016).

En relación a la regulación de GJs por NO, se determinó que la eNOS colocaliza con Cx37 en las CEs y, además, se observó que, en CEs en las que se eliminó la expresión de Cx40 y 43, pero no de la Cx37, el tratamiento con los donadores de NO, SNAP o DETA, redujo el acoplamiento mediado por GJs (Kameritsch, Khandoga et al. 2005); (McKinnon *et al.,* 2009; Pfenniger *et al.*, 2010). A su vez, la eNOS también colocaliza con Cx40 en las CEs, pero, al contrario de lo observado con Cx37, el tratamiento de HUVEC con SNAP incrementó el acoplamiento a través de GJs formados por Cx40, lo que fue mediado por la señalización de GMPc, AMPc y la proteína quinasa A (PKA) (Alonso *et al.*, 2010; Hoffmann *et al.*, 2003; Kameritsch *et al.*, 2003). Estos antecedentes sugieren que el NO inhibe el acoplamiento mediado por GJs formados por Cx37, pero incrementa el acoplamiento a través de GJs formadas por Cx40, probablemente por medio de la fosforilación de esta Cx. Si bien en células HeLa transfectadas con Cx43 tratadas con SNAP no se observaron cambios en el

acoplamiento a través de GJs formados por estas Cxs (Hoffmann *et al.*, 2003; Kameritsch *et al.*, 2005); en arterias toracodorsales y co-cultivos de HUVEC y CMLV se demostró que Cx43 se encuentra S-nitrosilada en las CEs, en las CMLV y en las uniones mioendoteliales formadas entre ambas células y que la S-nitrosilación de Cx43 se asocia a la apertura de las uniones mioendoteliales formadas por Cx43 (Straub *et al.*, 2011). Sin embargo, si la S-nitrosilación de Cx43 es un mecanismo de regulación de las GJs formados por estas Cxs durante la migración endotelial no ha sido evaluado a la fecha.

Por otra parte, en relación a la regulación mediada por NO de HCs formados por Cxs, se demostró que el tratamiento de células HeLa transfectadas con Cx37, Cx40 o Cx43 con el donador de NO, BSA-NO, induce la apertura de los HCs formados por éstas Cxs (Figueroa *et al.*, 2013). A su vez, se ha descrito en astrocitos que la S-nitrosilación de la Cx43 inducida por el donador de NO, S-nitrosoglutatión, incrementa la permeabilidad de HCs formados por esta Cx (Retamal *et al.*, 2006). Sumado a ello, en CEs de arteria uterina humana se describió que Cx43 colocaliza con cav-1 en la membrana plasmática endotelial (Ampey *et al.*, 2016). De esta manera, como las CEs expresan HCs formados por Cx43 y esta Cx se localiza en caveolas al igual que la eNOS, es posible que el aumento en la producción de NO observado en las CEs del frente de migración regule la actividad de los canales formados por Cx43 durante la migración endotelial y la angiogénesis.

.

# HIPÓTESIS

La señalización de $Ca^{2+}$ observada durante la migración endotelial en la angiogénesis es:

1) Gatillada por el acoplamiento funcional de los canales $Na_v$ sensibles a TTX con la activación del modo reverso del intercambiador de $Na^{+}$-$Ca^{2+}$.

2) Coordinada por la S-nitrosilación de las conexinas que forman las uniones comunicantes y los hemicanales en las células endoteliales del frente de migración.

# OBJETIVOS

1. **Determinar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial.**

1.1. Evaluar la participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ en la migración endotelial.

1.2. Determinar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la proliferación de las células endoteliales.

1.3. Evaluar los mecanismos de activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en las células endoteliales del frente de migración.

2. **Determinar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX están involucrados en el inicio de la señalización de $Ca^{2+}$ observada en la migración endotelial.**

2.1. Determinar la distribución subcelular del NCX y de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en las células endoteliales del frente de migración.

2.2. Evaluar si el acoplamiento funcional entre los canales $Na_v$ sensibles a TTX y la activación del NCX en modo reverso participa en la migración endotelial.

3. **Evaluar si los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el NCX participan en la angiogénesis.**

3.1 Identificar la expresión de los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el NCX en células endoteliales de vasos sanguíneos *in vivo*.

3.2. Determinar si la inhibición farmacológica de los canales $Na_v$ sensibles a TTX y NCX reduce la angiogénesis *in vivo*.

3.3. Evaluar si la manipulación genética de los canales $Na_v$ sensibles a TTX reduce la formación de vasos sanguíneos *in vivo*.

4. **Determinar la participación de los canales formados por conexinas en la señalización de $Ca^{2+}$ en el frente de migración endotelial.**

4.1. Determinar la expresión y localización de conexinas en las CEs del frente y la monocapa celular durante la migración endotelial.

4.2. Evaluar la participación de hemicanales formados por conexinas en la señalización de $Ca^{2+}$ que media la migración endotelial.

4.3. Determinar si la nitrosilación dependiente de NO de conexinas endoteliales participa en la apertura de hemicanales en las células del frente de migración.

# MATERIALES

## Reactivos:

Los siguientes reactivos fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): Bromuro de etidio (Cat. #E8751), ácido 18-β-glicirretinico (β-GA; Cat. #G10105), suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS, Cat. #E0760), metil-β-ciclodextrina (MβCD; Cat. #C4767), N-nitro-L-nitroarginina (L-NA) (Cat. #N5501), Adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Cat. #A2383), paraformaldehído (PFA) (Cat. #158127), DAPI (Cat. #D9542), Duolink® In Situ reactivos de detección (Cat. # DUO92007), Duolink® In Situ sonda PLA anti-ratón (Cat. #DUO92001), Duolink® In Situ sonda PLA anti-conejo (Cat. #DUO92005).

El Fluo-4 AM (Cat. # F23917) se adquirió en Life Technologies (Eugene, OR, USA) y la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Cat. #B23151) en Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). La lamotrigina, (Cat. #L205) y el 4,9-anhidrotetrodotoxina, (Cat. #T560) se obtuvieron de Alomone Labs (Jerusalem, Israel). La tetrodotoxina (TTX) (Cat. #AF3015) fue adquirida en Affix Scientific (Fremont, CA, USA). Los péptidos $^{37,43}$Gap27 (Cat. #1476) y Gap19 (Cat. #6227), SEA0400 (Cat. #6164) y PPADS sal tetrasodio (Cat. #0625) se compraron en Tocris Bioscience (Bristol, UK). El ácido L-ascórbico (AA) (Cat. #sc-202686) se adquirió en Santa cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

**Cultivo celular:**

La Colagenasa tipo II (Cat. # 4176) fue adquirida en Worthington (Lakewood, NJ, USA), la mezcla de antibióticos y antimicóticos Anti-Anti (2X), (Cat. # 15240) se compró en Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) y el medio de cultivo M199 y suero fetal bovino (SFB) en Gibco (Grand Island, NY, USA).

**Anticuerpos:**

El anticuerpo policlonal anti-$Na_v1.2$ (Cat. #ASC-002) y el anticuerpo policlonal anti-$Na_v1.6$ (Cat. #ASC-009) fueron adquiridos en Alomone Labs (Jerusalem, Israel). El anticuerpo policlonal anti-Cx37 (Cat. #CX37A11-A) y el anticuerpo policlonal anti-Cx40, (Cat. #CX40-A) se compraron en Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA). El anticuerpo policlonal anti-S-nitroso-cisteína (SNO-Cys) (Cat. #N5411) se obtuvo de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo monoclonal anti-Cx43 (Cat. # 610062) se adquirió en BD-Transduction Labs (Lexington, KY, USA). El anticuerpo monoclonal anti-caveolina-1 (Cat. #MA3-600) y el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Cat. #03-3900) se obtuvieron de Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con Alexa Fluor® 568 (Cat. #A11011) y anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (Cat. #A10680) se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

# MÉTODOS

## 1. Aislamiento y cultivo de CEs de lecho vascular mesentérico.

Por medio de una incisión en la línea media de la pared abdominal se expuso la arteria mesentérica superior de ratas macho *Sprague dawley* de 200-230 g de peso previamente anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 90 y 10 mg/kg, respectivamente). La arteria se canuló y perfundió con una solución Tyrode-MOPS estéril (en mM NaCl 118, KCl 5,4, $CaCl_2$ 2,5, $KH_2PO_4$ 1,2, $NaHCO_3$ 23,8, glucosa 11,1 y MOPS 5, pH: 7,4), suplementada con una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Anti-Anti (2X)) por 15 min a temperatura ambiente. Posterior a ello, las ratas fueron sacrificadas por exsanguinación bajo anestesia profunda. El mesenterio fue aislado de la pared del tubo digestivo e incubado con una solución de colagenasa tipo II al 0,2%/BSA al 0,1% a 37°C por 1 h. Luego de ello, se adicionó medio 199 (M199) frío estéril y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. El pellet celular obtenido fue resuspendido en M199 completo (M199 20% SFB + 2% ECGS) y las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm en una placa de 24 pocillos para asegurar su distribución homogénea en los pocillos. Cuatro horas después se eliminaron las células no adherentes lavando con PBS (en mM: NaCl 136,9; KCl 2,7; $NaH_2PO_4$ 10,4 y $KH_2PO_4$ 1,8; pH 7,4). Finalmente, las células se mantuvieron en M199 completo a 37°C con 5%$CO_2$ y 95% aire atmosférico hasta su confluencia.

## 2. Herramientas farmacológicas.

La participación de canales $Na_v$ sensibles a TTX se evaluó utilizando TTX 1 µM y los inhibidores específicos de $Na_v1.2$, 100 µM Lamotrigina y de $Na_v1.6$, 500 nM 4,9-anhidrotetrodotoxina. La participación del intercambiador NCX en la señalización $Ca^{2+}$ se determinó utilizando el inhibidor del modo reverso del NCX, 1 µM SEA0400 y la participación de $Ca_v3.2$ durante la migración se evaluó mediante el uso de 10 µM $NiCl_2$. El efecto de la desorganización de las caveolas en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial se evaluó utilizando el quelante de colesterol 5 mM metil-β-ciclodextrina (MβCD). En tanto, para establecer la participación de canales formados por Cxs se utilizó el inhibidor general de Cxs, 50 µM ácido 18-β-glicirretínico (β-GA), el péptido inhibidor de canales formados por Cx37 y/o Cx43, 200 µM $^{37,43}$Gap27 y el péptido inhibidor de hemicanales formados por Cx43, 300 µM Gap19. La S-nitrosilación de Cxs se evaluó utilizando el agente reductor 50 µM ácido ascórbico (AA) y el inhibidor de la eNOS, 100 µM L-nitroarginina (L-NA). Los inhibidores fueron aplicados de forma individual 10 min previo a la realización de la lesión mecánica de la monocapa endotelial y se mantuvieron durante todo el procedimiento experimental según corresponda.

## 3. Ensayo de migración endotelial

El ensayo se realizó según lo descrito por Liang *et al.* (2007). Una vez que las células alcanzaron su confluencia en los cubreobjetos, se realizó una lesión mecánica unidireccional en la monocapa endotelial utilizando una punta de micropipeta p200. Posterior a ello, se

eliminaron las células no adheridas y los restos celulares lavando con PBS y las células fueron incubadas en medio M199 + 5% SFB en condiciones control o en presencia de los inhibidores farmacológicos de los $Na_v$ sensibles a TTX y de los canales formados por Cxs a 37°C y 5%$CO_2$-95% aire atmosférico por 15 h. Se capturaron a lo menos 10 imágenes de la zona lesionada en cada cubreobjetos a tiempos 0 h y 15 h utilizando el microscopio Nikon Eclipse E600FN y un objetivo 10x. La migración se expresó como porcentaje de cierre de lesión y fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Cierre de lesión (\%)} = \frac{(Af-Ai)}{Ai} * 100$$

Donde, Ai es el área inicial luego de realizar la lesión de la monocapa y Af es el área final luego de transcurridas las 15 h de incubación

**4. Ensayo de formación de estructuras tubulares.**

El ensayo de formación de estructuras tubulares se basa en el cultivo de CEs sobre matrices que contienen fibrina, colágeno u otros que semejan la matriz extracelular y la formación de estructuras tubulares en función del tiempo. El día previo a la realización de experimentos, se descongeló el extracto de membrana basal Matrigel® (Cat. #356237, Corning™, NY, USA) a 4°C durante toda la noche. El día de experimentación y sobre una placa de 24 pocillos previamente enfriada por refrigeración, se adicionaron 200 µL del extracto a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C hasta su gelificación. Una vez transcurrido este tiempo, las CEs se tripsinizaron, se sembraron en cada pocillo y fueron mantenidas a

37°C y 5%$CO_2$-95% aire atmosférico en condiciones control (M199 5%SFB), con TTX 1 μM o con 300 μM Gap19. Se capturaron imágenes de cada pocillo a tiempos 0, 6, 12 y 24 h utilizando el microscopio Nikon Eclipse E600FN con un objetivo 10x. Los resultados obtenidos a las 6 y 12 h fueron analizados utilizando el software ImageJ (Schneider *y cols*., 2012) y los resultados fueron expresados de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice angiogénico} = \frac{(Tcel + Ccel)}{Tcel * (1 + NCcel)}.$$

Donde, Tcel es el número total de células por campo de microscopía, Ccel es el número de células que forman parte de las estructuras tubulares y NCcel es el número de células que no forman parte de las estructuras tubulares.

## 5. Ensayo de proliferación celular

**5.1 Recuento manual:** La proliferación celular se determinó a través de recuento manual del número de divisiones celulares a las 5 h. Para ello, las CEs se sembraron a baja confluencia en cubreobjetos de 12 mm y bajo el microscopio Olympus BX50W (Olympus America Inc, Center Valley, PA) se seleccionaron campos de microscopía con 2-4 células, en los que las células se encontrasen a una distancia de más de 5 mm entre sí. Se capturaron imágenes cada 30 min por 5 h en condiciones control o en presencia de 1 μM TTX. Los resultados se expresaron como la variación del número de células a las 5 h respecto al número inicial de células de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{ N° de células} = \frac{\text{n° de células a las 5h}}{\text{n° inicial de células}} * 100$$

**5.2 Ensayo de 5'-bromodeoxiuridina (BrdU):** Para obtener resultados de la proliferación endotelial con una mayor resolución temporal se utilizó el ensayo de 5'-bromodeoxiuridina. Para ello, las CEs se sembraron en cubreobjetos a baja densidad y se mantuvieron por 12 h en condiciones control (M199 5% SFB) o en presencia de 1 μM TTX, o 300 μM Gap19. Transcurrido este tiempo, el ensayo de BrdU se realizó según las especificaciones del proveedor (EMD Millipore) y los resultados fueron expresados como valores absolutos de absorbancia.

A su vez para determinar cambios en la proliferación durante la migración endotelial, los cultivos de CEs posterior a la lesión mecánica de la monocapa se incubaron con 10 μM BrdU por 12 h. Luego, los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se realizó la inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario de ratón anti-BrdU (1:5000) y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (1:2000). Finalmente, se capturaron imágenes del frente de migración y de la monocapa endotelial utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus BX41 (Olympus, America Inc, Center Valley, PA) y un objetivo de inmersión en aceite 100x. Los resultados se expresaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de proliferación} = \frac{\text{n° de células BrdU (+)}}{\text{n° total de células}}$$

Donde el n° de células BrdU(+) corresponde al número de células que incorporaron BrdU en el campo de microscopía y el n° total de células corresponde al número total de células en el campo de microscopía observado en campo claro.

### 6. Determinación de la señal de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial.

Los cambios en los niveles de $Ca^{2+}$ intracelular en el frente de migración y la monocapa endotelial posterior a la lesión se determinaron utilizando el indicador sensible a $Ca^{2+}$, Fluo-4 AM. Una vez que las CEs alcanzaron su confluencia en los cubreobjetos, éstos se lavaron con buffer Tyrode-MOPS e incubaron con 3 μM Fluo-4 AM en buffer Tyrode-MOPS por 1 h a 30°C en oscuridad. Luego de ello, se realizó la lesión mecánica con una punta de micropipeta p200 en condiciones control o en presencia de los inhibidores farmacológicos. Las células dañadas se eliminaron lavando con buffer Tyrode-MOPS y los cubreobjetos se montaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX50W (Olympus America Inc, Center Valley, PA). Después de un periodo de equilibrio de 10 min se procedió a capturar de imágenes del frente de migración y la monocapa endotelial con un objetivo de inmersión en agua 40x y la cámara Retiga 1394 (Q Imaging). La intensidad de fluorescencia se determinó por epifluorescencia (excitación 494 nm y emisión 506 nm) y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, NIH, USA). La señal de $Ca^{2+}$ se cuantificó en las células del frente de migración y la monocapa endotelial de forma individual y además se cuantificó la señal de $Ca^{2+}$ a lo largo del eje anteroposterior en las CEs del frente de migración.

## 7. Inmunofluorescencia

La distribución subcelular de cav-1, de los canales $Na_v$ sensibles a TTX, de Cx43 y de las S-nitrosilaciones de proteínas en las CEs del frente de migración y la monocapa endotelial se determinaron por inmunofluorescencia en el ensayo de lesión de monocapa. Para ello, 4 h posterior a la lesión de la monocapa, las CEs se fijaron con PFA al 4% por 1 h a temperatura ambiente y se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 0,1% por 30 min a temperatura ambiente. Luego del bloqueo con una solución de BSA 3% por 30 min a temperatura ambiente los cubreobjetos fueron incubados según corresponda con: anticuerpos primarios de conejo anti-$Na_v$1.2 (1:350), anti-$Na_v$1.6 (1:350), anti-Cx37 (1:100), anti-Cx40 (1:100), anticuerpo primario de ratón anti-Cx43 (1:250), anti-cav-1 (1:100), anti-SNO-Cys (1:300) durante toda la noche (~12 h) a 4°C. Transcurrido este tiempo, el anticuerpo no unido se eliminó lavando con PBS y los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor® 568 (1:2.000) o anticuerpo anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (1:2.000). Finalmente, los núcleos fueron marcados incubando con DAPI por 10 min a temperatura ambiente y los cubreobjetos montados en portaobjetos con medio de montaje Dako®. Se capturaron imágenes en zonas del frente de migración y de la monocapa endotelial utilizando el microscopio confocal Spectral Eclipse C2 (Nikon Instruments) con un objetivo de inmersión en aceite 60x y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA).

## 8. Ensayo de ligación por proximidad (PLA)

La asociación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ y cav-1 se determinó a través del ensayo de ligación por proximidad (Duolink® In Situ). Para ello, se realizó la lesión mecánica de la monocapa endotelial en condiciones control y 15 minutos o 4 h posterior a la lesión las CEs se fijaron con 4% PFA por 1 h a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 0,1% PBS-Tritón X-100 por 30 min a temperatura ambiente. Luego de ello, se realizó el bloqueo con una solución de 3% BSA por 30 min a 37°C y los cubreobjetos fueron incubados durante toda la noche (~12 h) a 4°C con los anticuerpos primarios de conejo anti-$Na_v1.2$ o anti-$Na_v1.6$ (1:350) y el anticuerpo primario de ratón anti-cav-1 (1:100). Luego, los cubreobjetos se lavaron con el buffer A a fin de eliminar el anticuerpo primario no unido y se incubaron con una solución de sondas PLA en cámara húmeda por 1 h a 37°C. Posterior a ello, los cubreobjetos se incubaron con una solución de ligación por 30 min a 37°C, el que luego se eliminó lavando con buffer B y se incubaron con una solución de amplificación por 2 h a 37°C. Finalmente los núcleos fueron marcados con DAPI y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje Dako®. Se capturaron imágenes en zonas del frente de migración y de la monocapa endotelial utilizando el microscopio confocal Spectral Eclipse C2 (Nikon Instruments) con un objetivo de inmersión en aceite 60x y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, NIH, USA).

## 9. Ensayo de transferencia de colorante

La actividad de uniones comunicantes durante la migración endotelial se determinó mediante la transferencia del colorante etidio posterior a su microinyección a una célula única en las CEs del frente de migración y de la monocapa endotelial antes y después de la lesión mecánica en condiciones control o en presencia de 1 μM ATP o 100 μM PPADS. Los cubreobjetos con CEs confluentes se montaron en el microscopio BX50W (Olympus America Inc, Center Valley, PA), se identificó una zona de la monocapa endotelial o el frente de migración utilizando el objetivo de inmersión en agua 40x y se procedió a la microinyección de una CE con una micropipeta cargada con 25 mM bromuro de etidio. Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de vidrio de 1 mm de diámetro (WPI, Sarasota, FL, USA) en el puller PC-10 (Narishige, Tokio, Japón) y la microinyección se realizó utilizando el microinyector IM-400 (Narishige, Tokio, Japón) con parámetros de presión y tiempo de 0,010 MPa y 0,30 s, respectivamente. Las imágenes de la difusión de etidio fueron registradas cada 20 s por 2 min utilizando la cámara Retiga 1394 (Q Imaging) y se analizó utilizando el programa ImageJ (Schneider *et al.,* 2012) el número de células a las que difunde el colorante desde la célula microinyectada a los 2 min y la incidencia de acoplamiento, es decir el número de experimentos en las que etidio difundió a más de dos células.

## 10. Ensayo de captación de colorante

La apertura de hemicanales se determinó mediante la captación del colorante etidio según lo descrito por Figueroa *et al.* (2013) durante la migración endotelial. En los cubreobjetos con CEs confluentes se realizó la lesión mecánica en la monocapa celular en condiciones control o en presencia de 200 µM $^{37,43}$Gap27, 300 µM Gap19, 100 µM L-NA, 50 µM AA, 1 µM TTX o 1 µM SEA 0400 y las células dañadas se eliminaron lavando con buffer Tyrode-MOPS. Luego, los cubreobjetos se montaron en el microscopio BX50W y posterior a un periodo de equilibrio de 10 min, se adicionó bromuro de etidio 5 µM. La captación de etidio se registró cada 30 s por un periodo de 15 min por epifluorescencia (excitación 530-550 nm y emisión 590 nm) utilizando un objetivo de inmersión en agua 40x. Las imágenes obtenidas en zonas del frente de migración y la monocapa endotelial fueron analizadas utilizando el software ImageJ (Schneider *et al.,* 2012).

## 11. Evaluación de la angiogénesis en peces cebra.

Los peces cebra (*Danio rerio)* se mantuvieron bajo condiciones estándar y los experimentos en embriones de peces cebra se realizaron según la guía del National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japón.

La angiogénesis se evaluó determinando la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales (ISV, intersegmental blood vessels) a partir de la aorta dorsal entre las 24 y 48 horas postfertilización (hpf) en embriones de peces cebra decorionizados. La participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX se evaluó en embriones de pez cebra *Tg*(*fli1*:*mCherry*) en

los cuales la expresión de la proteína fluorescente GFP está dirigida por el promotor *fli1*. El factor transcripcional *fli1* se expresa en las CEs durante la formación de la vasculatura desde aproximadamente las 20 hpf y permanece hasta al menos 2 días post fertilización, de esta forma las CEs durante la angiogénesis pueden ser evaluadas a través de microscopía de fluorescencia en este modelo (Lawson y Weinstein, 2002). Estos embriones fueron incubados con 1 μM TTX en medio E3 (en mM: 5 NaCl, 0,17 KCl, 0,33 $CaCl_2$ y 0.33 $MgSO_4$) a 28°C entre las 24 y 48 hpf y se utilizó como indicador de la correcta aplicación de TTX la parálisis de los embriones posterior a la estimulación mecánica. A las 48 hpf los embriones fueron anestesiados con 0,0016% tricaína en medio E3 y montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% en placas de plástico de 35 mm. Las imágenes de la formación de ISV se obtuvieron en la porción media de los embriones control y los embriones tratados con 1 μM TTX utilizando un microscopio Olympus BX50W (Olympus America Inc, Center Valley, PA).

Por otra parte la participación de los canales formados por Cx43 en la angiogénesis se evaluó en embriones transgénicos de pez cebra *Tg*(*fli1*:*GFP*), con marcaje selectivo para el factor transcripcional *fli1* de forma específica en las CEs. A su vez se utilizaron embriones de pez cebra *Tg*(*kdrl*:*GFP*)(*fli1:H2B-mCherry*), en los cuales la expresión de la proteína fluorescente GFP está dirigida por el promotor *kdrl* que codifica para el receptor de VEGF en las CEs y la expresión de proteína histona H2B fusionada con la proteína fluorescente mCherry está dirigida por el promotor *fli1*; esto permite el reconocimiento individual de las CEs durante la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la identificación de sus núcleos.

### 11.1. Reducción de la expresión de Cx43 en embriones de peces cebra

Los oligonucleótidos antisentidos morfolinos (MOs) son secuencias de aproxidamente 25 bases que se unen al ARN objetivo y bloquean la traducción proteica al unirse al sitio de inicio de la traducción del ARNm o por inhibición del corte y empalme para generar el ARN maduro. Los MOs dirigidos contra el codón de inicio de la traducción de *Gja1* (Cx43MO) fueron diseñados utilizando la siguiente secuencia: 5'-TTC CCA ACG CAC TCC AGT CAC CCA T 3' (Iovine *et al.*, 2005) y se preparó un stock en $H_2O$ a una concentración 1 mM. Como control negativo (CtrlMO) se utilizaron los oligonucleótidos antisentidos morfolinos dirigidos a una mutación del intrón de β-globina humana (GeneTools, LLC, Philomath, OR) (secuencia: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA3'). Los embriones fueron inyectados en la etapa de 1-2 células con aproximadamente 2 nL de la solución control de morfolino o la solución 100 μM de Cx43MO con 0,5% de rojo fenol en una placa de agar al 3%. La correcta inyección se corroboró en cada embrión determinando la fluorescencia del rojo fenol en una lupa estereoscópica equipada con fluorescencia. Posterior a la inyección, los embriones se mantuvieron en medio E3 a 28°C hasta las 24 horas post-fertilización (hpf).

### 11.2. Evaluación de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales en embriones de peces cebra morfantes de Cx43.

La angiogénesis puede ser evaluada en embriones de peces cebra siguiendo la formación de vasos sanguíneos intersegmentales (ISV) que emergen de la aorta dorsal (DA) y conectan con los vasos anastomóticos dorsales longitudinales (DLAV) entre las 24 y 48 hpf. A las 24

hpf, los embriones fueron anestesiados con 0,0016% tricaína en medio E3, decorionizados y montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% en placas de plástico de 35 mm (Fukuhara *et al.*, 2014). Las placas se montaron en el microscopio confocal FluoView FV3000 (Olympus, Japón) equipado con un objetivo de inmersión en agua 20x y se identificó la aorta dorsal en la porción media de los embriones. Se capturaron imágenes de los embriones control y los embriones morfantes de Cx43 cada 30 min por 24 h (entre las 24 y 48 hpf) en diferentes planos focales a lo largo del eje z (distancia desde el objetivo) utilizando un intervalo de 4 µm (intervalo z) (Figura 2). Las reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas en cada embrión y su análisis posterior se realizó utilizando el software IMARIS 7.7.1 (Bitplane AG, Suiza) y los resultados se expresaron como: 1) el largo promedio de los ISV a las 48 hpf (largo de las ISV que alcanzaron los DLAV, en los morfantes de Cx43 y los embriones control), 2) el porcentaje de ISV incompletas (número de ISV que no alcanzan los DLAV respecto al total de ISV por campo de microscopía) y 3) el número de CEs por cada ISV.

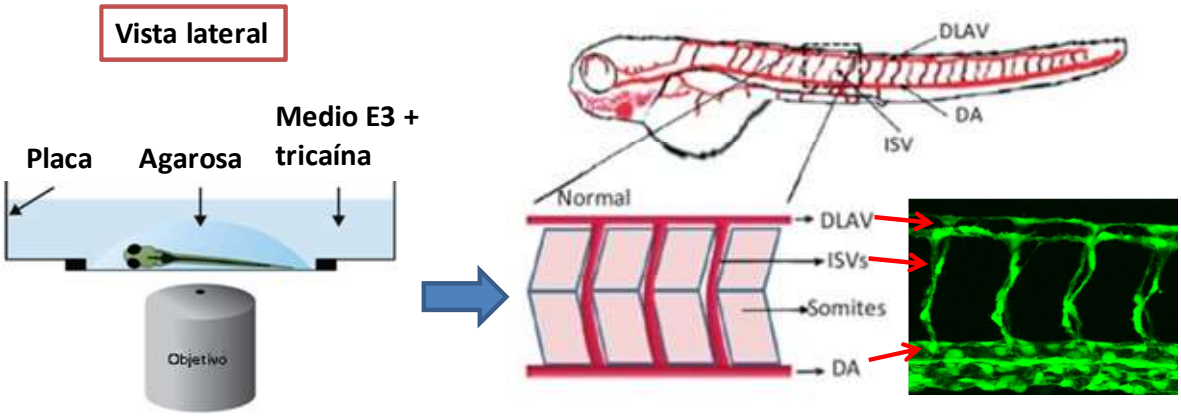


**Figura 2. Evaluación de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales (ISV) en embriones de peces cebra.** A las 24 hpf los embriones se anestesian con 0,0016% tricaína en medio E3, decorionizan y montan en agarosa en placas de plástico de 35 mm. Luego

utilizando un microscopio confocal se identifica la aorta dorsal (DA) en la porción central de los embriones y se sigue el desarrollo de los vasos sanguíneos intersegmentales (ISV) hasta las 48 hpf cuando los vasos anastomóticos dorsales longitudinales (DLAV) se forman (Modificado de Pinto-Texeira *et al.,* 2013 y Bansode *et al*, 2012).

## 12. Evaluación de la señalización de $Ca^{2+}$ durante la formación de ISV en embriones de peces cebra.

Los cambios en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la formación de ISV fueron evaluados al inicio de la formación de ISV (22 hpf) y una vez que las ISV se encuentran prácticamente formadas (30 hpf) en embriones transgénicos *Tg(fli1:Gal4FF);(5xUAS:GCaMP7a);(fli1:H2B-mCherry)*. Estos embriones expresan el indicador de calcio *GCamP7*, creado a partir del fragmento M13 del gen *Mylk*, el cual contiene la secuencia diana para la unión a calmodulina, fusionado a una forma de eGFP permutada circularmente en el extremo N-terminal, a la que a su vez se une en el extremo C-terminal el gen de calmodulina *CaM*. Una vez que el $Ca^{2+}$ se une a la calmodulina, la interacción $Ca^{2+}$-CAM-M13 induce un cambio conformacional en eGFP que produce un incremento en la intensidad de fluorescencia. El sensor de $Ca^{2+}$ GCamp7a se expresó utilizando el sistema de expresión *Gal4/UAS* bajo el control del promotor *Fli-1* lo que permite su expresión de forma específica en el citoplasma de las CEs. A su vez, la expresión de *H2B* fusionada con mCherry bajo el promotor de *Fli1* permite la expresión de la proteína histona H2B fluorescente de forma específica en los núcleos de las CEs y, de esta forma, permite realizar el seguimiento de la señalización de $Ca^{2+}$ de forma individual durante la formación de las ISVs a lo largo del tronco de los embriones. Los registros de la señal de $Ca^{2+}$ se realizaron según lo descrito por Yokota *et al.* (2015). Se registró la señal de $Ca^{2+}$ cada 5 s por 10 min en las CEs que emergen de la aorta dorsal en la

porción media de los embriones control y embriones morfantes de Cx43 con un intervalo z de 4 μm utilizando el microscopio confocal de alta velocidad Dragonfly 200 (Andor, Alemania) y un lente de inmersión en agua 25x. La señal de $Ca^{2+}$ se cuantificó en las ISV que emergen de la aorta dorsal en uno de lados del embrión de forma individual en cada CEs siguiendo el desplazamiento de los núcleos marcados con H2B-mCherry y se seleccionaron regiones de interés esféricas de 10-15 μm de diámetro evitando la superposición de la señal de $Ca^{2+}$ de las CEs adyacentes. Los resultados se expresaron a las 22 hpf y 30 hpf según la siguiente fórmula:

$$\Delta F / F_0 = \frac{(F - F_0)}{F_0}$$

Donde $F_0$ es el promedio de la intensidad de fluorescencia basal del sensor GCamp7a en las CEs y F es la fluorescencia en cada punto del curso temporal de forma individual en cada CE. $\Delta F / F_0$ se presenta como el promedio de todas las CEs en los ISV en los embriones control y embriones morfantes de Cx43. Una oscilación de $Ca^{2+}$ se definió como un incremento de la señal de GCamP7a mayor a dos desviaciones estándar por sobre el promedio de la intensidad de fluorescencia basal ($F_0$). A su vez, la frecuencia de oscilaciones de $Ca^{2+}$ se cuantificó como el número de peaks de $Ca^{2+}$ por minuto.

