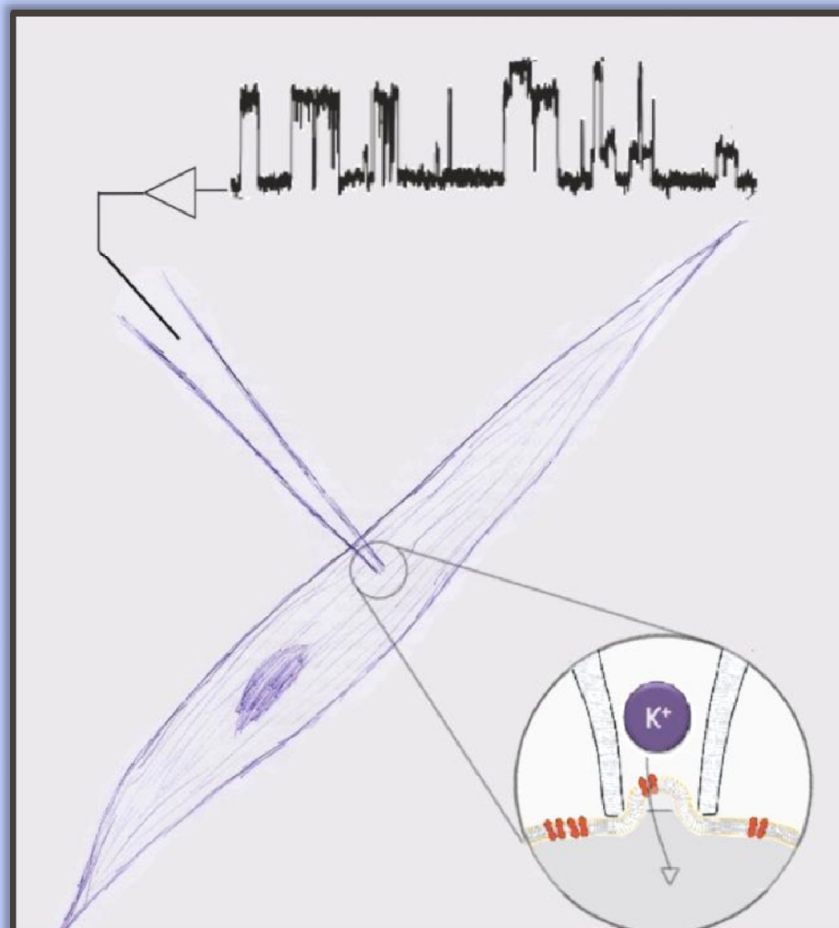




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FISIOLÓGÍA VASCULAR



Trabajo de Tesis Doctoral  
Canales de potasio en el músculo liso vascular humano:  
ácido araquidónico como factor hiperpolarizante  
dependiente de endotelio



Farm. Pedro Martín  
Directora: Prof. Dra. Verónica Milesi

Año 2012

Como en toda etapa por la que uno avanza hay personas, grupos e instituciones que acompañan y aportan desde sus respectivos lugares al trayecto que se recorre. Si bien la valoración es la que se da en el día a día, a veces viene bien la excusa para dejarlas por escrito. Así que para todos los que me acuerdo, y para los que no también (aunque debería), van mis agradecimientos:

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme formado y deformado en muchas cosas; por permitirme pasar en sus aulas, pasillos y laboratorios años excelentes tanto en el grado como el posgrado; por haberme garantizando el derecho de la educación pública y gratuita en todos sus niveles; por darme el espacio día a día para ser parte de la construcción de la misma.

Al GINFIV, completo como grupo, por la calidad humana y científica, pero sobre todo por demostrar que es posible trabajar en una estructura horizontal, donde cada opinión vale y aporta, donde todos (del más viejo al más joven) somos responsables de nuestro propio presente; por ser un modelo de grupo que vale la pena reproducir en cualquier ámbito en el que a uno le toque estar.

A Verónica, por ser la principal culpable del grupo que somos; porque a pesar de cargar con el peso de ser la responsable principal del devenir del grupo, nunca impone su visión de la cosas como única verdad; por involucrarse de lleno en la formación de sus becarios; por disponerse a enseñar, pero también a aprender con ellos; por dedicar las horas que sean necesarias y más; por concebir a la educación como un proceso constante donde la capacidad crítica es fundamental; por varias cosas más que seguro me olvido.

Al resto de la plana mayor: Ro, Nico y Ale, por haberme recibido junto con Vero desde el primer día como uno más; por haber pasado con todos momentos excelentes de dispersión, de discusión, de formación; por estar siempre disponibles cuando se necesita una mano; por acompañar cada día de este período con la alegría y el compañerismo con que da gusto hacer la cosas.

A los más nuevos: Meli, Magda, Lucho, Mati, Juan y Asu, por sumarse rápidamente y parecer del grupo desde primer momento; por ser también responsables del crecimiento que pasa cada día.

A los que estaban cuando llegué: Titi, Lau, Flor y Jorge, porque a pesar que cada uno sigue su camino por otros lados, son también responsables del presente de grupo y de la rápida integración que tuve en él.

A los amigos de la Facu: Fede, Agus, Javi, Juan y Negro, por garantizar la desconexión permanente, por las mañanas, tardes y noches compartidas desde hace hace años.

A los amigos del pago tandilense: Gaby, Ale, Fer, Braian, Huevo, Fede, Negro, Andy, Mario y Coco, porque a pesar de la distancia siempre se las arreglan para estar.

Al Taller de Magistrales y todos los compañeros del mismo, por ser el pilar que recuerda que la Universidad debe mirar siempre a la sociedad en la cual está inmersa.

A los compañeros del Espacio Varsavsky, por marcar siempre que la Facultad se construye y se modifica a partir de la participación comprometida del día a día.

A mis hermanos: Lu, Fede y Toto, responsables de que dure más de un mes en la ciudad de La Plata

A mamá y papá, por haberme permitido y bancado hace 10 años el venir a estudiar a La Plata, por dar una mano cada vez que los necesité.

A Lau, mi gran compañera de ruta con quien compartir la construcción del día a día, por su alegría, por esforzarse en entender y ayudar desde su parte en lo que puede, por darme un mano con las imágenes de la tesis, por llevar dentro suyo a Iván la construcción más importante que hemos encarado juntos.

Algunos de los resultados de la presente tesis doctoral forman parte de la publicación:

P. Martín, N. Enrique, A.R. Roldán Palomo, A. Rebolledo, V. Milesi, *Bupivacaine inhibits large conductance, voltage- and  $Ca^{2+}$ - activated  $K^+$  channels in human umbilical artery smooth muscle cells*, Channels 6 (en prensa).

# ÍNDICE

<b>Glosario de abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
1.1- Marco General: Arteria umbilical humana y células de músculo liso vascular	9
1.2- Canales de K <sup>+</sup> y su función vascular	18
1.3- Factores endoteliales y ácido araquidónico como EDHF	33
1.4- Objetivos	43
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>44</b>
2.1- Muestras de arteria umbilical humana (AUH): obtención y disociación celular	45
2.2- Registros electrofisiológicos en células aisladas de la AUH	47
2.3- Registros y metodología de análisis de las corrientes medidas en la configuración de canal único.	50
2.4- Registros y metodología de análisis de las corrientes macroscópicas medidas en la configuración de célula completa o <i>whole cell</i> .	63
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b>	<b>65</b>
3.1- Identificación de la diversidad de corrientes de K <sup>+</sup> a nivel de canal único en Células de Músculo Liso de la Arteria Umbilical Humana (AUH).	66
3.2- Estudio del efecto del ácido araquidónico sobre las corrientes macroscópicas de K <sup>+</sup> en Células de Músculo Liso de la AUH.	86
3.3- Estudio del efecto del ácido araquidónico sobre el canal BK <sub>ca</sub> a nivel de canal único en Células de Músculo Liso de la AUH.	89
3.4- ANEXO DE RESULTADOS: Caracterización de la inhibición por bupivacaína del canal BK <sub>ca</sub> en Células de Músculo Liso de la AUH.	102
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>118</b>
4.1- Discusión	119
4.2- Conclusiones	127
<b>CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>128</b>

## Glosario de abreviaturas

Las palabras en inglés fueron incluidas en itálica.

4-AP: 4-aminopiridina

AA: ácido araquidónico

AG: anestésicos generales

AL: anestésicos locales

AUH: arteria umbilical humana

BK<sub>Ca</sub>: del inglés, *high conductance voltage- and calcium dependent K<sup>+</sup> channel* (canal de K<sup>+</sup> de alta conductancia sensible al Ca<sup>2+</sup> y al voltaje)

CA: del inglés, *cell-attached*

Ca<sup>2+</sup>-ATPasa: bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPasa

CBS: cistationina-beta-sintasa

CCNS: canales catiónicos no selectivos

CCRP: canales de Ca<sup>2+</sup> operados por receptor

CCVO: canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje operados

CE: Células endoteliales

CML: células de músculo liso

CMLV: célula de músculo liso vascular

CO: Monóxido de carbono

COX: ciclooxigenasa

CSE: cistationina-gamma-liasa

DAG: diacilglicerol

DHET: ácido dihidroxieicosatrienoicos

EDHF: del inglés, *endothelium dependent hyperpolarizing factor* (factor hiperpolarizante dependiente de endotelio)

EET: ácido epoxieicosatrienoicos

EHS: epóxido-hidrolasa soluble

E<sub>K</sub>: Potencial de equilibrio del ion K<sup>+</sup>

eNOS: del inglés, *endothelium nitric-oxide syntase* (óxido-nítrico sintasa de origen endotelial)

E<sub>rev</sub>: Potencial de reversión

GC: guanilato ciclasa

GIRK: del inglés, *G-protein coupled inward rectifying K<sup>+</sup> channel* (canales de K<sup>+</sup>

rectificadores entrantes acoplados a proteína G)

GPCR: del inglés, *G-protein coupled receptor* (receptores acoplados a proteína G)

G<sub>βγ</sub>: Subunidad βγ de la proteína G

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

H<sub>2</sub>S: ácido sulfhídrico

HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico

HO: hemo-oxidasa

IK<sub>Ca</sub>: del inglés, *intermediate conductance calcium sensitive K<sup>+</sup> channel* (canal de K<sup>+</sup> de conductancia intermedia sensible al Ca<sup>2+</sup>)

IO: del inglés, *inside-out*

IP<sub>3</sub>: inositol-trifosfato

K<sub>2P</sub>: del inglés, *two pore domain K<sup>+</sup> channels* (canales de K<sup>+</sup> de 2 dominios formadores de poro)

K<sub>ATP</sub>: canales de K<sup>+</sup> sensibles al ATP intracelular

K<sub>IR</sub>: del inglés, *inward rectifying K<sup>+</sup> channels* (canales de K<sup>+</sup> de tipo rectificador entrante)

KO: *knockout*

KRB: krebs-ringer bicarbonato

K<sub>V</sub>: Canal de K<sup>+</sup> operado por voltaje

LOX: lipooxigenasa

ME: Músculo esquelético

MLC: del inglés, *myosine light chain* (cadena liviana de la miosina)

MLC20: del inglés, *myosine light chain 20 kDa* (cadena liviana de la miosina de 20 kDa)

MLCK: del inglés, *myosine light chain kinase* (quinasa de la cadena liviana de la miosina)

NA: noradrenalina

NO: Oxido Nítrico

NOS: del inglés, *nitric-oxide synthase* (oxido-nítrico sintasa)

NPR-B: del inglés, *natriuretic peptide receptor-B* (receptor del péptido natriurético B)

NXC: Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina

PIP<sub>2</sub>: del inglés, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (fosfatidil inositol 2-fosfato)

PKA: del inglés, *protein-kinase A* (proteína-quinasa A)

PKC: del inglés, *protein-kinase C* (proteína-quinasa C)

PKG: del inglés, *protein-kinase G* (proteína-quinasa G)

PLC: del inglés, *phospholipase C* (fosfolipasa C)

PN-C: péptido natriurético de tipo C

ROS: del inglés, *reactive oxygen species* (especies reactivas del oxígeno)

RS: Retículo Sarcoplásmico

SB: solución del baño

SC: del inglés, *single channel* (canal único)

SD: solución de disociación

SERCA: del inglés, *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplásmico/endoplásmico)

SK<sub>Ca</sub>: del inglés, *small conductance calcium sensitive K<sup>+</sup> channel* (canal de K<sup>+</sup> de baja conductancia sensible al Ca<sup>2+</sup>)

SNC: Sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

SP: solución de la pipeta

STOC: del inglés, *spontaneous transient outward currents* (corrientes espontáneas transitorias salientes)

SU: Sulfonilureas

SUR: del inglés, *sulfonylurea receptor* (Receptor de Sulfonilurea)

TEA: tetraetilamonio

TGI: tracto gastrointestinal

TMS: del inglés, *transmembrane segment* (segmento de transmembrana)

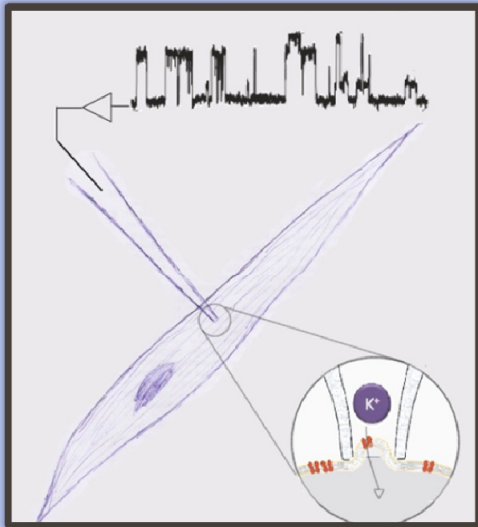
V<sub>m</sub>: Potencial de membrana

V<sub>m</sub>: potencial de membrana

WC: del inglés, *whole cell* (célula completa)

γ: conductancia





## **1. Introducción y objetivos**

2. Materiales y métodos

3. Resultados

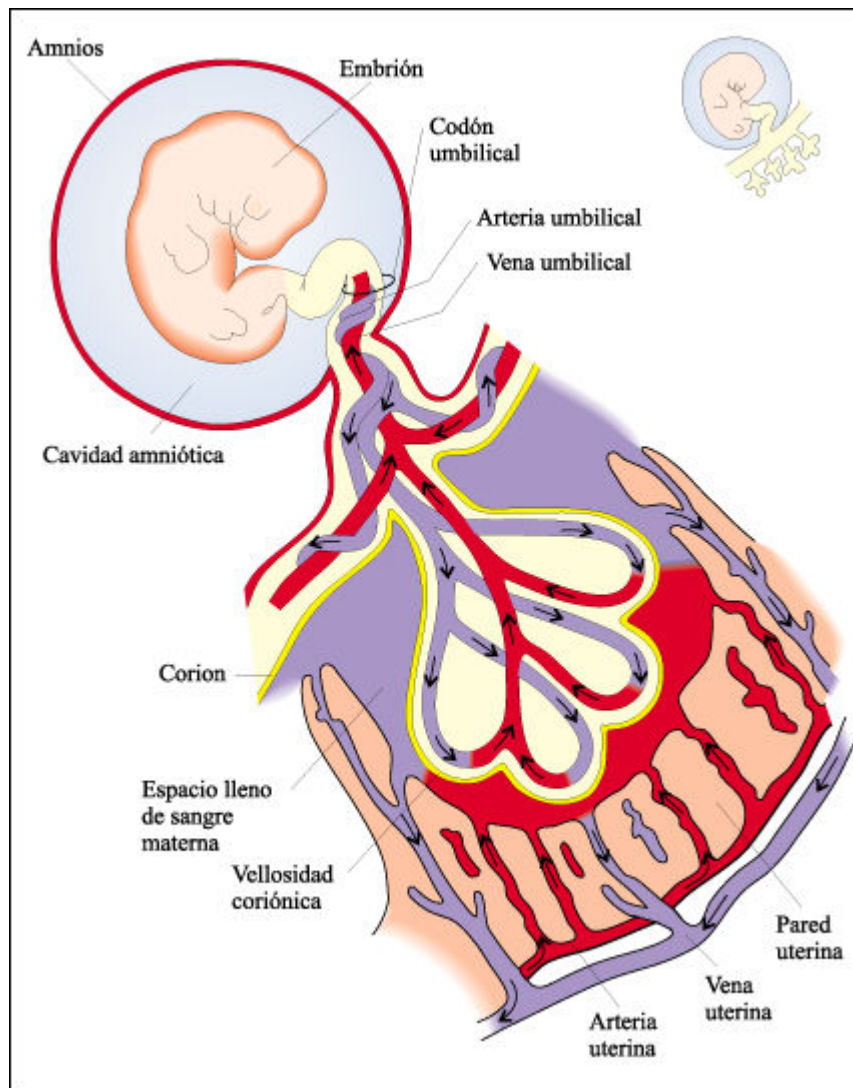
4. Discusión y conclusiones

5. Bibliografía

---

## 1.1- MARCO GENERAL: ARTERIA UMBILICAL HUMANA Y LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

Durante la fase embrionaria temprana comienza el desarrollo del aparato circulatorio extraembrionario formado por las vellosidades coriónicas y el cordón umbilical (figura 1.1.1).

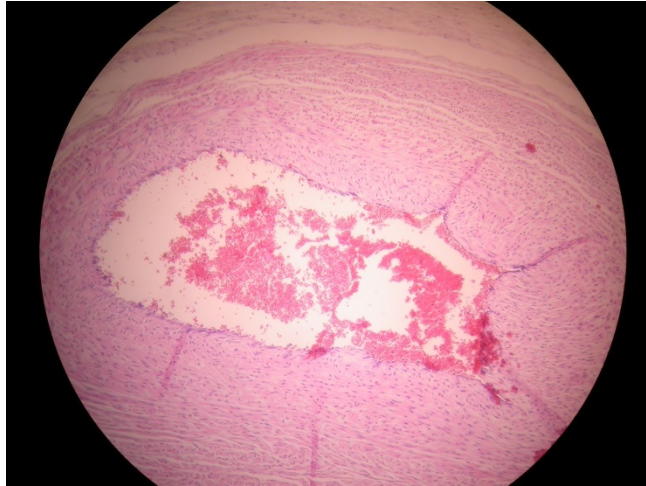


**Figura 1.1.1:** Esquema de la circulación feto-placentaria

Los vasos sanguíneos del cordón umbilical tienen un rol fundamental en el transporte de nutrientes vitales para el desarrollo del feto, ya que el estado contráctil de sus células musculares contribuye a la determinación del tono vascular que regula el flujo feto-placentario. Estos vasos no poseen inervación nerviosa autónoma [1], de

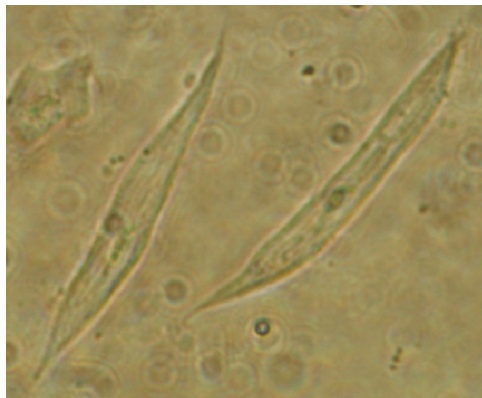
forma que la regulación del diámetro de los mismos está dada por factores liberados en forma local por células endoteliales o por el propio músculo liso, o que alcanzan las células de músculo liso (CML) a través del flujo sanguíneo. Estructuralmente, el cordón umbilical está compuesto por dos arterias y una vena. Las arterias se presentan espiraladas manteniendo un promedio 2.1 vueltas cada 10 cm de cordón en el embarazo a término. Ambas arterias se encuentran comunicadas por la anastomosis de Hyrtl cerca de su decusación en el extremo de la placa coriónica lo que permite un balance del flujo entre ambas [2,3]. El cordón umbilical carece de otros tipos vasculares como los *vasa vasorum* o linfáticos. Los vasos umbilicales se encuentran inmersos en una matriz extracelular, un tejido conectivo peculiar derivado del mesénquima extraembrionario, denominado gelatina de Wharton. Este tejido, presenta bajo número de células (miofibroblastos y mastocitos) y una alta concentración de colágeno, ácido hialurónico y glucosaminoglicanos [4]. Funciona no sólo como soporte, sino que también es un lugar de almacenamiento y estabilización de las concentraciones de distintos factores de crecimiento en la vecindad de las células vasculares [5].

La arteria umbilical humana (AUH) presenta una organización histológica formada por dos túnicas, la íntima y la media. Carece de lámina elástica y adventicia típica de otros lechos arteriales. La túnica íntima se ubica internamente (hacia la luz del vaso). Es una estructura compuesta por largas microvellosidades que se proyectan al lumen la cual está formada por una capa de células endoteliales ricas en retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y ribosomas [6]. El borde entre la túnica íntima y la media contiene un segundo tipo celular con características semejantes a las CML aunque más ricas en retículo endoplasmático rugoso y organelas [6]. La túnica media está formada por CML que se disponen internamente, longitudinales al eje del vaso en forma espiralada, y externamente forman una capa circular compacta, como se observa en la figura 1.1.2.



**Figura 1.1.2:** Fotografía tomada en nuestro laboratorio en la que se observa la estructura histológica de la arteria del cordón umbilical humano

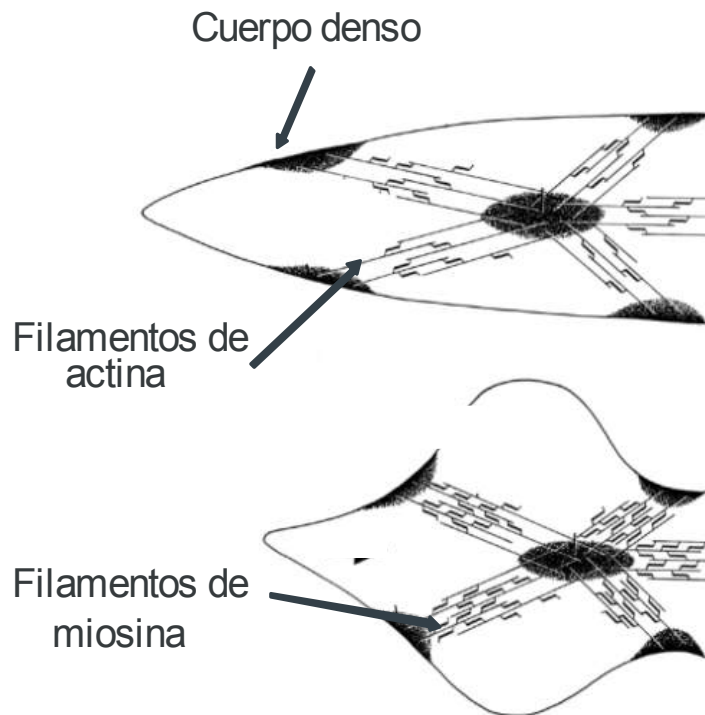
Las células musculares lisas de la túnica media son células fusiformes de unos 100 a 500  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro con una gran proporción superficie/volumen. Esta relación se debe, en parte, a las invaginaciones que presenta la membrana denominadas caveolas [7,8,9].



**Figura 1.1.3:** Fotografía tomada en nuestro laboratorio en la que se observan dos células de músculo liso disociadas enzimáticamente de la arteria umbilical humana.

Como es característico de este tipo celular, poseen estructuras contráctiles como son los filamentos finos formados por polímeros de actina globular y filamentos gruesos formados por miosina (dos subunidades proteicas pesadas y dos pares de subunidades livianas) que cuando se activan le confieren a la célula la propiedad de contraerse. Las cadenas pesadas de la miosina están enrolladas entre sí, constituyendo

el núcleo del filamento, y terminan en dos porciones de naturaleza globular capaces de hidrolizar ATP, las cuales sobresalen del mismo a intervalos regulares. Sobre cada cabeza de miosina se disponen dos tipos de cadenas livianas, una de ellas se denomina cadena liviana reguladora (MLC20, del inglés, *myosine light chain 20 kDa*) y posee un sitio de fosforilación en el aminoácido serina 19, importante para la regulación de la contracción. Estos filamentos se organizan en unidades de tres a cinco filamentos gruesos rodeados de varios filamentos finos y se fijan a estructuras proteicas denominadas cuerpos densos que están anclados a proteínas del citoesqueleto celular [10,11]. De esta manera, se forma la maquinaria contráctil, la cual modificará su longitud dependiendo de la concentración de calcio intracelular.



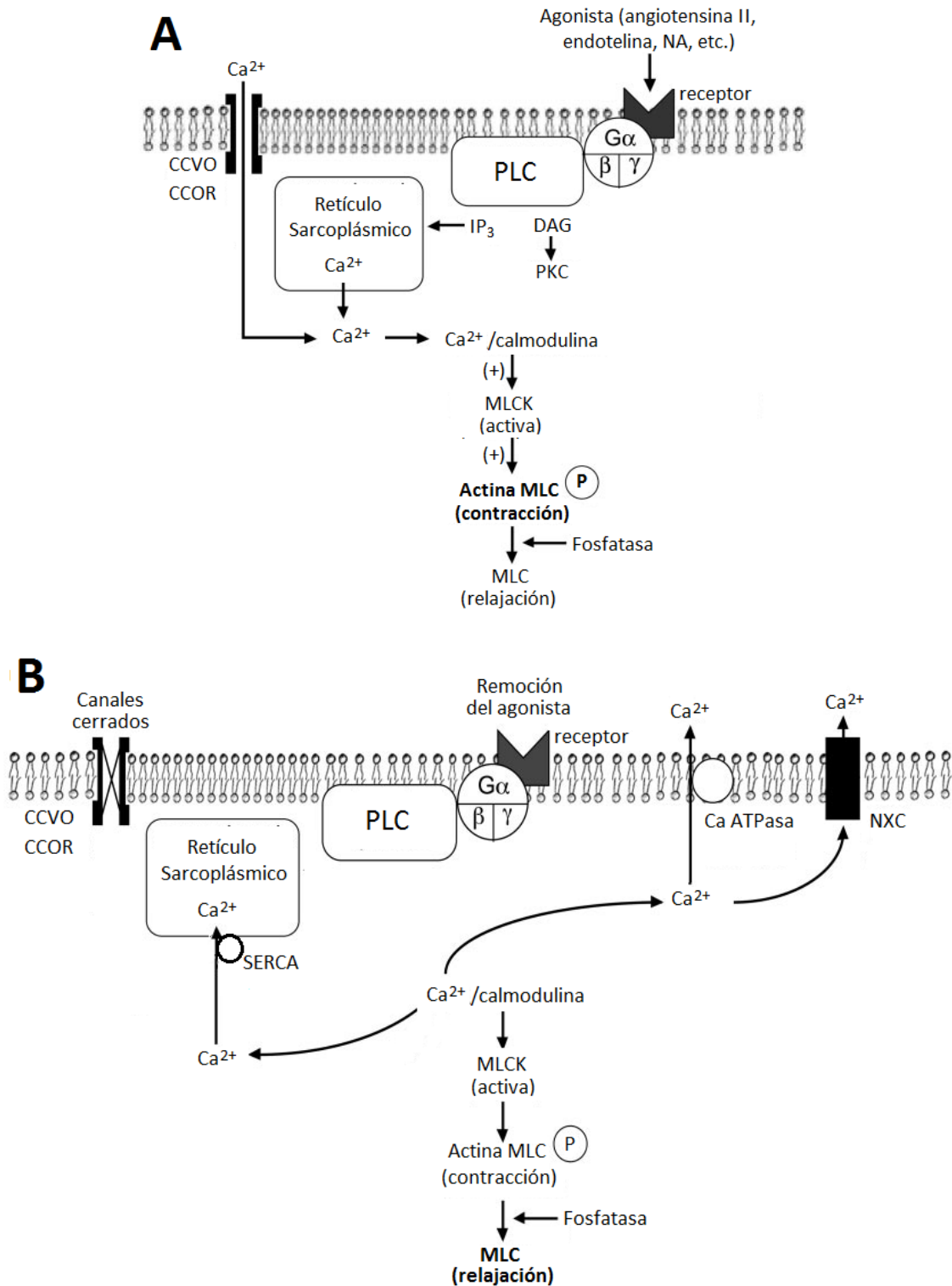
**Figura 1.1.4:** Esquema en el que se muestra la disposición de los filamentos contráctiles y los cuerpos densos.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol de la CML es fundamental en la determinación de su grado de contracción. En la condición de reposo la misma está comprendida en el rango de valores de 120 a 170 nM [12]. Un aumento global en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a niveles de 500 a 700 nM activa el aparato contráctil celular, desencadenando la contracción de la célula. Dicho aumento se

puede producir por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular o a partir de la liberación del mismo desde organelas intracelulares como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria (en algunos casos), que constituyen los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  celular (figura 1.1.5 A). Las vías de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  son numerosas y la importancia relativa de cada una de ellas varía entre los distintos tipos de células de músculo liso, incluso entre los distintos lechos vasculares. En resumen, un aumento global de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede estar mediada por:

- Activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (CCVO), de los cuales diferentes subtipos han sido identificados en el músculo liso (L, T, P/Q, R).
- Activación de canales catiónicos no selectivos (CCNS) permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden activarse mediante un número importante de estímulos (agonistas, estiramiento mecánico, depleción del retículo sarcoplásmico, estímulos despolarizantes de la membrana celular entre otros).
- Activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NXC) en su modo reverso de acción.
- Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  o por segundos mensajeros).
- Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria.