## 13. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio (X) ± error estándar (ES). La comparación entre dos grupos experimentales se realizó utilizando el test t de Student pareado o no pareado y las comparaciones entre múltiples grupos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías seguido de la prueba *post hoc* Bonferroni. Se empleó como criterio indicador de significancia estadística un valor de *p* menor a 95% ($p<0,05$). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA)

# RESULTADOS

## 1. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial.

La participación de los canales $Na_v$ en la migración de las CEs se evaluó mediante el ensayo de la lesión de la monocapa endotelial. La migración de las CEs cubrió casi completamente el área que había sido previamente raspada 15 h después de iniciar el ensayo de lesión de monocapa en condiciones control, mientras que el tratamiento con TTX redujo el cierre de la lesión observado en el mismo periodo de tiempo (Figura 3A y 3B). Se debe notar que el efecto máximo se obtuvo con 1 μM TTX, ya que el aumento de la concentración a 10 μM y 100 μM no acentuó la magnitud de la inhibición en la migración endotelial (Figura 2B), lo cual destaca la sensibilidad a TTX de las isoformas de canales $Na_v$ involucradas en la migración endotelial. Las CEs expresan dos isoformas de canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, y consistente con la participación de estas isoformas, la inhibición de los $Na_v1.2$ con lamotrigina o de los $Na_v1.6$ con 4,9-anhidrotetrodotoxina produjo una disminución de la migración endotelial similar a la observada con 1 μM TTX (Figura 3C y 3D), la cual se mantuvo al mismo nivel a pesar de la aplicación combinada de éstos inhibidores entre sí o con TTX (Figura 3D), sugiriendo que estos canales podrían formar parte de una misma vía de señalización.

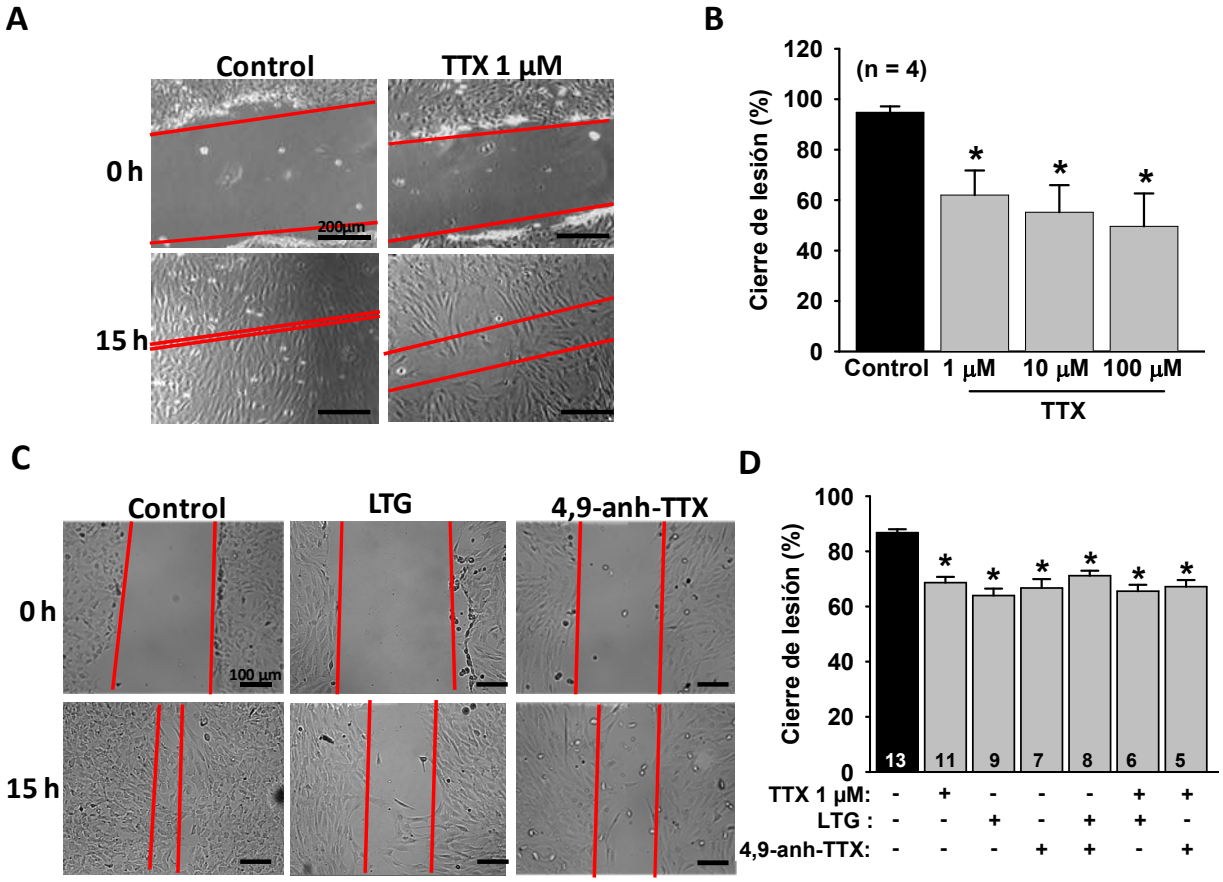


**Figura 3. Los canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ participan en la migración endotelial. A)** Imágenes representativas del avance de la migración endotelial observado en 15 h en el ensayo de lesión de monocapa en condiciones control o en presencia de tetrodotoxina (TTX), un inhibidor de los canales de $Na^+$ dependientes de voltaje ($Na_v$). **B)** Cuantificación del cierre de la lesión en condiciones control y en presencia de distintas concentraciones de TTX. **C)** Imágenes representativas del ensayo de lesión de monocapa en ausencia (Control) y en presencia del inhibidor de los $Na_v1.2$, lamotrigina (100 µM LTG), o del inhibidor de los $Na_v1.6$, 4,9-anhidro-tetrodotoxina (500 nM 4,9-anh-TTX). **D)** Cuantificación del cierre de la lesión en condiciones control y después de la aplicación de TTX, LTG o 4,9-anh-TTX por sí solos o en forma combinada. La línea roja destaca la ubicación relativa del borde de la lesión de la monocapa (A y C), y se muestra sólo como una referencia pero no se uso para el análisis estadístico. Los números dentro de las barras indica el valor de n. *, $p$<0,01 vs. Control por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni.

La posible contribución de una disminución en la proliferación celular al efecto de TTX sobre el cierre de la lesión se evaluó mediante la medición de la proliferación celular. En las condiciones normales de cultivo, es decir, con un medio de cultivo suplementado con un 20% de SFB, las CEs endoteliales aumentaron al doble su número en 5 h (Figura 4A). Sin embargo, en este periodo de tiempo no se observaron cambios en el número celular en el control o en presencia de TTX en las condiciones de cultivo utilizadas en el ensayo de lesión de monocapa, es decir, con un medio de cultivo suplementado con un 5% SFB (SFB 5%, Figura 4A). Como el estudio de la migración endotelial involucra un tiempo experimental mayor, se complementó el análisis de la proliferación celular por medio de la medición de la incorporación de BrdU por 12 h. Consistente con la observación directa de la división celular en presencia de 5% SFB, no se observaron diferencias en la incorporación de BrdU en cultivos con un 40% y un 80% de confluencia en condiciones control o en presencia de 1 μM TTX (Figura 4B). A su vez, este análisis también se realizó en el ensayo de lesión de monocapa mediante la detección de la incorporación de BrdU directamente en las CEs del frente de migración y de la monocapa endotelial, lo cual confirmó que el tratamiento con 1 μM TTX no afecta la proliferación de las CEs del frente de migración o de la monocapa endotelial (Figura 4C y D). Por lo tanto, estos resultados en su conjunto indican que los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial, sin afectar la proliferación de las CEs.

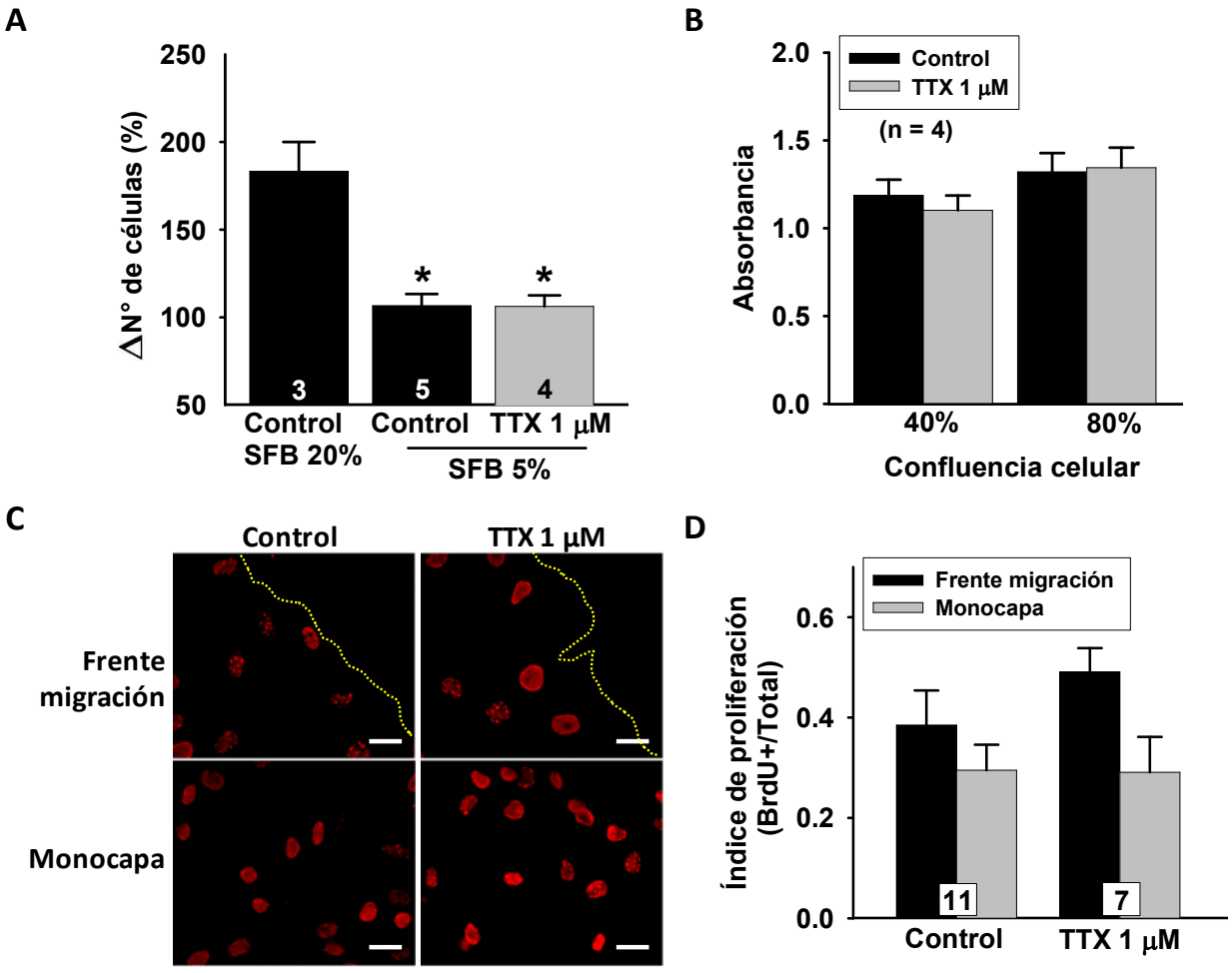


**Figura 4. Los canales $Na_v$ no participan en la proliferación de las células endoteliales. A)** Análisis de la proliferación endotelial de acuerdo a la variación en el número de divisiones celulares observadas en 5 h en presencia de un medio de cultivo suplementado con 20% (20% SFB) o 5% (5% SFB) de suero fetal de bovino. Además, se muestra el efecto del tratamiento con tetrodotoxina (1 μM TTX). **B)** Proliferación endotelial por 12 h de acuerdo al ensayo de incorporación de BrdU en cultivos con un 40% o un 80% de confluencia. **C)** Imágenes representativas de la incorporación BrdU por 12 h en las células del frente de migración y de la monocapa endotelial. En rojo se observa la tinción de los núcleos de las células que incorporaron BrdU y la línea punteada en amarillo denota el borde del frente de migración. **D)** Cuantificación del índice de proliferación como el número de células que incorporan BrdU (BrdU+) respecto al número total de células observado en las imágenes de campo claro de las células del frente de migración y la monocapa en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. El número dentro de las barras indica el valor n. *, $p$<0,01 vs. Control SFB 20%, por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni.

### 1.1. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, participan en la señalización de $Ca^{2+}$ asociada a la migración endotelial.

Considerando que la migración endotelial depende de incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$, se evaluaron los cambios en la señalización de $Ca^{2+}$ utilizando el indicador fluorescente sensible a $Ca^{2+}$, Fluo-4, en el ensayo de lesión de monocapa. En condiciones control se observó que, posterior a la lesión de la monocapa, la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa de forma restringida en las primeras filas de CEs del frente de migración respecto a la monocapa endotelial (Figura 5A y 5B). Para determinar la distribución subcelular de estos incrementos de $Ca^{2+}$ se realizó un análisis más detallado de la señal de Fluo-4 en las CEs del frente de migración y la monocapa endotelial. De esta manera, se analizaron los cambios en los niveles de $Ca^{2+}$ observados desde la parte anterior (más cercana al área lesionada) a la parte posterior de las células. Este análisis mostró que en las CEs de la monocapa endotelial la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene constante entre la parte anterior y posterior, mientras que en las CEs del frente de migración se observó que la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta desde la parte anterior (frente) hacia la parte posterior (Figura 6A-C).

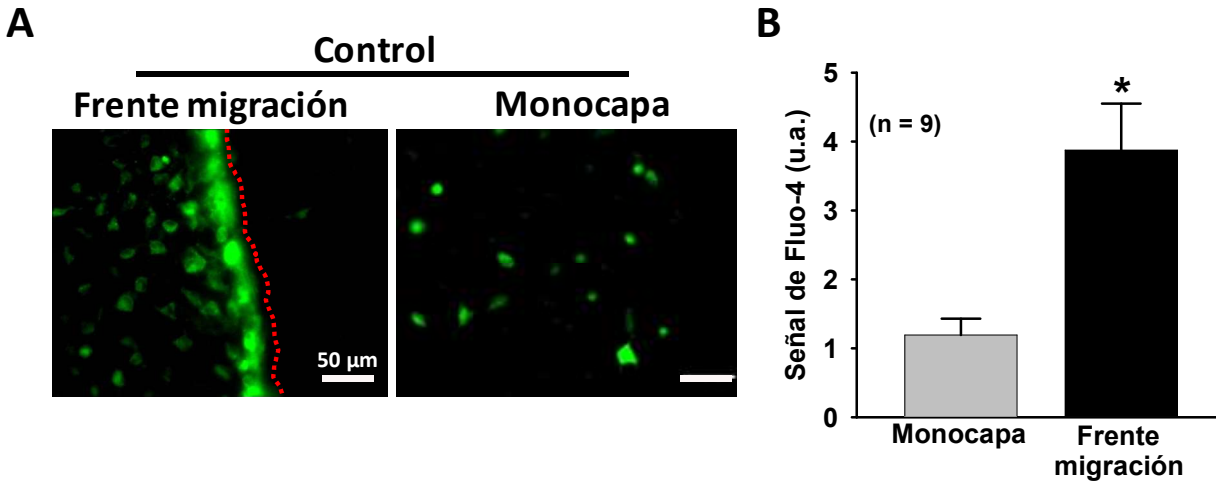


**Figura 5. En las células del frente de migración la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular incrementa durante la migración endotelial. A)** Imágenes representativas de la fluorescencia del indicador de $Ca^{2+}$ Fluo-4 en el frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control. La línea punteada en rojo señala el borde del área lesionada. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 en el frente de migración y la monocapa endotelial (monocapa) en condiciones control. *, $p<0,01$ vs. Monocapa, por la prueba t de Student no pareada.

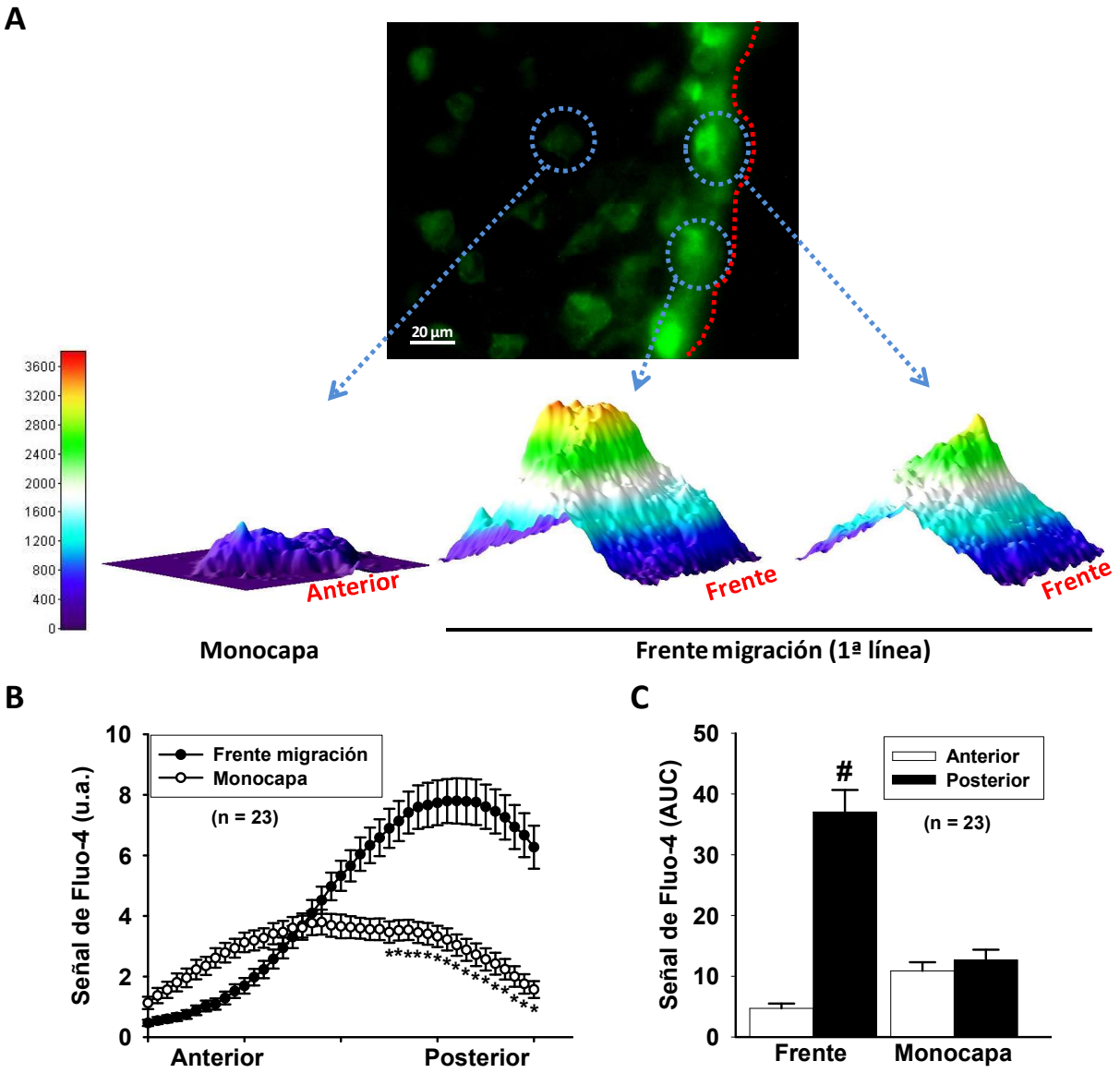


**Figura 6.El incremento de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración ocurre en un gradiente hacia la parte posterior. A)** Imágenes representativas de la señal fluorescente del indicador de $Ca^{2+}$ Fluo-4 y del análisis tridimensional de la intensidad de fluorescencia en las células del frente de migración y de la monocapa endotelial. El círculo azul destaca la célula analizada. La escala de pseudocolores indica la intensidad de fluorescencia observada en los análisis tridimensionales. **B)** Análisis de los cambios en la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje antero-posterior de las células endoteliales del frente de migración y de la monocapa. **C)** Análisis del área bajo la curva (AUC) de los primeros 5 µm del extremo anterior y posterior de los cambios mostrados en (B) de la señal fluorescente observada en las células endoteliales del frente de migración y de la monocapa endotelial. *, $p$<0,05 vs. Frente de migración por ANOVA de dos vías más la prueba post hoc Bonferroni. #, $p$<0,05 vs. Anterior por la prueba t de Student pareada.

A diferencia de lo observado en condiciones control, el tratamiento de las CEs con 1 μM TTX, el inhibidor de los canales $Na_v1.2$, lamotrigina, o el inhibidor de los canales $Na_v1.6$, 4,9-anhidrotetrodotoxina, previno el incremento de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración (Figura 7A). Es importante notar que la magnitud de la inhibición de la señalización de $Ca^{2+}$ fue similar con los tres bloqueadores (Figura 7B), lo cual sugiere que ambas isoformas de canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, participan en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial. Interesantemente, al analizar la distribución de la señal de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración, los resultados muestran que la inhibición de los canales $Na_v$ sensibles a TTX redujo de forma específica el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs mientras que en la parte anterior el $Ca^{2+}$ se mantuvo sin cambios (Figura 7C).

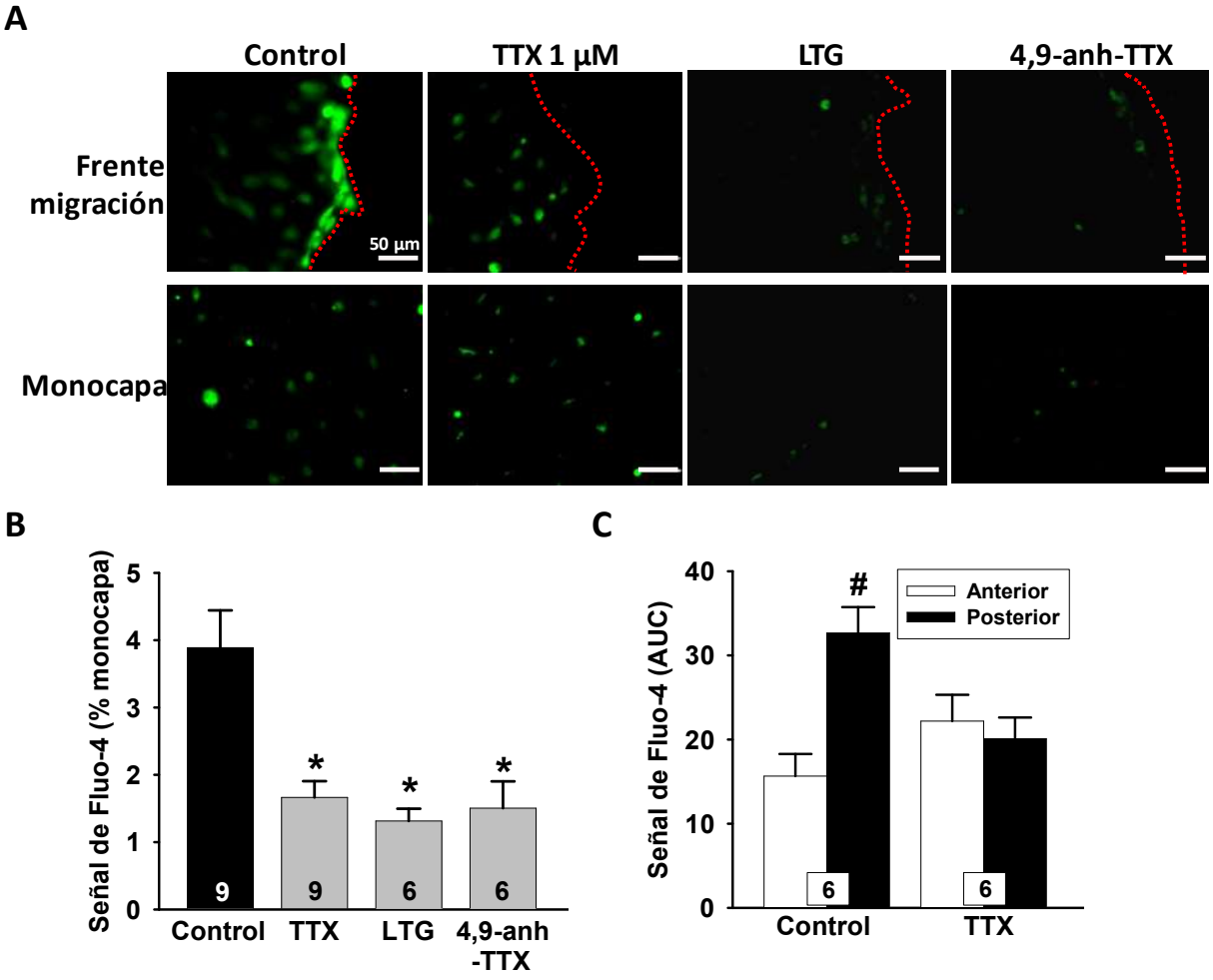


**Figura 7. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en el incremento de la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular en la parte posterior de las células endoteliales del frente de migración. A)** Imágenes representativas del aumento en la señal de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control y después del bloqueo de los canales $Na_v1.2$ con lamotrigina (100 µM LTG) o de la inhibición de los canales $Na_v1.6$ con 4,9-anhidro-tetrodotoxina (500 nM 4,9-anh-TTX). La línea punteada en rojo señala el borde del área lesionada. **B)** Cuantificación del aumento de la intensidad de fluorescencia del indicador sensible a $Ca^{2+}$ Fluo-4 en el frente de migración respecto a la monocapa endotelial en condiciones control y en presencia de TTX, LTG o 4,9-anh-TTX. **C)** Área bajo la curva (AUC) de los cambios observados en los primeros 5 µm del extremo anterior y posterior de la señal fluorescente de Fluo-4 de las células endoteliales del frente de migración en condiciones control y en presencia de TTX. El número dentro de las barras indica el valor de n. *, $p$<0,01 vs. Control por ANOVA de una vía más la prueba post hoc Bonferroni. #, $p$<0,01 vs. Anterior por la prueba t de Student pareada.

Puesto que se ha descrito que la principal proteína estructural de las caveolas, caveolina-1 (cav-1), se redistribuye a la parte posterior de las CEs durante la migración y que las caveolas representan microdominios que compartimentalizan la señalización de $Ca^{2+}$, se analizó por inmunofluorescencia la distribución de cav-1 en conjunto con los canales $Na_v$ sensibles a TTX en el ensayo de lesión de monocapa. Los resultados muestran que cav-1 se distribuye de forma homogénea a lo largo del eje anteroposterior de las CEs de la monocapa endotelial, pero la lesión de la monocapa indujo la redistribución de cav-1 a la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 8A y 8B). Esta redistribución de cav-1 a la parte posterior de las CEs del frente de migración se inhibió en presencia de 1 μM TTX (Figura 8C). De la misma forma, los canales $Na_v1.2$ presentaban una distribución homogénea en el eje anteroposterior de las CEs de la monocapa endotelial y se redistribuyeron a la parte posterior de las CEs del frente de migración posterior a la lesión de la monocapa (Figura 8A y 8D), lo que se inhibió en presencia de 1 μM TTX (Figura 8E). Es importante notar que la superposición de las imágenes de inmunofluorescencia del frente de migración para los canales $Na_v1.2$ y cav-1 sugiere que estas proteínas co-localizan en la parte posterior de las CEs del frente de migración. A su vez, al igual que lo observado para cav-1 (Figura 9A y 9B), los canales $Na_v1.6$ se distribuyeron de forma homogénea en las CEs de la monocapa endotelial. Sin embargo, contrario a lo observado con loscanales $Na_v1.2$, la distribución de los canales $Na_v1.6$ en las CEs del frente de migración se mantuvo homogénea después de realizar la lesión de la monocapa en condiciones control (Figura 9A y 9D) y, consecuentemente, el tratamiento con 1 μM TTX no afectó la distribución de éstos canales (Figura 9E). Interesantemente, la superposición de las imágenes de inmunofluorescencia para los canales $Na_v1.6$ y cav-1 sugiere que estas proteínas presentan un menor grado de colocalización en el frente de migración en

comparación con los canales $Na_v1.2$ y cav-1. A su vez, se observó que en condiciones control las CEs del frente de migración se polarizan, como se evidencia por la localización de los núcleos en la parte posterior de estas células, lo cual no fue afectado por el tratamiento con 1 μM TTX (Figura 8F y 9F).

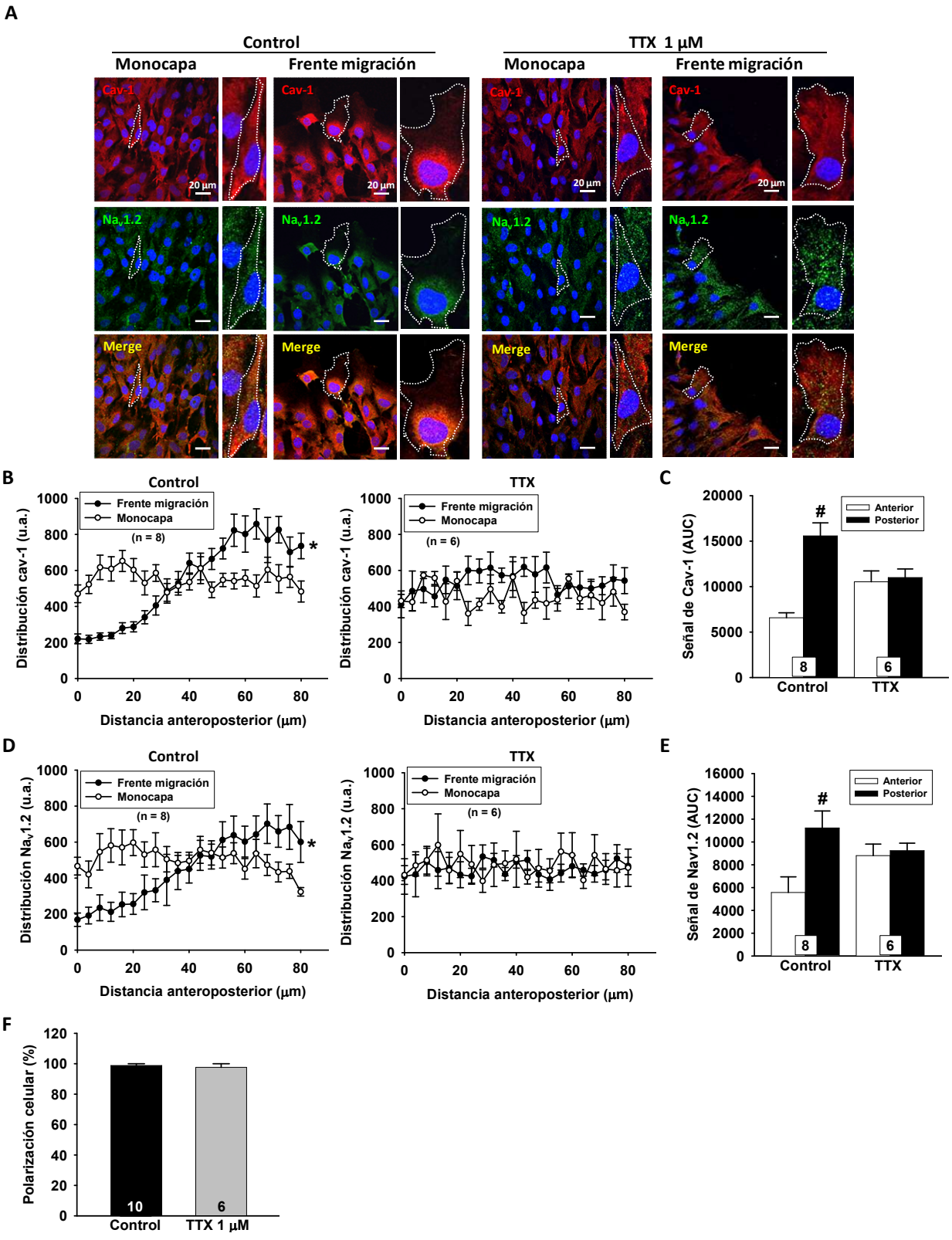
A
Control
TTX 1 µM
Monocapa
Frente migración
Cav-1
Na$_v$1.2
Merge
20 µm
B
Control
TTX
Frente migración
Monocapa
(n = 8)
(n = 6)
Distribución cav-1 (u.a.)
Distancia anteroposterior (µm)
C
Señal de Cav-1 (AUC)
Anterior
Posterior
Control
TTX
D
Distribución Na$_v$1.2 (u.a.)
E
Señal de Nav1.2 (AUC)
F
Polarización celular (%)
Control
TTX 1 µM

**Figura 8. Redistribución de caveolina 1 (cav-1) junto con los canales $Na_v1.2$ en las células endoteliales del frente de migración. A)** Imágenes representativas de la distribución de cav-1 (rojo) y los canales $Na_v1.2$ (verde) en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa 4 h después de realizada la lesión en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. La línea punteada blanca denota el borde celular. **B)** Análisis de la distribución de cav-1 a lo largo del eje antero-posterior de las células del frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. **C)** Área bajo la curva (AUC) de la mitad anterior y posterior de la distribución de cav-1 de las células del frente de migración. D) Análisis de la distribución de los canales $Na_v1.2$ a lo largo del eje antero-posterior de las células del frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. **E)** Área bajo la curva (AUC) de la mitad anterior y posterior de la distribución de los canales $Na_v1.2$ de las células del frente de migración. **F)** Proporción de células del frente de migración que se encuentran polarizadas en condiciones control y después del tratamiento con 1 μM TTX. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p<0,01$ vs. Monocapa por ANOVA de dos vías. #, $p<0,01$ vs. Anterior por la prueba t de Student pareada.

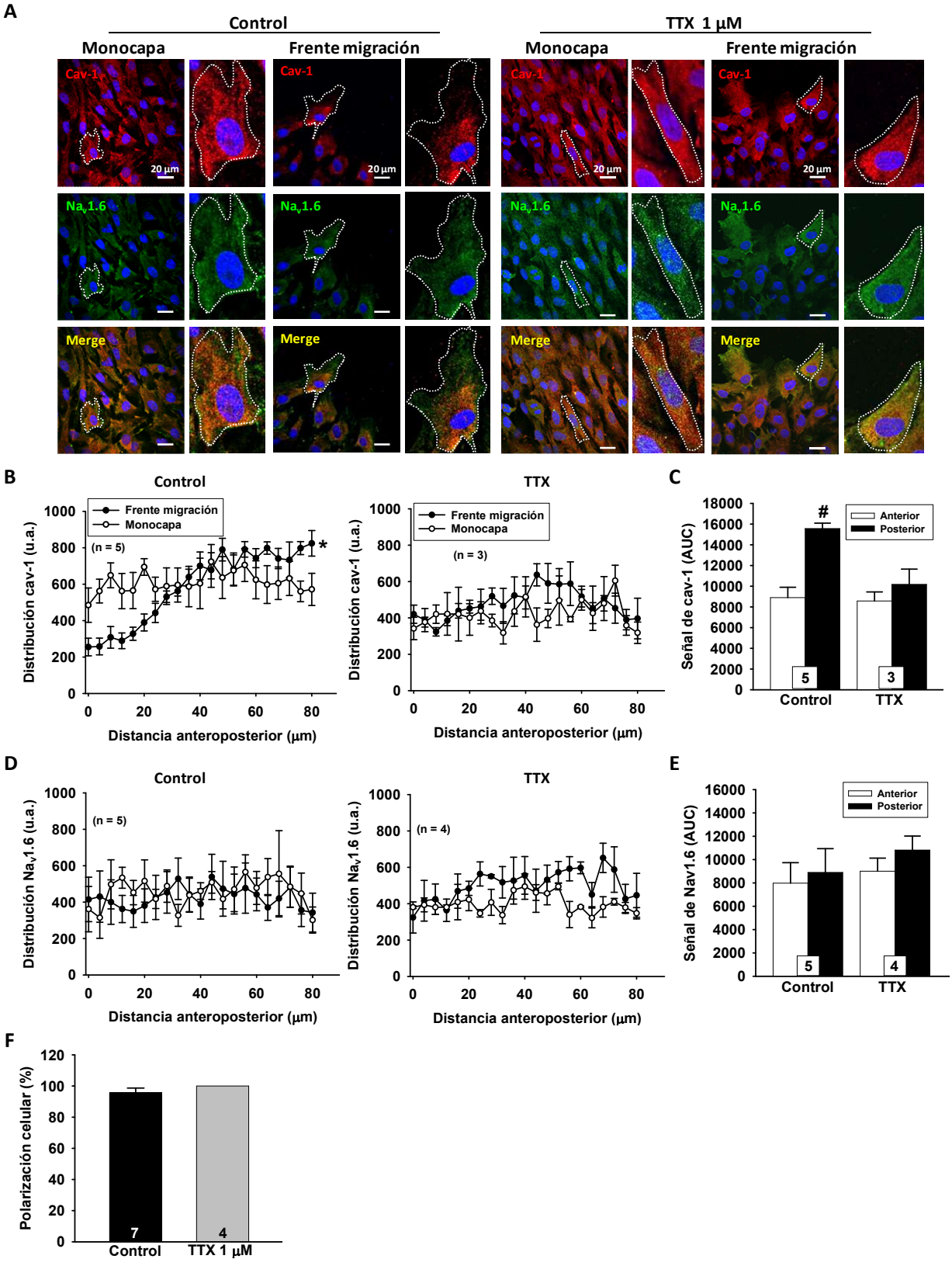
A
Control
TTX 1 µM
Monocapa
Frente migración
Monocapa
Frente migración
Cav-1
Na$_v$1.6
Merge
20 µm
B
Control
TTX
Frente migración
Monocapa
(n = 5)
(n = 3)
Distribución cav-1 (u.a.)
Distancia anteroposterior (µm)
C
Anterior
Posterior
Señal de cav-1 (AUC)
Control
TTX
D
Control
TTX
(n = 5)
(n = 4)
Distribución Na$_v$1.6 (u.a.)
Distancia anteroposterior (µm)
E
Anterior
Posterior
Señal de Nav1.6 (AUC)
Control
TTX
F
Polarización celular (%)
Control
TTX 1 µM

**Figura 9. Redistribución de caveolina 1 (cav-1) y los canales $Na_v1.6$ en las células endoteliales del frente de migración. A)** Imágenes representativas de la distribución de cav-1 (rojo) y los canales $Na_v1.6$ (verde) en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa 4 h después de realizada la lesión en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. La línea punteada blanca denota el borde celular. **B)** Análisis de la distribución de cav-1 a lo largo del eje antero-posterior de las células del frente de migración en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. **C)** Área bajo la curva (AUC) de la mitad anterior y posterior de la distribución de cav-1 de las células del frente de migración. **D)** Análisis de la distribución de los canales $Na_v1.6$ a lo largo del eje antero-posterior de las células del frente de migración en condiciones control y en presencia de 1 μM TTX. **E)** Área bajo la curva (AUC) de la mitad anterior y posterior de la distribución de los canales $Na_v1.6$ de las células del frente de migración. **F)** Proporción de células del frente de migración que se encuentran polarizadas en condiciones control y después del tratamiento con 1 μM TTX. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p<0,01$ vs. Monocapa por ANOVA de dos vías. #, $p<0,01$ vs. Anterior por la prueba t de Student pareada.

Para confirmar la colocalización de cav-1 y los canales Nav1.2 en las CEs del frente de migración, se evaluó la relación espacial de estas proteínas mediante el ensayo de ligación por proximidad. Los resultados obtenidos muestran que los canales $Na_v1.2$, pero no los $Na_v1.6$, se asocian espacialmente con cav-1 (Figura 10A). Esta asociación de los canales $Na_v1.2$ con cav-1 se incrementó en las CEs del frente de migración respecto a la monocapa endotelial a los 15 min posterior a la lesión y este incremento fue aún mayor a las 4 h posterior a la lesión (Figura 10B). Estos antecedentes muestran que la redistribución de los canales $Na_v1.2$ en caveolas en las CEs del frente de migración, pero no de los canales $Na_v1.6$, está involucrada en la señalización de $Ca^{2+}$ que media la migración endotelial y sugiere que estas dos isoformas de canales $Na_v$ participan en la señalización de $Ca^{2+}$ por diferentes mecanismos.

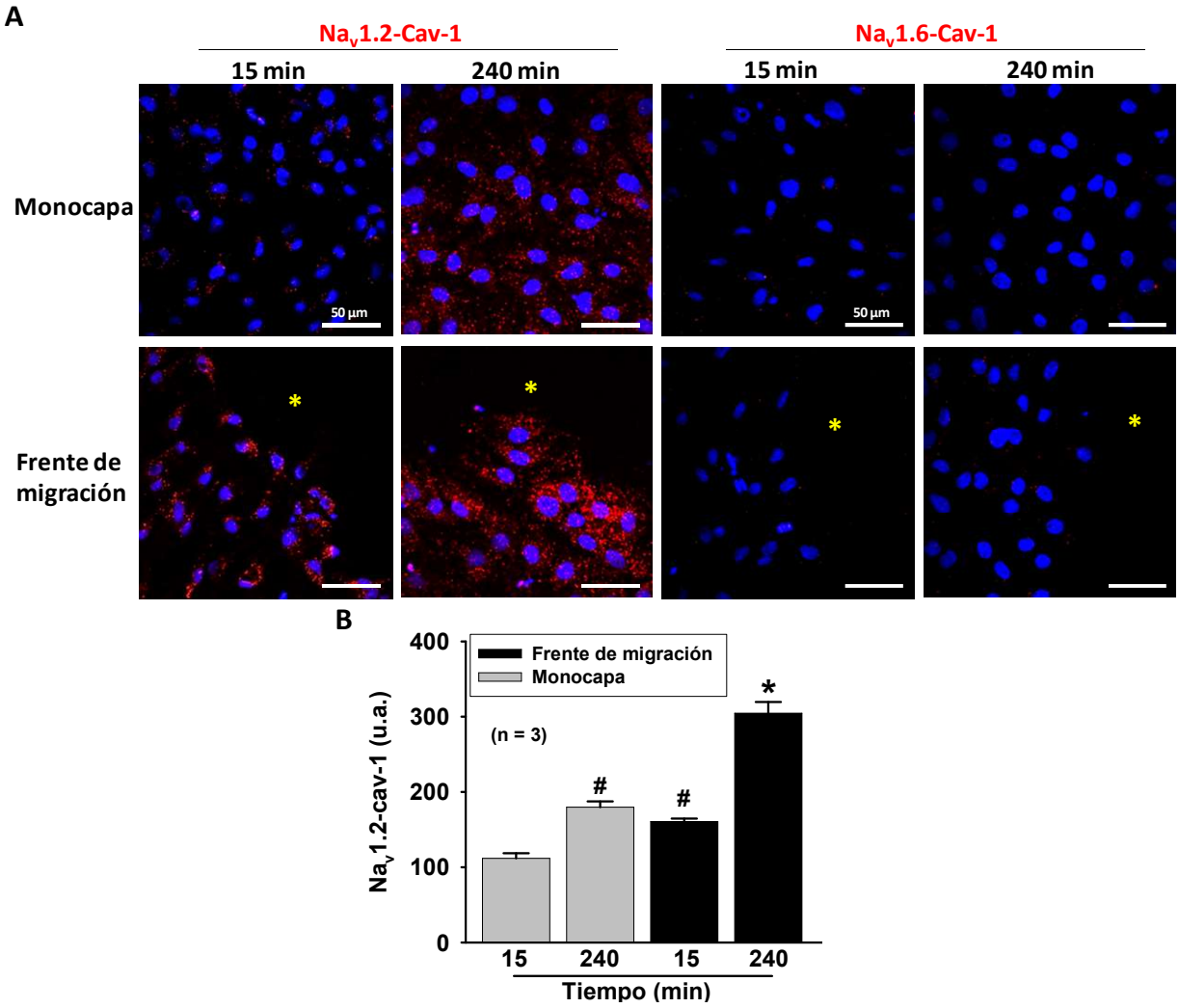


**Figura 10. Asociación espacial de los canales Na$_v$1.2, pero no los Na$_v$1.6, con cav-1 durante la migración de las células endoteliales.** La asociación espacial de los canales Na$_v$1.2 y Na$_v$1.6 con cav-1 se determinó por medio del ensayo de ligación por proximidad a los 15 y 240 min después de realizar la lesión la monocapa endotelial. **A)** Imágenes representativas de la asociación de los canales Na$_v$1.2 y Na$_v$1.6 con cav-1. La señal fluorescente roja denota la asociación espacial entre las proteínas analizadas. **B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia en las células del frente de migración y la monocapa endotelial a los 15 y 240 min posterior a la lesión. *, $p$<0,001 vs. Monocapa a los 15 min por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni. #, $p$<0,05 vs. Monocapa a los 15 min por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni.

Consistente con la compartimentalización de la señalización de $Ca^{2+}$ en microdominios específicos de las células endoteliales, la desorganización de las balsas lipídicas por medio del

tratamiento con metil-β-ciclodextrina eliminó el incremento de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración (Figura 11A y B) y redujo significativamente la migración endotelial a las 15 h posterior a la lesión de la monocapa (Figura 11C y D). Esto confirma que la restricción de la señalización a dominios subcelulares específicos como las caveolas es necesaria para la migración endotelial.

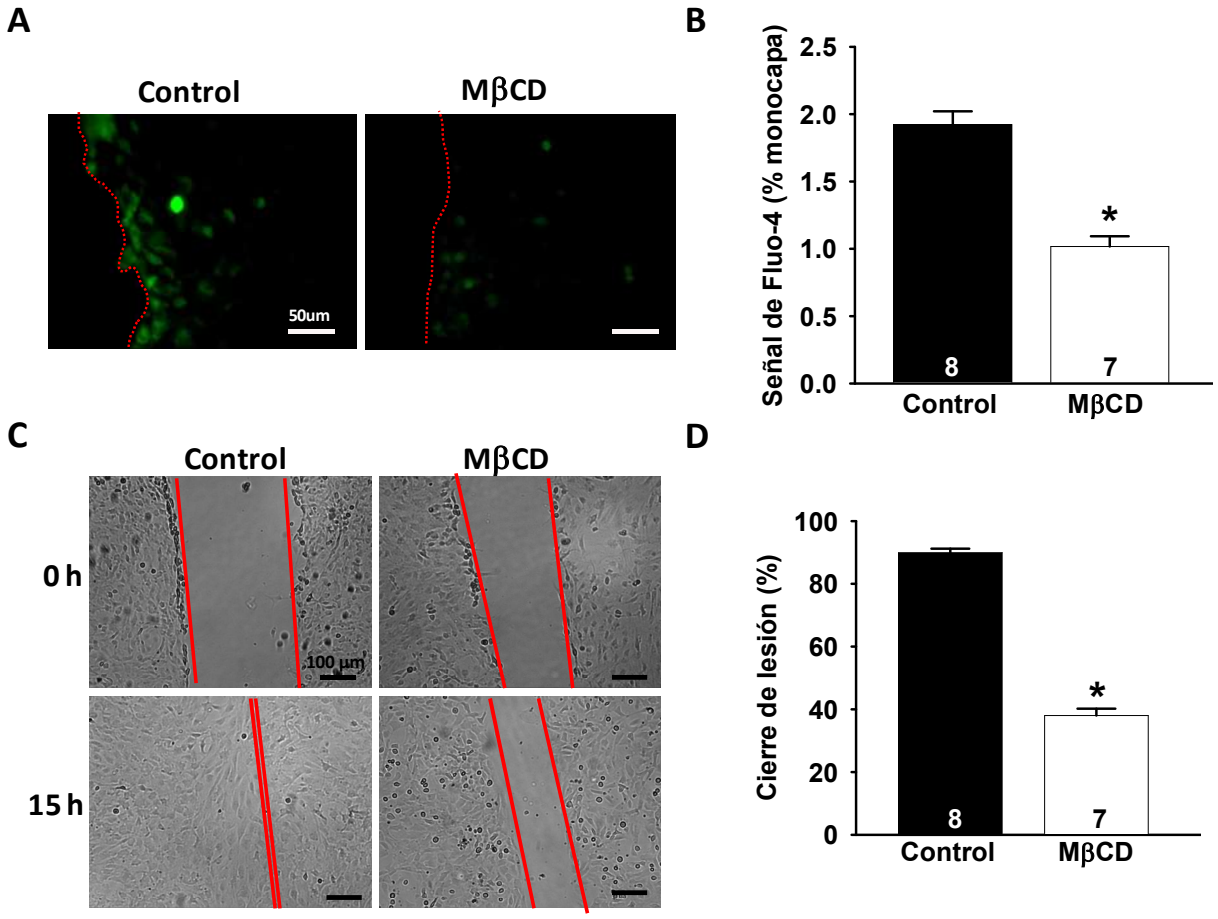


**Figura 11. La señal de $Ca^{2+}$ asociada a la migración de las células endoteliales depende de la presencia de microdominios como las balsas lipídicas. A)** Imágenes representativas del incremento de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración en condiciones control y después de la desorganización de las balsas lipídicas por medio del tratamiento con 5 mM metil-β-ciclodextrina (MβCD). **B)** Análisis del aumento en la intensidad de fluorescencia del indicador de $Ca^{2+}$ Fluo-4 en el frente de migración respecto a la monocapa endotelial. **C)** Imágenes representativas de la migración endotelial observada a las 15 h en condiciones control y después del tratamiento con 5 mM metil-β-ciclodextrina. La línea roja destaca la ubicación relativa del borde de la lesión de la monocapa, y se muestra sólo como una

referencia pero no se utilizó para el análisis estadístico. **D)** Cuantificación del porcentaje de cierre de la lesión. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,001 vs. Control por la prueba t de Student no pareada.

## 1.2. El modo reverso del intercambiador NCX participa en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial.

Un posible mecanismo por el cual los canales $Na_v$ sensibles a TTX podrían inducir un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la migración endotelial es la activación de canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje ($Ca_v$). Si bien se corroboró la expresión de los canales $Ca_v$ tipo T de la isoforma $Ca_v3.2$ en los cultivos de CEs mesentéricas (Figura 12A), la inhibición de estos canales con bajas concentraciones de $Ni^{2+}$ (10 µM) no redujo el cierre de la lesión de la monocapa endotelial a las 15 h (Figura 12B y 12C), lo que indica que los canales $Ca_v3.2$ no participan en la migración endotelial.

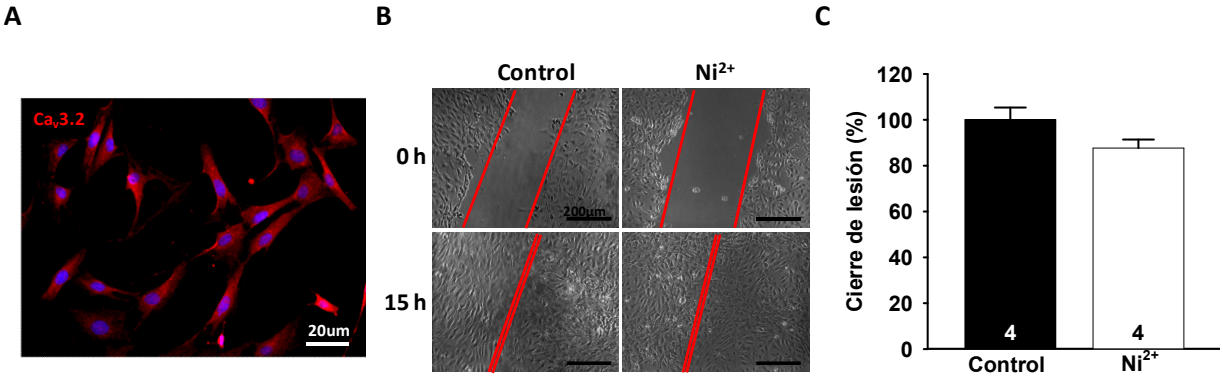


**Figura 12. Los canales $Ca_v3.2$ no participan en la migración endotelial. A)** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de los canales $Ca_v3.2$ en cultivos primarios de células endoteliales mesentéricas. **B)** Imágenes representativas del ensayo de lesión de monocapa en condiciones control y en presencia de Níquel (10 µM $Ni^{2+}$). La línea roja destaca la ubicación relativa del borde de la lesión de la monocapa, y se muestra sólo como una referencia pero no

se utilizó para el análisis estadístico. **C)** Cuantificación de la migración endotelial en ausencia y presencia de $Ni^{2+}$. Los números dentro de las barras indican el valor de n.

Otro posible mecanismo que podría mediar la señalización de $Ca^{2+}$ asociada a los canales $Na_v$ es la activación del modo reverso del NCX. Al evaluar la señal de $Ca^{2+}$ durante la lesión de la monocapa endotelial se observó que el tratamiento con el inhibidor del modo reverso del NCX, SEA0400 (1 μM) redujo el incremento de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración (Figura 13A y 13B). Interesantemente, al igual que lo observado con TTX, el tratamiento con SEA0400 redujo el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 13C), lo que sugiere que la entrada de $Na^{+}$ a través de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la parte posterior de las células del frente de migración gatilla una señalización de $Ca^{2+}$ mediada por la activación del modo reverso del NCX.

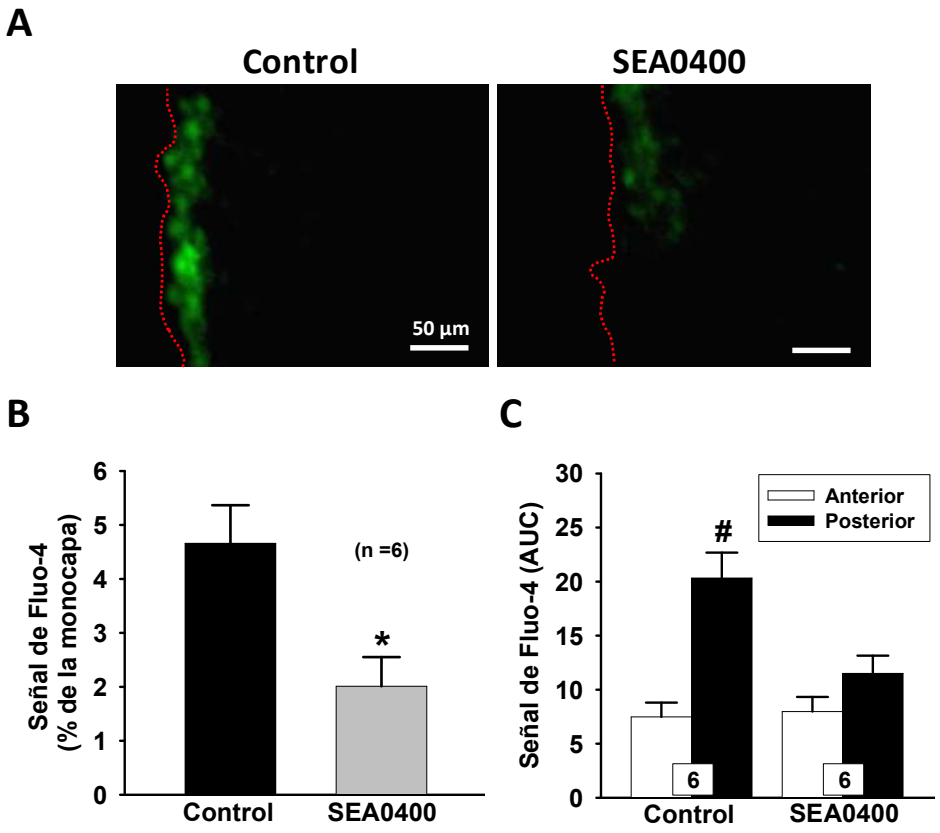


**Figura 13. El incremento de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración depende de la activación del modo reverso del intercambiador $Na^{+}$-$Ca2^{+}$ (NCX). A)** Imágenes representativas del aumento de $Ca^{2+}$ observado en el frente de migración de las células endoteliales en condiciones control y durante la inhibición del modo reverso del NCX con 1 µM SEA0400. **B)** Cuantificación del incremento de $Ca^{2+}$ en las células del frente de migración respecto a la monocapa en ausencia y presencia de SEA0400. **C)** Área bajo la curva (AUC) de los cambios observados en los primeros 5 µm del extremo anterior y posterior de la señal fluorescente de Fluo-4 de las células endoteliales del frente de migración en condiciones control y en presencia de 1 µM SEA0400. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,05 vs. Control por la prueba t de Student no pareada. #, $p$<0,05 vs. Anterior, por la prueba t de Student pareada.

### 1.3. Los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la angiogénesis.

Como los resultados indican que los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial se evaluó si estos canales están involucrados en la formación de estructuras tubulares, la cual es una de las etapas claves en la angiogénesis junto con la migración endotelial. Los resultados obtenidos muestran un aumento progresivo en la formación de estructuras tubulares a las 6 h y a las 12 h en condiciones control, lo cual fue drásticamente inhibido en presencia de 1 µM TTX (Figura 14A y B).

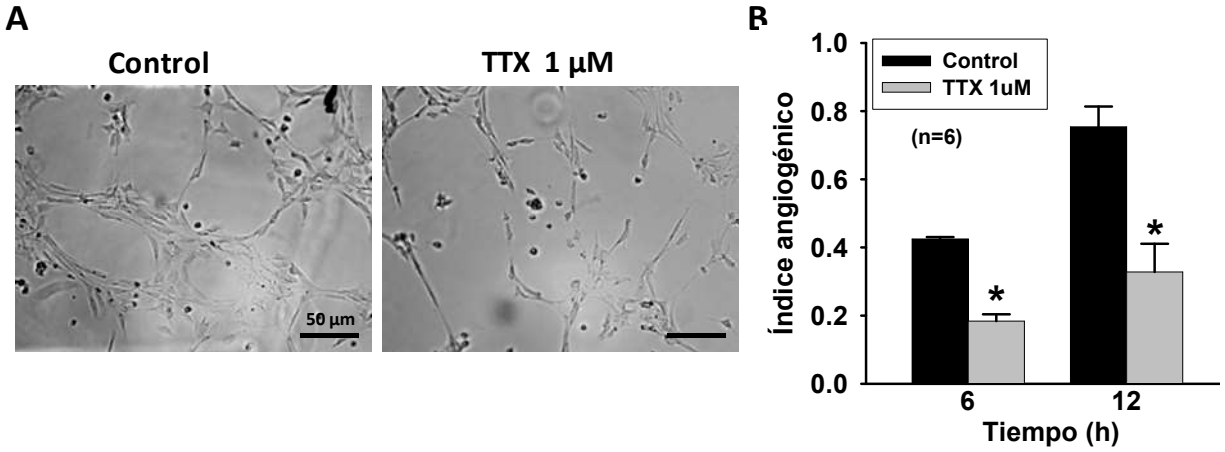


**Figura 14. Los canales de $Na_v$ sensibles a TTX participan en la formación de estructuras tubulares *in vitro*. A)** Imágenes representativas de la formación de estructuras tubulares en matrigel después de 12 h en condiciones control o en presencia de 1 µM TTX. **B)** Cuantificación de la formación de estructuras tubulares después de 6 h y 12 h por medio del cálculo del índice angiogénico en condiciones control y en presencia de 1 µM TTX. * $p$<0,01 vs. Control por la prueba t de Student no pareada.

Consistente con la participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la formación de estructuras tubulares *in vitro*, la incubación de embriones de peces cebra con 1 µM TTX resultó en una reducción en la longitud de los vasos sanguíneos intersegmentales (ISV)

(Figura 15A y 15B), sugiriendo que los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la angiogénesis.

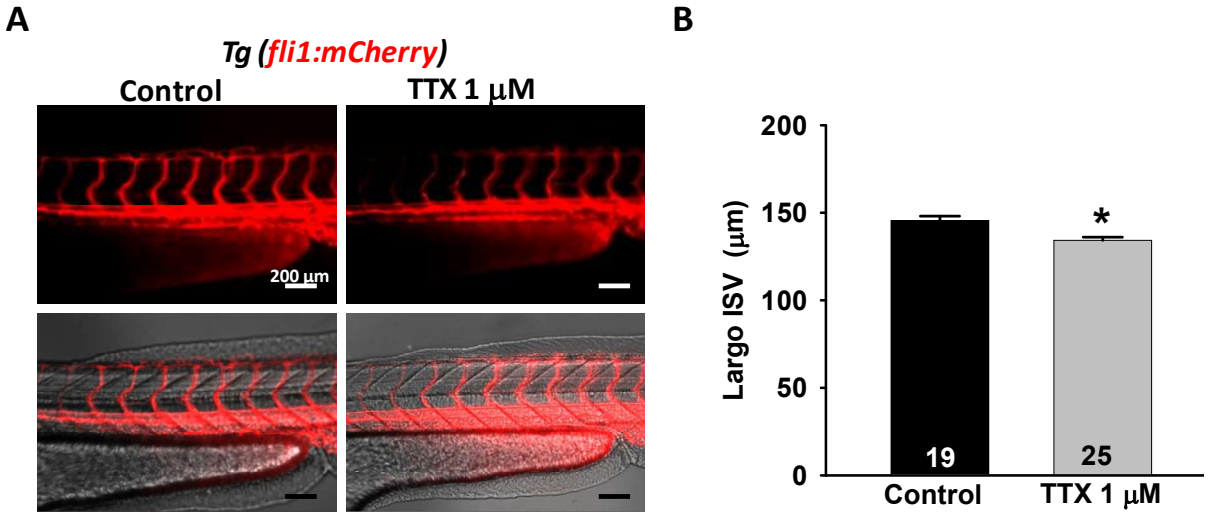


**Figura 15. Los canales de $Na_v$ sensibles a TTX participan en la formación de los vasos sanguíneos. A)** Imágenes representativas de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales (ISV, en rojo) a las 48 horas post-fertilización (hpf) en la porción media (vista lateral) de embriones de peces cebra *Tg(fli1-mCherry)*. **B)** Análisis del largo de los ISV en los embriones de peces cebra mostrados en (A). Todas las imágenes analizadas corresponden a la región media de los embriones. El tratamiento con TTX se realizó entre las 24 y 48 hpf. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,001 vs. Control por la prueba t de Student no pareada.