A continuación se esquematiza y describe el mecanismo de contracción de la CML (figura 1.1.5).



**Figura 1.1.5: Esquema del mecanismo de contracción de las CML.** A: esquema representativo del incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular que deriva en la contracción de la CML por predominio de de la MLC fosforilada. B: esquema representativo de la remoción Ca<sup>2+</sup> intracelular que deriva en la relajación de la CML por predominio de la MLC sin fosforilación. CCOR: canales de Ca<sup>2+</sup> operados por ligando. PLC: fosfolipasa C

El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a una proteína citoplasmática denominada calmodulina que posee afinidad por el mismo (figura 1.1.5). La calmodulina posee cuatro sitios de unión para iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y cuando éste aumenta su concentración se favorece la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que activa a la proteína quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK, del inglés *miosine light chain kinase*). Esta quinasa puede estar ligada a los filamentos finos a través de su extremo N terminal y cuando es activada fosforila a la MLC20 [13,14,15]. Esta reacción desencadena un ciclo, durante el cual ocurre el corrimiento de las cabezas de miosina desplazando los filamentos de actina mediante el gasto de energía metabólica a través de la actividad ATPasa del complejo actomiosínico. Este mecanismo conduce al acortamiento de la estructura contráctil y el consiguiente desarrollo de fuerza. El ciclo de la contracción se lleva a cabo hasta que el  $\text{Ca}^{2+}$  vuelve a disminuir a la concentración de reposo, a la cual la MLCK se inactiva y se interrumpe la fosforilación de la miosina.

Esto sucede al finalizar el estímulo contráctil, donde, el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido del citoplasma hasta alcanzar nuevamente las concentraciones de reposo y la consecuente relajación celular. Esto implicará la extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular y el secuestro de éste hacia los compartimentos intracelulares. La extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  puede realizarse a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  actuando en su modo directo y/o por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ubicada en la membrana plasmática. Por su parte, la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los reservorios intracelulares, es mediada por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en la membrana del retículo (SERCA, del inglés *sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*), que permite reinstaurar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares de reposo.

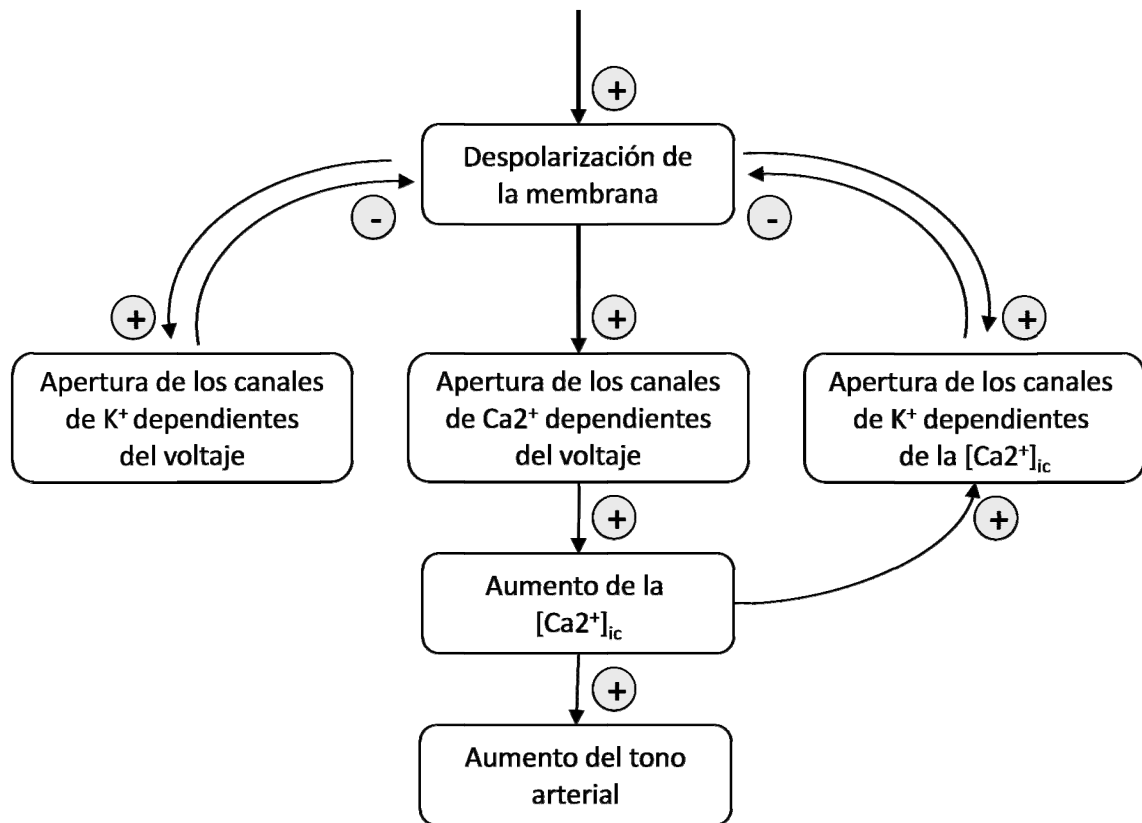
Diversos estímulos endógenos y exógenos (agonistas, iones, fármacos etc.) pueden alterar el estado contráctil de las células de músculo liso vascular (CMLV) actuando sobre las estructuras celulares que intervienen en la regulación de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En particular, el endotelio vascular sintetiza y libera mediadores vasoactivos en respuesta a distintos estímulos fisiológicos como pueden ser sustancias circulantes (como serotonina, angiotensina II, adrenalina, bradiquinina), sustancias liberadas por las plaquetas o por las células del sistema inmune, neurotransmisores liberados por las terminales nerviosas, cambios en la presión de  $\text{O}_2$



sanguínea, alteraciones ácido base, así como cambios en el flujo sanguíneo que generan una fuerza de roce (del inglés, *shear stress*) sobre la superficie celular. El conocimiento de la importancia del rol endotelial en el control del tono vasomotor ha aumentado mucho desde la demostración por Furchgott y Zawadzky (1980) de que la acetilcolina relajaba tejido vascular precontraído sólo en presencia de endotelio intacto [16]. Actualmente se sabe que la acción de muchos vasodilatadores o vasoconstrictores es dependiente de la integridad del endotelio. Los factores liberados por el mismo pueden difundir y actuar sobre las CMLV produciendo diversos efectos que alteran la regulación del estado contráctil de estas últimas, y por lo tanto del diámetro de la luz del vaso [17]. En el caso de la AUH su rol es fundamental en la regulación del flujo feto-placentario el cual tiene implicancia directa sobre el feto.

Los canales iónicos selectivos al  $K^+$  también cumplen un rol muy importante en la regulación del estado contráctil de la CMLV ya que son fundamentales en la determinación del valor de potencial de membrana ( $V_m$ ) celular, el cual constituye una propiedad bioeléctrica de vital importancia en la fisiología celular. Existe una vinculación directa entre el valor del  $V_m$  y el estado contráctil de las CMLV, dado que el mismo regula la activación de los CCVO, y por lo tanto el influjo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior celular. Los valores de  $V_m$  de reposo de las CMLV oscilan en el rango de  $-40$  a  $-60$  mV, variando de acuerdo con el tejido y a los métodos de medida. Este valor es mantenido por flujos iónicos a través de canales iónicos de la membrana plasmática en función del gradiente electroquímico y de la permeabilidad de la membrana para cada ion. Numerosos trabajos, han demostrado la participación de distintos tipos de canales selectivos al  $K^+$  en la regulación y mantenimiento del  $V_m$  en CMLV [18,19]. La activación de estos canales produce hiperpolarización de la membrana celular (y relajación vascular) mientras que su inhibición despolariza la misma, desencadenando la contracción vascular.

A continuación (figura 1.1.6) se esquematiza la función de los canales de  $K^+$  en la regulación del  $V_m$  y su influencia sobre la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_{ic}$ ) que establece el grado de contracción de las células musculares lisas.



**Figura 1.1.6:** Esquema de la regulación del  $V_m$  y concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular en las CMLV y su relación con el tono vascular. (Modificada de Nelson et al. (1995) [18])

El objetivo general de esta tesis consiste en caracterizar los canales de  $K^+$  de las CML de la AUH como moduladores del  $V_m$  y el efecto del ácido araquidónico (AA) como posible factor endotelial sobre los mismos, por lo que a continuación haremos una breve descripción de las diversas familias de canales de  $K^+$ , seguida de otra correspondiente a los factores endoteliales y su rol en la regulación del estado contráctil de las CMLV.

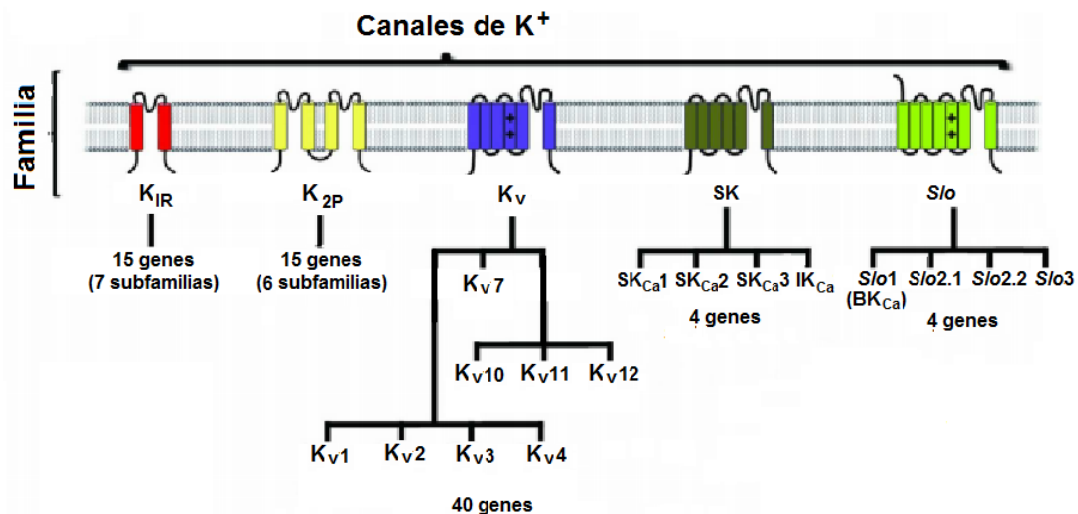
## 1.2- CANALES DE K<sup>+</sup> Y SU FUNCIÓN VASCULAR

Los canales de K<sup>+</sup> son un conjunto de proteínas cuyo origen se postula en simultáneo con el origen de la vida en la tierra [20]. Constituye el grupo más numeroso de canales específicos para un ion en particular. Los mismos se expresan tanto en células eucariotas como procariotas y justamente un canal de K<sup>+</sup> de estas últimas fue el primer canal iónico cristalizado [21]. A partir de la estructura de rayos X del mismo, pudo localizarse la región formadora de poro, la cual se observó que está ampliamente conservada en todas las familias de canales de K<sup>+</sup>, inclusive en todos los reinos. En contraste, en el resto de la secuencia de los canales de K<sup>+</sup> se observan porciones de importante variabilidad, que permiten agruparlos, en base a su estructura, en 3 grandes grupos [22,23,24,25,26] (figura 1.2.1):

- Canales 2 Segmentos de Transmembrana -1 dominio formador de Poro (2TMS-1P): Este grupo está compuesto por la familia de canales K<sub>IR</sub> (del inglés, *inward rectifier K<sup>+</sup> channels*), y su estructura es similar a la del primer canal de K<sup>+</sup> cristalizado. Cada subunidad de los canales de esta familia, posee 2 regiones de transmembrana (en inglés, *transmembrane segment*, TMS) conectadas por 1 dominio formador de poro (P), y se ensamblan como tetrámeros.
- Canales 4 Segmentos de Transmembrana - 2 dominios formadores de Poro (4TMS-2P): formado por la familia de canales K<sub>2P</sub> (del inglés, *two pore domain K<sup>+</sup> channels*). Son los canales de K<sup>+</sup> de descubrimiento más reciente (1995, [27]) y se caracterizan por poseer en cada subunidad 2 dominios formadores de poro y de 4 segmentos de transmembrana. A diferencia del resto de los canales de K<sup>+</sup>, el canal se forma como dímero.
- Canales 6 Segmentos de Transmembrana -1 dominio formador de Poro (6TMS-1P): Es el grupo más numeroso de canales de K<sup>+</sup> e incluye a 3 familias. Están formados por tetrámeros cuyas subunidades, como su nombre lo indica, poseen 6 segmentos de transmembrana (S1-S6) que acompañan a 1 dominio formador de poro. Dentro de este grupo podemos encontrar a la familia de canales de K<sup>+</sup> operados por voltaje o K<sub>V</sub>, que presentan como característica estructural una región en el segmento de transmembrana S4 que presenta 4

aminoácidos cargados positivamente y que funciona como sensor de voltaje. Esta es otra de las características de la estructura de canales iónicos que está altamente conservada en otras familias de canales iónicos de  $K^+$ , de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  que presentan sensibilidad al voltaje.

Este grupo se completa con 2 familias de canales de  $K^+$  sensibles a la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $K_{Ca}$ ). La primera se denomina  $SK_{Ca}$  (del inglés, *small conductance calcium sensitive  $K^+$  channel*), compuesta por una serie de canales  $K^+$  de conductancia intermedia y baja con actividad independiente del voltaje. Mientras que la segunda se denomina familia de los *Slo*, cuyo miembro más relevante es el canal de  $K^+$  de alta conductancia sensible al  $Ca^{2+}$  y al voltaje, conocido como  $BK_{Ca}$  (del inglés, *big conductance voltage- and calcium-dependent  $K^+$  channel*).



**Figura 1.2.1:** Familias de canales de  $K^+$  agrupados según la estructura primaria de sus subunidades. Los rectángulos indican los dominios de transmembrana (TMS), las interrupciones en la membrana indican los dominios formadores de poro y los signos + señalan la ubicación del sensor de voltaje. (Modificada de Gonzalez *et al.* (2012) [26]).

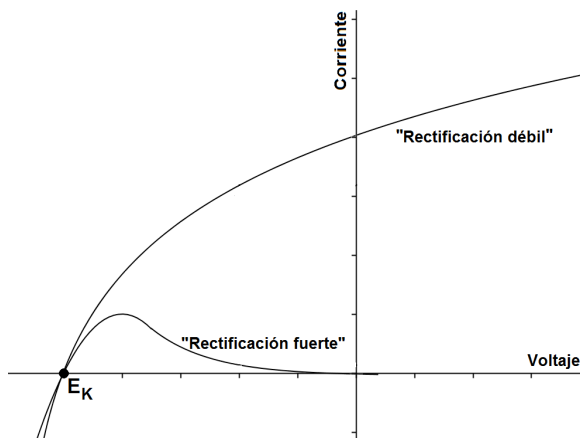
A continuación, describiremos brevemente las características de cada una de las familias de canales de  $K^+$ , detallando en particular aquellos de los cuales se conoce una importante función en la fisiología vascular:

## FAMILIA DE LOS CANALES $K_{IR}$ (KCNJ)

El nombre de esta familia  $K_{IR}$  proviene de una propiedad biofísica de las corrientes de los canales que la componen, cuya traducción sería “canales de  $K^+$  de tipo rectificador entrante” (o también llamado rectificador anómalo), y se debe al fenómeno por el cual su relación entre la corriente macroscópica y el voltaje de la membrana no sigue un comportamiento lineal u óhmico como se espera para un canal independiente de voltaje, presentando una mayor conductancia iónica a potenciales más negativos que el potencial de equilibrio para el  $K^+$  ( $E_K$ ) (figura 1.2.2). Este fenómeno se debe a un bloqueo voltaje dependiente del canal generado por el  $Mg^{2+}$  o las poliamidas intracelulares [28,29] las cuales, a medida que el potencial de membrana adquiere valores más positivos, obstruyen el poro del canal impidiendo el paso de corriente en dirección saliente. De esta manera, el rol de estas corrientes en la modulación del valor del  $V_m$  depende principalmente del valor del  $E_K$  [30]. Así, en condiciones fisiológicas estos canales generan una importante conductancia de  $K^+$  a potenciales cercanos al  $E_K$ , la cual disminuye cuando la célula se despolariza. Esta propiedad les confiere una funcionalidad importante en la fijación y regulación del potencial de membrana celular [18,29,30].

No todos los canales de potasio  $K_{IR}$  presentan el mismo grado de rectificación, sino que algunos son rectificadores débiles, otros intermedios y otros son rectificadores fuertes (figura 1.2.1). Esta característica está determinada por la presencia de un aminoácido cargado negativamente (Asp) en la posición 172 del segmento S2 para los rectificadores fuertes, que se modifica por un aminoácido neutro (Asn) en los débiles [31,32]. Es una familia de canales de baja conductancia, en general nunca superan los 40 pS. Se inhiben por el  $Ba^{2+}$  y el  $Cs^+$  en forma no selectiva, mientras que otros bloqueantes clásicos de canales de  $K^+$  tienen poco efecto en bajas concentraciones [24,26,29].

En su estructura básica puede observarse la ausencia del segmento cargado S4, lo que se manifiesta en la insensibilidad al voltaje, de manera que, en ausencia de algunos moduladores particulares (ATP, subunidad  $\beta\gamma$  de las proteínas G), estarían abiertos en todo el rango del potencial de membrana [29,33], si bien finalmente esto no se observa por la rectificación antes descrita.



**Figura 1.2.1:** Esquema representativo de las relaciones corriente macroscópica vs. voltaje para canales con rectificación entrante fuerte o débil.

En esta familia existen 15 genes que codifican para canales  $K_{IR}$ , los cuales se agrupan en 7 subfamilias (tabla 1.2.1). A su vez pueden agruparse en 4 grupos funcionales [26]: los  $K_{IR}$  clásicos, los acoplados a proteína G (GIRK, del inglés, *G-protein coupled inward rectifier  $K^+$  channel*), los sensibles al ATP intracelular ( $K_{ATP}$ ) y los transportadores (en inglés, *K-transport channels*). Su diversidad funcional está incrementada por: i. la presencia de *splicing* alternativo, ii. la posibilidad (debido a la elevada homología de los subtipos) de generar heteromultímeros entre distintos tipos de subunidades de esta familia y, iii. la formación de complejos con subunidades accesorias (receptor de sulfonilurea en los  $K_{ATP}$ ) [29,34].

En la tabla 1.2.1 se presentan los subtipos de canales de cada familia, juntos con sus características principales y su distribución en los tejidos.

**Tabla 1.2.1: Características de los canales de K<sup>+</sup> K<sub>IR</sub>**

Subfamilia Funcional	Nombre	Gen	Propiedades biofísicas y moduladores	Ubicación	Datos de interés
K <sub>IR</sub> Clásicos (K <sub>IR</sub> 2.x)	K <sub>IR</sub> 2.1	KCNJ2	Rectificación fuerte. $\gamma = 15-40$ pS <u>Inhibidores:</u> $\downarrow$ pH <sub>ic</sub>	Miocitos cardíacos, endotelio, CMLV, ME, SNC, nefrón	Homómeros y heterómeros. <u>Función:</u> regulación del potencial de reposo.
	K <sub>IR</sub> 2.2	KCNJ12			
	K <sub>IR</sub> 2.3	KCNJ4			
	K <sub>IR</sub> 2.4	KCNJ14			
K <sub>ATP</sub> (K <sub>IR</sub> 6.x)	K <sub>IR</sub> 6.1	KCNJ8	Rectificación débil. $\gamma = 30$ pS (6.1) y 80 pS (6.2) <u>Inhibidores:</u> $\uparrow$ [ATP] <sub>ic</sub> , SU <u>Activadores:</u> $\uparrow$ [NDP] <sub>ec</sub> , PKA, pinacidil	Cardíaco, SNC, páncreas, músculo liso, ME	Formados por octómeros: 4 K <sub>IR</sub> 6.x + 4 SUR <u>Función:</u> sensor del estado metabólico
	K <sub>IR</sub> 6.2	KCNJ11			
GIRK (K <sub>IR</sub> 3.x)	K <sub>IR</sub> 3.1	KCNJ3	Rectificación fuerte. $\gamma \sim 30$ pS <u>Inhibidores:</u> $\downarrow$ pH <sub>ic</sub> , PKC <u>Activadores:</u> $\uparrow$ [Na <sup>+</sup> ] <sub>ic</sub> , G <sub><math>\beta\gamma</math></sub>	Nódulo sinusal, páncreas, SNC	Heterómeros. Activados por GPCR. <u>Función:</u> modulación de células excitables
	K <sub>IR</sub> 3.2	KCNJ6			
	K <sub>IR</sub> 3.3	KCNJ9			
	K <sub>IR</sub> 3.4	KCNJ5			
K-transport channels	K <sub>IR</sub> 1.1 o ROMK1	KCNJ1	Rectificación fuerte. $\gamma = 35$ pS <u>Inhibidores:</u> $\downarrow$ pH <sub>ic</sub> , PKC <u>Activadores:</u> PKA	Nefrón, SNC	Homómero. <u>Función:</u> formación de potencial transepitelial
	K <sub>IR</sub> 4.1	KCNJ10	Rectificación intermedia. $\gamma = 20-60$ pS <u>Inhibidores:</u> $\downarrow$ pH <sub>ic</sub> <u>Activadores:</u> $\uparrow$ [Na <sup>+</sup> ] <sub>ic</sub>	Células de la glía, nefrón, coclea	Heterómeros (4.x + 5.x). <u>Función:</u> Bufferes de K, Participa en la formación de potencial transepitelial
	K <sub>IR</sub> 4.2	KCNJ15			
	K <sub>IR</sub> 5.1	KCNJ16			
	K <sub>IR</sub> 7.1	KCNJ13	$\gamma = 50$ fS	Renal, tiroides	No se conoce su función

Abreviaturas:  $\gamma$ : conductancia; ME: Músculo esquelético; SNC: Sistema nervioso central; SU: Sulfonilureas; SUR: Receptor de Sulfonilureas; PKA: fosforilación por la proteína-quinasa A; PKC: fosforilación por la proteína-quinasa C; G <sub>$\beta\gamma$</sub> : Subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G; GPCR: Receptores acoplados a proteína G. NDP: Nucleótidos 2-fosfato.

Bibliografía consultada: [24,26,29].

Como se puede observar en la tabla, sólo 2 de las subfamilias presentan actividad en las CMLV. En primer lugar los K<sub>IR</sub> clásicos se encuentran vinculados a los

dos tipos principales de células de los vasos sanguíneos (endotelio y músculo liso) [29]. El  $K_{IR}$  2.2 (en mayor medida) y el 2.1 son considerados los canales de  $K^+$  más relevantes a nivel endotelial, dado que fijan un potencial de membrana hiperpolarizado que favorece el influjo de  $Ca^{2+}$  (por aumentar su fuerza impulsora) ante diversos estímulos de agonistas o de *shear stress*, que derivan en la liberación de factores vasorelajantes [17]. Por otro lado, en las CMLV, se describió la presencia del  $K_{IR}$  2.1 los cuales le confieren a la célula una mayor conductancia al ión  $K^+$  ante incrementos leves en la concentración extracelular del mismo (6-15 mM). De esta manera se lo cree responsable de la relajación de las CMLV ante una liberación local de  $K^+$  desde las células endoteliales. Dicho efecto paradójico (dado que lo esperable es la contracción inducida por la despolarización que produce un aumento de la concentración de  $K^+$  extracelular, debido al cambio en el  $E_K$ ) [18,35,36] explicaría un mecanismo de dilatación vascular mediado por endotelio, como también parece tener una función importante a nivel del SNC, donde la concentración extracelular de  $K^+$  aumenta con la actividad neuronal [29].

La otra subfamilia presente es la de canales  $K_{ATP}$ , cuya actividad guarda relación con el estado metabólico de las CMLV. Estos canales se inhiben cuando aumenta la concentración de ATP intracelular, generando despolarización. Se ha demostrado que en distintos lechos vasculares estos canales pueden ser activados por factores derivados de endotelio que aumentan su actividad vía fosforilación por PKA [18,37,38].

#### **FAMILIA DE LOS CANALES $K_{2P}$ (KCNK):**

Esta familia es la más novedosa dentro de los canales de  $K^+$  y se diferencia del resto de sus congéneres tanto en el aspecto estructural, como se enunció anteriormente, como a nivel funcional. Se la considera como canales de *background* o de *leak* (del inglés, fuga), debido a que permanecen abiertos prácticamente a todos los valores de potencial de membrana, con escasa dependencia del voltaje (en la mayoría de los casos presentan rectificaciones débiles). Esta característica es la que determina que compartan junto con los  $K_{IR}$  un rol principal en la determinación del valor de



potencial de membrana de reposo en distintos tipos celulares, además de ser capaces de alterar la amplitud y la duración de los potenciales de acción [26,39].

Esta familia está compuesta por canales iónicos codificados por 15 genes. Se los clasifica en 6 familias: los canales rectificadores entrantes débiles (TWIK, *tandem of P domain-weak inward rectifier K<sup>+</sup> channel*), los relacionados al TWIK sensibles al ácido araquidónico (TREK, *TWIK related K<sup>+</sup> channel*), los inhibidos por el descenso del pH extracelular (TASK, *TWIK related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel*), los activados por alcalinización (TALK, *TWIK related alkaline pH activated K<sup>+</sup> channel*), los inhibidos por halotano (THIK, *tandem pore domain halotane-inhibited K<sup>+</sup> channel*) y los presentes en la médula espinal (TRESK, *TWIK related spinal cord K<sup>+</sup> channel*). En la tabla 1.2.2 resumimos sus características más importantes y su distribución en los tejidos.

Estos canales, poseen una variada sensibilidad farmacológica, son insensibles a los inhibidores clásicos de los canales de K<sup>+</sup> como el TEA (tetraetilamonio) y la 4-AP (4-aminopiridina) y se desconocen hasta ahora inhibidores específicos [22,26,39,40]. Es importante tener en cuenta que si bien existe un importante volumen de datos bibliográficos que describen la farmacología de esta familia, la mayoría se ha puesto en evidencia en canales expresados en sistemas heterólogos, quedando pendiente el estudio sobre la relevancia funcional en los diversos tejidos. Su capacidad de responder a distintos estímulos fisiológicos como el cambio en el pH intra o extracelular, la temperatura y el estiramiento de la membrana, entre otros, permite plantear para este tipo de canales un rol relevante como sensores de diversos estados celulares, sumado a su rol en la determinación del potencial de membrana y la moderación de la excitabilidad celular.