## 2. Durante la migración endotelial las CEs del frente de migración se mantienen acopladas a través de GJs.

La migración endotelial es un proceso coordinado y uno de los mecanismos que participan en la coordinación de la función celular es la comunicación a través de GJs formados por conexinas, por lo que se estudió la variaciones en el acoplamiento a través de

GJs durante la migración endotelial. En condiciones control (monocapa sin lesionar), se observó que posterior a la microinyección de etidio a una célula única, el colorante difundió rápidamente a las células vecinas, lo que indica que estas células se encuentran acopladas a través de GJs. Posterior a la lesión de la monocapa se observó que el acoplamiento a través de GJs se mantuvo en las células del frente de migración; sin embargo, en estas condiciones, las células de la monocapa endotelial se desacoplaron entre sí y de las CEs del frente de migración (Figura 16A a 16C).

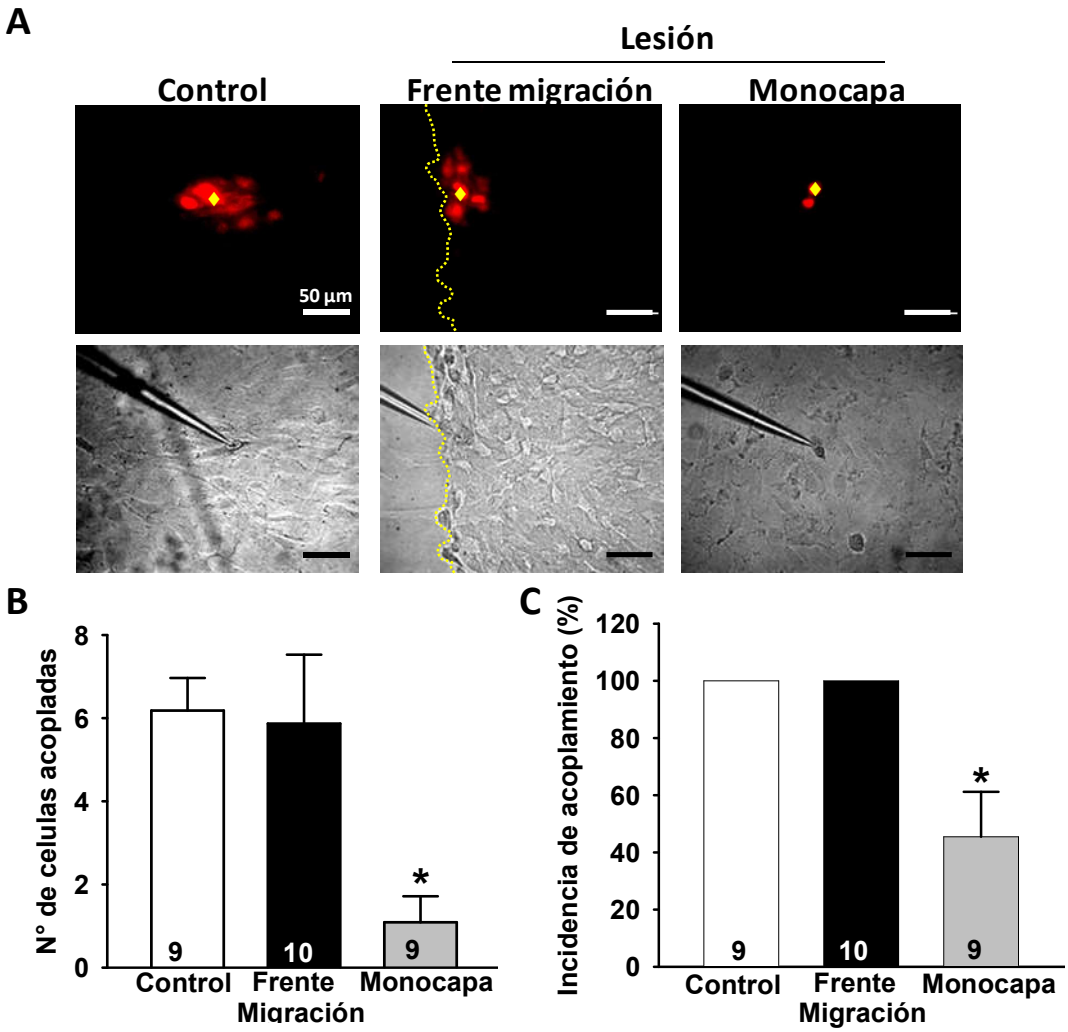


**Figura 16. Acoplamiento vía uniones comunicantes de las células endoteliales en el frente de migración y la monocapa celular. A)** Imágenes representativas de la difusión intercelular

de etidio por 2 min desde una célula microinyectada en el cultivo de células endoteliales mesentéricas (Control) o en el frente de migración y la monocapa celular después de iniciado el ensayo de lesión de monocapa. El rombo amarillo indica la célula microinyectada y la línea punteada amarilla demarca el borde del frente de migración. **B)** Número de células que evidencian la señal de etidio 2 min después de la microinyección del colorante en una célula endotelial. **C)** Análisis de la incidencia de acoplamiento intercelular manifestado por la difusión del colorante etidio a más de dos células adyacentes a la célula microinyectada. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p<0,05$ vs. Control por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni.

Si bien a la fecha se desconocen los mecanismos que median la reducción de la comunicación a través de GJs observada en la monocapa endotelial después de realizar la lesión, una posibilidad es la participación de una vía purinérgica, pues la lesión mecánica de las CEs induce la liberación de ATP (Yin *et al.*, 2007) y, en otros tipos celulares, se ha observado que ATP inhibe el acoplamiento a través de GJ (Zhu y Zhao, 2012). Al evaluar el acoplamiento de las células endoteliales en la monocapa intacta se observó que la difusión intercelular del colorante fue similar entre el control y el tratamiento con 1 μM ATP, tanto en el número de células acopladas (Figura 17A y 17B) como en la incidencia de acoplamiento (Figura 17C). Consistente con ello, el tratamiento por 10 min con el inhibidor de los receptores purinérgicos P2, 100 μM PPADS, no previno la reducción en el número de células acopladas y de la incidencia del acoplamiento observado en la monocapa después de realizar la lesión (Figura 17D a 17F). Esto indica que el desacoplamiento de las CEs de la monocapa entre sí y de las CEs del frente de migración observado posterior a la lesión no está mediado por la activación de una vía purinérgica.

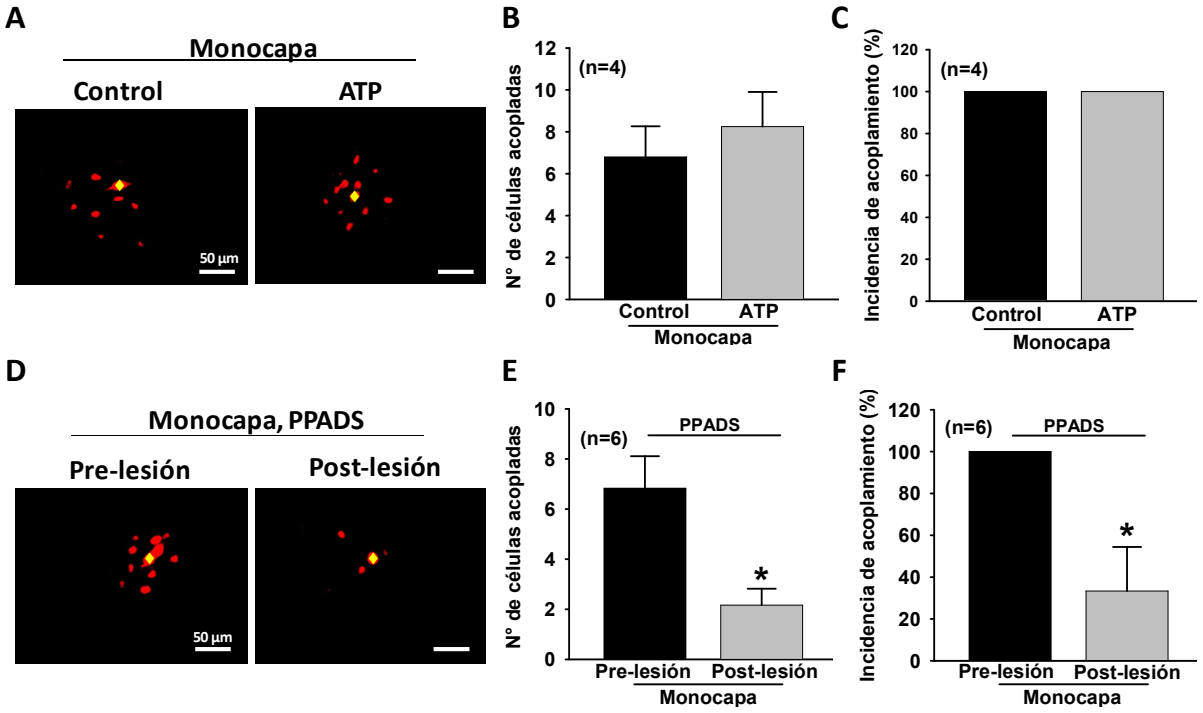


**Figura 17. La señalización purinérgica no participa en la reducción de la comunicación a través de uniones comunicantes en la monocapa endotelial posterior a la lesión. A)** Imágenes representativas de la difusión intercelular de etidio desde una célula microinyectada en el cultivo de células endoteliales mesentéricas en condiciones control o en presencia de 1 µM ATP. **B)** Número de células que evidencian la señal de etidio después de la microinyección del colorante en una célula endotelial en condiciones control y en presencia de 1 µM ATP. **C)** Análisis de la incidencia de acoplamiento intercelular en ausencia (Control) y presencia de 1 µM ATP. La difusión de etidio se evaluó 2 min después de su microinyección en una célula endotelial. **D)** Imágenes representativas de la difusión intercelular de etidio desde una célula microinyectada en el cultivo de células endoteliales mesentéricas antes y después de realizar la lesión de la monocapa. El tratamiento 100 µM PPADS se inició 10 min previo a realizar la lesión. **E)** Número de células que evidencian la señal de etidio después de la microinyección del colorante en una célula endotelial en presencia de 100 µM PPADS antes (pre-lesión) y después de realizar la lesión (post-lesión) de la monocapa endotelial. **F)** Análisis de la incidencia de acoplamiento intercelular de acuerdo a la difusión del colorante etidio a más de dos células adyacentes a la microinyectada en presencia de 100 µM PPADS antes y después de lesionar la monocapa. El rombo amarillo indica la célula microinyectada. *, $p<0,01$ vs. Pre-lesión por la prueba t de Student pareada.

## 3. La apertura de hemicanales formados por Cx43 participa en señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis.

### 3.1. Los hemicanales de Cx43 participan en la migración endotelial.

Las conexinas no sólo forman uniones comunicantes entre las células, sino además hemicanales, lo cuales son permeables a $Ca^{2+}$. Por lo tanto, se evaluó la apertura de hemicanales durante la migración endotelial mediante la medición de la captación de colorante. Interesantemente, al lesionar la monocapa endotelial se observó un incremento en la apertura de hemicanales de Cxs en las CEs del frente de migración respecto a la monocapa endotelial en condiciones control (Figura18A y 18B). A su vez, se observó que el tratamiento por 15 min con el péptido $^{37,43}$Gap27, que inhibe los canales formados por Cx37 y/o Cx43 o con el péptido Gap19, que inhibe específicamente los hemicanales formados por Cx43, redujo la captación de etidio (Figura 18A y 18C), indicando que los hemicanales formados por Cx43 se abren en las CEs del frente de migración durante la migración endotelial.

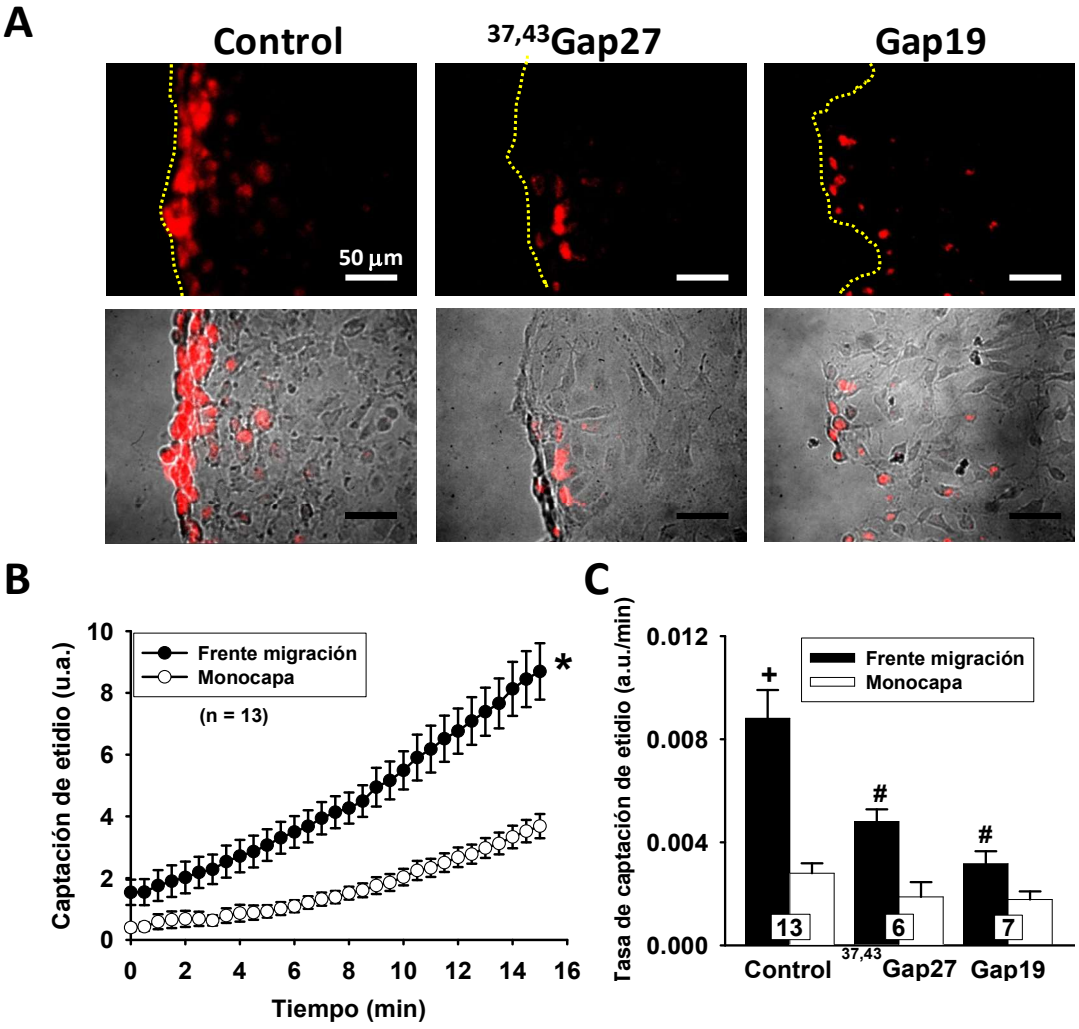


**Figura 18. Activación de hemicanales formados por Cx43 en el frente de migración. A)** Imágenes representativas de la captación de etidio observada 15 min después de iniciado el ensayo de lesión de la monocapa endotelial en condiciones control o en presencia del péptido bloqueador de canales formados por Cx37 y Cx43, 200 µM $^{37,43}$Gap27 o el péptido inhibidor de hemicanales formados Cx43, 300 µM Gap19. **B)** Curso temporal del aumento de la captación de etidio en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control. **C)** Análisis de la tasa de captación de etidio observada en el frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control o en presencia de $^{37,43}$Gap27 o Gap19. La tasa de captación corresponde a la pendiente de la curva mostrada en B. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,001 vs. Monocapa por ANOVA de dos vías. +, $p$<0,001 vs. Monocapa en condiciones Control por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni. #, $p$<0,001 vs. Frente de migración en condiciones Control por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni.

Para determinar si la apertura de los hemicanales de Cx43 observada en las CEs del frente de migración es relevante para la migración endotelial, se evaluó el efecto del inhibidor general de conexinas, β-GA, y el péptido Gap19 en el ensayo de lesión de monocapa. Los resultados muestran que el tratamiento con β-GA o Gap19 produjo una reducción en el cierre de la lesión endotelial (Figura 19A y 19B). Es importante notar que la inhibición de la migración endotelial en presencia de cada uno de estos inhibidores fue similar en magnitud, lo que apoya la participación de los hemicanales formados por Cx43 en la migración endotelial.

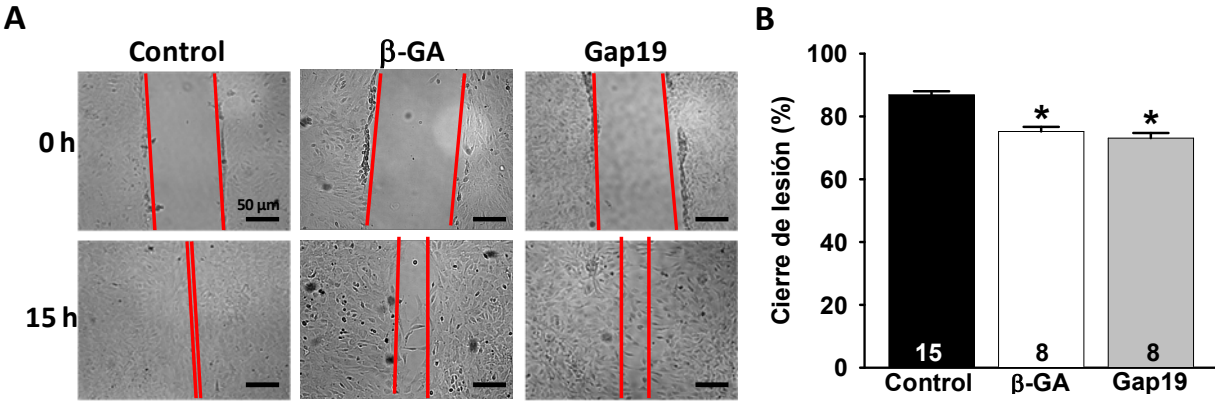


**Figura 19. La inhibición de los hemicanales formados por Cx43 reduce la migración endotelial. A)** Imágenes representativas del avance observado en 15 h de la migración endotelial en el ensayo de lesión de monocapa en condiciones control o en presencia del inhibidor general de canales formados por Cxs, 50 µM ácido β-glicirretínico (β-GA) o el péptido inhibidor de hemicanales formados por Cx43, 300 µM Gap19. La línea roja destaca la ubicación relativa del borde de la lesión de la monocapa, y se muestra sólo como una referencia pero no se utilizó para el análisis estadístico. **B)** Cuantificación del cierre de la lesión en ausencia (Control) y presencia de β-GA o Gap19. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,001 vs. Control por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni.

Por otra parte, al evaluar la participación de los hemicanales formados por Cx43 en la proliferación endotelial a través de la medición de la incorporación de BrdU en cultivos de CEs con un grado de confluencia de 40% y 80% se observó que el péptido inhibidor de hemicanales de Cx43, Gap19 no disminuyó la proliferación endotelial (Figura 20A). Consistente con esto, al evaluar la incorporación de BrdU por las CEs en el ensayo de lesión de la monocapa, se observó que el tratamiento con Gap19 no redujo la proliferación endotelial en el frente de migración o en la monocapa respecto al control (Figura 20B a 20C), lo cual indica que la apertura de hemicanales formados por Cx43 en las células del frente de migración es necesaria para la migración, pero no para la proliferación de las CEs.

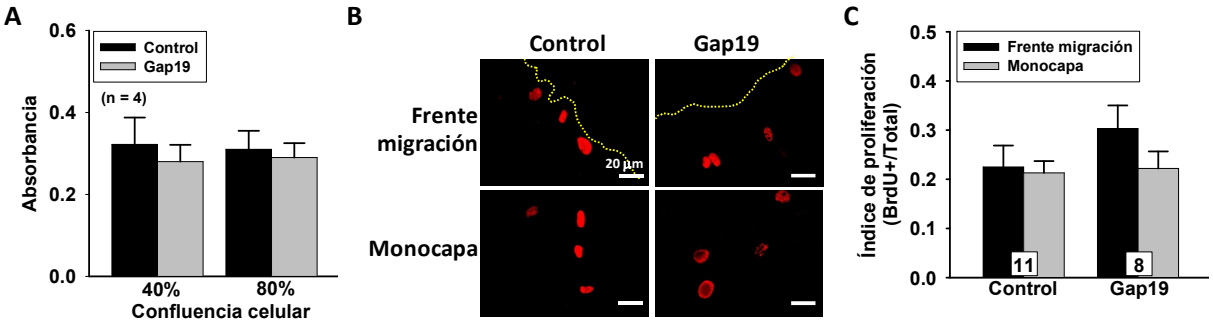


**Figura 20. El efecto de los hemicanales formados por Cx43 en la migración es independiente de la proliferación de las células endoteliales. A)** Análisis de la proliferación endotelial por 12 h de acuerdo al ensayo de incorporación de BrdU en cultivos con un 40% o un 80% de confluencia en condiciones control o en presencia de 300 µM Gap19. **B)** Imágenes representativas de la incorporación de BrdU por 12 h en las células del frente de migración y de la monocapa endotelial. En rojo se observa la tinción de los núcleos de las células que incorporaron BrdU y la línea punteada en amarillo denota el borde del frente de migración. **C)** Análisis de la incorporación de BrdU en las células del frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control y en presencia de 300 µM Gap19. Los números dentro de las barras indican el valor n.

### 3.2. La redistribución de la Cx43 se asocia con la señalización de $Ca^{2+}$ que media la migración endotelial.

En vista que los resultados indican que los hemicanales formados por Cx43 participan en la migración endotelial, se evaluó si la apertura de estos canales en las CEs contribuye a la señalización de $Ca^{2+}$ observada en el frente de migración. Como fue previamente evidenciado, posterior a realizar la lesión de la monocapa se observó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las CEs del frente de migración en condiciones control. La aplicación por 15 min de β-GA o $^{37,43}$Gap27 redujo significativamente el incremento de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración (Figura 21A y 21B). Al analizar la señal de $Ca^{2+}$ que se genera en las CEs del frente de migración, se observó que el tratamiento con β-GA o $^{37,43}$Gap27 inhibió el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 21C), lo cual sugiere que la apertura de los hemicanales formados por Cx43 contribuye al incremento de la señalización de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs durante la migración.

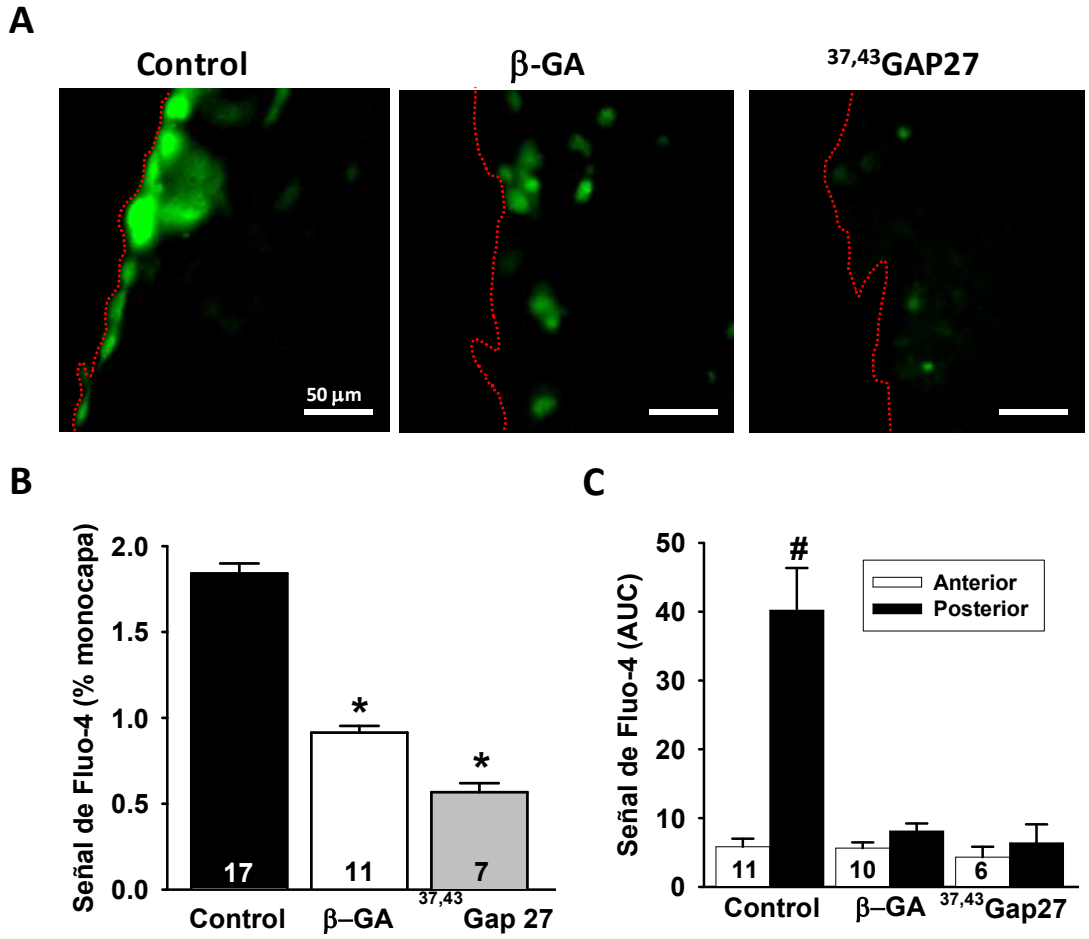


**Figura 21. La apertura de los hemicanales formados por Cx43 participa en el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las células endoteliales del frente de migración. A)** Imágenes representativas del aumento en la señal de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales del frente de migración en condiciones control y después del bloqueo de canales formados por conexinas (Cx) con 50 µM ácido β-glicirretínico (βGA) o de la inhibición de los hemicanales formados por Cx37 y/o Cx43 mediante la aplicación por 15 min de 200 µM $^{37,43}$Gap27. La línea punteada en rojo señala el borde del área lesionada. **B)** Análisis del aumento en la intensidad de fluorescencia del indicador de $Ca^{2+}$ Fluo-4 en el frente de migración respecto a la monocapa endotelial. C) Área bajo la curva (AUC) de los cambios observados en los primeros 5 µm del extremo anterior y posterior de la señal fluorescente de Fluo-4 de las células endoteliales del frente de migración en condiciones control y en presencia de βGA o $^{37,43}$Gap27. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,001 vs. Control por ANOVA de una vía más la prueba *post hoc* Bonferroni. #, $p$<0,001 vs. Anterior por la prueba t de Student pareada.

Considerando la compartimentalización de la señalización de $Ca^{2+}$ en microdominios específicos de las CEs del frente de migración, se evaluó la distribución de Cx43 en conjunto con cav-1. Los resultados obtenidos muestran que Cx43 se distribuyó de forma homogénea en las CEs de la monocapa en condiciones control y que la lesión de la monocapa indujo su redistribución a la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 22A y 22D) al igual que lo observado para cav-1 (Figura 22A y 22B). Es interesante notar que al igual que lo observado con los canales $Na_v1.2$, la superposición de las imágenes de inmunofluorescencia del frente de migración para Cx43 y cav-1 es consistente con la colocalización de ambas proteínas en la parte posterior de las CEs del frente de migración. A su vez, se observó que el tratamiento con Gap 19 inhibió la redistribución de cav-1 (Figura 22C) y de Cx43 (Figura 22E) en las CEs del frente de migración. Sumado a los resultados anteriores esto indica que la apertura de hemicanales formados por Cx43, posiblemente en caveolas, participa en el incremento de la señalización de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración.

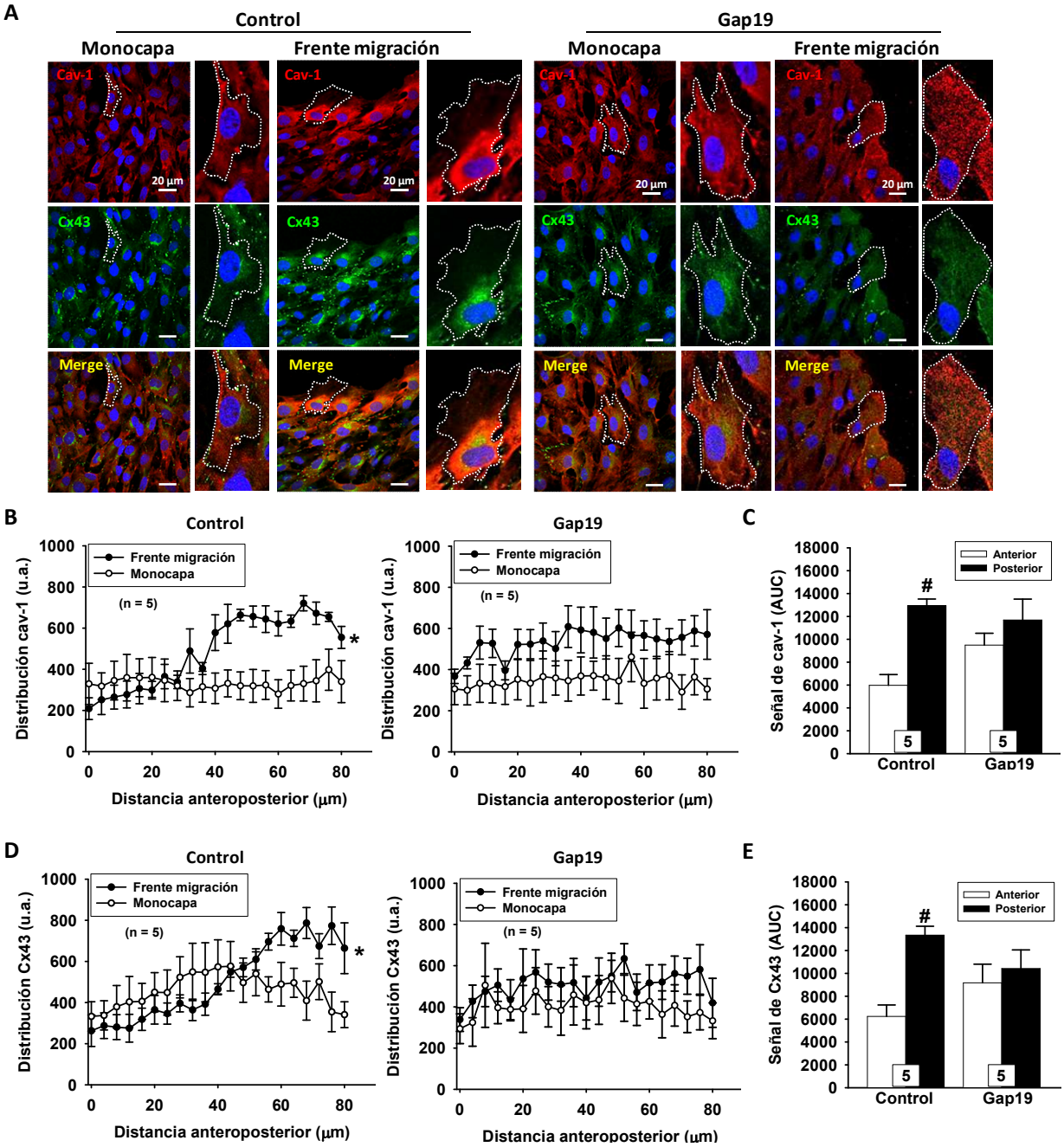


**Figura 22. Redistribución de caveolina 1 (cav-1) junto con Cx43 en las células endoteliales del frente de migración. A)** Imágenes representativas de la distribución de cav-1 (rojo) y Cx43 (verde) en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa 4 h después de realizada la lesión en condiciones control y en presencia de 300 µM Gap19. La línea punteada en blanco delimita el borde celular. **B)** Análisis de la distribución de cav-1 a lo largo del eje antero-posterior de las células del frente de migración y la monocapa endotelial en condiciones control y en presencia de 300 µM Gap19. **C)** Área bajo la curva (AUC) de la mitad anterior y posterior de la distribución de cav-1 en las células del frente de migración. **D)**

Análisis de la distribución de Cx43 a lo largo del eje antero-posterior de las células del frente de migración y de la monocapa endotelial en condiciones control y en presencia de 300 μM Gap19. **E)** Área bajo la curva (AUC) de la mitad anterior y posterior de la distribución de Cx43 en las células del frente de migración. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p<0,05$ vs. Monocapa, por ANOVA de dos vías. #, $p<0,05$ vs. Anterior por la prueba t de Student pareada.

### 3.3. La S-nitrosilación de Cx43 es un potencial mecanismo de apertura de los hemicanales formados por esta Cx en las CEs del frente de migración.

La S-nitrosilación de Cx43 ha sido descrita como uno de los mecanismos que media la apertura de hemicanales formados por esta Cx. Por lo tanto, se analizó la captación de etidio en presencia del inhibidor de la eNOS, L-NA, o el agente reductor, ácido ascórbico (AA). Los resultados muestran que la inhibición de la producción de NO o el tratamiento con AA redujeron en similar magnitud la apertura de HCs formados por Cxs en las CEs del frente de migración (Figura 23A y 23B). Consistente con esto, el tratamiento con L-NA o AA también inhibió la migración endotelial en el ensayo de lesión de la monocapa (Figura 23C y 23D). Es importante destacar que la inhibición de la captación de etidio y de la migración endotelial observada en presencia de estos tratamientos, fue similar en magnitud a lo observado con el inhibidor de los HCs formados por Cx43, Gap19.

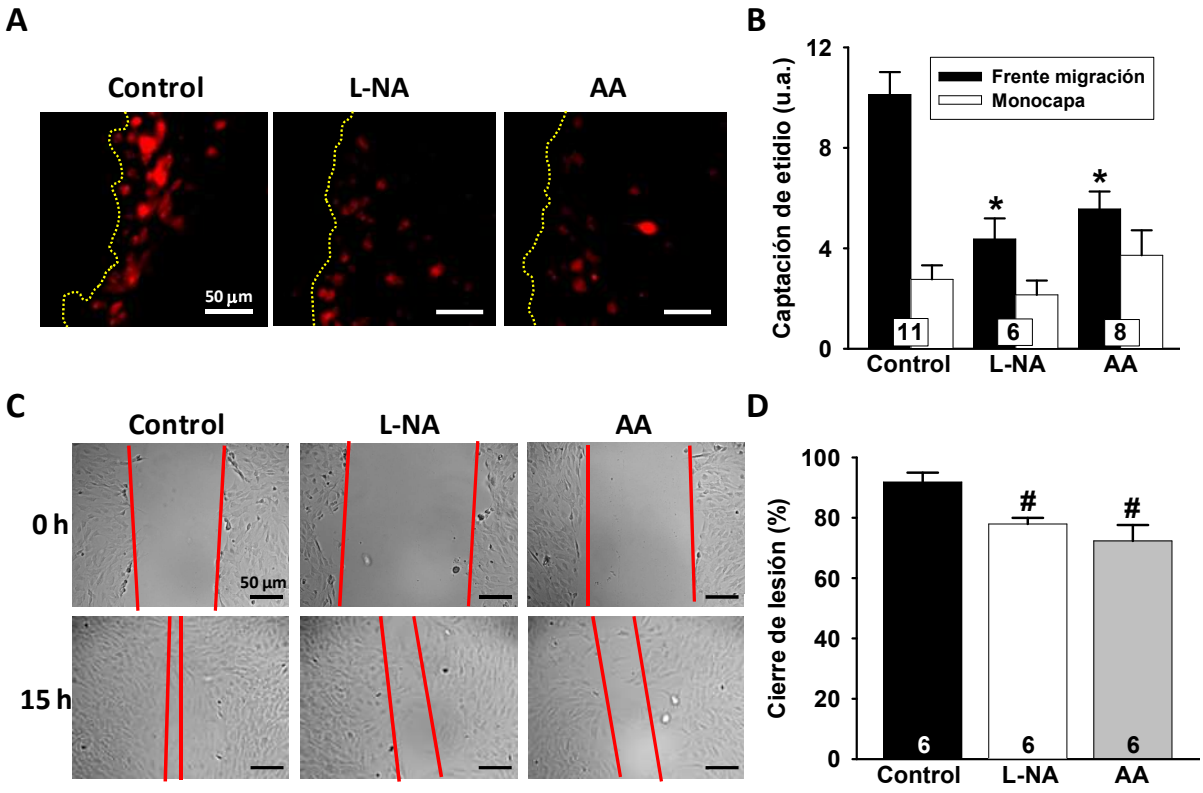


**Figura 23. La apertura de hemicanales formados por conexinas y la migración endotelial se reducen en presencia del inhibidor de la eNOS y el agente reductor ácido ascórbico. A)** Imágenes representativas de la captación de etidio en el ensayo de lesión de la monocapa endotelial 15 min posterior a la adición de etidio en condiciones control o en presencia del inhibidor de la eNOS, 100 µM $N^G$-nitro-L-arginina (L-NA) o el agente reductor 50 µM ácido ascórbico (AA). La línea punteada amarilla delimita el borde de la lesión de la monocapa. **B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia de etidio en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa en condiciones control y en presencia de L-NA o AA. **C)** Imágenes representativas del avance observado en 15 h de la migración endotelial en el ensayo de lesión de monocapa en condiciones control y en presencia de 100 µM L-NA o 50 µM AA. La línea roja destaca la ubicación relativa del borde de la lesión de la monocapa. y se muestra sólo como una referencia pero no se uso para el análisis estadístico. **D)** Cuantificación del cierre de la lesión en condiciones control y en presencia de L-NA o AA. Los números dentro de las barras indican el valor de n.*, $p<0,01$ vs. Frente de migración en condiciones Control por ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni. #, $p<0,01$ vs. Control por ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni.

Además, al evaluar por inmunofluorescencia la distribución global de proteínas S-nitrosiladas en el ensayo de lesión de la monocapa endotelial, se observó un incremento en la S-nitrosilación (SNO-cys) de las proteínas de las CEs del frente de migración, lo cual fue inhibido por el tratamiento con L-NA o AA (Figura 24A y 24B). En conjunto, estos resultados sugieren que la S-nitrosilación de hemicanales formados por Cx43 media la apertura de estos canales en las CEs del frente de migración.

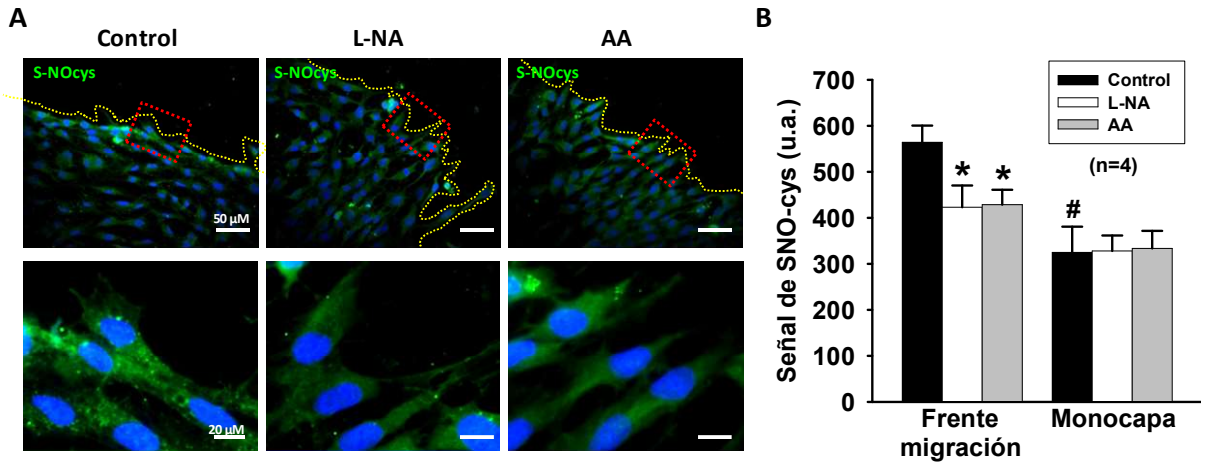


**Figura 24. Las células endoteliales del frente de migración presentan una mayor S-nitrosilación (S-NOcys). A)** Imágenes representativas de la distribución de las S-nitrosilaciones (verde) en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa 4 h después de realizada la lesión en condiciones control y en presencia del inhibidor de la eNOS, 100 µM $N^G$-nitro-L-arginina (L-NA) o el agente reductor 50 µM ácido ascórbico (AA). La línea punteada amarilla delimita el borde de la lesión de la monocapa y el panel inferior muestra una magnificación de la zona delimitada en rojo en las imágenes del panel superior **B)** Análisis de la distribución de las S-nitrosilaciones (S-NOcys) en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa en condiciones control y en presencia de L-NA o AA. *, $p<0,05$ vs. Frente de migración en condiciones Control por ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni. #, $p<0,001$ vs. Frente de migración en condiciones Control por ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni.

### 3.4. La vía de señalización $Na_v$ -NCX media la apertura de los hemicanales formados por Cx43 en las células endoteliales del frente de migración.

Los resultados obtenidos indican que los canales $Na_v$ sensibles a TTX, el modo reverso del intercambiador NCX y los hemicanales formados por Cx43 median los incrementos de $Ca^{2+}$ de forma restringida en la parte posterior de las CEs del frente de migración, lo cual sugiere que pueden ser parte de una misma vía de señalización. Para determinar si la apertura de los hemicanales formados por Cx43 depende de la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX y del modo reverso del intercambiador NCX se evaluó la captación de etidio en el ensayo de lesión de monocapa en presencia de 1 μM TTX y 1 μM SEA0400. Interesantemente, el tratamiento con TTX (Figura 25A y 25B) o con SEA0400 (Figura 26A y 26B) disminuyó la apertura de hemicanales formados por Cxs en las CEs del frente de migración. Esto indica que la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX con la subsecuente iniciación del modo reverso del intercambiador NCX es necesaria para la apertura de hemicanales de Cx43 en las CEs del frente de migración. Además, estos resultados en conjunto también sugieren que los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el modo reverso del NCX podrían participar en el inicio de la señalización de $Ca^{2+}$, mientras que los hemicanales formados por Cx43 podrían participar en la mantención de la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial.

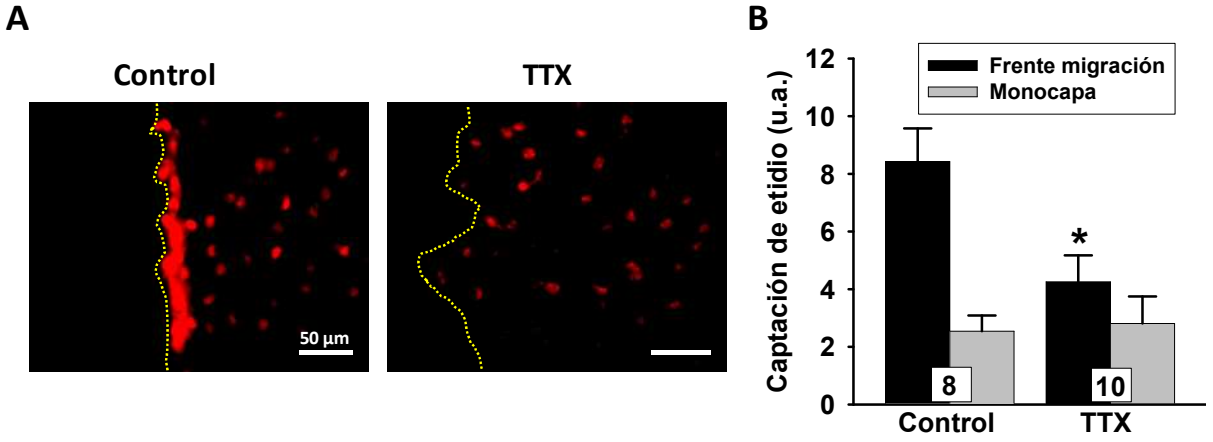


**Figura 25.La inhibición de los canales $Na_v$ sensibles a TTX reduce la apertura de hemicanales formados por conexinas en las células endoteliales del frente de migración.** **A)** Imágenes representativas de la captación de etidio en el frente de migración 15 min posterior a la adición de etidio en condiciones control o en presencia de 1 µM TTX. La línea punteada en amarillo señala el borde del área lesionada. **B)** Cuantificación de la captación de etidio observada después de 15 min en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa en condiciones control o en presencia de 1 µM TTX. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *, $p$<0,05 vs. Frente de migración en condiciones Control por ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni.

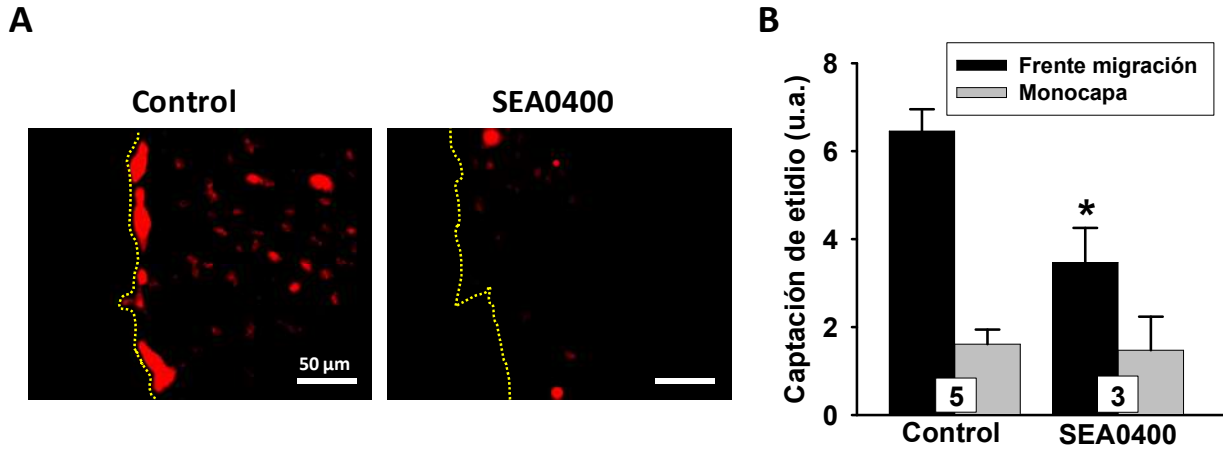


**Figura 26. La inhibición del modo reverso del intercambiador $Na^+$-$Ca^{2+}$ (NCX) reduce la apertura de hemicanales de conexinas en las células endoteliales del frente de migración.** **A)** Imágenes representativas de la captación de etidio 15 min después de la adición de etidio en condiciones control o en presencia de 1 µM SEA0400. La línea punteada en amarillo señala el borde del área lesionada. **B)** Cuantificación de la captación de etidio observada después de 15 min en las células endoteliales del frente de migración y la monocapa en condiciones control o en presencia de SEA0400. Los números dentro de las barras indican el valor de n. *,

*p*<0,05 vs. Frente de migración en condiciones Control por ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni.

### 3.5. Los hemicanales de Cx43 participan en la formación de estructuras tubulares *in vitro*.

Considerando la participación de hemicanales formados por Cx43 en la migración endotelial, se evaluó su participación en la angiogénesis a través de la evaluación de la formación de estructuras tubulares en Matrigel. Los resultados obtenidos muestran que la formación de estructuras tubulares se inició a las 6 h y siguió aumentando hasta las 12 h en condiciones control, lo cual fue notoriamente atenuado por el tratamiento con Gap19 (Figura 27A y 27B). Es importante destacar que la reducción en la formación tubular observada al inhibir los hemicanales formados por Cx43 fue similar a la obtenida después de inhibir los canales $Na_v$ sensibles a TTX, lo cual apoya la noción que ambos se encuentran en la misma vía de señalización durante la migración endotelial y la angiogénesis.

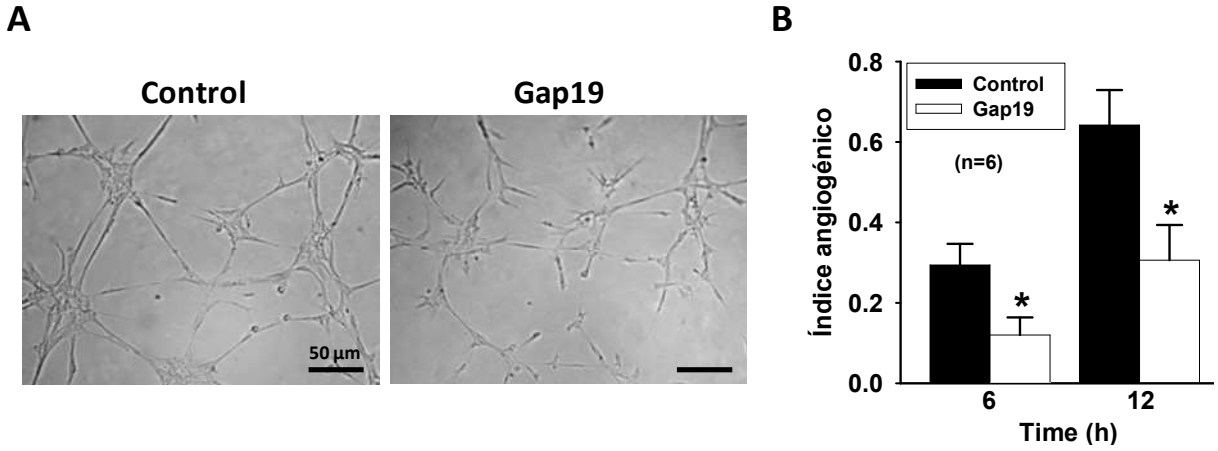


**Figura 27. Los hemicanales de Cx43 participan en la formación de estructuras tubulares *in vitro*. A)** Imágenes representativas de la formación de estructuras tubulares en matrigel después de 12 h en condiciones control o en presencia de 300 µM Gap19. **B)** Cuantificación de la formación de estructuras tubulares después de 6 h y 12 h por medio del cálculo del índice angiogénico en condiciones control y en presencia de 300 µM Gap19. *, $p$<0,05 vs. Control, por la prueba t de Student no pareada.

### 3.6. Los canales formados por Cx43 participan en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la angiogénesis *in vivo*.

Para corroborar la participación de los canales formados por Cx43 en la angiogénesis, se redujo la expresión de *Cx43* en embriones de peces cebra inyectándoles oligonucleótidos antisentidos morfolinos dirigidos contra el codón de inicio de la traducción de *Gja1* (Cx43MO) y la formación de ISV fue comparada respecto a la de embriones control (CtrlMO), a los que se les inyecto oligonucleótidos antisentidos morfolinos dirigidos a una mutación del intrón de β-globina humana. Se observó que la inyección de 0.8 ng del morfolino de Cx43 indujo un incremento del área ocupada por las cavidades cardiacas, tanto en el ancho (149.9 ± 5.7 µm en el Cx43MO vs. 119.1 ± 5.4 µm en CtrlMO) como en el largo (285.9 ± 11.4 µm en Cx43MO vs 251.7 ± 5.1 µm en CtrlMO) respecto a los embriones control (Figura 28).

A su vez, los embriones morfantes presentan una curvatura en la porción media del embrión, lo que no fue observado en los embriones control (Figura 28). Por otra parte, no se observaron diferencias respecto al tamaño entre los embriones control y morfantes de Cx43 lo que indica que el crecimiento de los embriones no fue afectado. Sumado a lo anterior, defectos similares a los reportados al utilizar el morfolino de Cx43 se observaron en embriones inyectados con nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN) que cortaron el gen de *Cx43* (*Gja1*) (dato no mostrado).

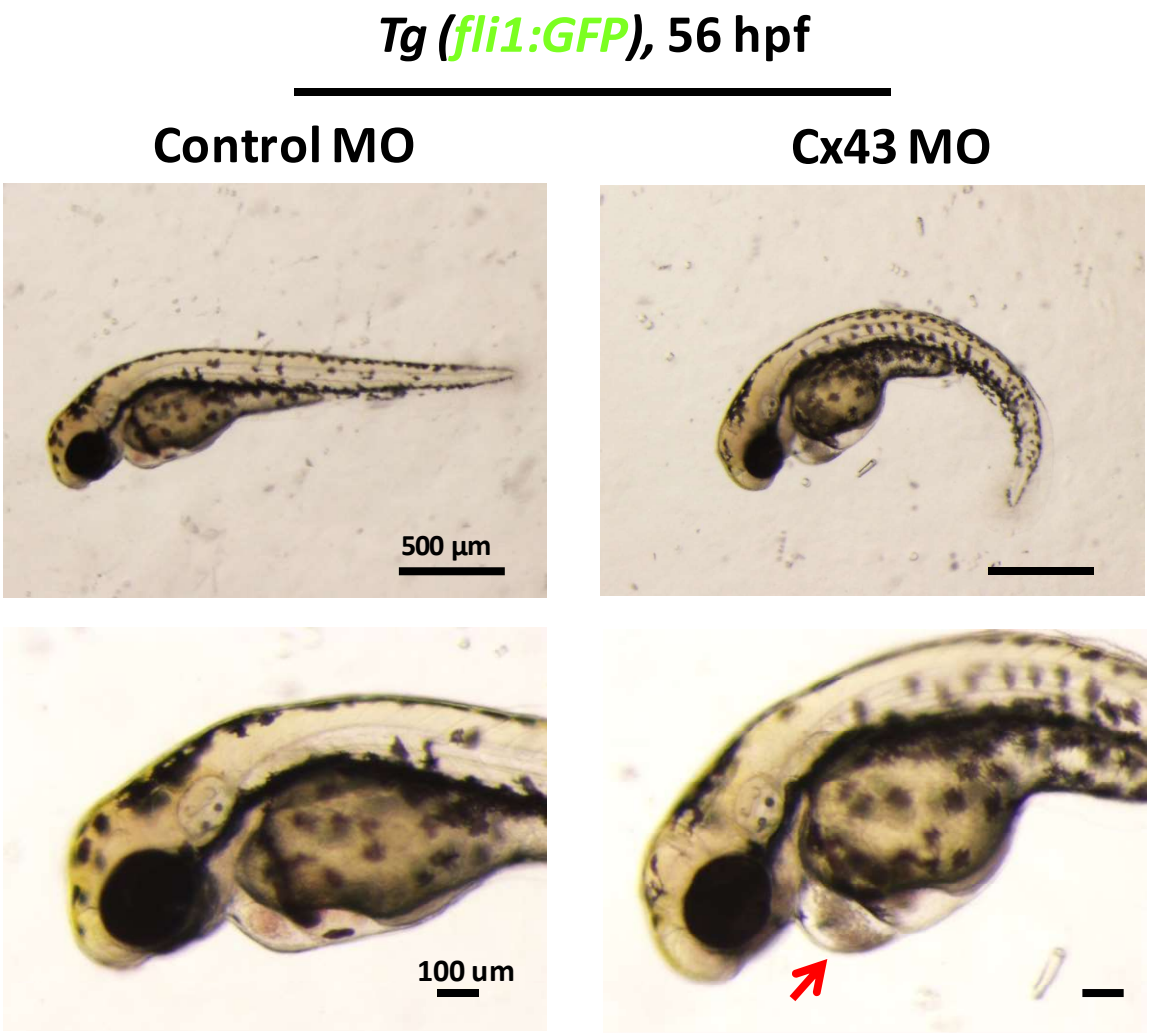


**Figura 28. La microinyección de un morfolino de Cx43 genera el fenotipo previamente descrito en este modelo.** Los embriones de peces cebra fueron inyectados en etapa de 1 célula con 0.8 ng de un morfolino control o del morfolino de Cx43. El panel superior muestra una vista lateral de embriones control y morfante de Cx43. En el morfante de Cx43 se observa una desformación en la porción central del embrión. En el panel inferior la flecha roja señala la alteración cardiaca observada en el embrión morfante de Cx43.

Para determinar los efectos de la disminución de la expresión de Cx43 en la angiogénesis se inyectó el morfolino de *Cx43* en embriones Tg(*fli1:GFP*), que expresan el factor transcripcional *Fli1* marcado con GFP de forma específica en las CEs (Lawson *et al*., 2002). El factor *Fli1* se expresa en etapas tempranas del desarrollo en las células progenitoras

hematopoyéticas y las células progenitoras endoteliales y en etapas tardías su expresión se restringe a las CEs y participa en los procesos de diferenciación celular, la vasculogénesis y la angiogénesis (Craig y Sumanas 2016; Li *et al*., 2015). 24 horas posterior a la inyección del morfolino de Cx43 a los embriones *Tg(fli1:GFP*), se evaluó la formación de ISV en la porción media de estos embriones de peces cebra, los cuales emergen desde la aorta dorsal (DA) y se conectan con los vasos anastomóticos dorsales longitudinales (DLAV). En condiciones control se observó que los ISV se forman completamente y alcanzan a los DLAV a las 48 hpf, a diferencia de lo observado en embriones morfantes de Cx43, donde algunos de los ISV no se formaron completamente (Figura 29A). Para descartar que este efecto se debiera a un retraso en la formación de las ISV se extendió el tiempo de evaluación hasta 72 hpf, a este tiempo los ISV continúan sin conectar con los DLAV en los mismos embriones que se evaluó a las 48 hpf (Figura 29A). Como consecuencia de esto, en los embriones morfantes de Cx43 se observó un incremento significativo del porcentaje de los ISV que no conectan con los DLAV (Figura 29B); sin embargo, el largo promedio de los ISV que si logran conectar con DLAV no difiere entre los embriones control y morfantes de Cx43 (Figura 29C). Esto confirma que la reducción de la expresión de Cx43 inhibe la angiogénesis.

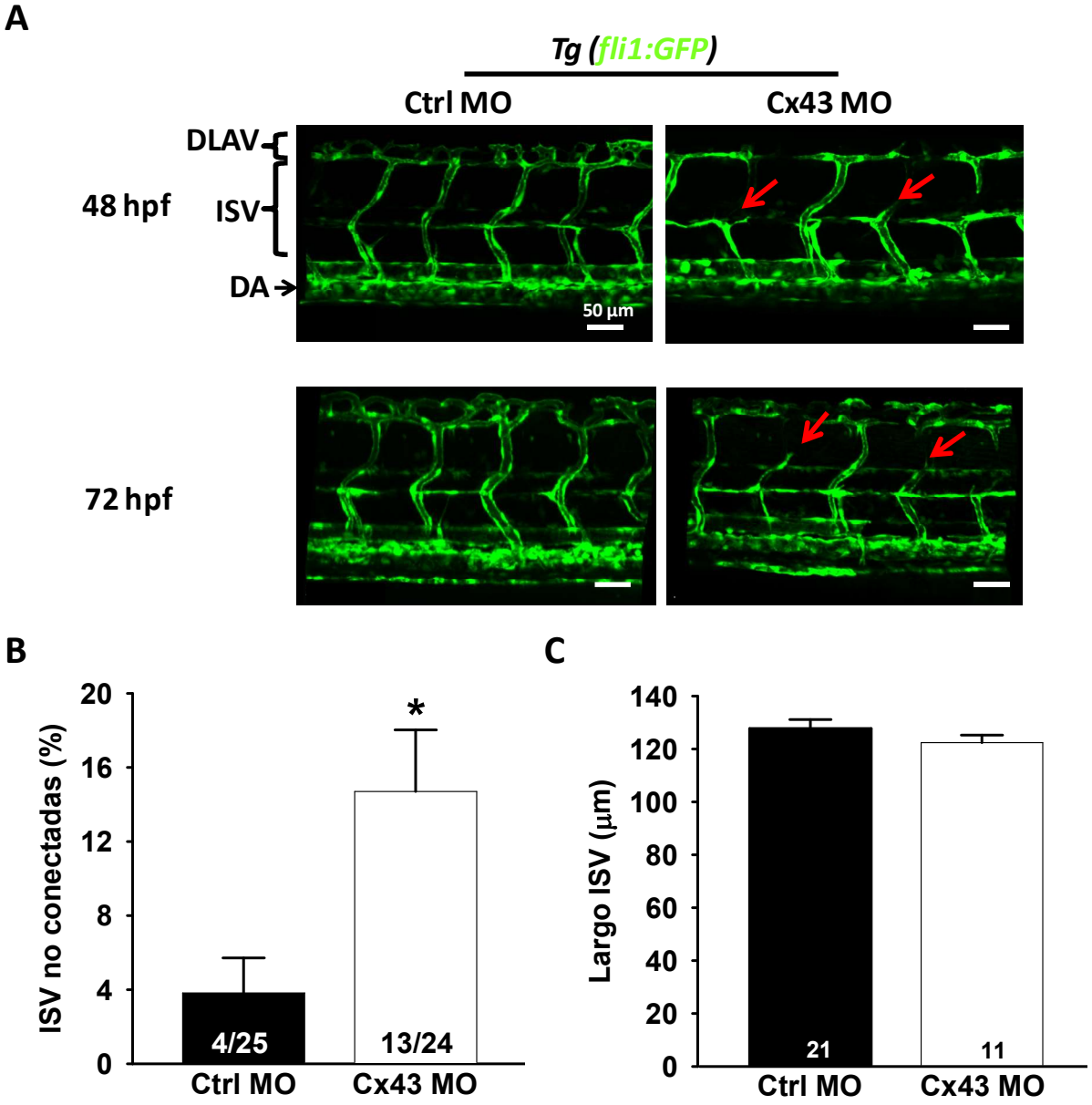


**Figura 29. La reducción de la expresión de Cx43 reduce la formación de vasos sanguíneos intersegmentales en embriones de peces cebra. A)** Imágenes representativas de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales (ISV) a partir de la aorta dorsal (DA) en la porción media (vista lateral) de embriones control (Ctrl MO) y morfantes de Cx43 (Cx43 MO) a las 48 y 72 horas post fertilización (hpf). Las flechas rojas señalan las ISV que no conectan con los vasos sanguíneos dorsales longitudinales (DLAV) en el morfante de Cx43. **B)** Cuantificación del porcentaje de las ISV no conectadas a las 48 h. **C)** Cuantificación del largo de los ISV conectados (que conectan con los DLAV) en los embriones Ctrl MO y Cx43 MO. Los números dentro de las barras indican el número de embriones con ISV defectuosas y el número total de embriones en (B) y el número total de embriones en (C). *, $p<0,01$ vs. Control, por la prueba t de Student no pareada.