Los estudios de localización de estos canales presentados en la tabla, son en su mayoría obtenidos a partir de estudio de PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) y muestran una extensa distribución de la expresión de ARNm de estos canales en diferentes tejidos, pero nuevamente debemos remarcar el escaso número de estudios sobre la presencia funcional de los mismos en sistemas nativos. En relación al tejido vascular, dicho estudio es prácticamente inexistente, pudiéndose destacar la presencia funcional en las CMLV de los canales TALK-2, TASK-1 y 2, TRAAK y TREK-1 y 2 [41,42,43].

**Tabla 1.2.2: Características de los canales de K<sup>+</sup> K<sub>2P</sub>**

Subfamilia Funcional	Nombre	Gen	Propiedades biofísicas	Ubicación	Datos de interés
TWIK	TWIK-1	KCNK1	Rectificación entrante. $\gamma = 5-34$ pS	Corazón, SNC	<u>Inhibidores:</u> $\downarrow$ pH <sub>ec</sub> , AG, AL, Ba <sup>2+</sup> <u>Activadores:</u> AA
	TWIK-2	KCNK6			
		KCNK7*			
TREK	TREK-1	KCNK2	Rectificación saliente. $\gamma = 66-179$ pS	SNC, pulmón, riñón, TGI, páncreas, hígado, placenta	<u>Inhibidores:</u> AL, PKA, PKC <u>Activadores:</u> <i>stretch</i> , AA, $\downarrow$ pH <sub>ic</sub> (1 y 2), $\uparrow$ pH <sub>ic</sub> (TRAAK) $\uparrow$ temperatura AG
	TREK-2	KCNK10			
	TRAAK	KCNK4			
TASK	TASK-1	KCNK3	Rectificación saliente. $\gamma = 14-38$ pS	Páncreas, placenta, SNC, pulmón, corazón	<u>Inhibidores:</u> $\downarrow$ pH <sub>ec</sub> , AL <u>Activadores:</u> AG, PIP <sub>2</sub>
	TASK-3	KCNK9			
	TASK-5*	KCNK15			
TALK	TASK-2	KCNK5	Rectificación saliente. $\gamma = 10-60$ pS	Riñón, páncreas, hígado, TGI, placenta	<u>Inhibidores:</u> AG, AL <u>Activadores:</u> $\uparrow$ pH <sub>ec</sub> , NO
	TALK-1	KCNK16			
	TALK-2	KCNK17			
THIK	THIK-1	KCNK13	Rectificación entrante. $\gamma =$ ND	Amplia distribución (sólo medida de RNAm)	<u>Inhibidores:</u> AG <u>Activadores:</u> AA, $\downarrow$ pH <sub>ec</sub>
	THIK-2	KCNK12			
TRESK	TRESK	KCNK18	Rectificación saliente. $\gamma = 16$ pS	SNC, testículos	<u>Inhibidores:</u> AG, AL <u>Inhibidores:</u> AA, $\uparrow$ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>ic</sub> , $\downarrow$ pH <sub>ic</sub>

Abreviaturas:  $\gamma$ : conductancia; SNC: Sistema nervioso central; TGI: tracto gastrointestinal; PKA: fosforilación por la proteína-quinasa A; PKC: fosforilación por la proteína-quinasa C; AA: ácido araquidónico; *stretch*: tensión en la membrana; PIP<sub>2</sub>: fosfatidil-fosfoinositol2-fosfato; AG: anestésicos generales (principalmente halotano); AL: anestésicos locales (principalmente bupivacaína). \*sin expresión funcional

Bibliografía consultada: [22,26,39,40]

### FAMILIA DE LOS CANALES DEPENDIENTES DEL VOLTAJE K<sub>v</sub>:

En esta familia se encuentra la mayor diversidad de canales de K<sup>+</sup> codificada por 40 genes [23]. Como su nombre lo indica, la actividad de estos canales depende del voltaje de la membrana, siendo activados por la despolarización de la misma. Como mencionamos anteriormente estos canales tienen una estructura primaria de 6 TMS, presentando en el segmento S4 el sensor de voltaje y en la región que une los

segmentos S5 y S6 la región formadora de poro. Al igual que de lo que sucede con la familia  $K_{IR}$ , estos canales funcionan como tetrámeros [26,44].

Además del elevado número de genes que codifica para este tipo de canales la diversidad funcional que presentan se ve incrementada por [23]: i) formación de heteromultímeros entre miembros de una misma subfamilia, ii) formación de heteromultímeros con miembros de las subfamilias de subunidades silentes, iii) regulación por medio de subunidades accesorias:  $\beta_1 - \beta_3$  [45,46], KCHIP1, minK y KCNE, iv) desarrollo de *splicing* alternativo en casi todas las subfamilias [47], v) *RNA editing* y modificaciones postranscripcionales.

Dado que la descripción detallada de este grupo de canales excede al objetivo de esta introducción, describiremos a continuación la clasificación básica de esta familia y las propiedades generales de cada subfamilia (ver tabla 1.2.3).

Este grupo de canales se divide en 12 subfamilias según su similitud genética y a su vez, en base a su funcionalidad, se distinguen 2 subgrupos: por un lado los canales  $K_V$  propiamente dichos ( $K_V1-4$ ,  $K_V7$  y  $K_V10-12$ ) y por el otro, la subunidades silentes ( $K_V5$ ,  $K_V6$ ,  $K_V8$  y  $K_V9$ ) que como homómeros no pueden generar canales funcionales, pero sí lo hacen al heteromerizarse con miembros de la subfamilia  $K_V2$  [23].

Por su parte, las 8 subfamilias que incluyen los canales  $K_V$  funcionales se han clasificado en base a las propiedades electrofisiológicas de sus corrientes macroscópicas como:

- i. canales con corrientes de tipo A, que median corrientes transitorias que se activan con la despolarización de la membrana mostrando una cinética de activación rápida seguida de una inactivación completa en el lapso de aproximadamente 100 ms [23]. Tienen un rol funcional muy importante en la codificación de la frecuencia de disparo de potenciales de acción en diferentes tipos neuronales [48]. En el musculo liso vascular no ha sido demostrado un rol importante para este tipo de corrientes [26].
- ii. canales con corrientes de tipo rectificador tardío, involucrados en corrientes macroscópicas inducidas por la despolarización que presentan activación lenta e inactivación leve o nula. Estos canales participan de la

repolarización que finaliza los potenciales de acción, restableciendo los valores de conductancia al  $K^+$  como dominante en la determinación del valor de potencial de membrana celular [49].

**Tabla 1.2.3: Características de los canales de  $K^+$   $K_V$**

Subfamilia	Nombre	Gen	Propiedades biofísicas y moduladores*	Ubicación	Datos de interés
$K_V1.x$ (tipo <i>Shaker</i> )	$K_V1.1$	KCNA1	Rectificador tardío (excepto 1.4)  $\gamma = 5-21$ pS  <u>Inhibidores:</u> 4-AP, TEA (1), flecainida, margatoxina (1 y 2) Correolide(3)	SNC, pulmón, ME, CML, páncreas, corazón, retina, bazo, timo, leucocitos, testículos, plaquetas, TGI, riñón, osteoclastos	Homómeros y heterómeros Modulados por $\beta_1- \beta_3$ . De los 6-8 se sabe poco. <u>Función:</u> mantenimiento $V_m$ , modulación de la excitabilidad neuronal y muscular, repolarización cardiaca.
	$K_V1.2$	KCNA2			
	$K_V1.3$	KCNA3			
	$K_V1.4$	KCNA4			
	$K_V1.5$	KCNA5			
	$K_V1.6$	KCNA6			
	$K_V1.7$	KCNA7			
	$K_V1.8$	KCNA10			
$K_V2$ (tipo <i>Shab</i> )	$K_V2.1$	KCNB1	Rectificador tardío  $\gamma = 8(1)$ y $15(2)$ pS  <u>Inhibidores:</u> TEA	SNC	Homómeros y heterómeros con los silentes <u>Función:</u> mantenimiento $V_m$ , modulación de la excitabilidad neuronal y muscular.
	$K_V2.2$	KCNB2			
$K_V3$ (tipo <i>Shaw</i> )	$K_V3.1$	KCNC1	Rectificador tardío (3.1 y 3.2) y tipo A (3.3 y 3.4)  $\gamma = 14 - 27$ pS <u>Inhibidores:</u> 4-AP, TEA	SNC, ME, CMLV, céls. germinales	Homómeros y heterómeros. <u>Función:</u> Modulación de la excitabilidad neuronal y muscular.
	$K_V3.2$	KCNC2			
	$K_V3.3$	KCNC3			
	$K_V3.4$	KCNC4			
$K_V4$ (tipo <i>Shal</i> )	$K_V4.1$	KCND1	Todas tipo A. $\gamma = 6(1)$ pS <u>Inhibidores:</u> AA (2), 4-AP (3)	Miocito cardíaco, SNC	Homómeros y Heterómeros Modulación por subunidades KCHIP1 y $\beta$ . <u>Función:</u> repolarización cardiaca
	$K_V4.2$	KCND2			
	$K_V4.3$	KCND3			

Subfamilia	Nombre	Gen	Propiedades biofísicas y moduladores*	Ubicación	Datos de interés
K <sub>v</sub> 5	K <sub>v</sub> 5.1	KCNF1	Forma heterómeros con los K <sub>v</sub> 2.x		
K <sub>v</sub> 6	K <sub>v</sub> 6.1	KCNG1	Forman heterómeros con los K <sub>v</sub> 2.x		
	K <sub>v</sub> 6.2	KCNG2			
	K <sub>v</sub> 6.3	KCNG3			
	K <sub>v</sub> 6.4	KCNG4			
K <sub>v</sub> 7	K <sub>v</sub> 7.1	KCNQ1	Rectificador tardío. $\gamma = 1,8 - 7,3$ pS  <u>Inhibidores:</u> mefloquina, linopiridina	SNC, Miocitos cardíacos, páncreas, riñón, oído, placenta y pulmón, CMLV	Homómeros y heterómeros Modulación por subunidades minK y KCNE <u>Función:</u> repolarización cardíaca modulación de la excitabilidad neuronal
	K <sub>v</sub> 7.2	KCNQ2			
	K <sub>v</sub> 7.3	KCNQ3			
	K <sub>v</sub> 7.4	KCNQ4			
	K <sub>v</sub> 7.5	KCNQ5			
K <sub>v</sub> 8	K <sub>v</sub> 8.1	KCNV1	Forman heterómeros con los K <sub>v</sub> 2.x		
	K <sub>v</sub> 8.2	KCNV2			
K <sub>v</sub> 9	K <sub>v</sub> 9.1	KCNS1	Forman heterómeros con los K <sub>v</sub> 2.x		
	K <sub>v</sub> 9.2	KCNS2			
	K <sub>v</sub> 9.3	KCNS3			
K <sub>v</sub> 10 (tipo <i>eag</i> )	K <sub>v</sub> 10.1	KCNH1	Rectificador tardío (activación lentas) $\gamma = ND$ <u>Inhibidores:</u> quinidina	SNC (ppal), placenta, Cél. tumorales	Homómeros Inhibe el complejo Ca-calmodulina <u>Función:</u> Control proliferación y diferenciación celular
	K <sub>v</sub> 10.2	KCNH5			
K <sub>v</sub> 11 (tipo <i>erg</i> )	K <sub>v</sub> 11.1	KCNH2	Rectificador tardío (activación lenta) $\gamma = 10$ (1) <u>Inhibidores:</u> atemizol, sertindol	Corazón, cerebro, riñón, hígado, testículos, útero, próstata	Homo y heterómeros Modulación por subunidades minK. <u>Función:</u> repolarización cardíaca
	K <sub>v</sub> 11.2	KCNH6			
	K <sub>v</sub> 11.3	KCNH7			
K <sub>v</sub> 12 (tipo <i>elk</i> )	K <sub>v</sub> 12.1	KCNH8	Rectificador tardío (activación lentas)	SNC, testículos, colón, ojo, pulmón, linfocitos	Heterómeros. Poca o nada de información.
	K <sub>v</sub> 12.2	KCNH3			
	K <sub>v</sub> 12.3	KCNH4			

Abreviaturas:  $\gamma$ : conductancia; ME: Músculo esquelético; SNC: Sistema nervioso central; TGI: tracto gastrointestinal;  $V_m$ : potencial de membrana. Los bloqueos por 4-AP (4-aminopiridina) y TEA (tetraetilamonio) se indicaron si sus  $IC_{50}$  son menores a 5mM y 1mM respectivamente.

\* Los números entre paréntesis indican el subtipo de canal que presenta la característica indicada. Bibliografía consultada: [23,26]

A nivel de distintos lechos vasculares existen antecedentes en la bibliografía que indican la expresión de canales de tipo  $K_v1.3$ ,  $K_v1.5$ ,  $K_v1.6$ ,  $K_v3.1$ ,  $K_v3.2$  y  $K_v7.4$  en las CMLV. Estos canales se activan ante la despolarización de la membrana constituyendo, junto al canal  $BK_{Ca}$ , un importante mecanismo de regulación de *feedback* negativo del potencial de membrana. Además se ha demostrado que contribuyen al potencial de membrana en el reposo [18,38,50,51], de manera que son importantes reguladores del tono vascular. La activación de los mismos mediada por fosforilación por la PKA parece estar involucrada en la respuesta a vasodilatadores liberados por el endotelio como adenosina, prostaciclina ( $PGI_2$ ) y receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G-protein coupled receptor*) [52]. Recientemente se ha descrito una importante participación de canales de  $K^+$  del tipo  $K_v1.3$  en la regulación de la proliferación y cambio fenotípico de las CMLV [53,54].

#### **FAMILIA DE LOS CANALES DE $K^+$ *Slo***

Esta familia está constituida por los canales codificados por los genes *Slo* (*Slo1*, *Slo2.1*, *Slo2.2* y *Slo3*), y tienen como característica general y diferencial, el presentar un valor elevado de conductancia iónica [55]. El canal codificado por *Slo1*, es el miembro más estudiado de esta familia y de alta relevancia a nivel del musculo liso vascular. Se denomina también canal de  $K^+$  de alta conductancia activado por voltaje y  $Ca^{2+}$  intracelular, canal maxi-K o  $BK_{Ca}$  (del inglés, *big conductance potassium channel*). Este canal es el que dio origen al nombre de la familia, dado que fue clonado por primera vez a partir del mutante de la *Drosophila* llamado “*Slowpoke*” [56]. Los canales de tipo *Slo*, además de su alta conductancia, se caracterizan por la capacidad que presentan de sensar cambios en la concentración intracelular de determinados iones ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ , según el subtipo) [25,26].

A pesar de que se los incluye dentro de los canales 6TMS, presentan en el extremo amino terminal un dominio transmembrana extra denominado  $S0$ , es decir son 7TMS-1P. La región formadora de poro se sitúa en la conexión entre los segmentos  $S5$  y  $S6$ , mientras que en el segmento  $S4$  de los *Slo1* y *3* se halla el sensor del voltaje (al igual que en los canales  $K_v$ ); finalmente la región carboxilo terminal es la responsable de la mayor parte de las regulaciones que presenta estos canales [25,26].

Las principales características de esta familia y su distribución tisular se resumen en la siguiente tabla (1.2.4):

**Tabla 1.2.4: Características de los canales de K<sup>+</sup> Slo**

Nombre	Gen	Propiedades biofísicas y moduladores	Ubicación	Datos de interés
Slo 1 (BK <sub>Ca</sub> , K <sub>Ca</sub> 1.1)	KCNMA1	$\gamma = 250$ pS. <u>Activadores:</u> $\uparrow[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ , despolarización <u>Inhibidores:</u> TEA, Ba <sup>2+</sup> Iberiotoxina, caribdotoxina, paxilina	SNC, CMLV, hígado, gónadas, Glándula suprarrenal, nefrón, cóclea	Modulación por subunidades $\beta$ . <u>Función:</u> moderación de la activación celular por despolarización o incremento de Ca <sup>2+</sup>
Slo 2.1 (Slick, K <sub>Ca</sub> 4.2,)	KCNT2	$\gamma = 60-180$ pS. <u>Activadores:</u> $\uparrow[\text{Na}^+]_{\text{ic}}$ , $\uparrow[\text{Cl}^-]_{\text{ic}}$ , PKC (2.2) <u>Inhibidores:</u> $\uparrow[\text{ATP}]_{\text{ic}}$ , PKC (2.1)	Miocitos cardíacos, SNC	<u>Función:</u> regulación de la activación celular por entrada de Na <sup>+</sup>
Slo 2.2 (Slack, K <sub>Ca</sub> 4.1)	KCNT1			
Slo 3 (K <sub>Ca</sub> 5.1)	KCNU1	<u>Activadores:</u> $\uparrow\text{pH}_{\text{ic}}$ , despolarización <u>Inhibidores:</u> TEA, Ba <sup>2+</sup> Iberiotoxina, paxilina	espermatozoides	<u>Función:</u> maduración del esperma

Abreviaturas:  $\gamma$ : conductancia; SNC: Sistema nervioso central; PKC: proteína-quinasa C

El bloqueo por TEA (tetraetilamonio) se indicó si sus IC<sub>50</sub> es menor 1mM.

Bibliografía consultada: [25,26,57]

El canal BK<sub>Ca</sub> (a diferencia del resto de los canales de esta familia) posee roles variados en la fisiología de las CMLV, en las cuales se encuentra altamente expresado. La función principal de este canal en las mismas, es la de disminuir o moderar la respuesta contráctil a estímulos excitatorios celulares que implican aumentos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ya sea por una despolarización de la membrana plasmática, liberación de Ca<sup>2+</sup> por el retículo sarcoplásmico (RS), u otro estímulo que lo genere) [18,38,58,59]. Además, existen numerosas citas bibliográficas que indican que este canal participa de la hiperpolarización de las CMLV dependiente de endotelio [17]. Por otro lado, la actividad de los canales BK<sub>Ca</sub> es también la responsable de generar relajación vascular aún cuando el incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular sea localizado a pequeñas áreas celulares debido a liberaciones espontáneas locales de Ca<sup>2+</sup> desde el RS (chispas, en inglés, *sparks*) debido a que las mismas generan corrientes transitorias salientes (STOC, del inglés *spontaneous transient outward*

*currents*) a través de canales BK<sub>Ca</sub>, que derivan en la hiperpolarización de la membrana celular [60,61,62].

Si bien existe un único gen para el canal BK<sub>Ca</sub>, se ha observado que su sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> varía según el tipo de célula nativa en la que se lo estudia. El *splicing* alternativo (11 variables [63]), sumado al acople de subunidades moduladoras β son dos factores importantes en la determinación de las variaciones funcionales observadas. Se conocen 4 tipos de subunidades β (β<sub>1</sub> a β<sub>4</sub>) [64,65,66], pero es la subunidad β<sub>1</sub> la que se encuentra expresada principalmente en las CMLV. Poseen una estructura primaria compuesta por 2 segmentos de transmembrana y al acoplarse al canal, modifican su cinética y su sensibilidad a la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular. La subunidad β<sub>1</sub>, en particular, incrementa significativamente la sensibilidad del canal al Ca<sup>2+</sup>, disminuye su dependencia del voltaje y enlentece la cinética de activación de la corriente macroscópica. Esta modificación mediada por la subunidad β<sub>1</sub> es esencial para la aparición de las corrientes de tipo STOC [67,68].

#### **FAMILIA DE LOS CANALES DE K<sup>+</sup> DE BAJA CONDUCTANCIA SENSIBLES AL Ca<sup>2+</sup> (SK<sub>Ca</sub>, KCNN)**

Si bien pertenecen a 2 familias distintas, este grupo de canales generalmente se halla descripto junto al canal BK<sub>Ca</sub>, debido a que estos canales también se activan por el incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, comparten la estructura 6TMS-1P y la denominación en base al valor de la conductancia unitaria del canal[57]. Las diferencias de esta familia respecto al canal BK<sub>Ca</sub> radican en el menor valor de la conductancia (como su nombre lo indica), la presencia de sólo 2 argininas en el segmento S4, que explica su actividad independiente del voltaje, y la ausencia del segmento S0 [69,70]. Además, en lo que respecta a la activación por Ca<sup>2+</sup>, en los canales de tipo SK<sub>Ca</sub> éste se une por intermedio de la calmodulina, mientras que en el caso del BK<sub>Ca</sub> la unión es directa [71].

Esta familia está compuesta por 4 genes, y se divide en 2 subfamilias basándose en la conductancia de canal único, los canales SK<sub>Ca</sub> propiamente dichos y los canales de



conductancia intermedia,  $IK_{Ca}$ , cuyas características se resumen a continuación (tabla 1.2.5).

**Tabla 1.2.5: Características de los canales de  $K^+$   $SK_{Ca}$**

Nombre	Gen	Propiedades biofísicas y moduladores	Ubicación	Datos de interés
$SK_{Ca1}$ ( $K_{Ca2.1}$ )	KCNN1	Rectificación entrante. $\gamma = 10-14$ pS <u>Activadores:</u> $\uparrow [Ca^{2+}]_{ic}$ <u>Inhibidores:</u> apamina, bicuculina	SNC, CMLV, cels. endoteliales, eritrocitos	Presentan <i>splicing</i> alternativo <u>Función:</u> moderación de la activación celular por despolarización o incremento de $Ca^{2+}$
$SK_{Ca2}$ ( $K_{Ca2.2}$ )	KCNN2			
$SK_{Ca3}$ ( $K_{Ca2.3}$ )	KCNN3			
$IK_{Ca1}$ ( $K_{Ca3.1}$ )	KCNN4	$\gamma = 45$ pS <u>Activadores:</u> $\uparrow [Ca^{2+}]_{ic}$ <u>Inhibidores:</u> caribdotoxina, AA, clotrimazol	CMLV, cels. endoteliales, cels. sanguíneas	

Abreviaturas:  $\gamma$ : conductancia; SNC: Sistema nervioso central; AA: ácido araquidónico.

Bibliografía consultada: [25,26,57]

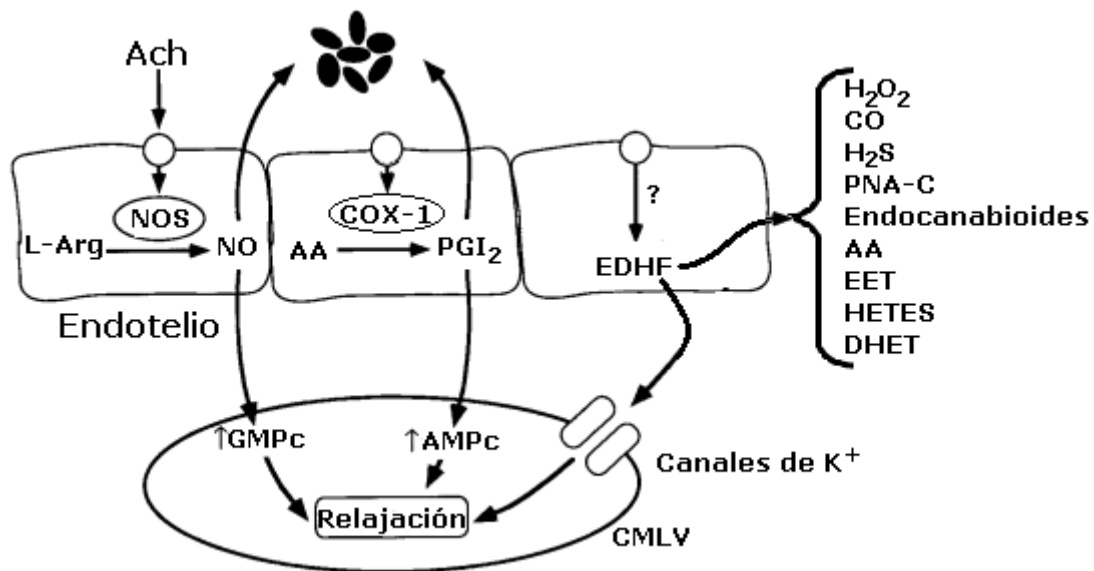
En contraste con el canal  $BK_{Ca}$ , que presenta una importante expresión a nivel de las CMLV y una baja expresión en las células endoteliales, los canales de esta familia,  $IK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$ , poseen en general baja expresión a nivel de las CMLV, pero una expresión constitutiva a nivel endotelial [72]. Ambos canales poseen, en algunos lechos vasculares, un rol principal en la relajación de las CMLV dependiente de endotelio según el siguiente mecanismo: un estímulo que genere un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular a nivel de la célula endotelial lleva a la activación de estos canales, los cuales permiten la salida de  $K^+$  hacia el espacio extracelular produciendo un incremento de la concentración de  $K^+$  extracelular sobre las CMLV, que induce la relajación de las mismas por el mecanismo antes descrito (ver sección de donde se describen los canales  $K_{IR}$ ) [17,73]. Por otro lado, la activación de estos canales generan la hiperpolarización de las células endoteliales, que se postula puede ser transmitida a las CMLV vecinas a través de uniones mio-endoteliales establecidas mediante conexinas [74,75].

### 3- FACTORES ENDOTELIALES Y ÁCIDO ARAQUIDÓNICO COMO EDHF

El endotelio vascular está formado por una monocapa de células que recubren la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos y posee un rol fundamental en la homeostasis cardiovascular. Las células endoteliales (CE) sintetizan y liberan una serie de factores que regulan la permeabilidad y el tono contráctil de los vasos sanguíneos así como también la angiogénesis y las respuestas inflamatorias, entre otros fenómenos vasculares. Es responsable de mantener el balance en la migración y proliferación de las CMLV, de la agregación o anti agregación plaquetaria, la trombogénesis y la fibrinólisis. Su participación en el balance entre vasoconstricción y vasodilatación es fundamental para la función vascular, de manera que las alteraciones endoteliales pueden desbalancear este equilibrio y desencadenar diversas patologías [17,76,77].

Entre los agentes vasodilatadores liberados por el endotelio ante el estímulo de un agonista, o por la acción de un estímulo mecánico sobre las CE (como la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo, denominada en inglés *shear*), clásicamente se encontraban descriptos el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) [78,79]. Sin embargo, en una gran cantidad de vasos sanguíneos las repuestas endoteliales no podían ser explicadas completamente por estos dos mediadores, dado que al inhibir su síntesis, la respuesta vasodilatadora persistía [80,81]. Debido a que esta respuesta vasorrelajante, mediada por endotelio e independiente de NO y de PGI<sub>2</sub>, se caracterizaba por la hiperpolarización de las CMLV, se la denominó genéricamente con el nombre de vasodilatación inducida por el Factor Hiperpolarizante Dependiente de Endotelio (EDHF, de la sigla en inglés *endothelium dependent hyperpolarizing factor*). La sigla EDHF actualmente está puesta en tela de juicio ya que genera confusión debido a que lleva a pensar en la existencia de un único factor soluble capaz de hiperpolarizar las CMLV, cuando en realidad se acepta la existencia de más de uno que cumple con esta condición. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y otros gases como el monóxido de carbono (CO) y el ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), el péptido natriurético atrial de tipo C (PNA-C), los endocannabinoides, y el ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos, por citar los más estudiados, son propuestos como posibles EDHF.

Es importante señalar que si bien son numerosas las sustancias que se proponen como EDHF, en distintos lechos vasculares de distintas especies, las mismas tienen como factor común un mecanismo de acción hiperpolarizante que involucra la activación de canales de  $K^+$  (figura 1.3.1). La hiperpolarización generada por estos factores lleva a la relajación del MLV, ya que disminuye la actividad de los CCVO presentes en las CMLV, produciendo una disminución de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y por lo tanto la relajación del musculo liso. Se ha observado que en muchos casos la respuesta del EDHF incrementa su relevancia ante la disminución de la funcionalidad del NO [82,83,84,85], mientras que en otros vasos constituye la vía principal de la relajación dependiente de endotelio [86,87,88].



**Figura 1.3.1:** Esquema de las vías principales de la relajación de las CMLV dependiente de endotelio. La activación de las células endoteliales puede inducir a la liberación del óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y diversos EDHF (derivados o no del AA), que desencadenan la relajación de las CMLV. El NO es sintetizado por la óxido-nítrico sintasa (NOS) y la PGI<sub>2</sub> a partir de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) (traducida y modificada de Faraci *et al.* (1998) [89])

El NO es un potente agente vasodilatador, que además, inhibe la agregación plaquetaria, la inflamación vascular y la proliferación de las CMLV (todos efectos antiaterogénicos). Existen tres isoformas de la enzima que sintetiza NO, la NOS (I, II y III; neuronal, inducible y endotelial, respectivamente). A nivel vascular tiene mayor

relevancia la endotelial (eNOS), la cuál es responsable de la producción de NO en estos tejidos [17,90]. El NO es reconocido como el factor endotelial de mayor importancia en la regulación de la función vascular [76]. Sus acciones son mediadas por la activación de la guanilato ciclasa (GC) soluble de las CMLV generando el respectivo aumento en la concentración de GMPc, que lleva directa o indirectamente (vía fosforilación por una proteína kinasa G (PKG)) a la hiperpolarización de las CMLV, mediante la activación de canales de potasio, entre ellos los canales de tipo  $BK_{Ca}$ ,  $K_{IR}$ ,  $K_{ATP}$  y  $K_V$  [79,82,91]. Por otro lado, el NO disminuye la afinidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ , entre otros mecanismos que median la vasodilatación. En los ratones *knockout* (KO) para la eNOS se ha observado que el EDHF tiene un efecto compensatorio de la actividad endotelial perdida [83,84].

Además de este gas, la NOS puede generar el ión superóxido, que luego por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede transformarse a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que, por difusión, puede actuar como factor regulador en las células vecinas, como se ha demostrado en diferentes lechos vasculares [92,93,94].

El  $H_2O_2$  es una especie reactiva del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) que posee efecto variable según el lecho vascular que se está analizando. De esta manera, en algunas arterias se ha observado un efecto contráctil, mientras que en otras su efecto es vasodilatador [95,96,97,98]. Tiene una actividad compensatoria en la perdida de la función del NO, y su actividad permanece cuando se utilizan inhibidores de la NOS. El  $H_2O_2$  no proviene sólo de la actividad de las NOS, sino que además puede generarse en ausencia de la misma como subproducto de otras enzimas como la lipooxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa (COX), la NADPH-oxidasa y enzimas de la cadena respiratoria [99]. Su efecto como EDHF sobre las CMLV se pone en evidencia al agregar catalasa al medio ya que esta enzima, que acelera la degradación del  $H_2O_2$ , evita su efecto [97,98]. El mecanismo por el cual el  $H_2O_2$  media la dilatación está poco dilucidado. Miura *et al* (2003) proponen la activación de canales de  $K^+$  en las CML como mecanismo de acción de la vasodilatación inducida por esta sustancia en la arteriola coronaria humana [98].

**El monóxido de carbono (CO) y el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ )**, gases de bajo peso molecular fácilmente difusibles con acción sobre las CMLV, también han sido

propuestos como EDHF. La principal fuente de CO es la degradación del grupo hemo (proveniente de la hemoglobina) mediada por la enzima hemo-oxidasas (HO) ya sea en su forma constitutiva (HO-2) o inducible (HO-1). Ambas se expresan tanto en las CE como en las CMLV. Se propone que su actividad vasodilatadora está mediada por la activación de la GC, de canales de  $K^+$  y/o por la inhibición de las enzimas de citocromo P450 responsables de la síntesis del vasoconstrictor 20-HETE, derivado del AA (ver más adelante) [100]. Por otro lado el CO tiene actividad inhibitoria sobre la NOS [101]. Si bien a la fecha la producción a nivel endotelial de CO se ha confirmado en escasos lechos vasculares sus efectos protectores y antiinflamatorios lo postulan como un factor de gran interés como blanco terapéutico [17].

El  $H_2S$  se sintetiza por la acción de dos enzimas, la CBS (cistationina-beta-sintasa) y la CSE (cistationina-gamma-liasas), las cuales usan a la cisteína como sustrato [17]. Este gas posee efectos antiinflamatorios, antioxidantes, vasodilatadores e hipotensores. La expresión de la CSE ha sido reportada a nivel de las CE, donde a partir del incremento de la concentración de calcio intracelular se produce  $H_2S$ , que genera la posterior activación de canales de potasio tipo  $K_{ATP}$  en las CMLV [102]. Se ha observado que el CO y el  $H_2S$  tienen función compensadora en varias situaciones fisiopatológicas que presentan descenso de la biodisponibilidad de NO [17,100].

La acción vasodilatadora, del **péptido natriurético de tipo C (PN-tipo C)** en algunos lechos vasculares y su mecanismo de acción lo postulan como un posible agente EDHF. Se ha descrito la capacidad del endotelio de sintetizar distintos tipos de péptidos, entre ellos, el PNA-C que tiene descrita actividad hiperpolarizante de CMLV y vasodilatadora [82]. Su acción esta mediada por la activación del receptor del péptido natriurético B (NPR-B, del inglés *natriuretic peptide receptor-B*), cuya cascada intracelular lleva a la activación de la GC y posterior activación de canales de potasio de tipo  $BK_{Ca}$  y  $K_{ATP}$  [103]. Por otro lado, este péptido actúa previniendo la actividad proliferativa de las CMLV, el reclutamiento de leucocitos y la reactividad vascular [104].

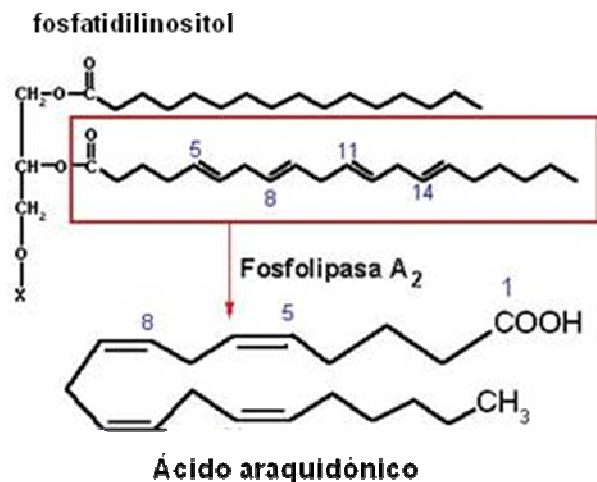
También **los canabinoides endógenos y exógenos, como el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) y la anandamida**, tienen acción hiperpolarizante sobre las CMLV y vasodilatadora mediante la activación de canales de  $K^+$  y la inhibición de canales de

Ca<sup>2+</sup> [105]. Si bien su existencia como factor endotelial no ha sido probada directamente, dado que no hay reportes que demuestren su producción a nivel de las CE, o su participación en la respuestas de las mismas a los distintos estímulos por agonistas [17,105], dichas sustancias parecen cumplir un rol relevante en la homeostasis cardiovascular [106]. Hay varios trabajos que han demostrado la importancia de los canabinoides endógenos en las respuestas vasodilatadoras frente a la hipoxia cardíaca y a nivel del sistema nervioso central [107,108,109].

Por último, y teniendo en cuenta que el rol del AA como factor hiperpolarizante de las CML de la AUH ha sido uno de los objetivos de esta tesis, describiremos con más detalle el rol y mecanismos de acción propuestos para **el ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos** como EDHF.

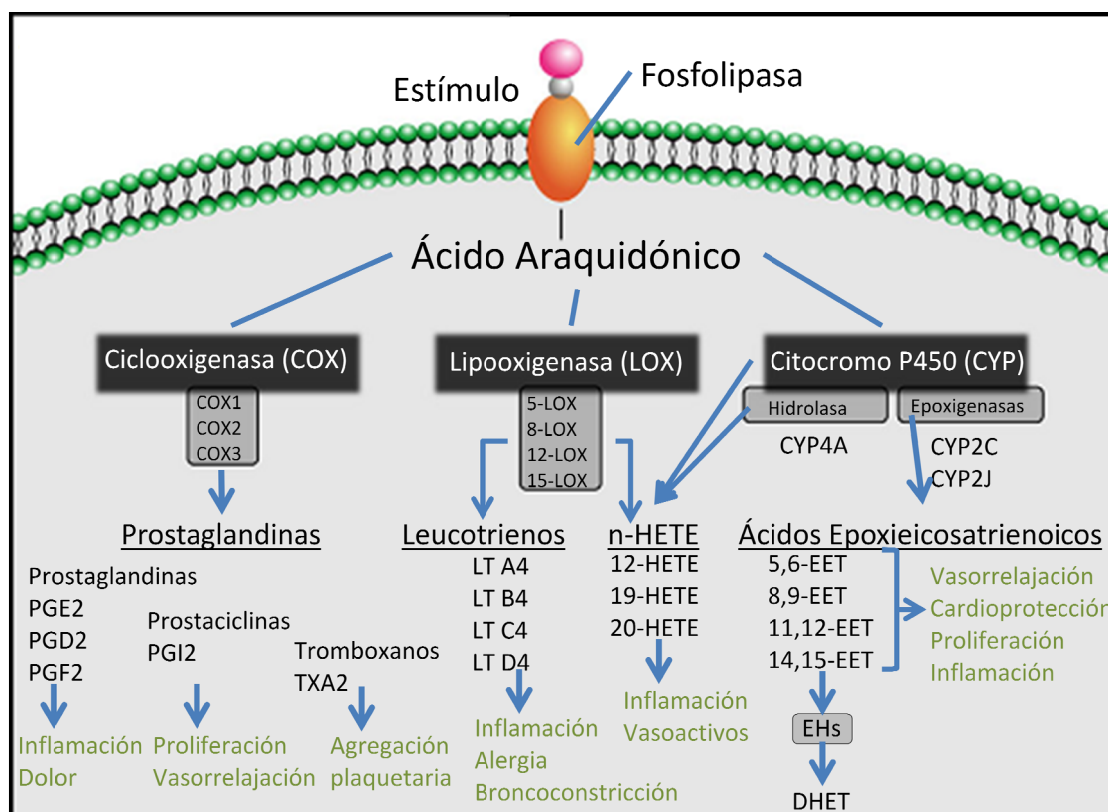
El ácido araquidónico, también denominado ácido icosatetraenoico es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces cis en las posiciones 5, 8, 11 y 14 (figura 1.3.2). Es el ácido eicosaenoico más abundante en el hombre. Se obtiene a partir de la dieta y también puede sintetizarse a partir del ácido linoléico por elongación y desaminación en el hígado. A nivel celular, puede encontrarse formando parte de las membranas celulares esterificando al C<sub>2</sub> del glicerol del fosfatidilinositol y de otros fosfolípidos [110].

Diversos agonistas como acetilcolina, histamina y bradiquinina según el vaso inducen a la generación de AA a nivel endotelial mediante la activación de determinadas lipasas (A<sub>2</sub>, C y D). La activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> produce la hidrólisis de los mismos y la liberación directa de AA al medio intracelular, mientras que la acción de la fosfolipasa C y D requieren de pasos adicionales para la liberación de AA [88,110].



**Figura 1.3.2:** Estructura química del ácido araquidónico y obtención a partir del fosfatidilinositol, por hidrólisis mediada por la fosfolipasa A<sub>2</sub>

Una vez liberado, el AA libre puede reincorporarse a los fosfolípidos, difundir al exterior celular o ser metabolizado por distintas enzimas. A nivel endotelial dicho metabolismo puede producirse por 3 vías, cuyas enzimas principales son la ciclooxigenasa (COX), la lipooxigenasa (LOX) o las epoxigenasas (pertenecientes al citocromo P450) [88,110]. En la figura 1.3.3 se esquematizan las vías, sus enzimas y sus productos.



**Figura 1.3.3:** Principales vías de metabolización del AA y sus respectivos productos finales con sus efectos. (Modificada de Panigrahy, D *et al.* 2010 [111])

Campbell *et al* (2007) han estudiado detalladamente la producción de factores por estas vías en células endoteliales en cultivo proveniente de arterias y venas pulmonares humanas, venas umbilicales humanas y arterias coronarias bovinas [88].

El principal metabolito del AA generado a partir de la actividad de la **enzima COX** en las CE e involucrado como factor endotelial es la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), mientras que otros como la prostaglandina PGE<sub>2</sub> y el ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (HHT) tienen una producción minoritaria [88,110]. La PGI<sub>2</sub>, como se mencionó anteriormente, fue uno de los primeros factores endoteliales descritos y uno de los principales mediadores de la respuesta endotelial en varios vasos sanguíneos [78]. La misma actúa sobre los receptores denominados IP generando antiagregación plaquetaria y vasodilatación. Este último efecto lo logra mediante la hiperpolarización de las CMLV, que dependiendo del lecho vascular, puede ser mediada por la activación de distintos tipos de canales de K<sup>+</sup>, principalmente actuando a nivel de los canales BK<sub>Ca</sub>, K<sub>ATP</sub>, K<sub>IR</sub> y K<sub>V</sub>. Su relevancia ha sido puesta de manifiesto con el uso de inhibidores selectivos de los receptores IP. Se ha observado en general que la contribución de la PGI<sub>2</sub> es importante especialmente como respuesta al estímulo mecánico a nivel endotelial (*shear stress*), mientras que posee poca relevancia en la actividad endotelial inducida por agonistas [112]. Los ratones KO para la COX presentan hipertensión con esclerosis arterial [17,82]. Por otro lado, su síntesis se incrementa en ratones KO para las NOS, lo que demuestra que la PGI<sub>2</sub> también puede compensar ese tipo de disfunción endotelial [113].

La acción de la **enzima LOX** a nivel endotelial genera como metabolitos principales del AA los ácidos 12- y 15-hidroxiicosatetraenoicos (HETEs), que pueden ser liberados por las CE y producir relajación de las CMLV mediante activación del canal BK<sub>Ca</sub> [114]. Existen pocos trabajos en donde se ha observado un efecto relevante de la LOX en la vasorelajación dependiente de endotelio [17,88], de manera que esta vía parece no tener una gran relevancia. El caso particularmente estudiado es el de la arteria aorta de conejo, donde existe un componente de vasodilatación mediada por endotelio e independiente de NO y de PGI<sub>2</sub> que se elimina al bloquear la LOX [115].



Dentro de la vía metabólica de las enzimas **citocromo P450 mono-oxigenasas** se incluyen a los productos del AA sintetizados a nivel endotelial por acción de las enzimas epoxigenasas. Más específicamente, se sintetizan 4 ácidos epoxieicosatrienicos (EETs): 14,15-, 11,12-, 8,9- y 5,6-EET, siendo los 2 primeros los principales metabolitos. Derivan de la acción de las isoenzimas 2C y 2J, y en general son vasodilatadores [116,117]. La naturaleza del derivado generado depende de las enzimas de este citocromo presentes [17,110]. Los EETs, DHETs (ver más adelante) y algunos HETEs son los únicos metabolitos del citocromo P450 a nivel de las CE, mientras que no se ha podido detectar su síntesis en las CMLV [88,116]. Los EETs previenen la inflamación, el estrés oxidativo, la agregación plaquetaria, la migración de las CMLV y promueve la fibrinólisis, conformando una serie de efectos protectores de la enfermedad aterosclerótica [76,118].

Respecto a su mecanismo de relajación vascular, se halla descrito que el 11,12-EET y el 14,15-EET activan al canal BK<sub>Ca</sub> de las CMLV de manera indirecta, por medio de la activación de un receptor acoplado a proteína G que lleva a la activación de una protein-quinasa A (PKA), que al fosforilar el canal incrementa su sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> y por lo tanto su actividad [116,119]. Campbell *et al.* (2007) han confirmado este efecto en CML provenientes de la arteria mamaria interna humana y de la arteria coronaria humana [88]. En experimentos *in vitro* utilizando la medición de fuerza realizada por tejido intacto se ha observado que a nivel de las arterias coronarias humanas, como también a nivel periférico en arterias subcutáneas, mamarias y musculares humanas, se observa una clara dilatación por estos agentes, la cual puede ser bloqueada en presencia de inhibidores del citocromo P450, o en presencia de iberiotoxina (un bloqueante selectivo de canales BK<sub>Ca</sub>) [88,116]. El peso de los EETs como EDHF se ha demostrado tanto para la relajación por agonistas, como para aquella mediada por *shear stress* [88]. A nivel endotelial también se halla presente la enzima soluble epóxido hidrolasa (EHs, del inglés, *epoxide hydrolase soluble*) que convierte a los EETs en ácidos dihidroxieicosatrienicos (DHETs) [88,110,116]. Los ratones KO para la enzima EHs, responsable de la degradación de los EET, presentan un valor inferior de presión arterial y una mayor protección frente al infarto agudo de miocardio, accidente cerebro-vascular y fenómenos de isquemia-reperfusión [17,120].

Otra enzima endotelial de este citocromo es la hidroxilasa, la misma convierte al AA en el 20-HETE, un potente agente vasoconstrictor [116]. Se ha demostrado su capacidad para contraer significativamente las arterias renales y cerebrales de rata y, las arterias coronarias y mesentéricas bovinas [17,88].

Si bien existe un claro consenso en que el efecto principal del AA como agente vasodilatador está mediado por sus metabolitos [88,98,121], la acción directa del AA como factor endotelial fue tempranamente propuesta por Lonigro *et al* en 1994 [122], dejando abierta la idea de un cuarto paso para la dilatación vascular producida por la acción directa del AA. Varios autores muestran datos que sustentan esta idea, sin embargo la misma no está completamente clara y los datos publicados varían dependiendo de la dosis de AA ensayada y del lecho vascular estudiado. En la siguiente tabla se resumen los diversos resultados descriptos en la bibliografía en referencia a este tema:

Autor	Lecho vascular	Medida	[AA] <sup>@</sup>	Efecto Indirecto <sup>#</sup>	Efecto Directo <sup>*</sup>	
Rosolowsky <i>et al</i> , 1993 [121]	Arterias pulmonares bovinas	Relajación de anillos precontraídos por agonista	CDR (EC <sub>50</sub> =0,3μM)	+	- (C+L+P o E)	
Miura <i>et al</i> , 1998 [123]	Arterias coronarias humanas	Relajación de anillos precontraídos por agonista	CDR (EC <sub>50</sub> =0,6μM)	< 0,1μM	+	- (C+N+L+P o E)
				> 0,1μM	+	+ (C+N+L+P)
		Potencial de membrana de CMLV	< 0,1μM	+	- (N+C+P)	
			> 0,1μM	+	+ (N+C+P)	
Oltman <i>et al</i> , 2001[124]	Arterias coronarias caninas perfundidas in vitro e in vivo	Diámetro arterial in vivo.	1 μM	+	- (N+C+P)	
			5 y 10 μM	+	+ (N+C+P)	
	Diámetro in vitro de arteria precontraída por agonista	< 1μM	+	- (N+C+P)		
		> 1μM	+	+ (N+C+P)		

Autor	Lecho vascular	Medida	[AA] <sup>@</sup>	Efecto Indirecto <sup>#</sup>	Efecto Directo <sup>*</sup>
Lonigro <i>et al</i> , 1994 [122]	Arteria coronaria porcina	Relajación de anillos precontraídos por agonista	Liberación desde endotelio inducido por bradiquinina (BK) (sin efecto al bloquear PLA2)	-	+ (N+C+L+P)
			3, 10 y 100 μM	-	+ (N+C+L+P)
You <i>et al</i> , 2002 y 2005 [125] [126]	Arteria cerebral media de rata	Diámetro in vitro de arteria presurizada	Liberación desde endotelio inducido por dUTP (sin efecto al bloquear PLA2)	-	+ (N+C+L+P+S+C)
Kirber <i>et al</i> , 1992[127]	Arteria pulmonar de conejo	Corrientes iónicas en CMLV aisladas	20 μM	NP	+ (activa el canal BK <sub>Ca</sub> )
Xu <i>et al</i> , 1996[128]	Arteria coronaria de perro	Corrientes iónicas en CMLV aisladas	1-16 μM	NP	+ (activa el canal K <sub>ATP</sub> )
Bryan <i>et al</i> , 2005[42]	Arteria cerebral media de rata	Corrientes iónicas en CMLV aisladas	10 μM	NP	+ (activa el canal TKEK-1)

NP= No probado \* El efecto directo del AA en los experimentos de órgano aislado, fue considerado como la persistencia de relajación en presencia de inhibidores de la NOS [N] (L-NAME, L-NNA), COX [C] (indometacina), LOX [L] (BW755c, baicaleína), del citocromo P450 [P] (SKF525a, 17-ODYA, miconazol, clotrimazol, MMPOH), SOD [S] (NDGA) y catalasa [C] o en ausencia del endotelio [E].

# El efecto indirecto es (+) cuando se observa una disminución en la respuesta vasodilatadora al agregar los inhibidores de las distintas rutas de metabolización del AA.

@ CDR: Curva Dosis-Respuesta. Entre paréntesis se indica el valor de la dosis efectiva 50 del ácido araquidónico. En el caso que fue necesario, se indica la concentración a partir de la cual aparece el efecto directo del AA.

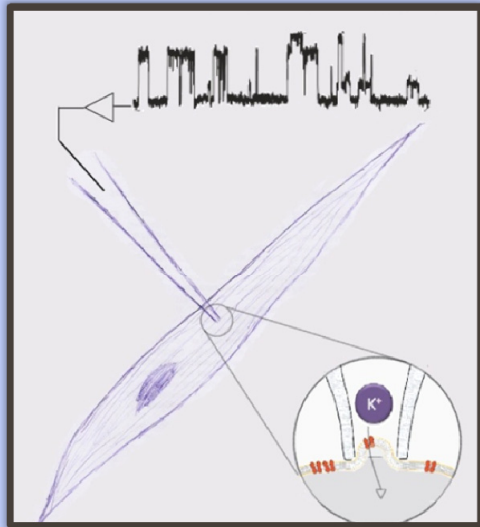
En particular, en los vasos del cordón umbilical humano, ha sido descrito que las células endoteliales producen eicosanoides derivados del AA, como la PGI<sub>2</sub> y el tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) [129,130], los cuales regulan el tono contráctil de dichos vasos sanguíneos, pero no hay datos en la bibliografía acerca del rol de los efectos de posibles EDHF sobre la arteria umbilical. En relación a este tema, los resultados que se presentan en este trabajo de Tesis Doctoral muestran evidencias de un efecto directo del AA sobre las células de músculo liso en las cuales genera la activación de canales de potasio calcio activados de tipo BK<sub>Ca</sub>. Esto sugiere que el AA podría funcionar como un EDHF en esta arteria de acuerdo a los resultados encontrados en otros lechos vasculares.

## 1.4- OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es contribuir al conocimiento y desarrollo de un área de base de importante impacto sobre la salud humana como lo es la fisiología vascular. En particular nos interesa aportar al conocimiento de la fisiología de vasos humanos, por lo cual planteamos utilizar en este estudio la arteria umbilical humana (AUH). Además este tejido, permite profundizar el conocimiento de los factores que pueden regular el flujo feto-placentario. Mediante esta investigación nos proponemos generar conocimiento acerca de los mecanismos que influyen sobre el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de músculo liso vascular y por lo tanto en su grado de contracción, como también el efecto de moduladores de la función contráctil vascular de origen endotelial.

Específicamente nos proponemos, en primer lugar, estudiar las propiedades de los diversos canales de  $\text{K}^+$  presentes en las células de músculo liso de la arteria umbilical humana mediante la técnica de *patch-clamp*. Esto permitirá evaluar el rol de estos canales en la regulación del potencial de membrana tanto en reposo, como en respuesta reguladora de un estímulo contráctil.

En segundo lugar, nos proponemos estudiar el rol modulador de factores de liberación endotelial sobre la actividad de dichos canales de  $\text{K}^+$ , así como su relación con la regulación del potencial de membrana. Nos focalizaremos específicamente en la acción, tanto a nivel de canal único, como a nivel de célula completa, del ácido araquidónico como uno de los mediadores propuestos como factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).



1. Introducción y objetivos
  - 2. Materiales y métodos**
  3. Resultados
  4. Discusión y conclusiones
  5. Bibliografía
-

## **2.1- MUESTRAS DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH): OBTENCIÓN Y DISOCIACIÓN CELULAR**

Para abordar el tema de estudio de esta tesis, utilizamos un vaso humano como es la arteria umbilical, la cual tiene origen en la aorta fetal y forma parte de la circulación feto-placentaria. Tomando un segmento del cordón umbilical en el momento del parto es posible aislar este vaso, obteniendo así una muestra de tejido vascular humano, algo a lo cual es difícil de acceder. A partir del mismo, podemos obtener células musculares lisas aisladas para el estudio de corrientes iónicas. Cabe destacar que esta arteria constituye un modelo experimental muy interesante para el estudio de la fisiología vascular, dado que permite abordar, en un tejido humano el estudio de estructuras celulares que participan en la regulación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, que son poco conocidas en las CMLV humano. Además, teniendo en cuenta la función de la AUH, permite estudiar los efectos de distintas condiciones fisiológicas, fisiopatológicas y farmacológicas, sobre una estructura fundamental en la regulación del flujo feto-placentario.

### **2.1.1– OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

Utilizamos segmentos vasculares de la AUH obtenidos a partir de muestras de cordones umbilicales provistos por el servicio de obstetricia del Instituto Central de Medicina (La Plata). Luego del parto se obtiene un segmento de 10 -15 centímetros de la parte medial del cordón umbilical el cual se introduce en una solución de Krebs Ringer Bicarbonato (KRB, en mM: NaCl 130; KCl 4,7;  $Na_2HPO_4$  1,17;  $MgSO_4$  1,16;  $NaHCO_3$  24;  $CaCl_2$  2,5, pH ajustado con carbógeno) sin glucosa y se conserva a 4°C hasta su utilización (durante las primeras 24 horas). A partir del mismo, en el laboratorio se procede a la disección de la arteria umbilical, aislándola completamente del tejido circundante (gelatina de Wharton). Estos segmentos arteriales son los que se utilizan inmediatamente para proceder a la disociación de las células de musculo liso.