Considerando que los resultados obtenidos *in vitro* mostraron la participación de los hemicanales formados por Cx43 en la migración, pero no en la proliferación endotelial, se evaluó el número de CEs por ISV en embriones de peces cebra *Tg*(*kdrl*:*GFP*);(*fli1:H2B-mCherry*) que expresan el receptor de VEGF marcado con GFP de forma global en las CEs y la proteína histona H2B marcada con mCherry bajo el control del promotor *Fli1* de forma específica en el núcleo de las CEs, lo que permite el reconocimiento individual de cada célula (Yokota *et al.*, 2015). Al cuantificar el número de CEs por cada ISV, no se observaron diferencias entre los embriones control y los embriones morfantes de Cx43 (Figura 30A y 30B), lo cual confirma *in vivo* que los canales formados por Cx43 no participan en la proliferación endotelial durante la angiogénesis.

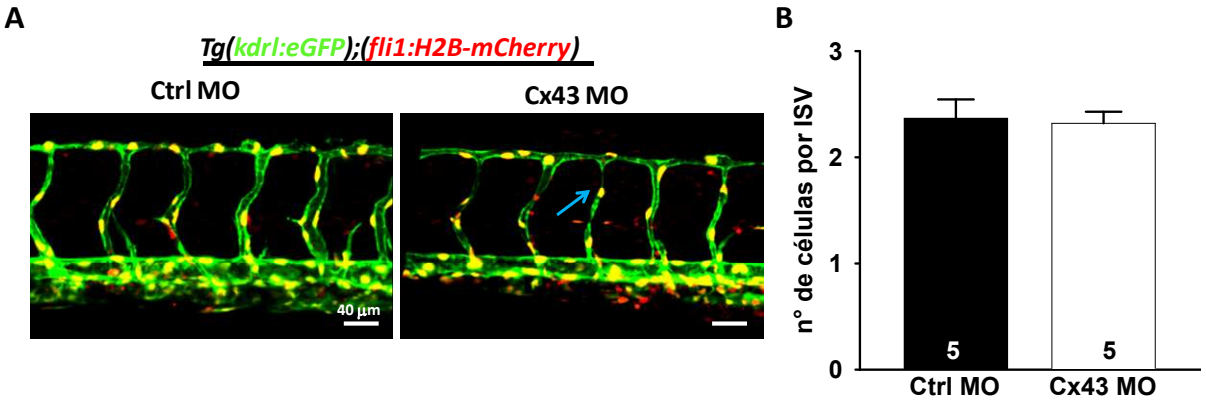


**Figura 30. El número de células endoteliales en los vasos sanguíneos intersegmentales es similar en los embriones de peces cebra control y morfantes de Cx43. A)** Imágenes representativas de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales en la porción media de embriones de peces cebra control (Ctrl MO) y morfantes de Cx43 (Cx43 MO) a las 48 horas post fertilización (hpf). Los núcleos de las células endoteliales se observan en rojo y los vasos sanguíneos intersegmentales (ISV) en verde. La flecha azul señala una ISV defectuosa en los

morfantes de Cx43. **B)** Cuantificación del número de células endoteliales por ISV en embriones control y embriones morfantes de Cx43. El número dentro de las barras indica el número de embriones de peces cebra.

En base a que los hemicanales formados por Cx43 participan en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial, se registró la señalización de $Ca^{2+}$ observada durante la angiogénesis *in vivo*. Esto se realizó reduciendo la expresión de *Cx43* a través de la inyección del morfolino de Cx43 a embriones de peces cebra *Tg(fli1:Gal4FF);(5xUAS:GCaMP7a);(fli1:H2B-mCherry)*. Este es un modelo de pez cebra doble transgénico en el cual la expresión del sensor de $Ca^{2+}$ GCaMP7a está bajo el control del sistema Gal4/UAS, el que a su vez se encuentra bajo el control del promotor *Fli1*, y a su vez la expresión de la proteína histona H2B marcada con mCherry en los núcleos de las CEs se encuentra bajo el control del promotor *Fli1*, de esta forma los cambios en la señalización de $Ca^{2+}$ se pueden registrar de forma individual en las CEs de los vasos sanguíneos del pez cebra (Muto *et al.*, 2013; Yokota *et al.*, 2015). En los embriones de peces cebra control se observó la generación de ondas de $Ca^{2+}$ en las células de punta a las 22 hpf (Figura 31A) mientras que en los embriones morfantes de Cx43 se observó una clara reducción de estos incrementos de $Ca^{2+}$ (Figura 31B). Al cuantificar los incrementos en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la formación de los ISV, se observó una reducción tanto en la amplitud (Figura 31C) como en la frecuencia (Figura 31D) de los incrementos de $Ca^{2+}$ en los embriones morfantes de Cx43 a las 22 hpf. Esto indica que los canales formados por Cx43 son importantes para la señalización de $Ca^{2+}$ al inicio de la formación de los ISV. Interesantemente, esta reducción de los incrementos de $Ca^{2+}$ en los embriones morfantes de Cx43 se mantuvo una vez que el proceso de formación de los ISV prácticamente se completó (Figura 31E y 31F). En conjunto, estos resultados muestran

que los canales formados por Cx43 participan en la señalización de $Ca^{2+}$ que media el desarrollo de la angiogénesis.

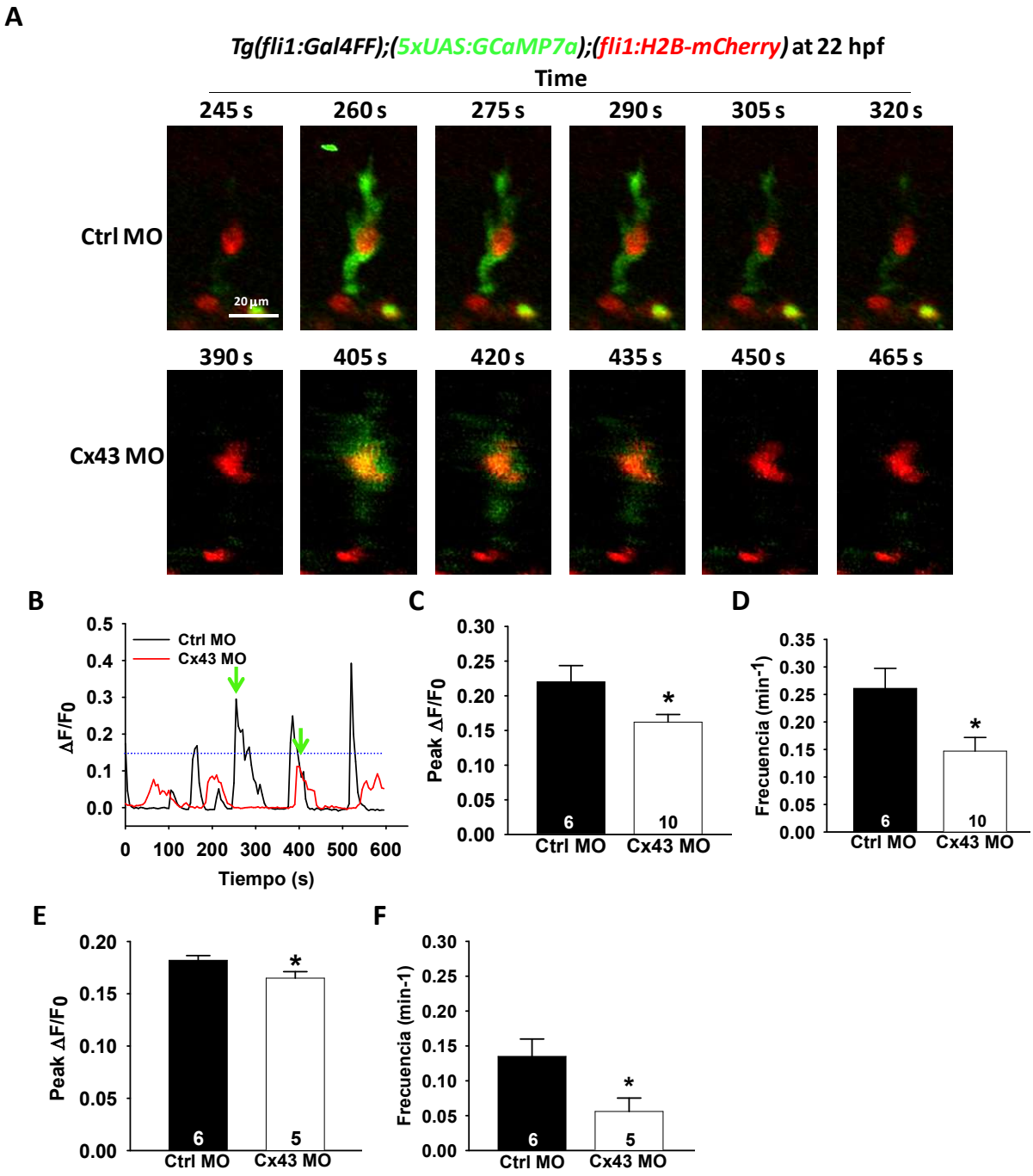


**Figura 31.El knock-down de Cx43 reduce la frecuencia y amplitud de los incrementos de $Ca^{2+}$ en las células endoteliales durante el inicio de la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales (22 hpf) y una vez ya formados (28 hpf). A)** Imágenes representativas de

las oscilaciones de $Ca^{2+}$ en una célula de punta en la región media del tronco de un embrión de pez cebra control y de un embrión morfante de Cx43 a las 22 post fertilización (hpf). **B)** Curso temporal de los cambios en la fluorescencia del sensor de $Ca^{2+}$ GCaMP7a en una célula de punta de un embrión control y morfante de Cx43. Las flechas en verde indican la onda de $Ca^{2+}$ en el control y el morfante de Cx43 mostrada en **A**. **C)** Cuantificación de los peak de las oscilaciones de $Ca^{2+}$ en embriones control y morfante de Cx43 a las 22 hpf. **D)** Cuantificación de la frecuencia de las oscilaciones de $Ca^{2+}$ en embriones control y morfante de Cx43 a las 22 hpf. **E)** Cuantificación de los peak de las oscilaciones de $Ca^{2+}$ en embriones control y morfante a las 28 hpf. **F)** Cuantificación de la frecuencia de las oscilaciones de $Ca^{2+}$ a las 28 hpf. El número dentro de las barras indica el número de embriones de peces cebra. #, $p<0,001$ vs. Ctrl MO por la prueba t de Student no pareada. *, $p<0,05$ vs. Ctrl MO por la prueba t de Student no pareada.

# DISCUSIÓN

La angiogénesis es un proceso complejo que involucra numerosas vías de señalización en las CEs y está involucrado en el desarrollo de variadas patologías, por lo cual su estudio ha concitado gran interés (Griffioen y Molema 2000; Potente *et al.*, 2011; Yoo y Kwon, 2013). La angiogénesis comprende la proliferación y migración de las CEs, la formación de la estructura tubular vascular y el reclutamiento de células murales (Geudens y Gerhardt, 2011). De éstas etapas, la migración endotelial es crucial para la correcta angiogénesis (Lamalice *et al.*, 2007; Michaelis U., 2014).

La migración depende de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ producto de la liberación de $Ca^{2+}$ desde el retículo endoplásmico y de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular. La liberación de $Ca^{2+}$ desde almacenes intracelulares ha sido ampliamente estudiada y depende de la activación de los receptores de $IP_3$ ($IP_3R$) (Moccia *et al.*, 2012). Este incremento de $Ca^{2+}$ se restringe a la parte anterior de las células durante la migración y participa en la formación de las lamelipodias y sus ciclos de extensión-retracción (Moccia *et al.*, 2019; Sáez *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2015). Por otra parte, se evidenció que, durante la migración, la $[Ca^{2+}]_i$ es mayor en la parte posterior de las CEs, lo que se atribuyó inicialmente a una menor actividad de la PMCA en la parte posterior (Tsai *et al.*, 2014). Sin embargo, esta mayor concentración de la $[Ca^{2+}]_i$ en la parte posterior también depende de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular en la parte posterior de las CEs y es relevante para la contracción de fibras de estrés y la retracción de la parte posterior de las CEs durante la migración (Kim *et al.*, 2016).

A la fecha, los mecanismos que participan en la entrada de $Ca^{2+}$ han sido poco estudiados. Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que la lesión de la monocapa endotelial induce la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX y del modo reverso del NCX en la parte posterior de las CEs del frente de migración, lo que a su vez estimula la apertura de hemicanales formados por Cx43 e induce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de forma restringida en la parte posterior, lo cual es una importante vía de señalización para la migración endotelial y la angiogénesis.

## 1. Participación de canales $Na_v$ en la señalización de calcio durante la migración endotelial y la angiogénesis

Las CEs expresan canales de $Na^+$ dependientes de voltaje ($Na_v$) (Gosling *et al.*, 1998; Traub *et al.*, 1999) y se ha descrito que la lesión de la monocapa endotelial induce un incremento de la $[Na^+]_i$ en las CEs del frente de migración (Chifflet *et al.*, 2005). A su vez, los canales $Na_v$ participan en la migración de células de cáncer gástrico, pulmonar y de mama, y de astrocitos (Anderson *et al.*, 2019; Besson *et al.*, 2015; Black y Waxman 2013). Consistente con esto último, los resultados obtenidos en la tesis muestran que la inhibición de los canales $Na_v$ sensibles a TTX con 1 μM TTX redujo la migración endotelial y que ésta reducción no fue mayor al inhibir los canales $Na_v$ insensibles a TTX con 10 μM TTX o los canales $Na_v$ resistentes a TTX con 100 μM TTX (Figura 3). Esto indica que los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la migración endotelial y es consistente con lo previamente observado en HUVEC (Andrikopoulos *et al.* 2011). Sin embargo, en dicho estudio en HUVEC el efecto sobre la migración se atribuyó a la isoforma de canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.7$

(Andrikopoulos *et al.*, 2011), mientras que en la presente tesis se encontró que los $Na_v$ sensibles a TTX $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ participan en la migración (Figura 3). A la fecha, se ha corroborado en las CEs de la circulación sistémica la expresión de las isoformas de canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ (Figueroa, Chen et al. 2007), pero no existen antecedentes respecto a la expresión de los canales $Na_v1.7$. La inhibición observada en presencia de TTX es similar a la producida por los inhibidores específicos de canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, lo que sugiere que sólo estas dos isoformas participan en la migración endotelial. La discrepancia entre los resultados de la presente investigación y la participación en la migración de la isoforma $Na_v1.7$ reportada por el grupo de Andrikopoulos (Andrikopoulos *et al.*, 2011) puede atribuirse a la heterogeneidad molecular y funcional en la angiogénesis entre las CEs provenientes de territorios macro y microvasculares, pues nuestro estudio utilizó CEs microvasculares de lecho vascular mesentérico y el de Andrikopoulos CEs macrovasculares de vena umbilical humana. Se han descrito variadas diferencias en la expresión de canales iónicos en las CEs según su origen, ejemplo de ello es que en CEs microvasculares pulmonares se expresan canales $Ca_v$ tipo T y canales TRPV4; sin embargo, estos canales no se expresan en CEs pulmonares macrovasculares (Nilius y Droogmans 2001; Stevens T., 2011). De la misma forma, se han observado diferencias respecto a la actividad proangiogénica de las CEs según su origen (Buschmann y Schaper 1999). En base a ello, se ha descrito que las CEs del lecho vascular mesentérico y otras CEs microvasculares presentan una mayor capacidad proliferativa y migratoria que las HUVEC (Lang *et al.*, 2003; Mansouri *et al.*, 2013) y que la secreción y actividad de las metaloproteinasas de la matriz que participan en la degradación de la membrana basal durante la angiogénesis, MMP1 y MMP9, se incrementa en las CEs microvasculares, pero no en HUVEC, en respuesta a TNFα y forbol miristato acetato (PMA)

(Jackson y Nguyen 1997). En concordancia con ello, se han observado diferencias en la angiogénesis inducida por el microRNA, mir-21, ya que mientras esta molécula induce angiogénesis en CEs microvasculares de retina bovina, la reduce en HUVEC (Guduric-Fuchs *et al.*, 2012; Sabatel *et al.*, 2011). Sumado a lo anterior, estos dos territorios vasculares también difieren respecto al estímulo que desencadena la angiogénesis, mientras que a nivel microvascular ocurre en respuesta a isquemia; a nivel macrovascular, este proceso ocurre en respuesta a un aumento de la tensión de roce (Buschmann y Schaper 1999). En base a estos antecedentes, es posible indicar que las diferencias observadas respecto a la isoforma de canales $Na_v$ que participa en la migración endotelial podrían estar dadas por el origen macro y microvascular de las CEs.

Considerando que la angiogénesis comprende además de la migración, la proliferación y la formación de estructuras tubulares por las CEs, se evaluó el rol de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en estos procesos. Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de los canales $Na_v$ sensibles a TTX no redujo la proliferación endotelial (Figura 4), pero si disminuyó la formación de estructuras tubulares *in vitro* (Figura 14), lo que en conjunto a los antecedentes anteriores indica que los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en las distintas etapas críticas del proceso angiogénico, incluyendo la migración y la formación tubular. Si bien la reducción del cierre de la lesión observada al inhibir los canales $Na_v$ sensibles a TTX fue de aproximadamente un 30% (Figura 3), se debe considerar que esta inhibición refleja exclusivamente la contribución de la migración y no de la proliferación, la cual podría dar cuenta de una parte importante del proceso. Consistente con esto, la desorganización de las caveolas con metil-β-ciclodextrina (Figura 11), que inhibe tanto la migración como la proliferación endotelial (Feng *et al*., 2012), produjo una reducción de aproximadamente un

60% del avance de las células endoteliales en el ensayo de lesión de monocapa, lo cual destaca la importancia de la proliferación celular en este ensayo. Por lo tanto, en futuros estudios se podría evaluar la migración endotelial por tiempos breves, de manera de reducir la contribución de la proliferación en el ensayo de lesión de monocapa.

Consistente con un rol de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la angiogénesis, la incubación de embriones de peces cebra con 1 μM TTX atenuó el crecimiento de los vasos sanguíneos intersegmentales (Figura 15). Si bien este efecto fue menor al esperado, probablemente esto no se debió a una falta de especificidad de TTX, pues se ha observado en embriones de peces cebra que el tratamiento con 300 nM TTX inhibe la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en neuronas mecanosensoriales Rohon-Beard (Pineda *et al.*, 2005), lo cual concuerda con lo observado en modelos murinos en los que el tratamiento con TTX a concentraciones menores de 1 μM inhibe completamente a los canales $Na_v$ sensibles a TTX (Lee y Ruben, 2008). Sumado a ello, se ha descrito que la reducción de la expresión de los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.1$ y $Na_v1.6$, en neuronas mecanosensoriales Rohon-Beard inhibe la movilidad de los embriones de peces cebra en respuesta a un estímulo táctil (Pineda *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015), lo cual también se observó en la presente tesis al incubar los embriones de pez cebra con 1 μM TTX, indicando que la concentración utilizada de TTX inhibe de forma eficaz los canales $Na_v$ sensibles a TTX en el pez cebra. Sin embargo, TTX es una molécula hidrofílica (Madejska *et al.*, 2019) y si bien puede inhibir a los canales $Na_v$ presentes en las neuronas mecanosensoriales que se encuentran en el ectodermo de los embriones, dada la localización de los vasos sanguíneos intersegmentales entre los somitos (Ellertsdóttir *et al.*, 2010; Isogai *et al.*, 2003) es posible que el acceso de TTX al tejido vascular hubiese estado limitado por la naturaleza hidrofílica de esta toxina, lo que podría

explicar el modesto impacto que tuvo este tratamiento sobre la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales. En futuros estudios, se podría mejorar la accesibilidad de TTX a las células endoteliales mediante su microinyección en el torrente sanguíneo de los embriones de peces cebra. Una ventaja de este modelo es que las concentraciones de TTX que inhiben a los canales $Na_v$ sensibles a TTX no reducen la viabilidad de los embriones de peces cebra, a diferencia de lo que se ha descrito en modelos de mamíferos (Lago *et al.*, 2015; Venkatesh *et al.,* 2005; Zimmer T., 2010), por lo que la utilización de este modelo para evaluar la participación de canales $Na_v$ en la angiogénesis presenta una ventaja significativa por sobre otros modelos *in vivo.*

En el presente estudio no se determinó en forma específica la isoforma de canales $Na_v$ que participa en la angiogénesis; sin embargo, se ha identificado que los embriones de peces cebra expresan genes duplicados de canales $Na_v$, en particular los genes *scn1Laa* y *scn1Lab* que están relacionados evolutivamente con los genes *SCN1A* ($Na_v1.1$), *SCN2A* ($Na_v1.2$), *SCN3A* ($Na_v1.3$) y *SCN9A* ($Na_v1.7$) de mamíferos y los genes *scn8aa* y *scn8ab* que están relacionados filogenéticamente con SCN8A ($Na_v1.6$). Además, estos genes presentan patrones de distribución en los tejidos similar a lo observado en mamíferos (Novak *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la ausencia de anticuerpos específicos contra canales $Na_v$ para peces cebra, actualmente no se ha corroborado si estas isoformas de canales $Na_v$ se expresan en la vasculatura de los embriones, lo que ha dificultado su evaluación a nivel proteico. Por lo tanto, se espera que un mayor conocimiento de las isoformas de canales $Na_v$ endoteliales permitirá manipular genéticamente estos canales y de esta forma corroborar la participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la angiogénesis.

Como se mencionó anteriormente, la migración endotelial depende de incrementos en la señalización de $Ca^{2+}$. Por lo tanto, basado en la participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la migración endotelial durante la angiogénesis y que durante la estimulación con VEGF se observa una despolarización de las CEs en paralelo a los incrementos de $Ca^{2+}$ (Dawson *et al.,* 2006), en el ensayo de lesión de la monocapa, se evaluó la participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la señal de $Ca^{2+}$. En estos experimentos, se observó que, en condiciones control, la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa de forma restringida en las células del frente de migración (Figura 5), formando una gradiente de concentración intracelular que aumenta desde la parte anterior a la posterior de las células (Figura 6), como fue observado previamente (Tsai *et al.*, 2015). Al inhibir los canales $Na_v$ sensibles a TTX, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$, se observó una reducción del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de forma específica en la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 7). Interesantemente, se ha observado que la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular en la parte posterior de las CEs es fundamental para la contracción de las fibras de estrés y la retracción de la parte posterior de las CEs durante la migración (Kim *et al.*, 2016). Además, en la migración se produce una despolarización de la membrana endotelial que se asocia a incrementos en la $[Na^+]_i$ de las CEs del frente de migración, lo cual induce la reorganización del citoesqueleto de actina (Chifflet *et al.*, 2003; Chifflet *et al.*, 2005) y la activación de la GTPasa RhoA y de MLCK, que participan en la formación y contracción de las fibras de estrés y la retracción de la parte posterior de las células durante la migración (Bai *et al.*, 2011). Basado en estos antecedentes, es posible proponer que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en la parte posterior de las CEs participe en la formación y contracción de las fibras de estrés durante la migración.

Las caveolas compartimentalizan componentes moleculares claves para la angiogénesis y participan en la migración endotelial (Frank *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2004; Morais *et al.*, 2012). Durante la migración, las caveolas se relocalizan en la parte posterior de las CEs, compartimentalizando de esta forma la señalización de $Ca^{2+}$ (Beardsley *et al.*, 2005; Isshiki *et al.*, 2002; Parat *et al.*, 2003). Por lo tanto, como se encontró que los canales $Na_v$ sensibles a TTX contribuyen a la señalización de $Ca^{2+}$ de forma específica en la parte posterior de las CEs del frente de migración, se analizó la distribución de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en conjunto con la proteína estructural de las caveolas, cav-1. Los resultados obtenidos muestran que los canales $Na_v1.2$ se redistribuyen a la parte posterior de las CEs del frente de migración y se asocian espacialmente con cav-1 (Figura 8 y 10), mientras que la distribución de los canales $Na_v1.6$ se mantuvo homogénea en las CEs del frente de migración y la monocapa, sin mostrar una mayor asociación con cav-1 (Figuras 9 y 10). Consistente con el rol de las caveolas en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración, su desorganización con MβCD redujo la señal de $Ca^{2+}$ en las CEs del frente de migración y la migración endotelial (Figura 11). En conjunto, esto sugiere que los canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ participan por diferentes mecanismos en la señalización de $Ca^{2+}$ observada durante la migración, y que se requiere de la localización de los canales $Na_v1.2$ en caveolas en la parte posterior de las CEs, pero no la de los canales $Na_v1.6$. Se ha descrito en CEs de arteria pulmonar que el tratamiento con la molécula proangiogénica, esfingosina-1-fosfato (Argraves *et al.*, 2010) induce la traslocación a las caveolas de la quinasa MLCK (Zhao *et al.*, 2009). La activación de esta quinasa depende de incrementos de $Ca^{2+}$ e induce la contracción de las fibras de estrés y la retracción de las CEs durante la migración (Lamalice *et al.,* 2007; Verin *et al.*, 1998). Por lo tanto, es posible proponer que la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX en caveolas participa en

los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en la parte posterior de las CEs que median la activación de la MLCK y la posterior contracción de las fibras de estrés durante la migración.

Considerando entonces que los $Na_v$ sensibles a TTX participan en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración se evaluó el mecanismo por el cual éstos canales podrían llevar a un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Es reconocido que la activación de los canales $Na_v$ en neuronas induce incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ mediados por canales $Ca_v$ que participan en la transmisión sináptica (Fekete *et al.*, 2009; Salthun-Lassalle *et al.*, 2004; Perez-Reyes E., 1999) y se ha sugerido que la activación secuencial de los canales $Na_v$ y los $Ca_v$ participa en los incrementos de $Ca^{2+}$ observados durante la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio (Figueroa *et al.*, 2007). En este estudio se corroboró que las CEs de lecho vascular mesentérico expresan canales $Ca_v$ tipo T, $Ca_v3.2$, (Figura 12), lo que es consistente con lo reportado a la fecha en CEs del lecho vascular mesentérico y de la circulación sistémica (Blanks *et al.*, 2007; Braunstein *et al.*, 2009; De Proost *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2016). Sin embargo, la inhibición de los canales $Ca_v3.2$ con bajas concentraciones de $Ni^{2+}$ no redujo la migración endotelial (Figura 12). En oposición a estos resultados, se reportó que la inhibición de los canales $Ca_v$ tipo T reduce la señalización de $Ca^{2+}$ en HUVEC y la migración endotelial inducida por angiotensina II (Martini *et al.*, 2010). Esta es una situación particular, pues el rol proangiogénico de la angiotensina II se asocia a condiciones patológicas como la retinopatía y la inflamación (Carbajo-Lozoya *et al.*, 2012); Tamarat *et al.*, 2002), por lo que es posible que en condiciones fisiológicas los canales $Ca_v$ no participen en la angiogénesis. Recientemente se ha descrito en CEs microvasculares pulmonares que expresan canales $Ca_v$ tipo T $Ca_v3.1$ pero no $Ca_v3.2$ (Zhou y Wu 2006), que el incremento de $Ca^{2+}$ mediado por la activación de los canales $Ca_v3.1$ induce la activación de la vía PI3K y de esta forma la migración endotelial y la

formación tubular (Zheng *et al.*, 2019). Interesantemente, y en contraposición a lo observado en la mayoría de las CEs microvasculares, el bloqueo de los receptores de VEGF o de la eNOS en estas CEs microvasculares pulmonares no redujo la angiogénesis (Zheng *et al.*, 2019). Esto sugiere que las CEs microvasculares pulmonares presentan un fenotipo proangiogénico que es independiente de la señalización de VEGF, y, por tanto, probablemente otros mecanismos de señalización estarían involucrados en la participación de los canales $Ca_v$ en la angiogénesis en este modelo en particular.

En base a que los $Ca_v3.2$ no participan en la migración endotelial, se evaluó si el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la activación de $Na_v$ sensibles a TTX durante la migración endotelial se debe a un acoplamiento funcional con el modo reverso del NCX. Los resultados obtenidos muestran que la inhibición del modo reverso del NCX redujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de forma específica en la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 13), al igual que lo observado para los canales $Na_v$ sensibles a TTX. En concordancia con ello, en HUVEC estimuladas con VEGF o trombina se observó que la activación del modo reverso del NCX participa en la señalización de $Ca^{2+}$, la migración endotelial y la formación de estructuras tubulares, y, en base a estos antecedentes, se sugirió que la activación del modo reverso del NCX podría ocurrir por un acoplamiento funcional con los $Na_v$ (Andrikopoulos *et al.*, 2011; Andrikopoulos *et al.*, 2015). El acoplamiento funcional entre los canales $Na_v$ y el modo reverso del NCX se ha descrito en cardiomiocitos (Larbig *et al.*, 2010). A su vez, en astrocitos se encontró que el acoplamiento funcional entre los canales $Na_v$, en particular con el canal Nav1.5, y la activación del modo reverso del NCX participa en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración (Pappalardo *et al.*, 2014). Interesantemente, los resultados de esta tesis muestran que la inhibición del incremento de $Ca^{2+}$ observado al

bloquear el modo reverso del NCX y los canales $Na_v$ sensibles a TTX es similar en magnitud, y que tanto el NCX como los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan de forma específica en el incremento de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración, por lo que es posible proponer que el acoplamiento funcional de los $Na_v$ y el NCX contribuye al incremento de $Ca^{2+}$ observado en la parte posterior de las CEs del frente de migración. En el presente estudio no se evaluó la distribución del NCX y su asociación con cav-1 durante la migración; sin embargo, se ha descrito que, en las CEs, el NCX en conjunto con la eNOS se localizan en caveolas y en las CEs aórticas porcinas se observó que la activación del modo reverso del NCX mediada por incrementos de la $[Na^+]_i$ induce la activación de la eNOS en caveolas (Lillo *et al.*, 2018; Teubl *et al.*, 1999). El NO estimula la migración endotelial y la angiogénesis (Cooke y Losordo 2002; Murohara *et al.*, 1998; Noiri *et al.*, 1998) y en las CEs del frente de migración aumenta la producción de NO (Berra-Romani *et al.*, 2013). Si bien gran parte de la eNOS y la producción de NO se concentra en las lamelipodias de las CEs del frente de migración, tanto la eNOS como la producción de NO también se observa en la parte posterior de estas células (Priya *et al.*, 2015) y, por tanto, es posible proponer que la entrada de $Na^+$ mediada por los canales $Na_v1.2$ activa el modo reverso del NCX en caveolas, incrementando así la $[Ca^{2+}]_i$ y estimulando la producción de NO en las CEs del frente de migración y de esta forma la migración endotelial y la angiogénesis.

Si bien, en la presente tesis no se abordaron los mecanismos de activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX durante la migración endotelial, la similar magnitud de la inhibición de la migración en presencia de 1 μM TTX o de los inhibidores de los canales $Na_v1.2$ o de $Na_v1.6$ de forma individual o combinada sugiere que los canales $Na_v$ son parte de una misma vía de señalización y que la activación de estos canales puede ocurrir de forma

secuencial durante la migración. En relación a ello, en neuronas piramidales corticales se observó que la activación de canales $Na_v1.2$ ocurre a potenciales significativamente más despolarizados que la activación de canales $Na_v1.6$ (-42,7 ± 1,1 mV para $Na_v1.2$ vs. -55.8 ± 0,8 mV para $Na_v1.6$) (Hu *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2018). Además, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal se evidenciaron diferencias similares entre la activación de los canales $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ (Rush *et al.*, 2005). Esto permite hipotetizar que, durante la migración, la activación de los canales $Na_v1.6$ podría ser primero, llevando el potencial de membrana a valores en que se activen los canales $Na_v1.2$ y que la $I_{Na}$ mediada por los canales $Na_v1.2$ active el modo reverso del NCX en caveolas, en la parte posterior de las CEs del frente de migración, incrementando de esta forma la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración.