### **2.1.2– DISOCIACIÓN CELULAR:**

La obtención de los miocitos aislados de la AUH se realizó a partir del protocolo de disociación celular descrito por Klockner (1993) [131] y posteriormente modificado en nuestro laboratorio para minimizar la cantidad de enzima utilizada [132]. El método

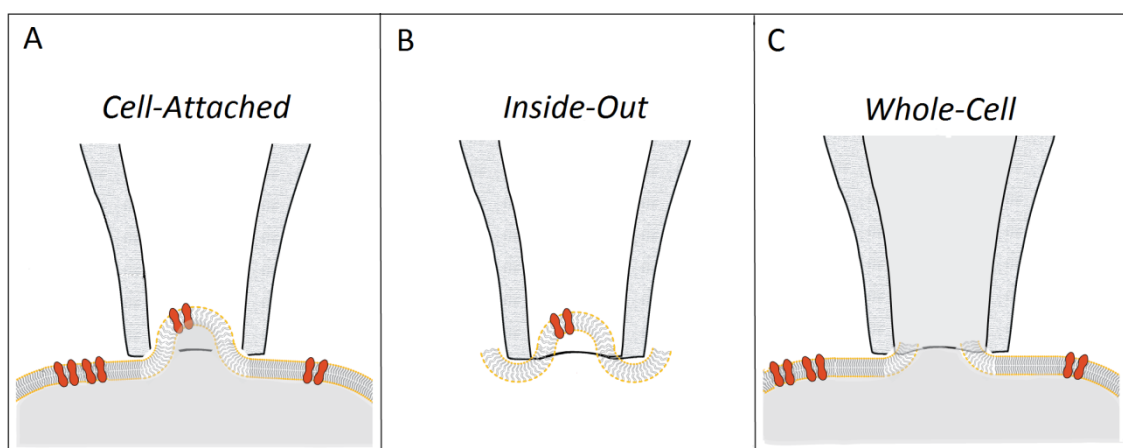
consiste en colocar un segmento arterial (20-40 mg) cortado en piezas de aproximadamente 2 x 2 mm en un medio de la siguiente composición (en mM): ClNa 140; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,7; Cl<sub>2</sub>Mg 1,2; HEPES 5; glucosa 6; pH ajustado a 7,4 con NaOH (solución de disociación, SD). Luego de 30 minutos se transfiere el tejido a un tubo conteniendo 1 ml de la SD a la cual se le adiciona 2-3 mg de colagenasa tipo I. El tubo con el tejido permanece en un baño termostatzado a 35 °C con agitación suave. Se hacen extracciones sucesivas de las CML aisladas mediante una dispersión del tejido tratado con una pipeta Pasteur cada 15 minutos, se separan de la solución por centrifugación y se resuspenden en la SD sin enzimas. Las CML aisladas y resuspendidas se colocan en una cámara de fondo de vidrio de 3 ml apta para microscopio invertido. Las células se seleccionan por su aspecto ahusado y relajado para intentar el logro de sellos con los microelectrodos de *patch-clamp*, y se usan durante las 5 a 6 horas posteriores a la disociación.

## 2.2- REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN LAS CÉLULAS AISLADAS DE LA AUH: GENERALIDADES

La Técnica de *patch clamp* permite medir corrientes iónicas de transmembrana manteniendo el potencial de la misma en valores prefijados (en inglés, *voltage-clamp*), o medir la variación de potencial de membrana ante un estímulo fijo de corriente (en inglés, *current-clamp*). Es por lo tanto, la técnica ideal para estudiar canales iónicos identificando los iones que transportan la corriente, la magnitud de las mismas, su sensibilidad al voltaje, drogas y estímulos de diferente tipo. La técnica consiste en la aproximación de una micropipeta de vidrio, por medio de un micromanipulador, a la superficie de la membrana de la célula elegida y el establecimiento de un sello de alta resistencia (en inglés, *Giga-seal*), de aproximadamente 10 GΩ, entre el vidrio de la misma y la membrana celular.

En la configuración denominada de célula completa (en inglés *whole-cell*, WC) se registran corrientes macroscópicas representativas de la totalidad de canales iónicos presentes en la membrana celular, mientras que en las configuraciones denominadas de canal único (en inglés, *single channel*, SC) en sus variantes de *cell-attached* (CA) e *inside-out* (IO) es posible registrar la corriente de un solo canal iónico.

A continuación se presenta un esquema de las distintas configuraciones utilizadas en esta tesis:



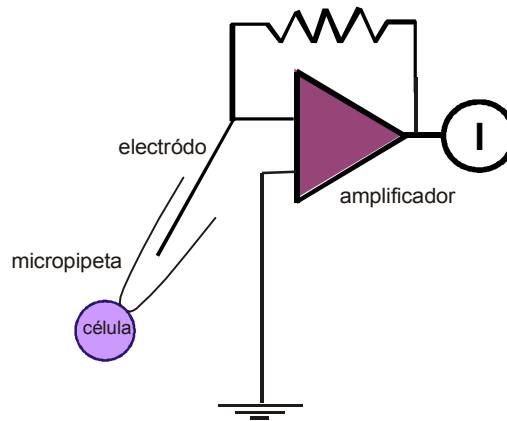
**Figura 2.2.1:** Esquema de las configuraciones del patch-clamp utilizadas. A: Configuración de *Cell-Attached* (CA), B: Configuración de *Inside-Out* (IO) y C: Configuración de *Whole-Cell* (WC).



En la configuración de CA se mantiene la integridad de célula, de manera que tanto la solución de la pipeta (SP) como la del baño (SB) están en contacto con la cara extracelular de la membrana. Esta configuración permite registrar las corrientes de los canales iónicos presentes en la porción de membrana que se introdujo en la punta de la micropipeta (en inglés, *patch*) al formar el sello de alta resistencia. En nuestro caso utilizamos, micropipetas de una resistencia de entre 2-4 M $\Omega$ , cuya punta tiene un área de aproximadamente 1,5  $\mu\text{m}^2$ . La resolución de esta técnica permite registrar la corriente iónica durante las aperturas de los canales en forma individual, los cuales se observan como saltos discretos en el nivel de corriente registrada. Además, en estas condiciones se conservan todas las interacciones y regulaciones intracelulares de la célula sellada.

A partir de la configuración de CA, se puede lograr el pasaje a las otras 2 configuraciones utilizadas. En la configuración de IO (figura 2.2.1 B) se escinde la porción de membrana sellada del resto celular, mediante el desplazamiento de la micropipeta con el micromanipulador. De esta manera, la punta de la misma queda con la porción de membrana sellada, cuya cara intracelular está ahora en contacto con la solución del baño. Esta configuración, al igual que la anterior, permite el registro de las corrientes de canales individuales, pero con control preciso de las soluciones que se ponen en contacto con ambos lados de la membrana.

Para la configuración de WC (figura 2.2.1 C) también es necesario partir de la configuración de CA, solo que en este caso se realiza una segunda presión negativa desde la pipeta, que logra retirar la porción de membrana sellada. De esta manera la solución de la pipeta dializa la célula y se establece una conexión eléctrica entre el electrodo (en contacto con la solución de la micropipeta) y el interior intracelular (ver esquema en la figura 2.2.2). Esta configuración representa un buen modelo para el estudio de canales iónicos en condiciones cercanas a las fisiológicas, dado que permite mantener gran parte de las estructuras intracelulares, respetar los gradientes de los distintos iones a ambos lados de la membrana y así registrar las corrientes en una célula que mantiene su capacidad de establecer un potencial de membrana en el reposo.



**Figura 2.2.2:** Esquema básico del circuito de *patch-clamp*

Observamos las células con un microscopio invertido (Televal 3; Zeiss, Jena, Alemania) estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria (Newport) recubierto con una caja de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente. La señal de corriente iónica fue registrada en función del tiempo con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA), se filtró adecuadamente con un filtro de tipo Bessel de 8 polos a una frecuencia de 2 kHz y se digitalizó (Digidata 1200 Axon Instruments, Foster City, CA) con una frecuencia de muestreo de 16 kHz en los registros de corrientes en las configuración de SC, y de 20 kHz en los registros de corrientes macroscópicas en la configuración de WC.

Las soluciones ensayadas fueron perfundidas con una pipeta multivías colocada en la proximidad de la célula investigada, todas a temperatura ambiente. Luego de ensayar un protocolo en una célula, se reemplaza la cámara experimental por otra conteniendo una nueva muestra de células. Las distintas drogas ensayadas fueron agregadas sobre las soluciones estándares utilizadas y, en el caso que correspondiera, los controles fueron realizados en presencia del solvente en el cual se disolvió la droga.

## **2.3- REGISTROS Y METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES MEDIDAS EN LA CONFIGURACIÓN DE CANAL ÚNICO (SC).**

### **2.3.1- REGISTROS EN LA CONFIGURACIÓN DE CANAL ÚNICO**

Como adelantamos en el inciso anterior, se realizaron registros de canal único de las corrientes de los canales iónicos presentes en las CML aisladas de la AUH trabajando en las configuraciones de CA e IO. Con el objetivo de estudiar la diversidad de canales iónicos selectivos al ión  $K^+$  presentes en este tipo celular, trabajamos inicialmente en la configuración de CA, dado que al conservar la integridad celular, la frecuencia de aparición de los canales es significativamente mayor, debido a que los mismos están sujetos a las regulaciones del medio intracelular (interacción proteína-proteína, fosforilaciones, segundos mensajeros, concentraciones iónicas particulares). Al pasar a la configuración del IO, estas regulaciones pueden perderse, lo que podría ocasionar un descenso en la actividad del canal iónico que haría más difícil su registro. Por otro lado, el estudio de las propiedades elementales de los canales iónicos (principalmente sobre el canal  $BK_{Ca}$ ) como lo son la selectividad iónica, la sensibilidad farmacológica, la relación entre la actividad del canal y el potencial de membrana ( $V_m$ ), entre otras, se realizó a nivel de canal único trabajando en la configuración de IO, dado que ésta permite la manipulación directa de las soluciones en contacto con el canal iónico. Además, tiene una mayor reproducibilidad al presentar un menor cantidad de factores (intracelulares) que pueden afectar el comportamiento del canal iónico en forma aleatoria entre las distintas células ensayadas.

Se realizaron registros de la actividad de canal único con una duración de 30 a 60 segundos, a distintos valores de potencial aplicado (entre -100 y +60 mV) los cuales permanecieron constantes a lo largo del registro. Trabajamos en condiciones simétricas para el ión  $K^+$  (ver soluciones en el punto 2.3.3). En estas condiciones pudimos observar la actividad de los canales iónicos presentes en la porción de membrana sellada en su estado estacionario para poder calcular para cada valor de potencial ensayado la amplitud de la corriente que atraviesa el mismo y la probabilidad de apertura ( $NPo$ , donde  $N$  indica el número de copias del canal, dado que no se puede establecer con certeza) . Como consecuencia de esto último, los canales que presentan inactivación en el tiempo a los distintos potenciales no fueron registrados.

### 2.3.2- ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE CANAL ÚNICO.

Para el análisis de los registros se utilizó el programa Clampfit 9.2, que permitió realizar los siguientes análisis:

#### 2.3.2 A: CÁLCULO DE LA CONDUCTANCIA IÓNICA.

La conductancia iónica es una propiedad intrínseca de un canal; constituye un valor empírico que se obtiene a partir de la amplitud de la corriente de canal único dividida por la fuerza impulsora de la corriente, la cual corresponde a la diferencia entre el potencial aplicado a la membrana menos el valor del gradiente electroquímico para el ion permeante [133]. A partir de los registros de corriente observados medimos los valores de amplitud de corriente ( $i$ ) para cada valor de potencial aplicado ( $V$ ) y construimos un gráfico  $i$  vs.  $V$  ( $i$ - $V$ ), que relaciona estos parámetros según la siguiente expresión:

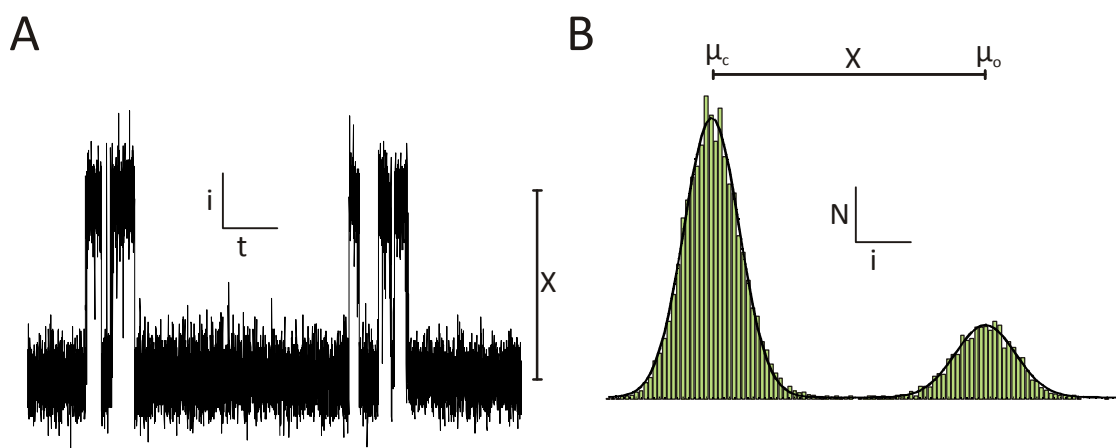
$$i_x = \gamma_x (V - E_x)$$

donde  $i_x$  es el valor de la amplitud de la corriente de canal único para un ión  $x$ , (medido en picoAmperes, pA),  $V$  es el potencial aplicado (en milivoltios, mV),  $\gamma_x$  es la conductancia de canal único (en pico Siemens, pS) y  $E_x$  es el potencial de equilibrio electroquímico para el ión  $x$  (en mV), obtenido mediante la aplicación de la ecuación de Nernst en base a las concentraciones iónicas utilizadas en el experimento. En nuestras condiciones de registro ( $K^+$  simétrico)  $E_x$  es igual a 0 mV y por lo tanto la fuerza impulsora es igual al potencial aplicado a la membrana.

Una vez medidos los valores de corriente, construimos las curvas  $i$ - $V$  (que en general presentan una relación lineal), a partir de las cuales calculamos el valor de la conductancia de canal único  $\gamma_x$  como el valor de la pendiente de la recta ajustada por el método de cuadrados mínimos. En los casos donde la relación  $i$ - $V$  no se ajusta completamente a una relación lineal (debido a un proceso de rectificación), la conductancia se calcula entre los potenciales que muestran una relación lineal. Es importante remarcar que el valor de la conductancia puede variar según las concentraciones iónicas a los lados de la membrana.

La medida de los valores de amplitud de corriente utilizada para la construcción de la curva  $i$ - $V$  fue realizada de dos maneras diferentes según la condición de registro.

En la mayoría de los casos el salto discreto en el valor de la corriente iónica que atraviesa el *patch* ante la apertura de un canal está claramente definido y puede ser medido mediante la ubicación de 2 líneas horizontales en los niveles de corrientes correspondientes a los estados abierto y cerrado. Por otro lado, en los casos donde el estado abierto presenta cierres transitorios muy veloces, que se manifiestan como un aumento en el ruido de la corriente (en inglés *flicker*), la decisión de dónde ubicar el cursor correspondiente al estado abierto es difícil. Por lo tanto, en estos casos, para evitar arbitrariedad en la medida de la amplitud de corriente tomamos todos los puntos de una porción de registro determinada y construimos un histograma de amplitud de corriente, donde quedan claramente identificados 2 picos, uno correspondiente al estado cerrado y otro al estado abierto del canal. Luego, realizamos un ajuste no lineal de distribución gaussiana de dos componentes por el método de cuadrados mínimos Levenberg-Marquardt, que permite obtener el valor medio ( $\mu$ ) de los picos de amplitud de corriente correspondientes a los estados cerrado ( $\mu_c$ ) y abierto ( $\mu_o$ ) (o, del inglés, *open*) del canal. Con esos valores, calculamos el valor de la amplitud de la corriente ( $i$ ) a los distintos potenciales como resultado de la diferencia  $\mu_o - \mu_c$ . Ambas metodologías se esquematizan en la figura 2.3.1.



**Figura 2.3.1: Medida de la amplitud de la corriente de canal único.** A: Registro típico de corriente en la configuración de canal único. El valor de la amplitud de la corriente, surge de la medida del salto discreto de corriente X. B: Histograma de distribución de amplitud de corriente del registro presentado en A y su ajuste con una función de Gauss de 2 componentes. La amplitud de la corriente de canal único (X) se calcula como la diferencia entre los valores medios de amplitud de los picos correspondientes al estado cerrado ( $\mu_c$ ) y abierto ( $\mu_o$ ).

### 2.3.2 B: CÁLCULO DE LA DENSIDAD DE CANALES IÓNICOS.

Los valores de conductancia de canal único permiten distinguir la presencia de dos o más canales diferentes en un *patch* cuando los mismos presentan diferencias en los valores de la misma. De esta manera, es posible estimar el mínimo número de canales iónicos que presenta un *patch* como el número de conductancias de distinto valor observadas en el mismo. Posteriormente, se obtiene la densidad mínima de canales al referir dicho valor al número total de *patches* analizados (ver fórmula en la sección de resultados: 3.1).

Este simple cálculo permite obtener un valor estimativo de la densidad media de canales presentes en la membrana celular, sin embargo debe tenerse en cuenta que con el mismo pueden cometerse tanto sobreestimaciones, como subestimaciones. En nuestro caso en particular podemos destacar tres fuentes posibles de subestimaciones: en primer lugar, el protocolo experimental elegido consistió en el registro de las corrientes de canales en el estado estacionario para cada valor de voltaje, por lo tanto, los canales que presentasen inactivación temporal rápida o que no se presentan aperturas en las condiciones de registro no fueron observados. En segundo lugar, se debe tener en cuenta la posibilidad de que exista más de un canal con valor similar de conductancia en el *patch*, hecho que puede deberse a la presencia de dos o más copias de un mismo canal (de baja  $P_o$ ) o a la presencia de más de un canal diferente con similar valor de amplitud. Este problema puede resolverse generando la máxima activación del canal con algún estimulante de su actividad, donde se ponga en evidencia el número de copias totales. Esta solución no pudo aplicarse en nuestro caso dado que implicaría conocer la identidad de todos los canales, como también poseer un activador disponible para cada uno. Por este motivo, tomamos como criterio siempre considerar un solo canal por valor de conductancia hallado, aceptando la posible subestimación. En último lugar, existe una serie de canales iónicos de muy baja conductancia unitaria cuya resolución supera la capacidad del equipo. El estudio de estos canales puede realizarse mediante su expresión en sistemas heterólogos, donde sus características pueden estimarse por medio del análisis de ruido, pero para ello se requiere la presencia de un solo tipo de canal iónico.

Por otro lado, en nuestras condiciones de registro de canal único, no es posible diferenciar un canal selectivo al ion  $K^+$  de uno selectivo al  $Cl^-$  o de un canal catiónico no selectivo que presenta al  $K^+$  como único ion permeante. De esta manera, el suponer que todas las corrientes observadas se deben a canales de  $K^+$ , implica un riesgo de sobreestimación de la densidad de canales de esa naturaleza. Sin embargo, pensamos que la sobreestimación en este caso es mínima porque en experimentos donde se cambió el gradiente de  $Cl^-$  no se observaron modificaciones en las relaciones i-V de los distintos tipos de canales que se observan en el *patch* (ver fundamentos en el punto 2.3.2 C).

### 2.3.2 C: ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD IÓNICA.

La permeabilidad iónica a nivel de canal único puede ser calculada a partir del corrimiento del valor de potencial donde la corriente se hace nula (potencial de reversión ( $E_{rev}$ )), de la curva i-V en condiciones biiónicas, donde se sustituye al ión  $K^+$  por otro ión  $X^+$  a ser ensayado [134,135], de manera de obtener la permeabilidad relativa del  $X^+$  respecto al  $K^+$  en condiciones de ausencia de corriente neta. La relación entre el valor de permeabilidad relativa y el corrimiento en el  $E_{rev}$  se obtiene a partir de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz [136,137]:

$$V_x - V_k = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_k K_o}{P_x X_i} - \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{K_o}{K_i}$$

Donde  $V_x$  y  $V_k$  son los  $E_{rev}$  con  $X^+$  y  $K^+$  en la cara intracelular de la membrana manteniendo constante la concentración de  $K^+$  en la solución en contacto con la cara externa de la membrana;  $P_x$  y  $P_k$  son las permeabilidades del canal a  $X^+$  y  $K^+$  respectivamente;  $K_o$ ,  $K_i$  y  $X_i$  son las concentraciones de los iones indicados en la cara extracelular (o) y en la cara intracelular (i); y  $F/RT = 0,0394 \text{ mV}^{-1}$  a  $22^\circ\text{C}$ . La relación de permeabilidad de  $X^+$  respecto a  $K^+$  se obtiene reordenando la ecuación anterior:

$$\frac{P_x}{P_k} = \frac{K_o}{X_i} \cdot e^{\left[\frac{(V_k - V_x)F}{RT}\right]}$$

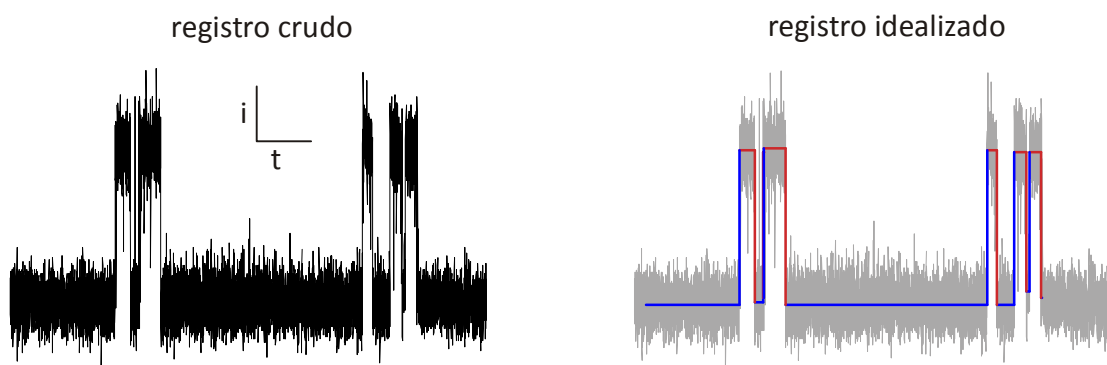
En nuestro caso, estudiamos la permeabilidad relativa de los iones  $Cs^+$  y colina (iones  $X^+$ ) respecto al  $K^+$ . Los datos para determinar el potencial de reversión fueron

obtenidos a partir de curvas i-V, las cuales se apartaron de la linealidad para los iones ensayados. En los experimentos donde el potencial de reversión no fue observado en el rango de potenciales expuestos, el mismo es indicado como superior al respectivo al mayor potencial expuesto.

### 2.3.2 D: ANÁLISIS DE ESTADO ESTACIONARIO: IDEALIZACIÓN DE REGISTROS POR EL CRITERIO DEL 50% DE LA AMPLITUD COMO VALOR UMBRAL.

La creación de registros idealizados a partir de los registros de canal único constituye un herramienta poderosa de análisis, dado que permite obtener los valores de amplitud y de tiempo de permanencia (en inglés, *dwelt time*) de cada evento de apertura o cierre de los canales presentes en el registro de corrientes, a partir de los cuales se pueden desarrollar numerosos estudios de las propiedades de la actividad de un canal único.

Básicamente, la construcción de un registro idealizado consiste en transformar un registro de canal único en una serie de líneas rectas que representan los estados cerrado y abierto del canal. Dicho proceso se sintetiza en la figura 2.3.2. En la misma podemos observar un registro crudo de canal único donde se observan aperturas de un canal iónico en el panel de la izquierda, mientras que a la derecha se esquematiza superpuesto el registro idealizado.



**Figura 2.3.2:** Esquema de la idealización de registros de canal único. Corriente típica de canal único (panel de la izquierda) y el esquema de su registro idealizado (a la derecha). Las líneas azules y rojas representan la idealización del estado cerrado y abierto respectivamente.



Para realizar el registro idealizado se debe indicar (por medio de un cursor) el nivel de corriente correspondiente al estado cerrado y con otro cursor el correspondiente al estado abierto del canal, estableciéndose de esta manera dos estados posibles: nivel 0 (cerrado) y nivel 1 (abierto). Antes de avanzar se debe aclarar que un “evento” comienza cuando el valor de la corriente pasa del nivel 0 al 1 para una apertura del canal (o del 1 al 0 para un cierre), y finaliza cuando la corriente vuelve a pasar del 1 al 0 en el caso de la apertura (o del 0 al 1 para el caso del cierre). Teniendo en cuenta que hay valores de corrientes entre los niveles 0 y 1, se utiliza como valor umbral para considerar un cambio de estado (del abierto al cerrado o viceversa) al valor del 50% de la amplitud entre los niveles 0 y 1. Esto último se denomina: criterio del 50% de la amplitud de corriente como valor umbral (en inglés *half-amplitude threshold criterion*). Una vez establecido los parámetros de inicio, el programa comienza a clasificar (automática o manualmente) los eventos dentro de cada uno de los niveles; para ello realiza un barrido de la corriente detectando los distintos eventos del registro y pasando a una planilla de hoja de cálculo los siguiente datos para cada evento detectado:

- Nivel (1 o 0)
- Tiempo de inicio del evento (en el registro)
- Tiempo de fin del evento (en el registro)
- Amplitud media (valor medio de corriente de todos los puntos que están dentro del evento)  $\pm$  desviación estándar.
- Tiempo de permanencia (*dwell time*) calculado como la diferencia entre el tiempo de inicio y el tiempo de fin de evento.

De esta manera se obtiene un listado de datos que describe completamente al registro de canal único, cuya utilización detallaremos a continuación. Cabe aclarar que dicha idealización puede realizarse con hasta 5 niveles de corrientes (además del correspondiente al estado cerrado), de manera que permite trabajar con registros con más de un canal o con más de una copia del mismo.

Como última generalización de este punto, debemos mencionar que en el análisis de nuestros registros fueron ignorados los eventos con una duración menor a 0,5 ms para evitar la detección como falsos eventos de ruido eléctrico del registro o de

cierres veloces e incompletos dentro de las aperturas de los canales. Por otro lado, en los casos en que fue utilizada la idealización automática, posteriormente se verifico que la misma coincidiera con el registro crudo [138].

### 2.3.2 E: ANÁLISIS DE ESTADO ESTACIONARIO: CÁLCULO DE LA PROBABILIDAD DE APERTURA.

La actividad de un canal iónico es un fenómeno estocástico por lo que la misma se cuantifica en términos de probabilidad de apertura ( $P_o$ ) del canal, que puede ser modificada por numerosos factores como el potencial de membrana, sustancias químicas, interacción proteína-proteína, entre tantos otros.

La  $P_o$  se define como la relación del tiempo que un canal pasa en el estado abierto dividido por el tiempo total (tiempo en el estado abierto más tiempo en el estado cerrado). En la mayoría de los experimentos la probabilidad de apertura se estima con el parámetro  $NP_o$ , donde  $N$  es el número total de canales (de igual valor de amplitud) presentes en el *patch*, y  $P_o$  es la probabilidad de apertura individual del canal. Para calcular este parámetro se idealizaron, registros de corriente de canal único de una duración de al menos 30 segundos según el criterio de 50% de la amplitud de corriente como valor umbral y a partir de ellos se obtuvo el valor de  $NP_o$ , según la siguiente fórmula:

$$NP_o = \frac{\sum_{j=1}^n j t_j}{T}$$

donde  $T$  es la duración del registro,  $t_j$  es el tiempo de permanencia con  $j=1, 2, 3...n$  canales abiertos. Este valor debe ser calculado una vez que la  $P_o$  del canal alcanzó el estado estacionario. Para confirmar este requisito se generaron gráficos de estabilidad de  $NP_o$  en los cuales se representan los valores de  $NP_o$  calculados en intervalos de 5 segundos en función del tiempo del registro de canal único. A partir de los mismos podemos confirmar que la actividad del canal no está variando en el tiempo de registro (en condiciones control), como también detectar a partir de qué punto se llega a un nuevo estado estacionario al someter al canal a un estímulo o una inhibición.

### 2.3.2 F: ANÁLISIS DE ESTADO ESTACIONARIO: CAMBIOS Y DISTRIBUCIONES DE LOS TIEMPOS DE PERMANENCIA.

El tiempo de permanencia del canal en el estado abierto o en el cerrado es un fenómeno estocástico descriptivo del comportamiento de un canal iónico que indica el tiempo que el canal permanece en el estado abierto (o cerrado), una vez que el mismo se abre (o se cierra). Permite describir si la actividad de un canal se manifiesta como pocas aperturas pero de larga duración, o muchas de duración menor. A su vez, permite explicar los aumentos en la  $P_o$  como acortamientos de los tiempos de permanencia en los estados cerrados o como alargamientos en los tiempos de apertura, o como una combinación de ambos fenómenos. Puede caracterizarse a partir de dos tipos de análisis: el tiempo de permanencia medio (en inglés, *mean open (or closed) time*) y la distribución de tiempos de permanencia.