**2. Participación de conexinas en la migración endotelial y la angiogénesis.**

La comunicación a través de canales formados por conexinas es relevante para diversas funciones celulares, entre ellas la formación de estructuras tubulares endoteliales (Gartner *et al.,* 2012); es por ello que se determinó la actividad de GJs durante la migración endotelial. Los resultados obtenidos muestran que en condiciones control las CEs están acopladas a través de GJs y esto se mantiene en las CEs del frente de migración; sin embargo, después de realizar la lesión, las CEs de la monocapa endotelial se desacoplan rápidamente (<15 min) entre sí y de las células del frente de migración (Figura 16). Esto concuerda con lo previamente reportado en CEs microvasculares de la corteza suprarrenal bovina (Pepper *et al.*, 1989; Pepper *et al.*, 1992). Si bien, en este último trabajo se sugirió que el desacoplamiento endotelial se debe a un incremento en la expresión de Cx37 y una reducción de Cx43 en las

CEs de la monocapa endotelial (Kwak *et al.*, 2001); esto se observó a las 24 h posterior a la lesión por lo que no parece una explicación plausible para el desacoplamiento de la monocapa endotelial observado en esta tesis. Se ha descrito que la tasa de recambio de las Cxs varía entre 1 y 5 h (Saffitz *et al.*, 2000) y en particular se ha observado que la vida media de Cx43 es de 4h en CEs de aorta bovina en condiciones control y durante la estimulación con el factor proangiogénico TGFβ-1, este último induce además un incremento en la síntesis de Cx43 entre las 3 y las 7 horas de estimulación (Ferrari *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 1997). De esta forma, considerando que el desacoplamiento de la monocapa ocurre inmediatamente posterior a la lesión, parece razonable suponer que se debe a cambios inducidos por modificaciones post-traduccionales en la apertura de las GJs y no a cambios en la expresión de las Cxs que las forman.

Se ha descrito que la lesión mecánica de la monocapa de células epiteliales induce la liberación de ATP y que la activación de receptores P2X inducida por ATP reduce el acoplamiento intercelular (Yin *et al.*, 2007; Zhu y Zhao, 2012). A su vez, la activación de receptores P2X estimula la migración endotelial y la angiogénesis (Tung *et al.*, 2015). Basado en estos antecedentes se evaluó si el desacoplamiento de las CEs de la monocapa endotelial durante la migración depende de la activación de una vía purinérgica. Sin embargo, el acoplamiento de las CEs en cultivo a través de GJs no se redujo en presencia de 1 μM ATP y el tratamiento con el inhibidor de receptores P2, PPADS, no previno la reducción del acoplamiento de las CEs de la monocapa posterior a la lesión (Figura 17), indicando que la señalización purinérgica no media el desacoplamiento de las CEs de la monocapa durante la migración. Otra posibilidad es que el desacoplamiento de la monocapa endotelial dependa de la señalización de VEGF. Las CEs en cultivo y durante la migración endotelial secretan VEGF

(Domigan *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2004) y se ha demostrado que la estimulación de CEs con VEGF reduce el acoplamiento intercelular (Suarez y Ballmer-Hofer, 2001). A su vez, se encontró que la estimulación con VEGF induce la fosforilación de Cx43 mediada por PKC y la internalización de los canales formados por dicha Cx (Nimlamool *et al.*, 2015). Estos antecedentes sugieren que la señalización de VEGF podría reducir el acoplamiento a través de GJ en la monocapa endotelial, posiblemente por la fosforilación de las Cxs que las forman, sin embargo, se requieren futuros estudios para comprobar esta hipótesis.

Además de la formación de GJs, se ha demostrado que Cx43 forma hemicanales funcionales en las CEs, (Braet *et al.*, 2003; D'Hondt *et al.*, 2014; Delvaeye *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2005; Sáez *et al.*, 2018) y que los hemicanales formados por esta Cx son permeables a $Ca^{2+}$ (De Bock *et al.*, 2012; Bol *et al.*, 2017; Schalper *et al*., 2010). Es por ello que se analizó si la apertura de HCs formados por Cxs participa en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial. Se observó que se incrementa la apertura de HCs formados por Cxs en las CEs del frente de migración, pero no en la monocapa endotelial, lo cual fue inhibido por el péptido bloqueador de canales formados por Cx37 y/o 43, $^{37,43}$Gap27, o del péptido inhibidor de hemicanales de Cx43, Gap19 (Figura 18). Es importante señalar que a tiempos cortos de incubación, como los utilizados en estos experimentos (15 min), el péptido $^{37,43}$Gap27 sólo inhibe HCs (De Bock *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012) y que la magnitud de la inhibición de la apertura de HCs fue similar en presencia de $^{37,43}$Gap27 o Gap19, lo que indica que son los HCs formados por Cx43 los que se abren en las CEs del frente de migración. A su vez, el tratamiento con β-GA o $^{37,43}$Gap27 previno el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de forma específica en la parte posterior de las CEs del frente de migración (Figura 21) y al analizar la distribución de Cx43, se observó que, al igual que cav-1, Cx43 se distribuye de forma homogénea en la

monocapa endotelial y posterior a la lesión se redistribuye a la parte posterior de las CEs del frente de migración, donde aparentemente colocaliza con cav-1 (Figura 22). La localización de canales formados por Cx43 en caveolas ha sido observada en CEs de arteria uterina y células HEK293T transfectadas con Cx43 (Ampey *et al.*, 2016; Schubert *et al.*, 2002), por lo que considerando estos antecedentes es posible que los HCs de Cx43 en caveolas participen en la señalización de $Ca^{2+}$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración.

Se ha observado que la S-nitrosilación de Cx43 media la apertura de hemicanales formados por esta Cx en astrocitos y células HeLa (Figueroa *et al.*, 2013; Retamal *et al.*, 2006). Considerando que Cx43 se redistribuye junto a cav-1 a la parte posterior de las CEs, que la apertura de los hemicanales formados por Cx43 media el incremento de $Ca^{2+}$ producido en la parte posterior de las CEs del frente de migración y que parte de la expresión de la eNOS y la producción de NO se localiza en la parte posterior de las CEs durante la migración (Priya *et al.*, 2015), se exploró si la S-nitrosilación media la apertura de hemicanales formados por Cx43 durante la migración endotelial. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con el inhibidor de la eNOS, L-NA, o con el agente reductor AA redujo la apertura de hemicanales formados por Cxs en las CEs del frente de migración y la migración endotelial (Figura 23) en una magnitud similar a lo observado en presencia de Gap19. A su vez, se observó que el nivel total de S-nitrosilaciones de proteínas se incrementa en las CEs del frente de migración, lo que se redujo en presencia de L-NA o AA (Figura 24). Se ha descrito en CEs macrovasculares y microvasculares que la eNOS se localiza en caveolas (Blair *et al.*, 1999; García-Cardeña *et al.*, 1997; Shaul *et al.*, 1996), esto sumado a los resultados obtenidos en este estudio sugiere que la producción de NO mediada por la activación de la eNOS podría, a

través de la S-nitrosilación de la Cx43, incrementar la apertura de hemicanales formados por esta Cx en las caveolas de la parte posterior de las CEs del frente de migración.

La participación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX, del modo reverso del intercambiador NCX y de los hemicanales formados por Cx43 en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la parte posterior de las CEs del frente de migración, sugiere que estos tres componentes serían parte de una misma vía de señalización. En concordancia con esto, la apertura de hemicanales formados Cxs en las CEs del frente de migración se redujo en presencia de 1 μM TTX (Figura 25) o 1 μM SEA0400 (Figura 26), esto muestra que la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el modo reverso del NCX es un evento previo a la apertura de hemicanales formados por Cx43 en las CEs del frente de migración. Estos resultados son consistentes con la noción de que el acoplamiento funcional de los canales $Na_v$ y el modo reverso del NCX media un incremento inicial de $Ca^{2+}$ que activa la producción de NO e induce la apertura de hemicanales formados por Cx43, manteniendo de esta forma el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la parte posterior de las células durante la migración endotelial.

Al evaluar la participación de los hemicanales formados por Cx43 en la migración endotelial, se observó que el tratamiento con el inhibidor general de Cxs, β-GA, o con el bloqueador de los HCs formados por Cx43, Gap19, redujo en una magnitud similar el cierre de la lesión de las CEs (Figura 19); sin embargo, el tratamiento con el péptido Gap19 no redujo la proliferación de las CEs en cultivos intactos o durante la migración (Figura 20). Esto indica que la apertura de hemicanales formados por Cx43 en las CEs del frente de migración participa en la migración, pero no en la proliferación endotelial. Similar a lo observado al inhibir los canales $Na_v$ sensibles a TTX, el bloqueo de los hemicanales formados por Cx43 redujo el cierre de la lesión endotelial en aproximadamente un 20%. Se debe notar que la

inhibición de los hemicanales formados por Cx43 no afectó la proliferación endotelial, lo cual indica que la reducción en el porcentaje de cierre de la lesión observada en estas condiciones corresponde íntegramente a la migración endotelial y que el 80% restante probablemente depende, en forma importante, de la proliferación endotelial. Esto último se podría evaluar reduciendo el tiempo del periodo experimental de manera que la repoblación del área libre de células dependa principalmente de la migración endotelial, con una mínima contribución de la proliferación celular.

Dado que la migración endotelial es una de las etapas claves del proceso angiogénico, se determinó si los canales formados por Cx43 participan en la angiogénesis. En este contexto, los resultados obtenidos en CEs muestran que la inhibición de los hemicanales formados por Cx43 redujo la formación de estructuras tubulares de CEs en cultivo (Figura 27).

Finalmente, para corroborar la participación de los canales formados por Cx43 en la angiogénesis se evaluó la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales en embriones de peces cebra en los que se redujo la expresión de Cx43 mediante la microinyección de un morfolino. La expresión de Cx43 en los vasos sanguíneos, el corazón y el sistema esquelético de los peces cebra ha sido previamente descrita (Chatterjee *et al.*, 2005; Janssen-Bienhold *et al.*, 1998). A la fecha, se ha determinado que los canales formados por Cx43 son relevantes para la formación y regeneración del sistema esquelético del pez cebra (Bhadra y Iovine, 2015; Govindan y Iovine, 2014; Hoptak-Solga *et al.*, 2007); sin embargo, se desconoce su función en el endotelio y si participan en la angiogénesis en este modelo. En el presente estudio, se observó que la inyección de 0.8 ng del morfolino contra *Cx43* indujo un incremento del área ocupada por las cavidades cardiacas, tanto en el ancho (149.9 ± 5.7 µm en el Cx43MO vs. 119.1 ± 5.4 µm en CtrlMO) y en el largo (285.9 ± 11.4 µm en Cx43MO vs

251.7 ± 5.1 μm en CtrlMO) (Figura 28), esto es consistente con lo previamente reportado en embriones de peces cebra en los que la inyección de 1.5 ng del mismo morfolino contra *Cx43* utilizado en la presente tesis indujo el desarrollo de defectos cardiovasculares, entre ellos edema pericárdico, alteraciones parciales o totales del plegamiento cardiaco y reducción en el número de eritrocitos en circulación; así como defectos esqueléticos, como el desarrollo de segmentos óseos más cortos durante el crecimiento de la aleta asociado a una menor proliferación de los osteoblastos, sin afectar la viabilidad y/o el tamaño de los embriones (Iovine *et al.*, 2005). A su vez, se observó una curvatura en la porción media de los embriones morfantes de Cx43 lo que no fue observado en los embriones control (Figura 28). Curvaturas similares en la porción media de embriones de peces cebra entre las 24 y 48 hpf se han evidenciado en embriones que presentan defectos esqueléticos, entre ellos del esqueleto faríngeo, la aleta pectoral y la columna vertebral (Liu *et al.,* 2013), esto sugiere que los defectos observados en los embriones morfantes de Cx43 corresponden a defectos morfológicos esqueléticos.

Se ha descrito que algunos morfolinos pueden inducir efectos tóxicos dependientes de la activación de p53, por lo cual se ha sugerido que la inyección de un morfolino contra p53 en conjunto al morfolino a ser evaluado es una medida recomendada para descartar los efectos inespecíficos en los embriones de peces cebra (Bedell *et al*., 2011). Si bien, en el presente estudio con el morfolino contra *Cx43* no se evaluaron los posibles efectos tóxicos dependientes de p53, en resultados preliminares se observó que los embriones inyectados con un TALEN contra *Cx43* presentan los mismos defectos cardiacos y la curvatura en la porción central producidos por el tratamiento con el morfolino contra *Cx43*. Además, aunque se deben realizar los controles para descartar la posible participación de p53, en los embriones

inyectados con el TALEN contra *Cx43* se observó una reducción similar en la formación de ISV, lo cual apoya la especificidad del morfolino contra *Cx43*. Consistente con esto, el grupo de Iovine (Iovine *et al*., 2005) determinó que los defectos morfológicos producidos por el mismo morfolino contra *Cx43* usado en esta tesis no difieren de los observados en un modelo de embrión de pez cebra que expresa alelos hipomórficos de *Cx43* (*sof*$^{b123}$), lo cual apoya la noción de que la inhibición del crecimiento de los ISV observado en los morfantes de Cx43 no corresponden a efectos inespecíficos.

Respecto a la angiogénesis, los resultados obtenidos muestran que los embriones morfantes de Cx43 presentan una reducción de la formación de vasos sanguíneos intersegmentales (Figura 29). Esto último no se asoció a cambios en la proliferación de las CEs (Figura 30), pero sí a una reducción en los incrementos de $Ca^{2+}$ en las CEs durante la angiogénesis (Figura 31). Si bien se ha determinado de forma general la participación de Cx43 en la angiogénesis a través de la reducción de su expresión en CEs (Dhein *et al.*, 2015; Gartner *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2010), los resultados de la presente tesis proponen por primera vez un mecanismo por el que los hemicanales formados por Cx43 median la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial, lo cual podría explicar su participación en la angiogénesis.

# CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que los canales $Na_v$ sensibles a TTX participan en la señalización de $Ca^{2+}$ durante la migración endotelial y la angiogénesis, posiblemente a través de la activación del modo reverso del NCX. Mientras que la redistribución de los canales $Na_v1.2$ en asociación con cav-1 a la parte posterior de las CEs del frente de migración es necesaria para su participación en la señalización de $Ca^{2+}$, la activación de los canales $Na_v1.6$ no requiere de su localización y redistribución en caveolas durante la migración endotelial, lo cual sugiere que los canales $Na_v1.2$ y los $Na_v1.6$ participan por diferentes mecanismos.

A su vez, se demostró que la apertura de los hemicanales formados por Cx43 en la parte posterior de las CEs del frente de migración es una vía de entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular durante la migración endotelial y la angiogénesis. Los resultados sugieren que la S-nitrosilación de Cx43 es el mecanismo que incrementa la apertura de los HCs formados por esta Cx durante la migración. Sumado, a ello se mostró que la activación de los canales $Na_v$ sensibles a TTX y el modo reverso del NCX inducen la apertura de los hemicanales de Cx43 en las CEs del frente de migración. .

Finalmente, en base a los resultados de la presente investigación se propone el siguiente mecanismo (Figura 32): La activación en caveolas de canales $Na_v$ sensibles a TTX media un incremento de $Na^+$ de forma restringida a la parte posterior de las CEs del frente de migración, lo cual induce la activación del modo reverso del NCX, incrementando inicialmente la $[Ca^{2+}]_i$. Esta señal de $Ca^{2+}$ inicial lleva a un aumento en la producción de NO y de esta forma se induce la apertura de hemicanales formados por Cx43 a través de la S-

nitrosilación de esta Cx, lo que genera un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que estimula la contracción de las fibras de estrés en la parte posterior de las CEs y de esta forma la migración endotelial y la angiogénesis.

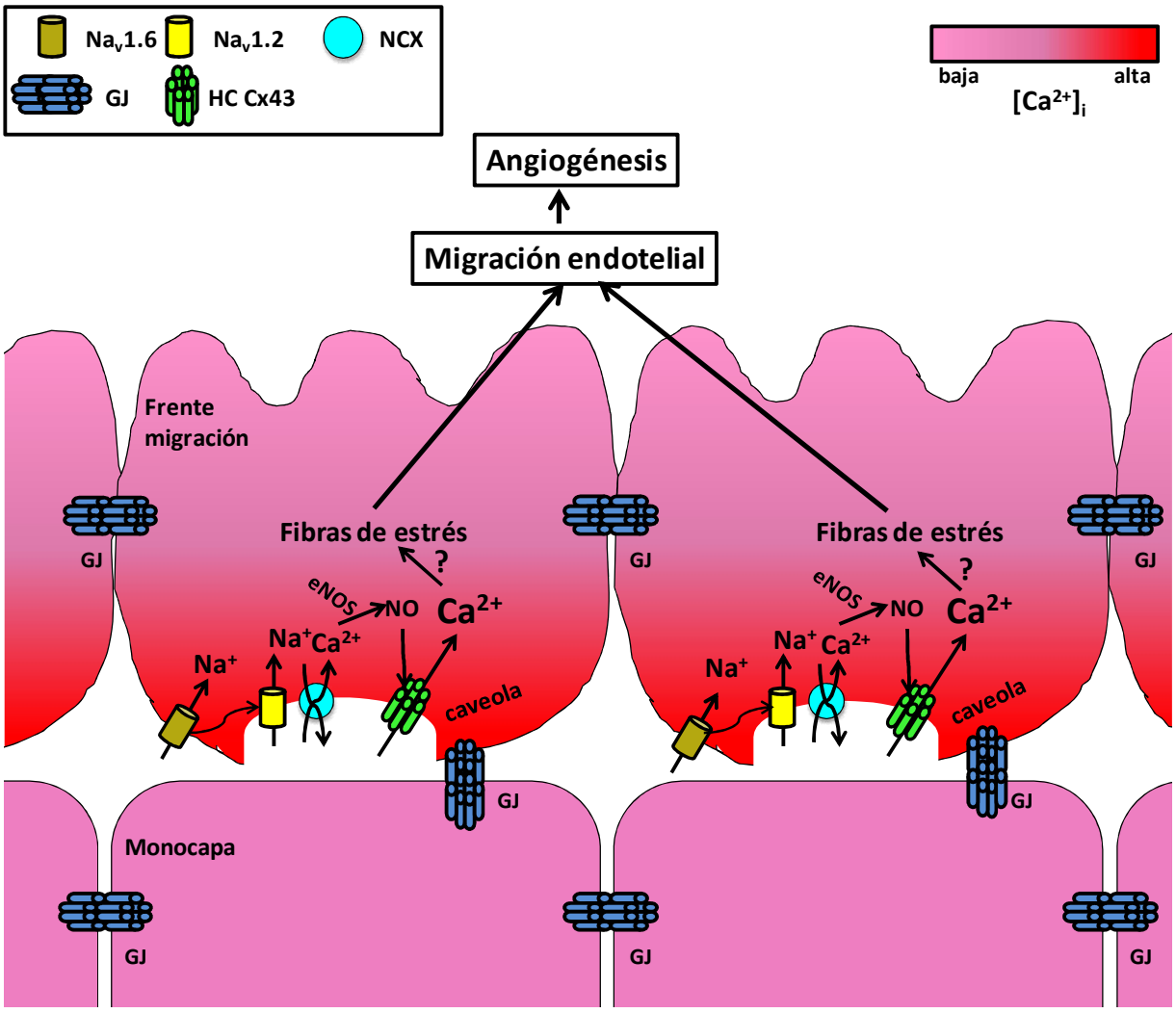


**Figura 32. Mecanismo propuesto de señalización de $Ca^{2+}$ mediado por los canales $Na_v$ sensibles a TTX, el modo reverso del NCX y los hemicanales de Cx43 durante la migración endotelial y la angiogénesis.** La activación secuencial de los canales $Na_v$ sensibles a TTX media incrementos de $Na^+$ los que activan el modo reverso del NCX en caveolas e incrementan inicialmente la $[Ca^{2+}]_i$ de forma restringida en la parte posterior de las CEs del frente de migración. Esta señal de $Ca^{2+}$ inicial podría incrementar la producción de NO e inducir la apertura de hemicanales de Cx43 mediada por S-nitrosilación generando así un incremento de la $[Ca^{2+}]$ que estimule retracción de la parte posterior de las CEs mediado por la contracción de las fibras de estrés y de esta forma estimula la migración endotelial y la angiogénesis.

# BIBLIOGRAFIA


Alonso, F., Boittin, F.-X., Beny, J.-L., y Haefliger, J.-A. (2010). Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and eNOS levels in the mouse aorta. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 299.

Ampey, B. C., Morschauser, T. J., Ramadoss, J., y Magness, R. R. (2016). Domain-Specific Partitioning of Uterine Artery Endothelial Connexin43 and Caveolin-1. Hypertension. 68(4), 982-988.

Anderson, K. J., Cormier, R. T., y Scott, P. M. (2019). Role of ion channels in gastrointestinal cancer. World J Gastroenterol. 25(38), 5732-5772.

Andrikopoulos, P., Baba, A., Matsuda, T., Djamgoz, M. B., Yaqoob, M. M., & Eccles, S. A. (2011). $Ca^{2+}$ influx through reverse mode $Na^{+}/Ca^{2+}$ exchange is critical for vascular endothelial growth factor-mediated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and angiogenic functions of human endothelial cells. J Biol Chem. 286(44), 37919-37931.

Andrikopoulos, P., Fraser, S. P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D. y Djamgoz, M. B. (2011). Angiogenic functions of voltage-gated $Na^{+}$ Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. J Biol Chem. 286(19), 16846-16860.

Andrikopoulos, P., Kieswich, J., Harwood, S. M., Baba, A., Matsuda, T., Barbeau, O., y Yaqoob, M. M. (2015). Endothelial Angiogenesis and Barrier Function in Response to Thrombin Require $Ca^{2+}$ Influx through the $Na^{+}/Ca^{2+}$ Exchanger. J Biol Chem. 290(30), 18412-18428.

Angus, M., y Ruben, P. (2019). Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action. Channels (Austin, Tex.). 13(1), 400-409.

Argraves, K. M., Wilkerson, B. A., y Argraves, W. S. (2010). Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis. World J Biol Chem. 1(10), 291-297.

Au, P., Tam, J., Duda, D. G., Lin, P. C., Munn, L. L., Fukumura, D., y Jain, R. K. (2009). Paradoxical effects of PDGF-BB overexpression in endothelial cells on engineered blood vessels in vivo. Am J Pathol. 175(1), 294-302.

Bai, H., Forrester, J. V., y Zhao, M. (2011). DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors. Cytokine. 55(1), 110-115.

Bai, H., McCaig, C. D., Forrester, J. V., y Zhao, M. (2004). DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(7), 1234-1239.

Bansode R. R., Leung T., Randolph P., Williams L., y Ahmedna M. (2012). Cinnamon extract inhibits angiogenesis in zebrafish and human endothelial cells by suppressing VEGFR1, VEGFR2, and PKC-mediated MAP kinase. Food Science & Nutrition. 1(1): 74–82

Banumathi, E., O'Connor, A., Gurunathan, S., Simpson, D. A., McGeown, J. G., y Curtis, T. M. (2011). VEGF-induced retinal angiogenic signaling is critically dependent on $Ca^{2+}$ signaling by $Ca^{2+}$/calmodulin-dependent protein kinase II. Invest Ophthalmol Vis Sci. 52(6), 3103-3111.

Beardsley, A., Fang, K., Mertz, H., Castranova, V., Friend, S., & Liu, J. (2005). Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. J Biol Chem. 280(5), 3541-3547.

Bedell, V. M., Westcot, S. E., y Ekker, S. C. (2011). Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. Briefings in functional genomics. 10(4):181-188.

Berra-Romani, R., Avelino-Cruz, J. E., Raqeeb, A., Della Corte, A., Cinelli, M., Montagnani, S., y Tanzi, F. (2013). $Ca^{2+}$-dependent nitric oxide release in the injured endothelium of excised rat aorta: a promising mechanism applying in vascular prosthetic devices in aging patients. BMC Surgery. 13(2), S40.

Berra-Romani, R., Raqeeb, A., Avelino-Cruz, J. E., Moccia, F., Oldani, A., Speroni, F., y Tanzi, F. (2008). $Ca^{2+}$ signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. Cell Calcium. 44.

Besson, P., Driffort, V., Bon, É., Gradek, F., Chevalier, S., y Roger, S. (2015). How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? Biochim Biophys Acta 1848(10 Pt B), 2493-2501.

Bhadra, J., y Iovine, M. K. (2015). Hsp47 mediates Cx43-dependent skeletal growth and patterning in the regenerating fin. Mech Dev. 138 *Pt 3*, 364-374.

Black, J. A., y Waxman, S. G. (2013). Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. Neuron. 80(2), 280-291.

Blair, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Conrad, P. A., y Smart, E. J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. J Biol Chem. 274(45), 32512-32519.

Blanks, A. M., Zhao, Z. H., Shmygol, A., Bru-Mercier, G., Astle, S., y Thornton, S. (2007). Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. J Physiol. 581(Pt 3), 915-926.

Blaustein, M. P., y Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol Rev. 79(3), 763-854.

Bol, M., Wang, N., De Bock, M., Wacquier, B., Decrock, E., Gadicherla, A., y Leybaert, L. (2017). At the cross-point of connexins, calcium, and ATP: blocking hemichannels inhibits vasoconstriction of rat small mesenteric arteries. Cardiovasc Res. 113(2), 195-206.

Bossu, J. L., Feltz, A., Rodeau, J. L., y Tanzi, F. (1989). Voltage-dependent transient calcium currents in freshly dissociated capillary endothelial cells. FEBS Lett. 255(2), 377-380.

Bossuyt, J., Taylor, B. E., James-Kracke, M., y Hale, C. C. (2002). The cardiac sodium-calcium exchanger associates with caveolin-3. Ann N Y Acad Sci. 976, 197-204.

Bouïs, D., Kusumanto, Y., Meijer, C., Mulder, N. H., y Hospers, G. A. (2006). A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. Pharmacol Res. 53(2), 89-103.

Braet, K., Aspeslagh, S., Vandamme, W., Willecke, K., Martin, P. E., Evans, W. H., y Leybaert, L. (2003). Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. J Cell Physiol. 197(2), 205-213.

Braunstein, T. H., Inoue, R., Cribbs, L., Oike, M., Ito, Y., Holstein-Rathlou, N. H., y Jensen, L. J. (2009). The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. J Vasc Res. 46(2), 138-151.

Buschmann, I., y Schaper, W. (1999). Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. News Physiol Sci. 14, 121-125.

Callies, C., Fels, J., Liashkovich, I., Kliche, K., Jeggle, P., Kusche-Vihrog, K., y Oberleithner, H. (2011). Membrane potential depolarization decreases the stiffness of vascular endothelial cells. J Cell Sci. 124(Pt 11), 1936-1942.

Capitão, M., y Soares, R. (2016). Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. J Cell Biochem- 117(11), 2443-2453.

Carbajo-Lozoya, J., Lutz, S., Feng, Y., Kroll, J., Hammes, H. P., y Wieland, T. (2012). Angiotensin II modulates VEGF-driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium. Cell Signal. 24(6), 1261-1269.

Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron. 26(1), 13-25.

Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. J Physiol. 590(11), 2577-2589.

Chatterjee, B., Chin, A. J., Valdimarsson, G., Finis, C., Sonntag, J. M., Choi, B. Y., y Lo, C. W. (2005). Developmental regulation and expression of the zebrafish connexin43 gene. Developmental Dynamics. 233(3), 890-906.

Chifflet, S., Hernández, J. A., y Grasso, S. (2005). A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. Am J Physiol Cell Physiol. 288(6), C1420-1430.

Chifflet, S., Hernández, J. A., Grasso, S., y Cirillo, A. (2003). Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. Exp Cell Res. 282(1), 1-13.

Cooke, J. P., y Losordo, D. W. (2002). Nitric oxide and angiogenesis. Circulation. 105(18), 2133-2135.

Craig, M. P., y Sumanas, S. (2016). ETS transcription factors in embryonic vascular development. Angiogenesis. 19(3), 275-285.

Cross, M. J., y Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. Trends Pharmacol Sci. 22(4), 201-207.

D'Hondt, C., Iyyathurai, J., Himpens, B., Leybaert, L., y Bultynck, G. (2014). Cx43-hemichannel function and regulation in physiology and pathophysiology: insights from the bovine corneal endothelial cell system and beyond. Front Physiol. 5, 348.

Daut, J., Mehrke, G., Nees, S., y Newman, W. H. (1988). Passive electrical properties and electrogenic sodium transport of cultured guinea-pig coronary endothelial cells. J Physiol. 402, 237-254.

Dawson, N. S., Zawieja, D. C., Wu, M. H., y Granger, H. J. (2006). Signaling pathways mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in human endothelial cells. FASEB J. 20(7), 991-993.

Dbouk, H. A., Mroue, R. M., El-Sabban, M. E., y Talhouk, R. S. (2009). Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. Cell Commun Signal. 7, 4.

De Bock, M., Culot, M., Wang, N., Bol, M., Decrock, E., De Vuyst, E., y Leybaert, L. (2011). Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability. J Cereb Blood Flow Metab. 31(9), 1942-1957.

De Bock, M., Wang, N., Bol, M., Decrock, E., Ponsaerts, R., Bultynck, G., y Leybaert, L. (2012). Connexin 43 hemichannels contribute to cytoplasmic Ca2+ oscillations by providing a bimodal $Ca^{2+}$-dependent $Ca^{2+}$ entry pathway. *J Biol Chem, 287*(15), 12250-12266.

De Proost, I., Brouns, I., Pintelon, I., Timmermans, J. P., y Adriaensen, D. (2007). Pulmonary expression of voltage-gated calcium channels: special reference to sensory airway receptors. Histochem Cell Biol. 128(4), 301-316.

del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-García, A., Anderson, R. G., y Schwartz, M. A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. Nat Cell Biol. 7(9), 901-908.

Delvaeye, T., De Smet, M. A. J., Verwaerde, S., Decrock, E., Czekaj, A., Vandenbroucke, R. E., y Leybaert, L. (2019). Blocking connexin43 hemichannels protects mice against tumour necrosis factor-induced inflammatory shock. Sci Rep. 9(1), 16623.

Deveza, L., Choi, J., y Yang, F. (2012). Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. Theranostics. 2(8), 801-814.

Dhein, S., Gaertner, C., Georgieff, C., Salameh, A., Schlegel, F., y Mohr, F. W. (2015). Effects of isoprenaline on endothelial connexins and angiogenesis in a human endothelial cell culture system. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 388(1), 101-108.

Domigan, C. K., Warren, C. M., Antanesian, V., Happel, K., Ziyad, S., Lee, S., y Iruela-Arispe, M. L. (2015). Autocrine VEGF maintains endothelial survival through regulation of metabolism and autophagy. J Cell Sci. 128(12), 2236-2248.

Dubroca, C., Loyer, X., Retailleau, K., Loirand, G., Pacaud, P., Feron, O., y Henrion, D. (2007). RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. Cardiovasc Res. 73(1), 190-197.

Ellertsdóttir, E., Lenard, A., Blum, Y., Krudewig, A., Herwig, L., Affolter, M., y Belting, H. G. (2010). Vascular morphogenesis in the zebrafish embryo. Dev Biol. 341(1), 56-65.

Elshabrawy, H. A., Chen, Z., Volin, M. V., Ravella, S., Virupannavar, S., y Shahrara, S. (2015). The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. Angiogenesis. 18(4), 433-448.

Evans, W. H., y Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). Mol Membr Biol. 19(2), 121-136.

Faehling, M., Kroll, J., Föhr, K. J., Fellbrich, G., Mayr, U., Trischler, G., y Waltenberger, J. (2002). Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. Faseb j. 16(13), 1805-1807.

Fang, J. S., Angelov, S. N., Simon, A. M., y Burt, J. M. (2012). Cx40 is required for, and cx37 limits, postischemic hindlimb perfusion, survival and recovery. J Vasc Res. 49(1), 2-12.

Fang, J. S., Coon, B. G., Gillis, N., Chen, Z., Qiu, J., Chittenden, T. W., y Hirschi, K. K. (2017). Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification. Nat Commun. 8(1), 2149.

Fekete, A., Franklin, L., Ikemoto, T., Rózsa, B., Lendvai, B., Sylvester Vizi, E., y Zelles, T. (2009). Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca elevation: implication for epilepsy. J Neurochem. 111(3), 745-756.

Feng, L., Liao, W., Luo, Q., Zhang, H., Wang, W., Zheng, J., y Chen, D. (2012). Caveolin-1 orchestrates fibroblast growth factor 2 signaling control of angiogenesis in placental artery endothelial cell caveolae. J. Cell Physiol. 227(6):2480-2491

Ferrari, G., Cook, B. D., Terushkin, V., Pintucci, G., y Mignatti, P. (2009). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. J Cell Physiol. 219(2), 449-458.

Figueroa, X. F., Chen, C. C., Campbell, K. P., Damon, D. N., Day, K. H., Ramos, S., y Duling, B. R. (2007). Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(3), H1371-1383.

Figueroa, X. F., Lillo, M. A., Gaete, P. S., Riquelme, M. A., y Sáez, J. C. (2013). Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. Neuropharmacology. 75, 471-478.

Fogh, B. S., Multhaupt, H. A., y Couchman, J. R. (2014). Protein kinase C, focal adhesions and the regulation of cell migration. J Histochem Cytochem. *62*(3), 172-184.

Frank, P. G., Woodman, S. E., Park, D. S., y Lisanti, M. P. (2003). Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. *23*(7), 1161-1168.

Fukata, M., y Kaibuchi, K. (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. Nat Rev Mol Cell Biol. 2(12), 887-897.

Fukuhara, S., Zhang, J., Yuge, S., Ando, K., Wakayama, Y., Sakaue-Sawano, A., y Mochizuki, N. (2014). Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish. Dev Biol. *393*(1), 10-23.

García-Cardeña, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., y Sessa, W. C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. J Biol Chem. 272(41), 25437-25440.

Gartner, C., Ziegelhoffer, B., Kostelka, M., Stepan, H., Mohr, F. W., y Dhein, S. (2012). Knock-down of endothelial connexins impairs angiogenesis. Pharmacol Res. 65(3), 347-357.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., y Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. The Journal of cell biology. 161(6), 1163-1177.

Gershome, C., Lin, E., Kashihara, H., Hove-Madsen, L., y Tibbits, G. F. (2011). Colocalization of voltage-gated $Na^+$ channels with the $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger in rabbit cardiomyocytes during development. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 300(1), H300-311.

Geudens, I., y Gerhardt, H. (2011). Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. Development. *138*(21), 4569-4583.

Gingras, D., Gauthier, F., Lamy, S., Desrosiers, R. R., y Béliveau, R. (1998). Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. *Biochem Biophys Res* Commun. 247(3), 888-893.

Gogiraju, R., Bochenek, M. L., y Schäfer, K. (2019). Angiogenic Endothelial Cell Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. Front Cardiovasc Med. 6, 20.

Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. Annu Rev Physiol. 63, 871-894.

Gomes, P., Srinivas, S. P., Van Driessche, W., Vereecke, J., y Himpens, B. (2005). ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46(4), 1208-1218.

Gordienko, D. V., y Tsukahara, H. (1994). Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na+ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar arter and human umbilical vein. Pflugers Arch. 428(1), 91-93.

Gosling, M., Harley, S. L., Turner, R. J., Carey, N., y Powell, J. T. (1998). Human saphenous vein endothelial cells express a tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium current. J Biol Chem, 273(33), 21084-21090.

Govindan, J., & Iovine, M. K. (2014). Hapln1a is required for connexin43-dependent growth and patterning in the regenerating fin skeleton. PLoS One. 9(2), e88574.

Grande-García, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N. B., Waterman-Storer, C. M., Valdivielso, J. M., y del Pozo, M. A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. J Cell Biol. 177(4), 683-694.

Griffioen, A. W., y Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol Rev. 52(2), 237-268.

Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Cullen, A., Harwood, L., Medina, R. J., O'Neill, C. L., y Simpson, D. A. (2012). Deep sequencing reveals predominant expression of miR-21 amongst the small non-coding RNAs in retinal microvascular endothelial cells. J Cell Biochem. 113(6), 2098-2111.

Gustafsson, F., Mikkelsen, H. B., Arensbak, B., Thuneberg, L., Neve, S., Jensen, L. J., y Holstein-Rathlou, N. H. (2003). Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. Histochem Cell Biol. 119(2), 139-148.

Gálvez, B. G., Matías-Román, S., Yáñez-Mó, M., Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F., y Arroyo, A. G. (2004). Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. Molecular biology of the cell. 15(2), 678-687.

Ha, J. M., Jin, S. Y., Lee, H. S., Shin, H. K., Lee, D. H., Song, S. H., y Bae, S. S. (2016). Regulation of retinal angiogenesis by endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. Korean J Physiol Pharmacol. 20(5), 533-538.

Haefliger, J. A., Allagnat, F., Hamard, L., Le Gal, L., Meda, P., Nardelli-Haefliger, D., y Alonso, F. (2017). Targeting Cx40 (Connexin40) Expression or Function Reduces Angiogenesis in the Developing Mouse Retina. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 37(11), 2136-2146.

Haefliger, J. A., Nicod, P., y Meda, P. (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. Cardiovasc Res. 62(2), 345-356.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science. 279(5350), 509-514.

Hamdollah Zadeh, M. A., Glass, C. A., Magnussen, A., Hancox, J. C., y Bates, D. O. (2008). VEGF-mediated elevated intracellular calcium and angiogenesis in human microvascular endothelial cells in vitro are inhibited by dominant negative TRPC6. Microcirculation. 15(7), 605-614.

Hashad, A. M., Harraz, O. F., Brett, S. E., Romero, M., Kassmann, M., Puglisi, J. L., y Welsh, D. G. (2018). Caveolae Link CaV3.2 Channels to BKCa-Mediated Feedback in Vascular Smooth Muscle. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 38(10), 2371-2381.

Herbert, S. P., y Stainier, D. Y. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 12(9), 551-564.

Hess, D. T., y Stamler, J. S. (2012). Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. J Biol Chem. 287(7), 4411-4418.

Hoffmann, A., Gloe, T., Pohl, U., y Zahler, S. (2003). Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. Cardiovasc Res. 60(2), 421-430.

Hoptak-Solga, A. D., Klein, K. A., DeRosa, A. M., White, T. W., y Iovine, M. K. (2007). Zebrafish short fin mutations in connexin43 lead to aberrant gap junctional intercellular communication. FEBS Lett. 581(17), 3297-3302.

Hu, M., Gopalakrishnan, M., y Li, J. (2009). Positive allosteric modulation of alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lack of cytotoxicity in PC12 cells and rat primary cortical neurons. Br J Pharmacol. 158(8), 1857-1864.

Inampudi, C., Akintoye, E., Ando, T., y Briasoulis, A. (2018). Angiogenesis in peripheral arterial disease. Curr Opin Pharmacol. 39, 60-67.

Iovine, M. K., Higgins, E. P., Hindes, A., Coblitz, B., y Johnson, S. L. (2005). Mutations in connexin43 (GJA1) perturb bone growth in zebrafish fins. Dev Biol. 278(1), 208-219.

Isogai, S., Lawson, N. D., Torrealday, S., Horiguchi, M., y Weinstein, B. M. (2003). Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. Development. 130(21), 5281-5290.

Isshiki, M., Ando, J., Yamamoto, K., Fujita, T., Ying, Y., y Anderson, R. G. (2002). Sites of $Ca(^{2+})$ wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. J Cell Sci. 115(Pt 3), 475-484.

Jackson, C. J., y Nguyen, M. (1997). Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. Int J Biochem Cell Biol*, 29*(10), 1167-1177.

Janssen-Bienhold, U., Dermietzel, R., y Weiler, R. (1998). Distribution of connexin43 immunoreactivity in the retinas of different vertebrates. J Comp Neurol. 396(3), 310-321.

Jin, R. C., y Loscalzo, J. (2010). Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. J Blood Med, 2010(1). 147-162.

Jozkowicz, A., Cooke, J. P., Guevara, I., Huk, I., Funovics, P., Pachinger, O., y Dulak, J. (2001). Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. Cardiovasc Res. 51(4), 773-783.

Kameritsch, P., Hoffmann, A., y Pohl, U. (2003). Opposing effects of nitric oxide on different connexins expressed in the vascular system. Cell Commun Adhes. 10(4-6), 305-309.

Kameritsch, P., Khandoga, N., Nagel, W., Hundhausen, C., Lidington, D., y Pohl, U. (2005). Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx37-containing gap junctions to small molecules. J Cell Physiol. 203(1), 233-242.

Kim, J. M., Lee, M., Kim, N., y Heo, W. D. (2016). Optogenetic toolkit reveals the role of $Ca^{2+}$ sparklets in coordinated cell migration. Proceedings of the National Academy of Sciences. 113(21), 5952.

Ko, Y. S., Yeh, H. I., Rothery, S., Dupont, E., Coppen, S. R., y Severs, N. J. (1999). Connexin make-up of endothelial gap junctions in the rat pulmonary artery as revealed by immunoconfocal microscopy and triple-label immunogold electron microscopy. J Histochem Cytochem. 47(5), 683-692.

Kohn, E. C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R. P., y Liotta, L. A. (1995). Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(5), 1307-1311.

Kwak, B. R., Pepper, M. S., Gros, D. B., y Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. Mol Biol Cell. 12(4), 831-845.

Lago, J., Rodríguez, L. P., Blanco, L., Vieites, J. M., y Cabado, A. G. (2015). Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses. Mar Drugs. 13(10), 6384-6406.

Lamalice, L., Le Boeuf, F., y Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. Circ Res. 100(6), 782-794.

Lang, I., Pabst, M. A., Hiden, U., Blaschitz, A., Dohr, G., Hahn, T., y Desoye, G. (2003). Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. Eur J Cell Biol. 82(4), 163-173.

Larbig, R., Torres, N., Bridge, J. H., Goldhaber, J. I., y Philipson, K. D. (2010). Activation of reverse $Na^{+}$-$Ca^{2+}$ exchange by the $Na^{+}$ current augments the cardiac $Ca^{2+}$ transient: evidence from NCX knockout mice. J Physiol, 588(Pt 17), 3267-3276.

Larson, D. M., Wrobleski, M. J., Sagar, G. D., Westphale, E. M., y Beyer, E. C. (1997). Differential regulation of connexin43 and connexin37 in endothelial cells by cell density, growth, and TGF-beta1. Am J Physiol. 272(2 Pt 1), C405-415.

Lawson N. D., y Weinstein B. M. (2002). *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. Developmental Biology. 248,307-318.

Lederer, W. J., Niggli, E., y Hadley, R. W. (1990). Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. Science. 248(4953), 283.

Lee, C. H., y Ruben, P. C. (2008). Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. Channels (Austin), 2(6), 407-412.

Lee, P. C., Kibbe, M. R., Schuchert, M. J., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Griffith, B. P., y Shears, L. L. (2000). Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. Microvasc Res. 60(3), 269-280.

Lee, P. C., Salyapongse, A. N., Bragdon, G. A., Shears, L. L., Watkins, S. C., Edington, H. D., y Billiar, T. R. (1999). Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. Am J Physiol. 277(4 Pt 2), H1600-1608.

Li, J., Cubbon, R. M., Wilson, L. A., Amer, M. S., McKeown, L., Hou, B., y Beech, D. J. (2011). Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca2+ entry and endothelial tube formation. Circ Res. 108(10), 1190-1198.

Li, Y., Luo, H., Liu, T., Zacksenhaus, E., y Ben-David, Y. (2015). The ets transcription factor Fli-1 in development, cancer and disease. Oncogene, 34(16), 2022-2031.

Liang, C. C., Park, A. Y., y Guan, J. L. (2007). In *vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2(2), 329-333.

Liao, Y., Day, K. H., Damon, D. N., y Duling, B. R. (2001). Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(17), 9989-9994.

Lillo, M. A., Gaete, P. S., Puebla, M., Ardiles, N. M., Poblete, I., Becerra, A., y Figueroa, X. F. (2018). Critical contribution of $Na(^{+})$-$Ca(^{2+})$ exchanger to the $Ca(^{2+})$-mediated vasodilation activated in endothelial cells of resistance arteries. Faseb j. 32(4), 2137-2147.

Little, T. L., Beyer, E. C., y Duling, B. R. (1995). Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. Am J Physiol. 268(2 Pt 2), H729-739.

Liu, J., Wang, X. B., Park, D. S., y Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. J Biol Chem. 277(12), 10661-10668.

Liu X., Wang H., Li G., Huang H., y Wang Y. (2013). The function of DrPax1b gene in the embryonic development of zebrafish. Genes Genet. Syst. 88, p. 261–269

Madejska, A., Michalski, M., y Osek, J. (2019). Marine Tetrodotoxin as a Risk for Human Health. J Vet Res. 63(4), 579-586.

Mansouri, K., Khodarahmi, R., y Ghadami, S. A. (2013). An *in vitro* model for spontaneous angiogenesis using rat mesenteric endothelial cells: possible therapeutic perspective for obesity and related disorders. Pharm Biol. 51(8), 974-980.

Martini, A., Bruno, R., Mazzulla, S., Nocita, A., y Martino, G. (2010). Angiotensin II regulates endothelial cell migration through calcium influx via T-type calcium channel in human umbilical vein endothelial cells. Acta Physiol (Oxf). 198(4), 449-455.

Martin-Romero F., Lopez-Guerrero A., Pascual-Caro C y Pozo-Guisado E. (2017). The Interplay between Cytoskeleton and Calcium Dynamics, Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease. IntechOpen. doi: 10.5772/66862

Matsunaga, T., Weihrauch, D. W., Moniz, M. C., Tessmer, J., Warltier, D. C., y Chilian, W. M. (2002). Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. Circulation. 105(18), 2185-2191.

McKinnon, R. L., Bolon, M. L., Wang, H. X., Swarbreck, S., Kidder, G. M., Simon, A. M., y Tyml, K. (2009). Reduction of electrical coupling between microvascular endothelial cells by NO depends on connexin37. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 297(1), H93-H101.

Michaelis, U. R. (2014). Mechanisms of endothelial cell migration. Cell Mol Life Sci. 71(21), 4131-4148.

Mikkelsen, M. F., Björling, K., y Jensen, L. J. (2016). Age-dependent impact of Ca($_V$) 3.2 T-type calcium channel deletion on myogenic tone and flow-mediated vasodilatation in small arteries. J Physiol. 594(20), 5881-5898.

Moccia, F., Berra-Romani, R., y Tanzi, F. (2012). Update on vascular endothelial Ca($^{2+}$) signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. World journal of biological chemistry. 3(7), 127-158.

Moccia, F., Dragoni, S., Lodola, F., Bonetti, E., Bottino, C., Guerra, G., y Tanzi, F. (2012). Store-Dependent $Ca^{2+}$ Entry in Endothelial Progenitor Cells As a Perspective Tool to Enhance Cell-Based Therapy and Adverse Tumour Vascularization. Current Medicinal Chemistry. 19.

Moccia, F., Negri, S., Shekha, M., Faris, P., y Guerra, G. (2019). Endothelial Ca($^{2+}$) Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: just What It Takes to Make a Blood Vessel. Int J Mol Sci. 20(16).

Morais, C., Ebrahem, Q., Anand-Apte, B., y Parat, M. O. (2012). Altered angiogenesis in caveolin-1 gene-deficient mice is restored by ablation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Pathol. 180(4), 1702-1714.

Munaron, L., y Fiorio Pla, A. (2009). Endothelial calcium machinery and angiogenesis: understanding physiology to interfere with pathology. Curr Med Chem, 16(35), 4691-4703.

Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., y Symes, J. F. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. Journal of Clinical Investigation. 101.

Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., y Kawakami, K. (2013). Real-time visualization of neuronal activity during perception. Curr Biol. 23(4), 307-311.

Naito, M., Hayashi, T., Kuzuya, M., Funaki, C., Asai, K., y Kuzuya, F. (1989). Vascular endothelial cell migration in vitro roles of cyclic nucleotides, calcium ion and cytoskeletal system. Artery. 17(1), 21-31.

Nevins, A. K., y Thurmond, D. C. (2006). Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. J Biol Chem, 281(28), 18961-18972.

Nilius, B., y Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiol Rev. 81(4), 1415-1459.

Nimlamool, W., Andrews, R. M., y Falk, M. M. (2015). Connexin43 phosphorylation by PKC and MAPK signals VEGF-mediated gap junction internalization. Mol Biol Cell, 26(15), 2755-2768.

Noiri, E., Lee, E., Testa, J., Quigley, J., Colflesh, D., Keese, C. R., y Goligorsky, M. S. (1998). Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. Am J Physiol. 274(1), C236-244.

Novak, A. E., Taylor, A. D., Pineda, R. H., Lasda, E. L., Wright, M. A., y Ribera, A. B. (2006). Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. Dev Dyn. 235(7), 1962-1973.

Okamoto, T., Akita, N., Kawamoto, E., Hayashi, T., Suzuki, K., y Shimaoka, M. (2014). Endothelial connexin32 enhances angiogenesis by positively regulating tube formation and cell migration. Exp Cell Res. 321(2), 133-141.

Olschewski, A., Olschewski, H., Bräu, M. E., Hempelmann, G., Vogel, W., y Safronov, B. V. (2001). Basic electrical properties of in situ endothelial cells of small pulmonary arteries during postnatal development. Am J Respir Cell Mol Biol. 25(3), 285-290.

Pani, B., y Singh, B. B. (2009). Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. Cell Calcium. 45(6), 625-633.

Papapetropoulos, A., García-Cardeña, G., Madri, J. A., y Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Clin Invest. 100(12), 3131-3139.

Pappalardo, L. W., Samad, O. A., Black, J. A., y Waxman, S. G. (2014). Voltage-gated sodium channel $Na_v$ 1.5 contributes to astrogliosis in an in vitro model of glial injury via reverse $Na^+$ /$Ca^{2+}$ exchange. Glia. 62(7), 1162-1175.

Parat, M. O., Anand-Apte, B., y Fox, P. L. (2003). Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. Mol Biol Cell. 14(8), 3156-3168.

Parton, R. G., y Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(3), 185-194.

Pepper, M. S., Montesano, R., el Aoumari, A., Gros, D., Orci, L., y Meda, P. (1992). Coupling and connexin 43 expression in microvascular and large vessel endothelial cells. Am J Physiol. 262(5 Pt 1), C1246-1257.

Pepper, M. S., Spray, D. C., Chanson, M., Montesano, R., Orci, L., y Meda, P. (1989). Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cells. J Cell Biol. 109(6 Pt 1), 3027-3038.

Perez-Reyes, E. (1999). Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. Cell Mol Life Sci. 56(7-8), 660-669.

Pfenniger, A., Derouette, J.-P., Verma, V., Lin, X., Foglia, B., Coombs, W., y Sorgen, P. (2010). Gap Junction Protein Cx37 Interacts With Endothelial Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 30.

Phng, L. K., y Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. Dev Cell. 16(2). 196-208.

Pineda, R. H., Heiser, R. A., y Ribera, A. B. (2005). Developmental, molecular, and genetic dissection of INa in vivo in embryonic zebrafish sensory neurons. J Neurophysiol. 93(6), 3582-3593.

Pinto-Teixeira F., Muzzopappa M., Swoger J., Mineo A., Sharpe J., y H. López-Shier. (2013). Intravital imaging of hair-cell development and regeneration in the zebrafish. Frontiers in Neuroanatomy. 7(1):33, 1-12,

Pogoda, K., Kameritsch, P., Mannell, H., y Pohl, U. (2019). Connexins in the control of vasomotor function. Acta Physiol (Oxf). 225(1), e13108.

Pogoda, K., Kameritsch, P., Retamal, M. A., y Vega, J. L. (2016). Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. BMC Cell Biol. 17 Suppl 1(Suppl 1), 11.

Pohl, U. (2020). Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function. Physiol Rev. 100(2), 525-572.

Potente, M., Gerhardt, H., y Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell. 146(6), 873-887.

Priya, M. K., Sahu, G., Soto-Pantoja, D. R., Goldy, N., Sundaresan, A. M., Jadhav, V., y Chatterjee, S. (2015). Tipping off endothelial tubes: nitric oxide drives tip cells. Angiogenesis. 18(2), 175-189.

Raica, M., y Cimpean, A. M. (2010). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). 3(3), 572-599.

Retamal, M. A., Cortés, C. J., Reuss, L., Bennett, M. V., y Sáez, J. C. (2006). S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(12), 4475-4480.

Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. Curr Opin Cell Biol. 36, 103-

Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D., y Wink, D. A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(37), 13147-13152.

Rodrigues, L., Sinhorini, I., Avanzo, J., Oloris, S., Carneiro, C., Lima, C., y Dagli, M. (2010). Diminished angiogenesis in the cornea of mice with heterologous deletion of Connexin 43 gene (Gja1). Brazilian Journal of Veterinary Pathology. 3.

Rush, A. M., Dib-Hajj, S. D., y Waxman, S. G. (2005). Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, $Na_v1.2$ and $Na_v1.6$, expressed in mouse spinal sensory neurones. J Physiol. 564(Pt 3), 803-815.

Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M. L., y Struman, I. (2011). MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. PLoS One. 6(2). e16979.

Saffitz, J. E., Laing, J. G., y Yamada, K. A. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. Circ Res. 86(7), 723-728.

Salthun-Lassalle, B., Hirsch, E. C., Wolfart, J., Ruberg, M., y Michel, P. P. (2004). Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels. J Neurosci. 24(26), 5922-5930.

Sayner, S. L., Balczon, R., Frank, D. W., Cooper, D. M., y Stevens, T. (2011). Filamin A is a phosphorylation target of membrane but not cytosolic adenylyl cyclase activity. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 301(1), L117-124.

Schalper, K.A, Sánchez, H. A., Lee, S. C., Altenberg, G. A., Nathanson, M. H., y Sáez, J. C. (2010). Connexin 43 hemichannels mediate the Ca2+ influx induced by extracelular alkalinization. Am J Physiol Cell Physiol. 299:C1504-1515.

Schubert, A. L., Schubert, W., Spray, D. C., y Lisanti, M. P. (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. Biochemistry, 41.

Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., y Michel, T. (1996). Acylation targets emdothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. J Biol Chem. 271(11), 6518-6522.

Simon, A. M., y McWhorter, A. R. (2003). Role of connexin37 and connexin40 in vascular development. Cell Commun Adhes. 10(4-6), 379-385.

Stan, R. V. (2005). Structure of caveolae. Biochim Biophys Acta. 1746(3), 334-348.

Stevens, T. (2011). Functional and molecular heterogeneity of pulmonary endothelial cells. Proc Am Thorac Soc. 8(6), 453-457.

Straub, A. C., Billaud, M., Johnstone, S. R., Best, A. K., Yemen, S., Dwyer, S. T., y Palmer, L. (2011). Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 31.

Suarez, S., y Ballmer-Hofer, K. (2001). VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. J Cell Sci. 114(Pt 6), 1229-1235.

Sund, M., Zeisberg, M., y Kalluri, R. (2005). Endogenous stimulators and inhibitors of angiogenesis in gastrointestinal cancers: basic science to clinical application. Gastroenterology. 129(6), 2076-2091.

Szászi, K., Sirokmány, G., Di Ciano-Oliveira, C., Rotstein, O. D., y Kapus, A. (2005). Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. Am J Physiol Cell Physiol. 289(3), C673-685.

Sáez, J. C., Contreras-Duarte, S., Gómez, G. I., Labra, V. C., Santibañez, C. A., Gajardo-Gómez, R., y Orellana, J. A. (2018). Connexin 43 Hemichannel Activity Promoted by Pro-Inflammatory Cytokines and High Glucose Alters Endothelial Cell Function. Front Immunol. 9, 1899.

Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., y Bennett, M. V. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. Biochim Biophys Acta. 1711(2), 215-224.

Sáez, P. J., Villalobos-Labra, R., Westermeier, F., Sobrevia, L., y Farías-Jofré, M. (2014). Modulation of endothelial cell migration by ER stress and insulin resistance: a role during maternal obesity? Front Pharmacol. 5, 189.

Tamarat, R., Silvestre, J. S., Durie, M., y Levy, B. I. (2002). Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. Lab Invest. 82(6), 747-756.

Teubl, M., Groschner, K., Kohlwein, S. D., Mayer, B., y Schmidt, K. (1999). $Na(^{+})/Ca(^{2+})$ exchange facilitates $Ca(^{2+})$-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 274(41), 29529-29535.

Thodeti, C. K., Matthews, B., Ravi, A., Mammoto, A., Ghosh, K., Bracha, A. L., y Ingber, D. E. (2009). TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling. Circ Res. 104(9), 1123-1130.

Timpson, P., Jones, G. E., Frame, M. C., y Brunton, V. G. (2001). Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. Curr Biol. 11(23), 1836-1846.

Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., y Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. Curr Vasc Pharmacol. 10(1), 4-18.

Traub, O., Ishida, T., Ishida, M., Tupper, J. C., y Berk, B. C. (1999). Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel. J Biol Chem. 274(29), 20144-20150.

Trivedi, D. P., Hallock, K. J., y Bergethon, P. R. (2013). Electric fields caused by blood flow modulate vascular endothelial electrophysiology and nitric oxide production. Bioelectromagnetics. 34(1), 22-30.

Tsai, F.-C., y Meyer, T. (2012). $Ca^{2+}$ pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. Current biology : CB. 22(9), 837-842.

Tsai, F.-C., Seki, A., Yang, H. W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjö, S., y Meyer, T. (2014). A polarized $Ca^{2+}$, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. Nature cell biology. 16(2), 133-144.

Tsai, F. C., Kuo, G. H., Chang, S. W., y Tsai, P. J. (2015). $Ca^{2+}$ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. Biomed Res Int. 2015, 409245.

Tung, H. C., Lee, F. Y., Wang, S. S., Tsai, M. H., Lee, J. Y., Huo, T. I., y Lee, S. D. (2015). The Beneficial Effects of P2X7 Antagonism in Rats with Bile Duct Ligation-induced Cirrhosis. PLoS One. 10(5), e0124654.

Venkatesh, B., Lu, S. Q., Dandona, N., See, S. L., Brenner, S., y Soong, T. W. (2005). Genetic basis of tetrodotoxin resistance in pufferfishes. Curr Biol. 15(22), 2069-2072.

Verin, A. D., Gilbert-McClain, L. I., Patterson, C. E., y Garcia, J. G. (1998). Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. Am J Respir Cell Mol Biol. 19(5), 767-776.

Vitorino, P., y Meyer, T. (2008). Modular control of endothelial sheet migration. Genes Dev. 22(23), 3268-3281.

Waheed, F., Speight, P., Kawai, G., Dan, Q., Kapus, A., y Szászi, K. (2010). Extracellular signal-regulated kinase and GEF-H1 mediate depolarization-induced Rho activation and paracellular permeability increase. Am J Physiol Cell Physiol. 298(6). C1376-1387.

Walsh, K. B., Wolf, M. B., y Fan, J. (1998). Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells. Am J Physiol. 274(2 Pt 2), H506-512.

Wang, N., De Bock, M., Antoons, G., Gadicherla, A. K., Bol, M., Decrock, E., y Leybaert, L. (2012). Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular $Ca^{2+}$ elevation. Basic Res Cardiol. 107(6), 304.

Wu, S., Moore, T. M., Brough, G. H., Whitt, S. R., Chinkers, M., Li, M., y Stevens, T. (2000). Cyclic nucleotide-gated channels mediate membrane depolarization following activation of store-operated calcium entry in endothelial cells. J Biol Chem. 275(25), 18887-18896.

Yarbrough, T. L., Lu, T., Lee, H. C., & Shibata, E. F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. Circ Res. 90(4), 443-449.

Ye, M., Yang, J., Tian, C., Zhu, Q., Yin, L., Jiang, S., y Shu, Y. (2018). Differential roles of $Na(_V)1.2$ and $Na(_V)1.6$ in regulating neuronal excitability at febrile temperature and distinct contributions to febrile seizures. Sci Rep. 8(1), 753.

Yeh, H. I., Rothery, S., Dupont, E., Coppen, S. R., y Severs, N. J. (1998). Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium. Circ Res. 83(12), 1248-1263.

Yin, J., Xu, K., Zhang, J., Kumar, A., y Yu, F. S. (2007). Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. J Cell Sci. 120(Pt 5), 815-825.

Yokota, Y., Nakajima, H., Wakayama, Y., Muto, A., Kawakami, K., Fukuhara, S., y Mochizuki, N. (2015). Endothelial $Ca^{2+}$ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. Elife. 4.

Yoo, S. Y., y Kwon, S. M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. Mediators Inflamm. 2013, 127170.

Yu, P. C., Gu, S. Y., Bu, J. W., y Du, J. L. (2010). TRPC1 is essential for in vivo angiogenesis in zebrafish. Circ Res. 106(7), 1221-1232.

Zhang, Y., Kecskés, A., Copmans, D., Langlois, M., Crawford, A. D., Ceulemans, B., y Esguerra, C. V. (2015). Pharmacological characterization of an antisense knockdown zebrafish model of Dravet syndrome: inhibition of epileptic seizures by the serotonin agonist fenfluramine. PLoS One. 10(5), e0125898.

Zhao, J., Singleton, P. A., Brown, M. E., Dudek, S. M., y Garcia, J. G. (2009). Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium: role in barrier enhancement. Cell Signal. 21(12), 1945-1960.

Zhao, M., Bai, H., Wang, E., Forrester, J. V., y McCaig, C. D. (2004). Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. J Cell Sci, 117(Pt 3), 397-405.

Zheng, Z., Chen, H., Xie, P., Dickerson, C. A., King, J. A. C., Alexeyev, M. F., y Wu, S. (2019). α(1G) T-type calcium channel determines the angiogenic potential of pulmonary microvascular endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol. 316(3), C353-c364.

Zhou, C., y Wu, S. (2006). T-type calcium channels in pulmonary vascular endothelium. Microcirculation. 13(8), 645-656.

Zhou, J. Z., y Jiang, J. X. (2014). Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions--an update. FEBS Lett. 588(8), 1186-1192.

Zhu, Y., y Zhao, H. B. (2012). ATP activates P2X receptors to mediate gap junctional coupling in the cochlea. Biochem Biophys Res Commun. 426(4), 528-532.

Ziche, M., Parenti, A., Ledda, F., Dell'Era, P., Granger, H. J., Maggi, C. A., y Presta, M. (1997). Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. Circ Res. 80(6), 845-852.

Zimmer, T. (2010). Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system. Mar Drugs. 8(3), 741-762.

Zuazo-Gaztelu, I., y Casanovas, O. (2018). Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. Front Oncol. 8, 248.