Como su nombre lo indica, el análisis del tiempo medio de permanencia en el estado abierto, consiste en realizar el promedio de los valores de tiempo de permanencia de todas las aperturas del canal detectadas en el registro idealizado. Lo mismo puede realizarse para el canal en el estado cerrado.

Este análisis puede realizarse únicamente en los *patches* donde se presenta una única copia del canal en cuestión, dado que en caso contrario llevaría a una subestimación de los tiempos de permanencia correspondientes al estado cerrado del canal. Por otro lado, como el título de este apartado lo indica, esta es una característica de estado estacionario y por lo tanto, antes de obtener el valor medio debe confirmarse que el canal se encuentra en el mismo. Nuevamente, el control necesario puede realizarse a partir de un gráfico de estabilidad, para asegurar que el tiempo medio de permanencia no está variando a lo largo del registro. En este caso, el mismo se construye a partir de los datos obtenidos a partir del registro idealizado, tomando únicamente los datos obtenidos para el estado que se desea analizar. Se grafican los valores de tiempo de permanencia de cada evento en función del tiempo de inicio del evento, obteniéndose un diagrama de dispersión que permite analizar si el parámetro está estable o si se está modificando en el tiempo.

Por su parte, las distribuciones de tiempo de permanencia de los estados abierto y cerrado se logran generando un histograma donde los intervalos de clase (o

cajones, en inglés, *bin*) representan el logaritmo decimal del tiempo de permanencia en el estado abierto o cerrado según corresponda. Dichos valores se obtienen a partir del registro idealizado y los controles del registro son los mismos que los recién mencionados para el tiempo de permanencia medio [139].

El análisis de las distribuciones de tiempo de permanencia permite obtener el número de diferentes estados abiertos y cerrados que presenta el canal en las condiciones analizadas, como así también la constante de *dwell time* ( $\tau$ ) de cada uno de esos estados y su contribución a los estados abierto y cerrado. Estos parámetros surgen del ajuste de la distribución con una función de Gauss con el mínimo número de componentes con los que se logre la mejor correlación entre la distribución y el ajuste (en inglés, *maximal likelihood ratio test*). Dicho análisis indica que el canal presenta, en las condiciones analizadas, tantos estados abiertos o cerrados (según la distribución que se esté analizando) como componentes presente el ajuste. Además, cada componente representa y caracteriza cada uno de estos estados, dado que su media ( $\mu$ ) es el logaritmo de la constante de *dwell time*, y el área bajo la curva representa la frecuencia (normalizada en 1) con la que el canal se presenta en dicho estado, sobre el total de las veces que se abre o se cierra. Por su parte, la constante de *dwell time* es indicativa del tiempo que el canal permanece cerrado o abierto cuando se presenta en dicho estado. De esta manera, por ejemplo, una distribución de estado abierto con 2 componentes indica que el canal puede abrirse en dos estados diferentes y según en cuál de ambos se encuentre permanecerá más o menos tiempo abierto, observándose mayores tiempos de abierto en el estado cuya constante de *dwell time* presente un valor mayor [139].

### 2.3.2 G: ANÁLISIS DEL EFECTO DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE LA BUPIVACAÍNA SOBRE EL CANAL BK<sub>Ca</sub>.

Como se presentará en el capítulo anexo de los resultados, la bupivacaína genera sobre el canal BK<sub>Ca</sub> una disminución en la amplitud de la corriente unitaria e induce un comportamiento *flickery* (muchos cierres excesivamente veloces para el tiempo de muestreo) en el estado abierto del canal. Para cuantificar ambos efectos en

las diversas concentraciones de bupivacaína ensayadas a los distintos potenciales de membrana, realizamos histogramas de distribución de amplitud tomando una porción de registro de canal único de 250 ms, donde el canal permaneciera el 50% del tiempo en el estado abierto. Luego, realizamos un ajuste no lineal con un función de Gauss de dos componentes por el método de cuadrados mínimos Levenberg-Marquardt, que permitió obtener el valor medio ( $\mu$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ) de los picos de amplitud de corriente correspondientes a los estados cerrado y abierto. De esta manera, el valor de la amplitud de la corriente unitaria a distintos potenciales y, en ausencia y en presencia de las diferentes concentraciones de bupivacaína ensayadas, fue calculado como la diferencia entre los valores medios de los estados abierto y cerrado ( $\mu = \mu_o - \mu_c$ ), mientras que el efecto *flickery* inducido en el estado abierto del canal fue cuantificado con el valor de la desviación estándar del pico de corriente del histograma correspondiente al estado abierto del canal ( $\sigma_o$ ).

Para asegurar que se había alcanzado el máximo efecto de la droga en cada concentración y evitar subestimaciones del mismo, realizamos un gráfico de estabilidad del valor de la amplitud de la corriente de canal único. Al igual que con el tiempo de permanencia se requiere la idealización del registro siguiendo el criterio del 50% de la amplitud de corriente como valor umbral (corrigiendo en este caso el cursor del nivel correspondiente al estado abierto a medida que la droga hacía su efecto). Luego se tomaron únicamente los eventos correspondientes al estado abierto y se graficaron los valores medios de amplitud de corriente de cada evento en función del tiempo de inicio del evento, obteniéndose también en este caso, un diagrama de dispersión que permite analizar a partir de qué momento el efecto de la droga llegó a su máximo. Se puede observar el mismo en el capítulo de resultados, en la figura 3.A.6.

### 2.3.3- SOLUCIONES UTILIZADAS EN LOS REGISTROS DE CANAL ÚNICO.

Se utilizaron esencialmente dos soluciones estándares para los registros de canal único:

- Solución de la pipeta (SP) en mM: KCl 140; MgCl<sub>2</sub> 0,5; HEPES 10; Glucosa 6; CaCl<sub>2</sub> 1; llevada a pH 7,4 con KOH

- Solución del baño (SB) en mM: KCl 140; MgCl<sub>2</sub> 0,5; HEPES 10; Glucosa 6; EGTA 1; llevada a pH 7,4 con KOH.

Con el objetivo de estudiar los efectos de 4-aminopiridina 5 mM (4-AP), se agregó esta droga a la SP modificando la misma a:

- Solución de la pipeta con 4-AP: KCl 140; MgCl<sub>2</sub> 0,5; HEPES 10; Glucosa 6; CaCl<sub>2</sub> 1, 4-AP 5; llevada a pH 7,4 con HCl.

Para evaluar la sensibilidad del canal BK<sub>Ca</sub> a la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, se agregó a la SB diferentes cantidades de CaCl<sub>2</sub> desde una solución madre acuosa para obtener las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> libre ensayadas, siguiendo el cálculo realizado con el programa: *Maxchelator software* de *Stanford University*: <http://maxchelator.stanford.edu>.

Con el objetivo de estudiar la selectividad iónica del canal BK<sub>Ca</sub>, se modificó la SB, reemplazando completamente el KCl 140 mM por CsCl 140 mM o cloruro de colina 140 mM. Además, en estos casos la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre fue de 1,2 μM, para poder observar el canal a todos los valores de potenciales.

Los efectos de la paxilina 500 nM, el ácido litocólico 150 μM, la bupivacaína 30, 100, 300 y 1000 μM, y el ácido araquidónico 10 μM, se ensayaron agregando las mismas a la SB desde una solución madre concentrada (dilución 1:1000). La bupivacaína fue disuelta en agua bi-destilada, la paxilina en dimetilsulfoxido (DMSO), mientras que el ácido litocólico y el ácido araquidónico en una mezcla etanol-DMSO (2,4:7,6). En los casos donde fue necesario, el solvente se agregó en las condiciones control en la misma dilución de 1:1000.

La sensibilidad a la acidificación del medio intracelular del canal BK<sub>Ca</sub>, fue probada a partir de una SB cuyo pH final fue llevado a 6 con KOH.

La 4-AP, la paxilina, el ácido araquidónico, el ácido litocólico, la bupivacaína, el DMSO, el etanol, el HEPES y el EGTA y la colagenasa tipo I fueron adquiridas en Sigma-Aldrich Co. Las otras sales fueron de calidad analítica provenientes de proveedores locales.

#### 2.3.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS REGISTROS DE CANAL ÚNICO.

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la misma. Se realizaron test de t de Student para comparar entre 2 grupos, mientras que la comparación entre múltiples grupos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Holm-Sidack. Para estudiar si la disminución en la frecuencia de aparición de cada uno de los grupos de canales se debía a la presencia de 4-AP se realizaron las tablas de contingencia correspondientes (no mostradas) y se analizaron por el test no paramétrico de chi cuadrado. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en los casos que el valor de p fue menor a 0,05.

## 2.4- REGISTROS Y METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES MACROSCÓPICAS MEDIDAS EN LA CONFIGURACIÓN DE CÉLULA COMPLETA O *WHOLE CELL (WC)*.

### 2.4.1- REGISTROS EN LA CONFIGURACIÓN DE CÉLULA COMPLETA:

Como mencionamos en la sección 2.2 de este capítulo, la configuración de célula completa (WC) permite registrar las corrientes que atraviesan la membrana a través de todos los canales presentes, en respuesta a un pulso de voltaje (modo *voltage-clamp*).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se aplicaron protocolos de voltaje en forma de un pulso rectangular, que consisten en un cambio discreto instantáneo del valor de potencial desde un valor determinado (potencial de mantenimiento) a otro valor de potencial que se mantiene durante un tiempo y luego retorna en forma instantánea al valor inicial (figura 2.4.1).



**Figura 2.4.1: Esquema de protocolo de un pulso de voltaje.**

### 2.4.2- ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE CÉLULA COMPLETA.

Las corrientes macroscópicas en condiciones control y luego del agregado de las distintas drogas probadas fueron analizadas a partir de las relaciones corriente voltaje (I-V). Para construir estas curvas, la corriente macroscópica fue evocada por un protocolo de pulsos de voltaje de 500 ms de duración en el rango de -70 a +60 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -50 mV. El valor de la corriente fue medido a los 400 ms desde el inicio del pulso, momento en el cual la corriente alcanzó el estado estacionario. A partir de estos experimentos se estimó además el valor del potencial de membrana en el reposo, como el valor en que la corriente macroscópica se hace nula.



La corriente fue monitoreada a través de un único pulso de voltaje desde un potencial de mantenimiento de -50 mV hasta un potencial de +40 mV durante el todo el experimento con el fin de registrar los cambios temporales de la misma en cada condición ensayada. Una vez alcanzado el efecto máximo se realizó el protocolo de curvas I-V antes descripto.

#### 2.4.3- SOLUCIONES UTILIZADAS EN LOS REGISTROS DE CÉLULAS COMPLETA.

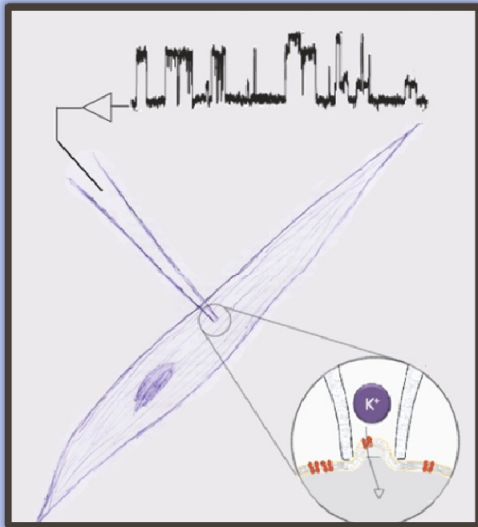
Se utilizaron tres soluciones estándares para los registros de célula completa:

- Solución intracelular de la pipeta (SI) en mM: KCl 130; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; EGTA 0,1; CaCl<sub>2</sub> 0,1; Na<sub>2</sub>ATP 5; llevada a pH 7,3 con KOH
- Solución extracelular del baño (SE) **4-AP 5mM** en mM: NaCl 130; KCl 5,4; MgCl<sub>2</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,5; HEPES 5; Glucosa 6; 4-AP 5; llevada a pH 7,4 con HCl.
- Solución extracelular del baño (SE) **Paxilina 500 nM** en mM: NaCl 130; KCl 5,4; MgCl<sub>2</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,5; HEPES 5; Glucosa 6; Paxilina 500 nM; llevada a pH 7,4 con NaOH.

Los efectos de la bupivacaína 300 µM y del ácido araquidónico 10 µM se ensayaron agregando las mismas a la SE correspondiente, desde una solución madre concentrada (dilución 1:1000). La bupivacaína fue disuelta en agua bi-distilada y el ácido araquidónico en una mezcla etanol-DMSO (2,4:7,6). En los casos donde fue necesario, el solvente se agregó en las condiciones control en la misma dilución de 1:1000.

#### 2.4.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS REGISTROS DE CÉLULA COMPLETA.

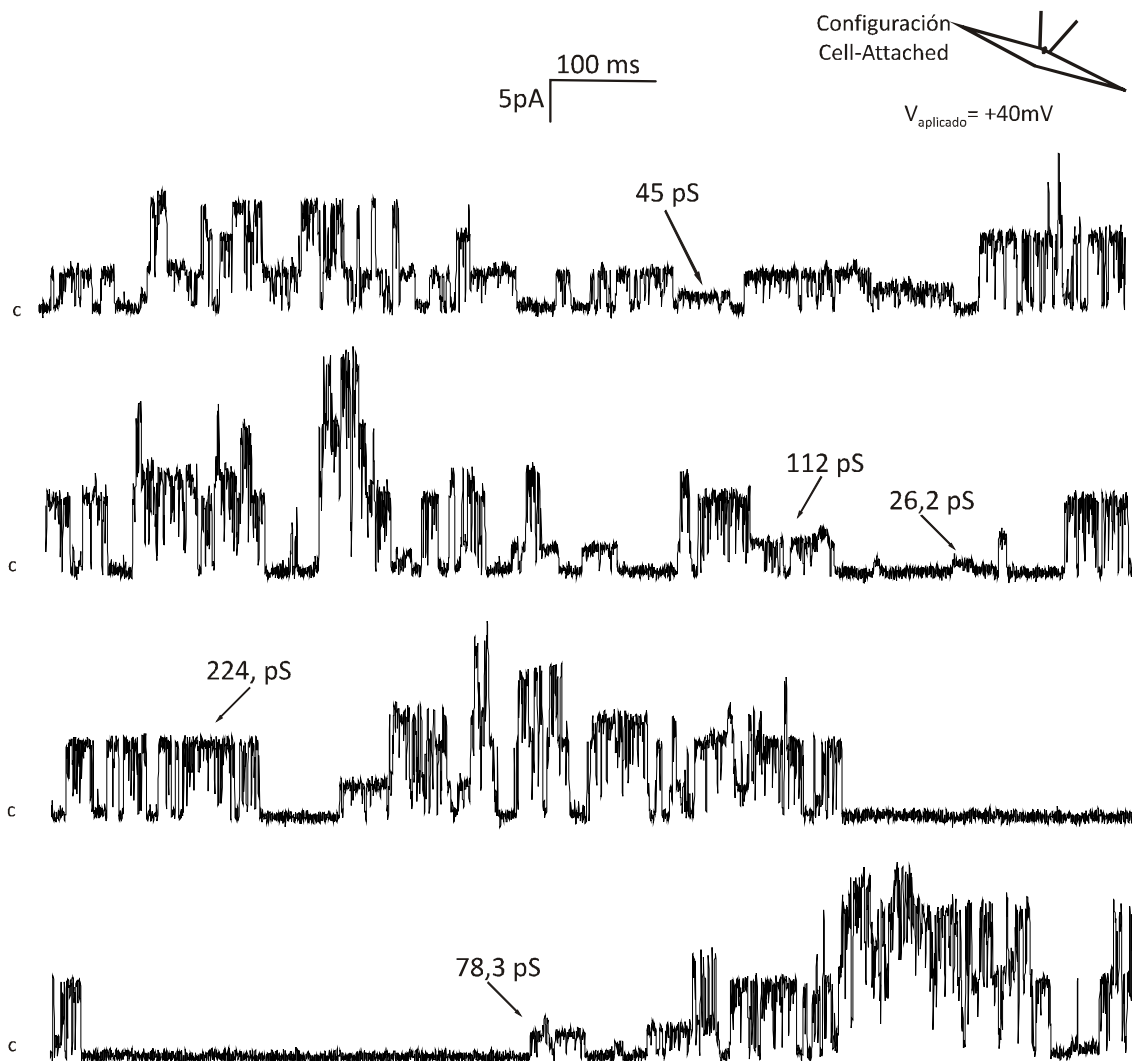
Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la misma. Se realizaron test de t Student para comparar entre 2 grupos, mientras que la comparación entre múltiples grupos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA seguido de un test de Holm-Sidack. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en los casos en que el valor de p fue menor a 0,05.



1. Introducción y objetivos
  2. Materiales y métodos
  - 3. Resultados**
  4. Discusión y conclusiones
  5. Bibliografía
-

### 3.1: IDENTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE CORRIENTES DE K<sup>+</sup> A NIVEL DE CANAL ÚNICO EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO (CML) DE LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH).

Como primera etapa de este trabajo de tesis, utilizando la técnica de *patch-clamp*, caracterizamos los distintos tipos de corrientes iónicas que presentan las CML de la AUH en configuración de canal único. Para ello trabajamos con las células aisladas obtenidas mediante un proceso de disociación enzimática con colagenasa y registrando sus corrientes en condiciones de K<sup>+</sup> simétricas. Registramos la corriente a través de los canales iónicos presentes en la porción de membrana sellada (en inglés, *patch*) a distintos valores de potencial desde -100 mV hasta +60 mV, los cuales se mantienen fijos durante 30-60 segundos. Observamos que, para cada valor de potencial, se distinguen corrientes de canal único de diferentes amplitudes, las cuales sugieren la presencia de más de un tipo de canal iónico por *patch*. Estos protocolos nos permitieron construir curvas de amplitud de corriente (*i*) versus voltaje (V), (*i*-V), para todos los canales presentes en estas condiciones en cada uno de los *patches*. A partir de estas relaciones obtuvimos los valores de conductancia iónica ( $\gamma$ ) como el valor de la pendiente del ajuste lineal a las mismas. A modo de ejemplo, en la figura 3.1.1 se presenta un registro típico de un *patch* que presenta 5 valores diferentes de amplitud de corriente y sus correspondientes valores de conductancia. Los registros de corriente se realizaron, en los casos en que fue posible, primero en la configuración de *Cell-Attached* (CA), e inmediatamente después en la de *Inside-Out* (IO). En la primera configuración, se mantiene la integridad celular, por lo tanto la solución de la pipeta como la de perfusión del baño, se ponen en contacto con la cara extracelular de la membrana, mientras que el medio intracelular se mantiene sin mayores modificaciones. En cambio, en la configuración de IO se escinde la porción de la membrana sellada del resto celular, quedando, de esta manera, la solución del baño en contacto directo con la cara intracelular de la membrana. (Los detalles metodológicos de cada configuración se expusieron con mayor profundidad en el capítulo 2: Metodología, sección 2.2)



**Figura 3.1.1:** Registro típico de un *patch* con múltiples canales en las CML de la AUH en configuración de CA obtenido a un potencial de membrana de +40 mV, en condiciones de  $K^+$  simétrico. Se indican los valores de conductancia de canal único de los 5 canales presentes en el *patch*, calculados a partir del valor de la pendiente de sus respectivas curvas i-V. c indica el nivel de corriente correspondiente al estado cerrado de todos los canales.

En esta serie experimental utilizamos arterias umbilicales humanas (AUH) provenientes de 26 cordones y registramos las corrientes en un total de 85 células, de las cuales sólo en 9 células ensayadas no observamos actividad de canales iónicos (sin canales). En la tabla 3.1.1 se presenta el número de experimentos realizados en cada configuración:

Configuración	Nº de Células	Configuración	Nº de Células
CA → IO	53	Total CA	73
Solo IO	12	Total IO	65
solo CA	20		
Total	85		

**Tabla 3.1.1: Número de experimentos de canal único realizados en las CML de la AUH agrupados según configuración. CA → IO indica que la misma célula fue registrada en condición de CA y**

posteriormente en la configuración de IO.

La mayoría de los registros de corriente obtenidos sugieren actividad de uno o más canales en simultáneo, ya que fue posible observar distintos niveles de amplitud de corriente en un solo *patch* (de 1 a 6 niveles como máximo). En la tabla 3.1.2 se observa la distribución porcentual del número de canales por *patch* propuesta en base al número de valores diferentes de amplitud de corriente observados en los mismos:

Número de canales	% del total de <i>patches</i>
Sin canales	12 %
1 canal	31 %
2 canales	27 %
3 o más canales	30 %

**Tabla 3.1.2: Distribución de *patches* en base al número de canales diferentes.**

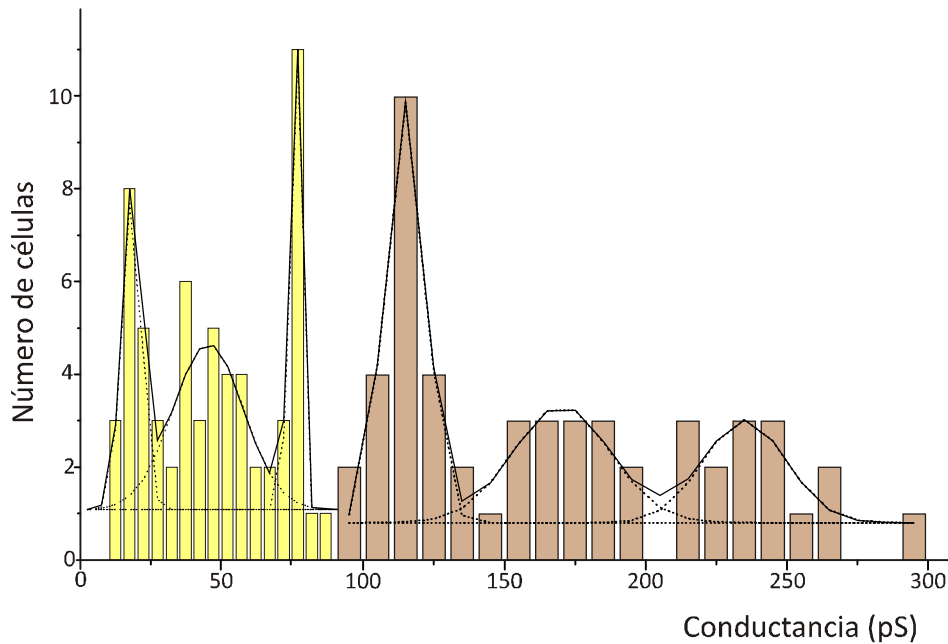
En base a estos datos podemos estimar la mínima densidad media de canales diferentes por *patch* realizando el siguiente cálculo:

$$\text{mínima densidad de canales} = \frac{n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + \dots + n_j \times j}{n_0 + n_1 + n_2 + \dots + n_j}$$

Donde  $n_0$  es el número de *patches* donde no se observaron corrientes, mientras que  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_j$  son el número de *patches* donde se observaron 1, 2 o  $j$  niveles diferentes de amplitud de corriente respectivamente. En estas condiciones estimamos una densidad de 2,06 canales diferentes/*patch*. Cabe aclarar que en esta etapa del estudio experimental no podemos distinguir la selectividad iónica de cada uno de los canales. En nuestras condiciones experimentales las corrientes que medimos podrían ser mediadas por canales selectivos al  $K^+$  o selectivos al  $Cl^-$  o por un canal catiónico no selectivo (CCNS) permeable al ión  $K^+$ , por ser éste el único catión presente en las soluciones capaz de transportar la corriente a través del mismo.

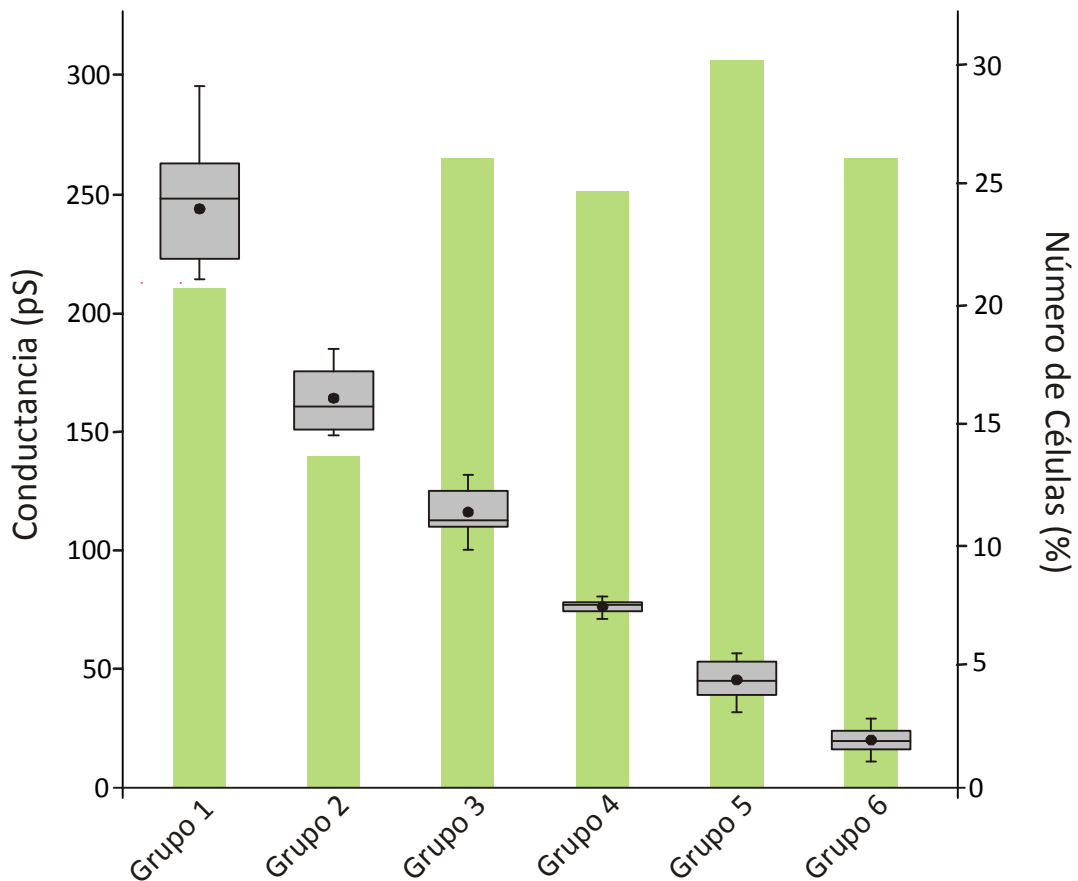
Con el fin de analizar la diversidad de canales presentes en este tipo celular, realizamos una clasificación en base a los valores de conductancia de canal único obtenidos a partir de las curvas i-V. Como criterio para realizar la clasificación, analizamos la distribución de los valores de conductancia de canal único en condición de CA a partir de un histograma de distribución de los mismos, que se presenta en la figura 3.1.2. Podemos observar una importante variedad de valores de conductancia entre 10 pS (mínimo valor capaz de ser medido en base al ruido del equipo y a los potenciales analizados) y 292,6 pS (máximo valor de conductancia hallado). Como se puede observar en la figura, para lograr una correcta definición de la distribución de las mismas en base al número de conductancias observadas y su respectiva dispersión, dividimos el histograma en dos porciones (de 10 a 90 pS y de 90 a 300 pS), utilizando en cada rango distintos intervalos de clase o ancho de cajón (en inglés, *bin*). A partir del histograma podemos identificar los rangos donde se observan valores similares de conductancia, que permite suponer la presencia de, al menos, un canal con alta frecuencia de aparición y con valores de conductancia homogéneos que se ajustan a una distribución normal. En base a esta última característica, fue posible ajustar la distribución de conductancias obtenida con una función de Gauss de 6 componentes, definiendo así los siguientes los rangos de valores de conductancia en los cuales agrupar en primera instancia los comportamientos de los canales observados:

- Grupo 1: Canales de alta conductancia ( $\gamma > 200$  pS).
- Grupo 2: Canales de conductancia intermedia alta (de 130 a 200 pS).
- Grupo 3: Canales de conductancia intermedia entre 85 y 130 pS.
- Grupo 4: Canales de conductancia intermedia entre 65 y 85 pS.
- Grupo 5: Canales de conductancia intermedia baja (entre 30 y 65 pS)
- Grupo 6: Canales de conductancia baja ( $\gamma < 30$  pS).



**Figura 3.1.2:** Histograma de distribución de los valores de conductancias de canal único de las CML de la AUH en condición de CA. Construido a partir de los valores de conductancia (pendiente de las relaciones i-V) para cada canal presente en todas las células analizadas. La línea sólida indica el ajuste de la distribución con una función de Gauss de seis componentes, cada uno de los cuales, esquematizados con líneas punteadas. Los anchos del cajón fueron de 5 y 10 pA para los rangos de 10 a 90 y de 90 a 300 pS, respectivamente.

Una vez establecidos los 6 grupos de valores de conductancia, analizamos sus frecuencias de aparición en la configuración de CA (como el porcentaje de *patches* en los que se observa cada grupo de conductancia), sus valores medios de conductancia y la dispersión de valores de la misma. En la figura 3.1.3 presentamos en un mismo gráfico los valores de frecuencia de aparición de cada grupo de conductancias (barras) y un diagrama de cajas para los valores de conductancia de cada grupo, donde puede observarse el valor medio (punto) y la mediana de las mismas (línea divisora interna de la caja), como también, el rango de valores de conductancia limitados por los percentiles 25 y 75 (caja) y por los percentiles 5 y 95 (líneas).



**Figura 3.1.3:** Frecuencia de aparición, valores medios, medianas y dispersión de los valores de conductancias de los seis grupos presentes en las CML de la AUH en configuración de CA.

Gráfico de barras: porcentaje de aparición de canales con la conductancia respectiva a cada grupo respecto del total de células registradas en la condición de CA. Gráfico de cajas: valor medio (punto), mediana (línea divisora de la caja) y rango de valores entre los percentiles 25 y 75 (caja) y los percentiles 5 y 95 (líneas) de las conductancias incluidas en cada grupo. Número total de células = 73.

A partir de los valores de frecuencia de aparición podemos observar que fueron más frecuentes los canales de conductancia por debajo de 90 pS.

Antes de profundizar el análisis dentro de cada grupo en particular, presentamos en forma comparativa, en la tabla 3.1.3, los valores de conductancia media con sus respectivos errores y las frecuencias de aparición en las dos configuraciones de registro, CA e IO, para los 6 grupos de conductancias. Se incluyeron en la tabla los datos de CA ya presentados con el fin de facilitar la comparación con la condición de IO.



	Rango de conductancia	Conductancia en CA (pS)*	% de aparición en CA	Conductancia en IO (pS)*	% de aparición en IO
Grupo 1	> 200 pS	241,0 ± 6,8	20,5 %	250,4 ± 6,7	23,1 %
Grupo 2	130 – 200 pS	164,1 ± 4,3	13,7 %	164,8 ± 3,7	9,2 %
Grupo 3	85 – 130 pS	116,2 ± 2,1	26,0 %	128,3 ± 5,1	13,8 %
Grupo 4	65 – 85 pS	76,3 ± 1,2	24,7 %	76,1 ± 2,1	15,4 %
Grupo 5	30 – 65 pS	45,4 ± 1,6	30,1 %	44,8 ± 1,8	24,6 %
Grupo 6	10 – 30 pS	20,1 ± 1,1	26,0 %	22,0 ± 1,5	21,5 %

**Tabla 3.1.3: Conductancias media y frecuencia de aparición de cada grupo de canales registrados en las CML de la AUH, en configuración de CA e IO. \* media ± error estándar**

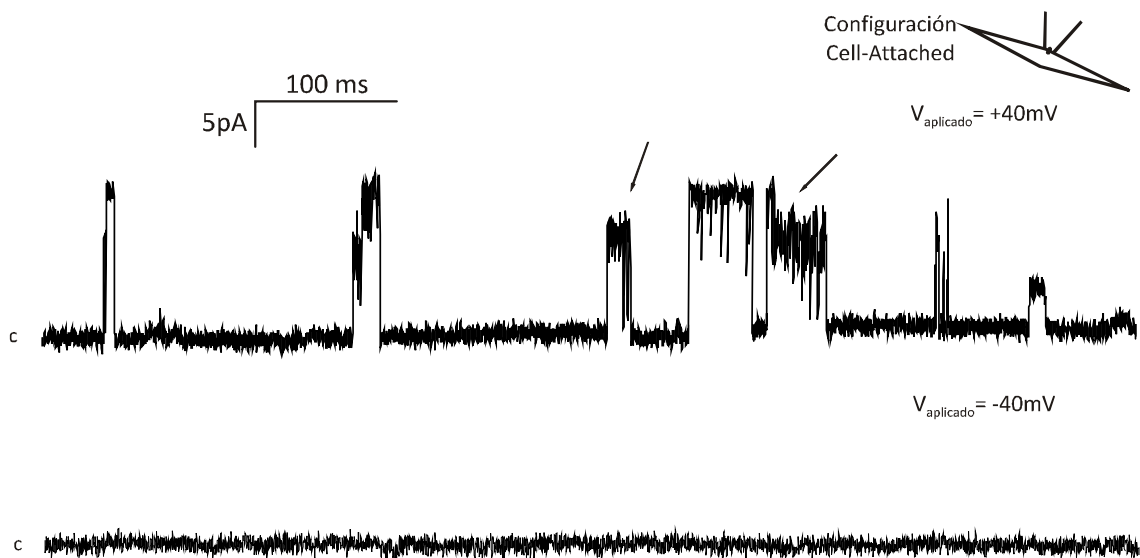
Como se puede observar en la tabla, no hay variaciones significativas de los valores de conductancia de los canales iónicos entre las dos condiciones de registro, pero sí se observa una clara disminución en la frecuencia de aparición en la mayoría de los canales. Por otro lado, cabe destacar que la suma de todos los porcentajes de frecuencia de aparición es superior al 100%, lo cual se debe a la aparición de más un canal por célula analizada.

En base al análisis de la distribución de conductancias que realizamos, describiremos a continuación las características de los 6 grupos de canales encontrados:

**Grupo 1: Canales de alta conductancia ( $\gamma > 200$  pS):** El valor medio de la conductancia hallado en CA ( $241,0 \pm 6,8$  pS), similar al de la configuración de IO ( $250,4 \pm 6,7$  pS), es indicativo del canal de  $K^+$  de alta conductancia sensible al  $Ca^{2+}$  y al voltaje ( $BK_{Ca}$ ) ya que no hay muchos canales iónicos que presenten valores tan altos de conductancia iónica. En todas las células ensayadas el canal presentó una curva i-V lineal, un aumento de la probabilidad de apertura al despolarizar la membrana y una caída de la misma al pasar de la configuración de CA a IO. Estos 3 datos (conductancia unitaria, dependencia del voltaje y caída de la NPo al escindir el *patch*) coinciden con la identificación del canal  $BK_{Ca}$  realizada por nuestro grupo, en este tipo celular, en un trabajo precedente [132]. En este trabajo de tesis, se realizó una exhaustiva caracterización de sus propiedades

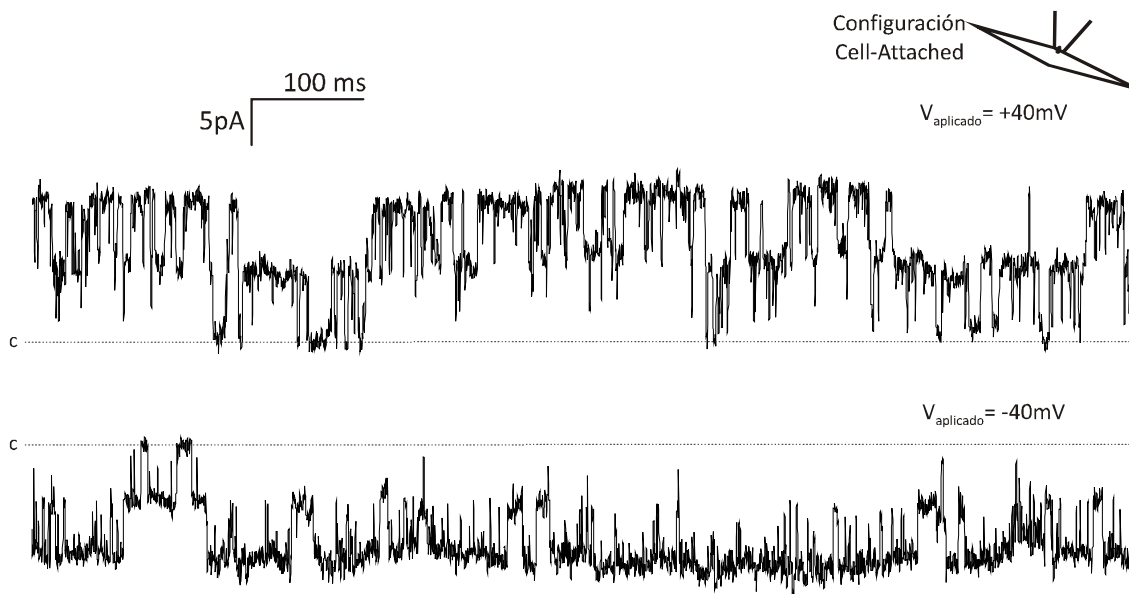
biofísicas, las cuales presentaremos en la sección 3 éste capítulo de resultados de esta tesis. Esto nos permite proponer que el canal de alta conductancia es efectivamente el canal BK<sub>Ca</sub>, del cual pueden observarse algunas aperturas en el registro de la figura 3.1.1.

**Grupo 2: Canales de conductancia intermedia alta (de 130 a 200 pS):** En este grupo (el menos frecuente) agrupamos a una serie de conductancias de las cuales no fue posible obtener un comportamiento homogéneo. Esto, sumado a la dispersión de los valores de conductancia (ver figura 3.1.3), permite sospechar de la presencia de más de un tipo de canal en este grupo. En 5 casos de los 10 registros donde se presentaron conductancias de este grupo en la configuración de CA, se observó que las mismas aparecían inmediatamente antes o después del canal del grupo 1, como puede observarse en la figura 3.1.4. Este hecho, permite proponer que esta conductancia representa en realidad un estado de sub-conductancia del canal BK<sub>Ca</sub>.



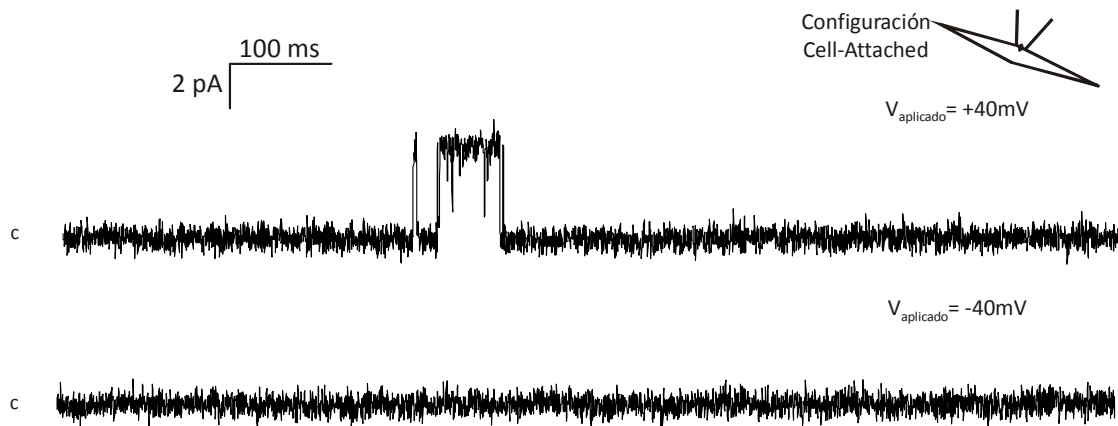
**Figura 3.1.4:** Registro típico del canal del grupo 2 susceptible de ser un estado de sub-conductancia del canal del grupo 1. Las flechas indican las aperturas correspondientes al canal en cuestión. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

De los 5 registros restantes, 3 presentaron una alta actividad del canal a todos los potenciales ensayados (figura 3.1.5). Finalmente, los 2 registros restantes son canales de actividad dependiente del voltaje observados en *patches* donde también estaba presente el canal BK<sub>Ca</sub>, sin que presente evidencias claras de ser un estado de subconductancia del mismo.



**Figura 3.1.5:** Registro típico del canal del grupo 2 de alta activación a todos los potenciales. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

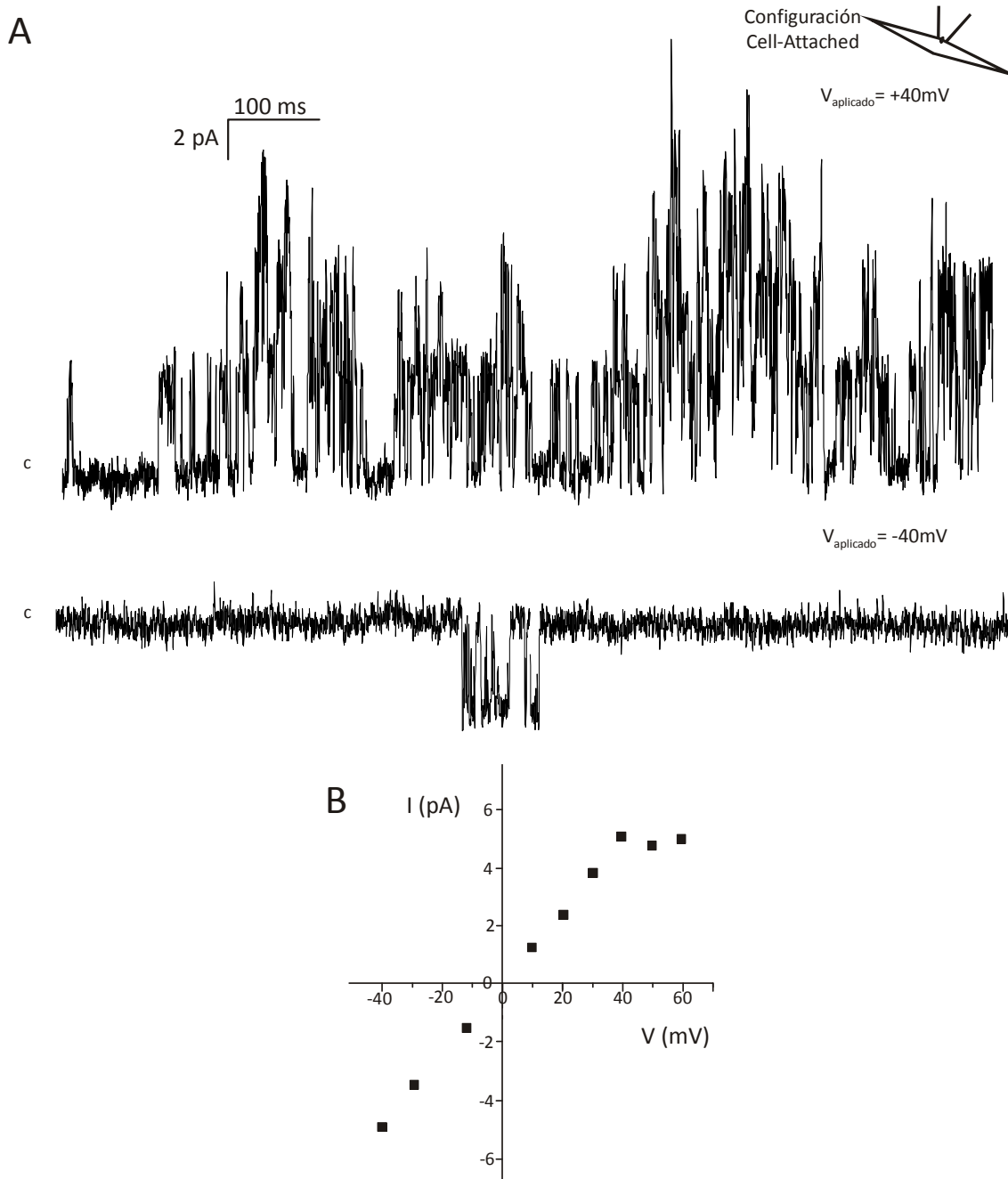
**Grupo 3:** Canales de conductancia intermedia entre 85 y 130 pS: Este grupo presenta valores de conductancia más homogéneos que los anteriores ( $116,2 \pm 2,1$  pS en CA y  $128,5 \pm 5.1$  pS en IO) y una elevada frecuencia de aparición en CA (26%) que disminuye a la mitad al pasar a IO (13,8%). A pesar de la homogeneidad en la medida de las conductancias, del análisis detallado de los registros podemos discriminar entre dos comportamientos diferenciales. El primero, y mayoritario (11 de 19), presentó un comportamiento que se repitió en los grupos 4, 5 y 6: manifestó una activación claramente dependiente del voltaje observándose raramente actividad del mismo a potenciales de membrana menores a 0 mV; presentó tiempos de aperturas intermedias (de 10 a 100 ms) sin cierres transitorios (en inglés *flickery*); y en general, se observó una sola copia por *patch* y curvas i-V lineales. En casi todos los casos acompaña al canal BK<sub>Ca</sub> y a otros canales de comportamiento similar que describiremos en los siguientes 3 grupos. En el registro de la figura 3.1.1 está presente, y en la figura 3.1.6 se presenta un registro típico del mismo en forma aislada.



**Figura 3.1.6:** Registro típico del canal del grupo 3 dependiente del voltaje que presenta actividad a potenciales mayores que  $0\text{ mV}$  y presenta una relación  $i\text{-V}$  lineal. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

Por otro lado, dentro de este grupo encontramos 4 células de comportamiento muy homogéneo caracterizadas por presentar siempre al menos 3 copias del canal por *patch*, una rectificación en las curvas  $i\text{-V}$  para los valores de corrientes correspondiente a potenciales mayores que  $+40\text{mV}$  (3.1.7 B), un modo de apertura más ruidoso o *flickery* respecto al resto de los canales observados y, si bien su actividad tiene una clara dependencia del voltaje (observándose más activo a los potenciales despolarizados), el canal presenta actividad significativa a potenciales hiperpolarizados. En la figura 3.1.7 A se presenta un registro típico.

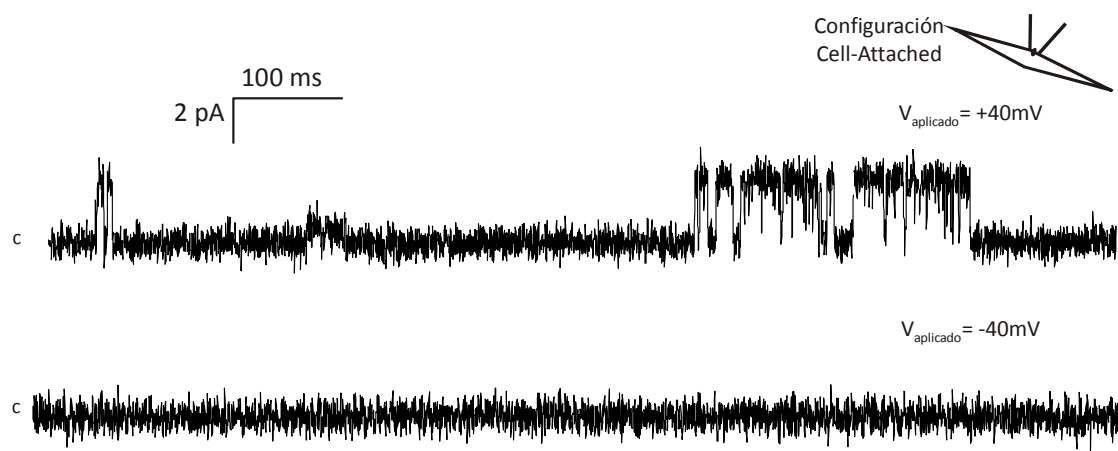
El resto de los canales de este grupo presenta un comportamiento intermedio difícil de clasificar dentro de alguno de estos 2 comportamientos principales.



**Figura 3.1.7: Registro típico del canal del grupo 3 rectificante débil.** A. Registros típicos de la actividad del canal. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B. Relación i-V del canal presentado en A donde se puede observar la propiedad de rectificación débil.

**Grupo 4: Canales de conductancia intermedia entre 65 y 85 pS:** Constituye el grupo más homogéneo de valores de conductancias encontrado en este tipo celular, como puede observarse claramente en la figura 3.1.3. Si bien el rango para agrupar las conductancias que surgió de los histogramas fue de 20 pS (entre 65 y 85 pS), 9 de los 18 valores de conductancia hallados en este grupo presentaron su valor entre 76 y 80 pS, con un valor medio de  $76,3 \pm 1,2$  para CA y de  $76,1 \pm 2,1$  pS para IO. Su frecuencia

de aparición disminuye al pasar de la configuración de CA a la de IO (de 24,6% a 15,4%). Esta conductancia presentó curvas i-V lineales y una clara dependencia del voltaje, observándose activación del canal a potenciales despolarizados mayores a 0 mV, mientras que raramente se observaron aperturas del canal a potenciales menores que dicho valor. Se caracteriza por presentar tiempos de apertura intermedios sin *flicker* (entre 10 y 100 ms). Tal como puede verse en la figura 3.1.1, suele estar acompañado por otros canales con similar dependencia del voltaje, pertenecientes a distintos grupos (BK<sub>Ca</sub>, el primer subgrupo del 3 y otros de los 2 siguientes (grupo 5 y 6)) En la figura 3.1.8 se presenta un registro típico en forma aislada.



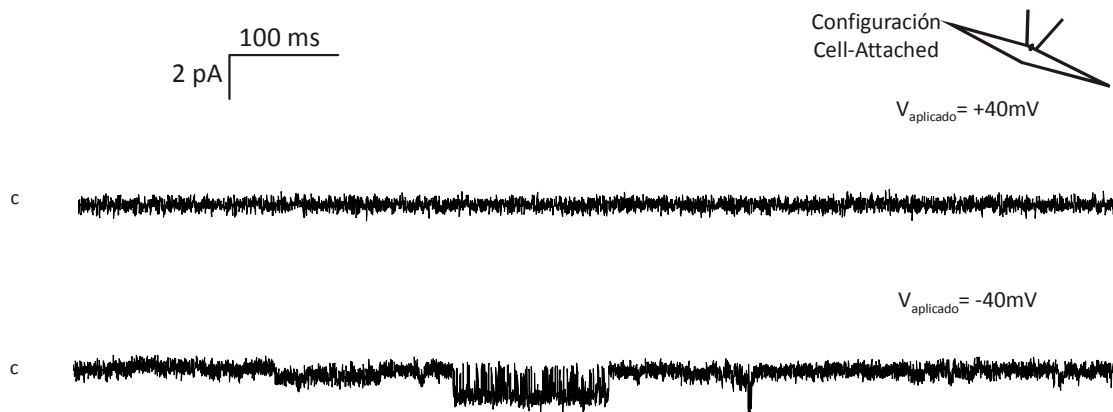
**Figura 3.1.8:** Registro típico del canal del grupo 4 de actividad dependiente del voltaje. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

Grupo 5: Canales de conductancia intermedia baja (entre 30 y 65 pS): Observamos una importante frecuencia de aparición (30%) de conductancias de este grupo en la configuración de CA que disminuye levemente al pasar IO. A pesar de que el intervalo de conductancias que resultó para la conformación de este grupo es estrecho, esto no se refleja en un comportamiento homogéneo de las corrientes. Esta situación, como también la del grupo siguiente (de conductancia baja) es esperable, dado que la mayor diversidad de canales de K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y CNS poseen conductancias menores a los 50 pS y por lo tanto es difícil, en base al valor de conductancia, distinguir diferentes poblaciones de canales de estos tipos en células nativas. En nuestro caso en particular, dentro de las conductancias que incluimos en este grupo podemos diferenciar 3 comportamientos típicos:

- Canal dependiente del voltaje, de relaciones i-V lineales y tiempos de apertura intermedios. Es mayoritario dentro de este grupo y su análisis es difícil dado que se presenta en general junto a otros canales ya descritos también sensibles al voltaje. Como puede observarse en la figura 3.1.1, acompaña al canal BK<sub>Ca</sub>, al canal del grupo 3 de conductancia lineal y a canales del grupo 4 y 6. En la figura 3.1.9 se presenta un registro típico del mismo.
- Canal de aperturas esporádicas y casuales (como máximo se observaron tres por *patch*), en general se observa a potenciales hiperpolarizados y con muchos cierres veloces dentro de la misma (*flickery*) (figura 3.1.10).
- Canales de actividad independiente del voltaje de comportamiento muy heterogéneo en cuanto a conductancia y nivel de actividad, al punto que no nos permitió arribar a ninguna conclusión sobre los mismos.



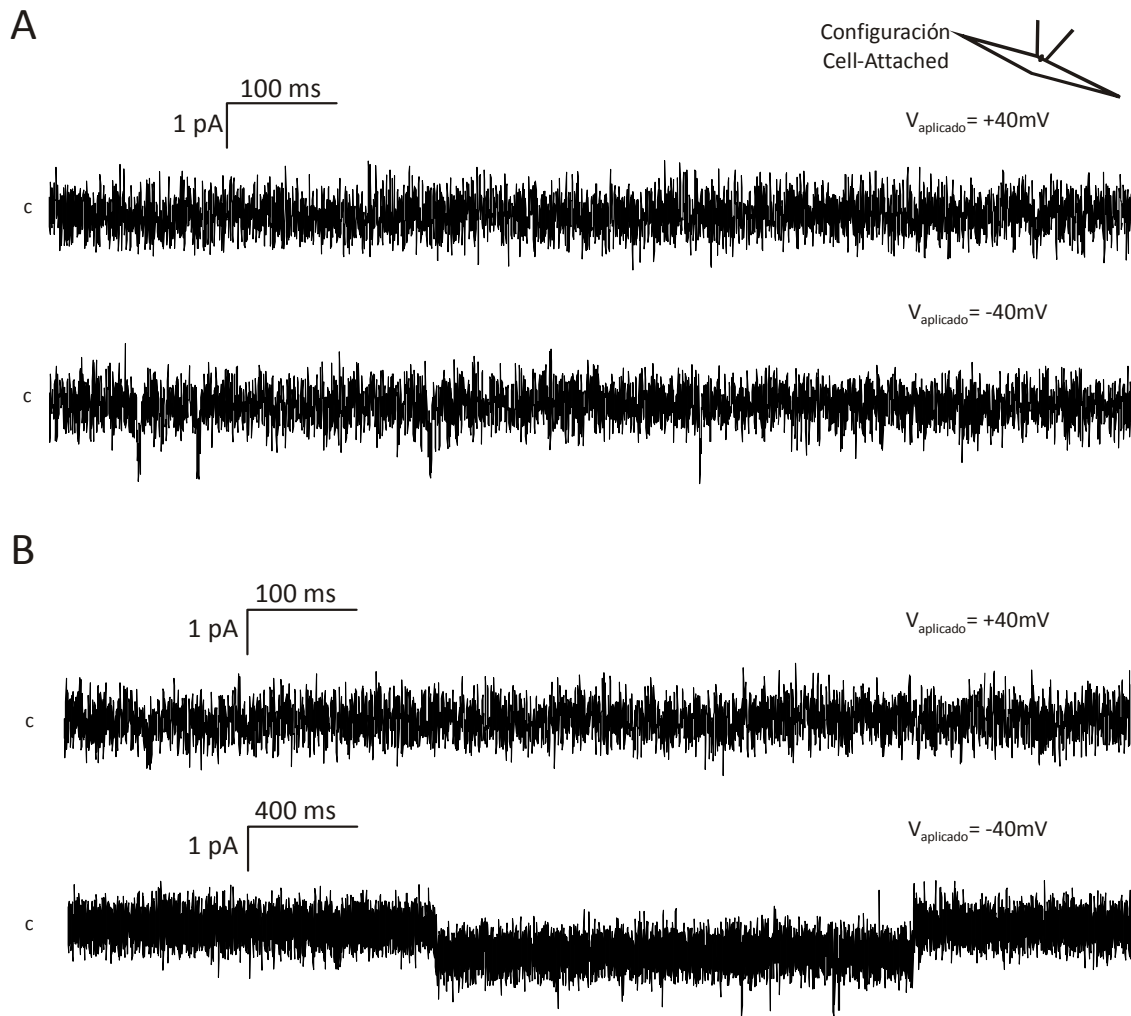
**Figura 3.1.9:** Registro típico del canal del grupo 5 de actividad dependiente del voltaje.  
c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.



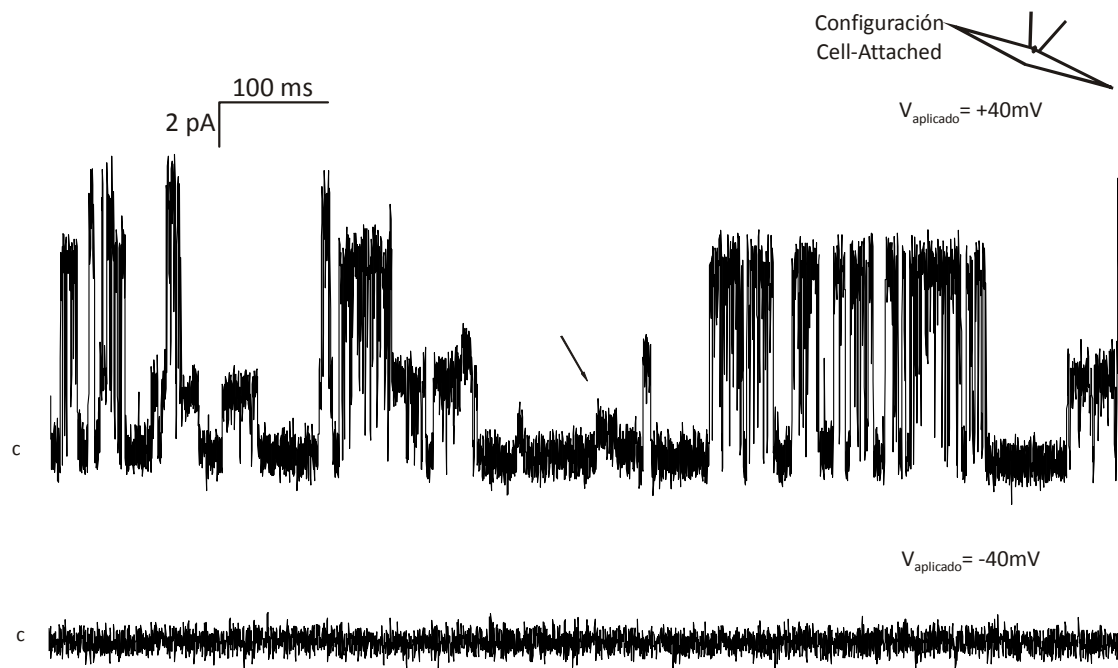
**Figura 3.1.10:** Registro típico del canal del grupo 5 de aperturas ruidosas o *flickery*. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

Grupo 6: Canales de conductancia baja ( $\gamma < 30$  pS): Al igual que en el grupo anterior, las conductancias representativas son frecuentes (26% en CA), presentando más de un comportamiento dentro del mismo. Según su dependencia del voltaje, pueden dividirse en 2 subgrupos: el primero, y más frecuente, consiste en canales que se observaron activados principalmente a potenciales hiperpolarizados (menores a  $-40$  mV), donde en algunos *patches* se presenta con tiempos de apertura cortos (menores a 10 ms) y en otros con tiempos de apertura largos (mayores a 100 ms), como se observa en la figura 3.1.11 A y B. En contraste, el segundo subgrupo está constituido por canales que presentaron actividad solo a potenciales despolarizados (figura 3.1.12). Estos últimos fueron muy difíciles de caracterizar dada su baja conductancia y su presencia a potenciales donde aparecen otros canales de conductancia mayor ( $BK_{Ca}$ , 3 (lineal), 4 y 5), como puede observarse en la figura 3.1.1. A pesar de poder diferenciarse claramente los comportamientos, los valores de conductancia (obtenidos a partir de curvas i-V lineales) no varían significativamente entre los subgrupos.





**Figura 3.1.11:** Registro típico de los canales del grupo 6 de actividad a potenciales hiperpolarizados, de tiempos de apertura cortos (A) y largos (B). c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.



**Figura 3.1.12:** Registro típico de los canales del grupo 6 de actividad dependiente del voltaje. La flecha indica la apertura correspondiente al canal en cuestión. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

El análisis global de estos datos nos permite sugerir la presencia funcional de una importante diversidad de canales iónicos en las CML de la AUH. En función de este análisis más detallado, podemos estimar ahora que existen por lo menos 10 tipos distintos de canales iónicos, dado que si bien la distribución de conductancias iónicas nos permitió generar 6 grupos de posibles canales, las corrientes iónicas correspondientes a los grupos 2, 3, 5 y 6 muestran indicios que pueden interpretarse como correspondientes a canales diferentes de similar conductancia. Dado que muchos de ellos poseen actividad inclusive a potenciales hiperpolarizados, se les podría adjudicar un rol relevante en la regulación del potencial de membrana celular y de esta manera, en distintas funciones celulares dependientes del potencial de membrana.

Es importante señalar que el registro de corrientes de canal único y el análisis de los mismos, en un total de 85 células, constituye un extenso y laborioso trabajo que nos permite, mediante la caracterización de las conductancias que se activan con más frecuencia en las CML de la AUH, tener un idea general y completa de los posibles tipos

de canales iónicos funcionales que se expresan en este tipo celular para luego comenzar con la identificación más detallada de cada uno de ellos.

Un trabajo precedente realizado por nuestro grupo, describe en CML de la AUH la presencia a nivel de las corrientes macroscópicas de célula completa (del inglés *whole-cell*) de una corriente inhibida por 4-aminopiridina (4-AP), un inhibidor selectivo de los canales de  $K_v$ , [132]. Teniendo en cuenta esto, decidimos investigar cuál o cuáles de los grupos de canales descritos en las páginas anteriores podrían ser los responsables de mediar esta corriente. Para ello, registramos canales en las mismas condiciones descritas en la parte inicial de esta sección, pero ahora en presencia de 4-AP 5 mM en la solución de la pipeta. En la tabla 3.1.4 se muestra el total de células ensayadas y en la tabla 3.1.5 la distribución del número de canales por *patch* propuesta en base al número de valores diferentes de amplitud de corriente observados en los mismos.

Configuración	Nº de Células	Configuración	Nº de Células
CA → IO	68	Total CA	78
Solo IO	32	Total IO	100
solo CA	10		
Total	110		

**Tabla 3.1.4:** Número de experimentos de canal único realizados en las CML de la AUH, en presencia de 4-AP 5 mM en la pipeta, agrupados según configuración. CA → IO indica que la

misma célula fue registrada en condición de CA y posteriormente en la configuración de IO.

Número de canales	% del total de <i>patches</i>
Sin canales	21%
1 canal	43%
2 canales	20%
3 o más canales	16%

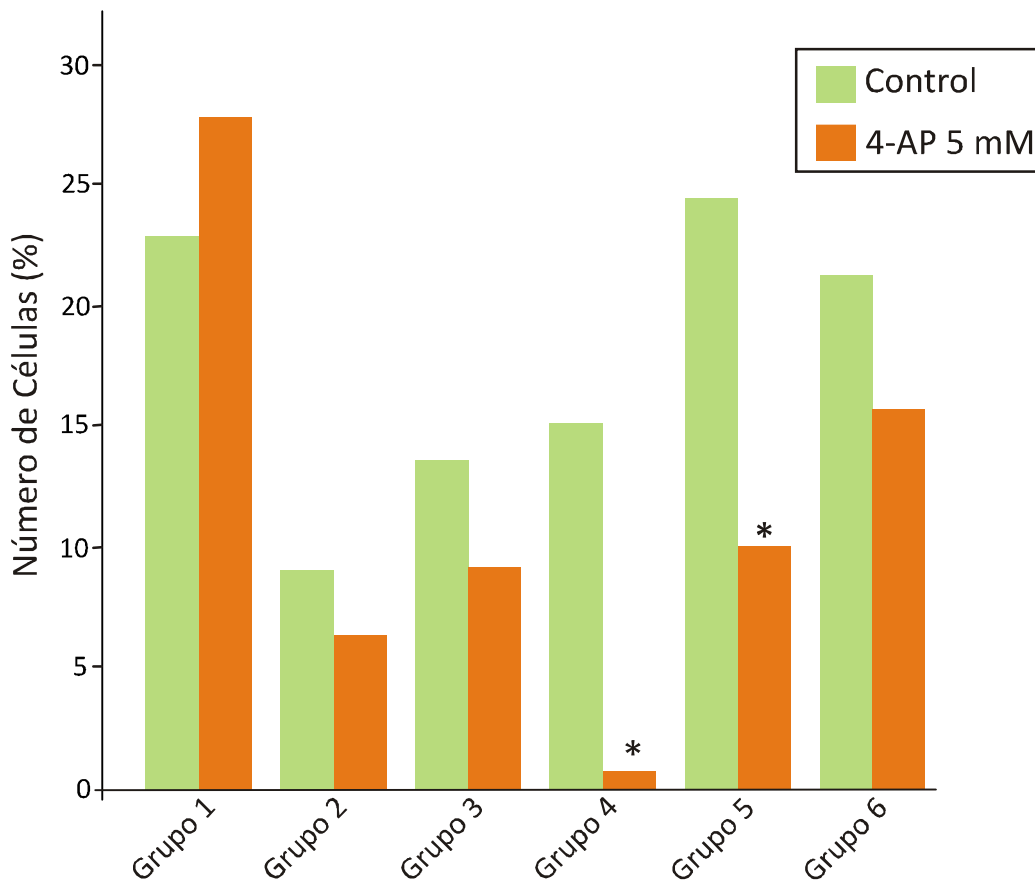
**Tabla 3.1.5:** Distribución de *patches* en base al número de canales diferentes observados en presencia de 4-AP 5 mM en la pipeta.

De la comparación de estos resultados con los obtenidos en las condiciones control observamos que se duplicaron la cantidad de *patches* sin corrientes iónicas del 12% al 21%, a la vez que disminuyó el porcentaje de *patches* que presentaron más de un canal (57% al 36%). Este efecto es claramente apreciable al realizar el cálculo de la mínima densidad de canales, que en estas condiciones fue de 1,38; cuando en

ausencia de 4-AP había sido de 2,06 canales diferentes/*patch*. Esto sugiere que los canales sensibles a 4-AP son relevantes en las CML de la AUH.

Por otro lado, realizamos un análisis de frecuencia de aparición, en la configuración de IO, de los 6 grupos de conductancias caracterizados en las condiciones control, pero ahora en presencia de 4-AP (figura 3.1.13, barras naranjas). Utilizamos para este análisis los datos correspondientes a la configuración de IO para evitar posibles efectos de la 4-AP a nivel intracelular que pueden derivar en la modificación de la actividad de otros canales distintos a los  $K_V$  [140,141]. En el mismo gráfico se agregaron los datos obtenidos en la condición control (barras verdes) a fin de facilitar el análisis comparativo de las frecuencias de aparición en ambas condiciones. Podemos observar que se modificó la misma en más de un grupo de conductancias respecto a los valores en condiciones control. Particularmente, observamos una caída en la frecuencia de aparición de todos los grupos de canales a excepción del canal  $BK_{Ca}$  (grupo 1) que aumentó levemente. El efecto inhibitorio de la 4-AP solo fue significativo para el grupo 4 y el grupo 5 (test de tablas de contingencia, Chi-cuadrado).

Por lo tanto, luego de haber analizado en un número comparable de células (100 en esta serie), observamos que en presencia de 4-AP casi no aparece la conductancia de 76 pS y disminuye en  $\approx 50\%$  la frecuencia de aparición de la conductancia de aproximadamente 45 pS. Se puede concluir que estas conductancias serían atribuibles a canales de tipo  $K_V$  sensibles a la 4-AP. Cabe recordar además que estos grupos se caracterizaron por presentar un marcado aumento de la actividad del canal al despolarizar la membrana, lo cual es consistente con el comportamiento esperado para un canal operado por voltaje.



**Figura 3.1.13:** Frecuencia de aparición de canales en la configuración de IO en condiciones control (verde) y en presencia de 4-AP (naranja), agrupados según el valor de sus conductancias. \* indica diferencias estadísticamente significativa respecto al control (test de  $\chi^2$ )

Respecto al resto de los grupos de canales observados no es posible, por el momento, asociarlos con un tipo puntual de canal. Los valores de conductancia permiten hipotetizar sobre una importante cantidad de canales iónicos de  $K^+$ ,  $Cl^-$ , y CNS, que al no poseer bloqueantes específicos, deberán caracterizarse por el efecto de una combinación de drogas no selectivas, cuyo desarrollo excede los objetivos de esta tesis, pero puede plantearse como punto de partida para trabajos posteriores.

Estos datos nos permiten, por un lado, proponer la presencia funcional de por lo menos dos tipos de canales como posibles  $K_v$  en las CML de la AUH, y además, lo que es fundamental para el trabajo en células nativas, establecer una condición de registro de canal único mas acotada en cuanto a la presencia de número y diversidad de canales iónicos en los *patches*. En función de estos resultados actualmente sabemos que trabajando en IO, solo con la adición de 4-AP 5 mM en la pipeta, podemos por ejemplo registrar, en forma casi aislada, canales de conductancia mayores a 100 pS.

Esto constituye un punto importante para el estudio de distintas propiedades biofísicas de los canales iónicos como lo son la probabilidad de apertura y los tiempos de permanencia, entre otros, que en muchos casos es muy difícil realizar en células nativas debido a la imposibilidad de registrar a los mismos en forma aislada.

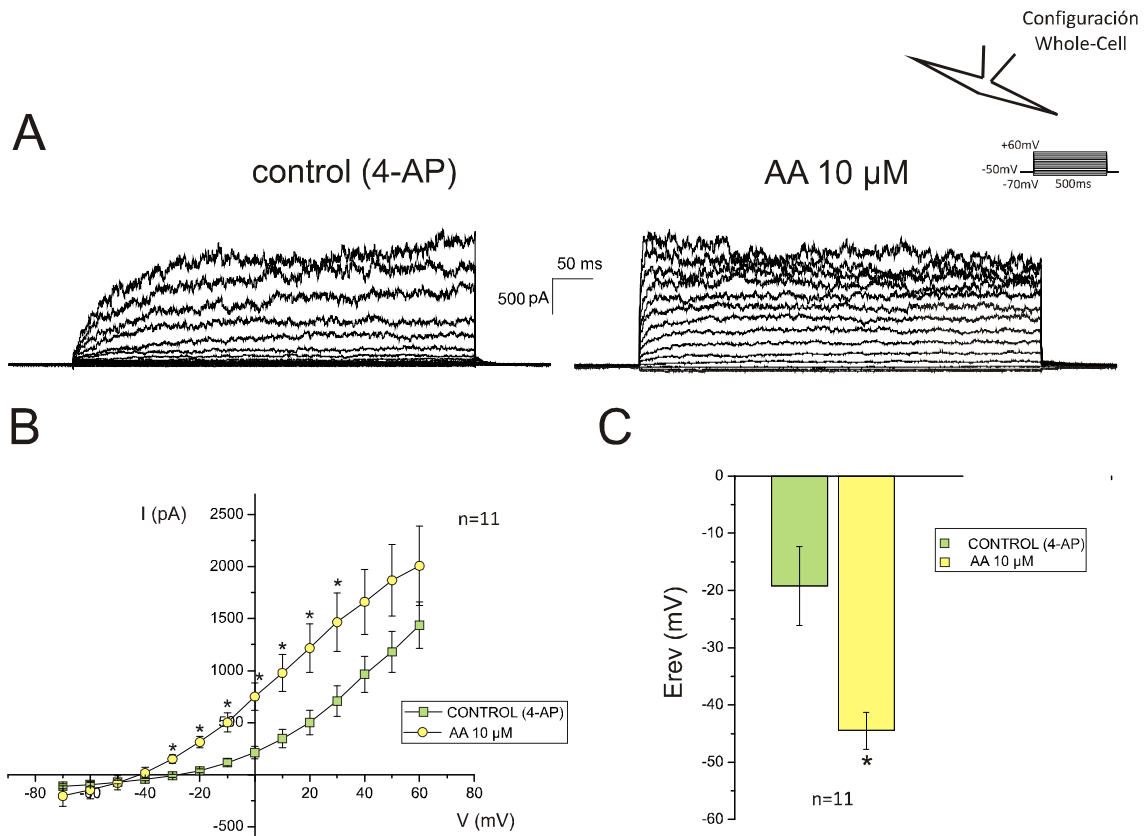
A continuación, y tal como se enunció en los objetivos de estudio de esta tesis, se presentan los resultados obtenidos del estudio de canales selectivos al ión  $K^+$  en las CML de la AUH como posibles estructuras blanco del ácido araquidónico (AA), lípido que se postula como uno de los EDHF.

Se analizó en primer lugar el efecto del AA sobre las corrientes macroscópicas de célula completa, para luego, en función del efecto que produzca sobre las corrientes totales, analizarlo en profundidad a nivel de canal único.

### **3.2: ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCÓPICAS DE $K^+$ EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO (CML) DE LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH).**

A la fecha, el único reporte bibliográfico en CML de la AUH donde se ponen en evidencia, a nivel de célula completa, las propiedades de la corriente macroscópica evocada por estímulos sucesivos de voltaje fue publicado por nuestro grupo de investigación [132]. Allí se describe la presencia mayoritaria de dos tipos de corrientes iónicas: una inhibida por 4-aminopiridina 5 mM y por lo tanto probablemente mediada por canales de  $K^+$  voltaje operados de tipo  $K_v$ , tal como se citó previamente, y otra corriente inhibida por iberiotoxina 200 nM, mediada entonces por canales de tipo  $BK_{Ca}$ , para los cuales esta toxina es un inhibidor específico.

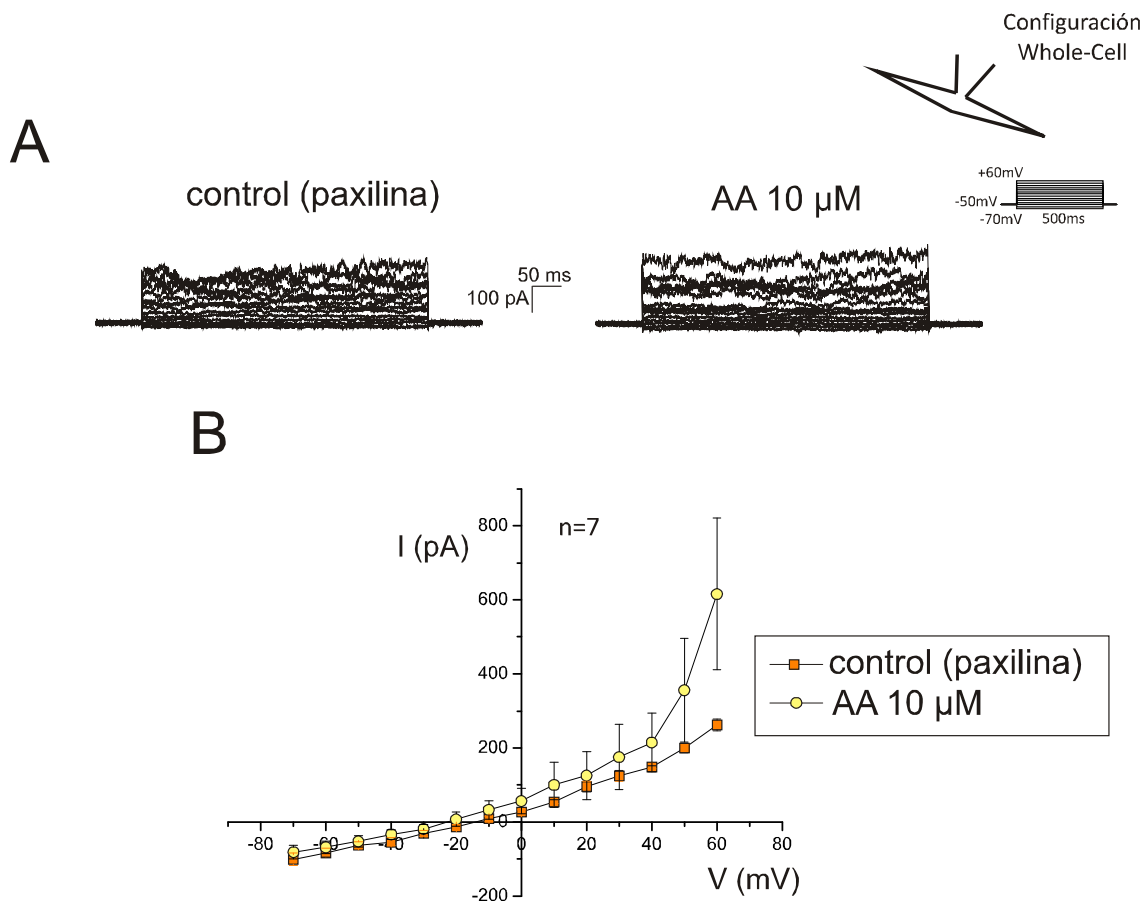
Teniendo en cuenta este antecedente, en primer lugar, se ensayó el efecto del ácido araquidónico (AA) 10  $\mu$ M sobre las corrientes macroscópicas evocadas por pulsos de voltaje en presencia de 4-AP 5 mM en la solución de perfusión (ver los detalles experimentales de esta configuración en la sección: Metodología 2.4). En estas condiciones, observamos un aumento de la corriente saliente y un cambio en el valor del potencial de reversión ( $E_{rev}$ ) hacia valores más hiperpolarizados. En la figura 3.2.1 se muestran los registros típicos de corriente, donde se puede observar además un aumento en la cinética de activación de las mismas en presencia de AA, las curvas de relación corriente macroscópica media ( $I$ ) en función del voltaje ( $V$ ), ( $I$ - $V$ ) y los valores medios de  $E_{rev}$  antes y después del agregado del AA.



**Figura 3.2.1: Efecto del AA 10  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes macroscópicas en CML de la AUH en presencia de 4-AP 5 mM.** A: Registros típicos superpuestos de las corrientes macroscópicas obtenidas tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 10 mV, de 500 ms, entre -70 y +60 mV partiendo de un potencial de mantenimiento de -50 mV en condiciones control y luego del agregado de AA 10  $\mu\text{M}$ . B: Curvas I-V medias obtenidas a partir del valor de corriente del estado estacionario de dichos registros. C: Valor medios del  $E_{\text{rev}}$  en cada una de las condiciones. \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , test de t de Student)

Estos resultados sugieren que el AA podría estar activando canales de tipo  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  como efecto responsable del aumento en la corriente macroscópica total en presencia de 4-AP. Sin embargo, no se puede descartar el efecto del mismo sobre la corriente mediada por canales Kv (en esas condiciones inhibida por la 4-AP) u otros posibles tipos de canales. Por lo tanto, en otra serie de experimentos ensayamos el efecto del AA sobre las corrientes macroscópicas en presencia de paxilina, un inhibidor para canales de tipo  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  cuya selectividad ha sido comprobada y de mayor accesibilidad económica comparado con la iberiotoxina. La paxilina 500 nM inhibe gran parte de la corriente macroscópica evocada por voltaje y el AA 10  $\mu\text{M}$  no produce ningún efecto significativo sobre la cinética y la magnitud de la corriente remanente (figura 3.2.2).





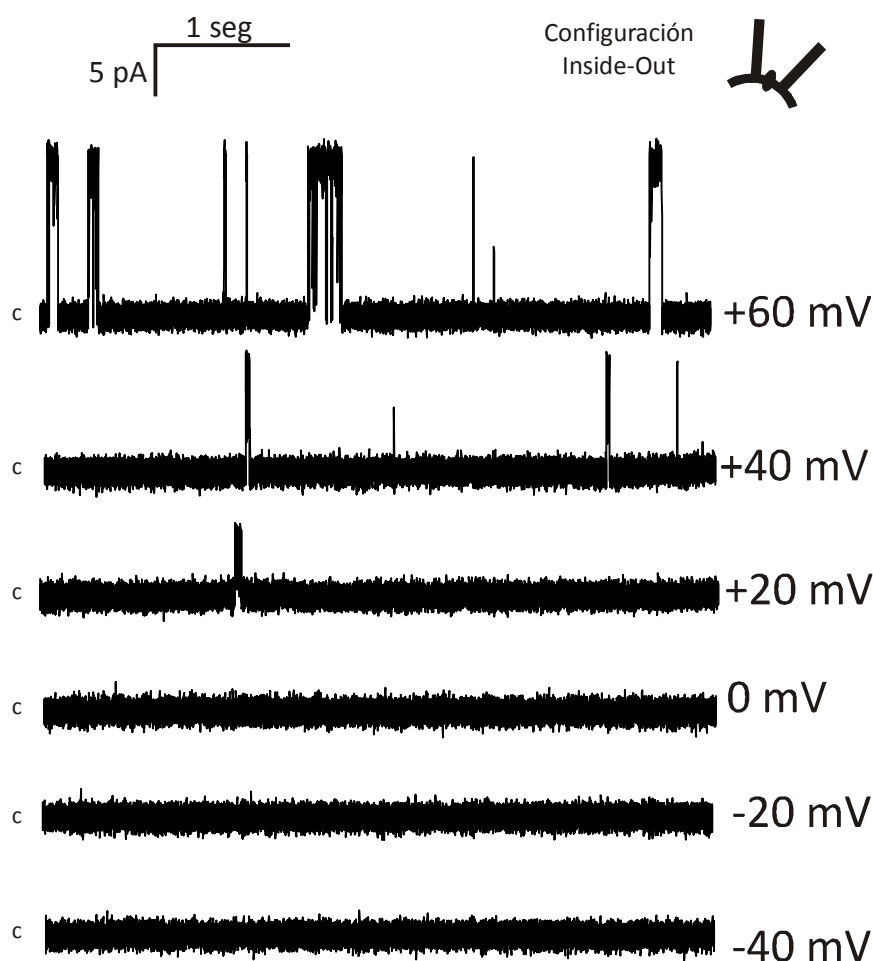
**Figura 3.2.2:** Efecto del AA 10  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes macroscópicas en CML de la AUH en presencia de paxilina 500 nM. A: Registros típicos superpuestos de las corrientes macroscópicas obtenidas tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 10 mV, de 500 ms, entre -70 y +60 mV partiendo un potencial de mantenimiento de -50 mV en condiciones control y luego del agregado de AA 10  $\mu\text{M}$ . B: Curvas I-V medias obtenidas a partir del valor de corriente del estado estacionario de dichos registros.

Estos datos permiten concluir que en este tipo celular el AA aumenta la corriente macroscópica mediada por canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  mientras que no afecta la corriente  $\text{K}_{\text{V}}$  antes descrita. Además, produce un claro efecto hiperpolarizante sobre el potencial de membrana celular, medido como cambio del potencial de reversión a partir de las relaciones I-V.

Considerando entonces estos resultados, presentamos a continuación el estudio que se realizó a nivel de canal único, para indagar si el efecto del AA sobre los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  es directo y cuál es su mecanismo de activación.

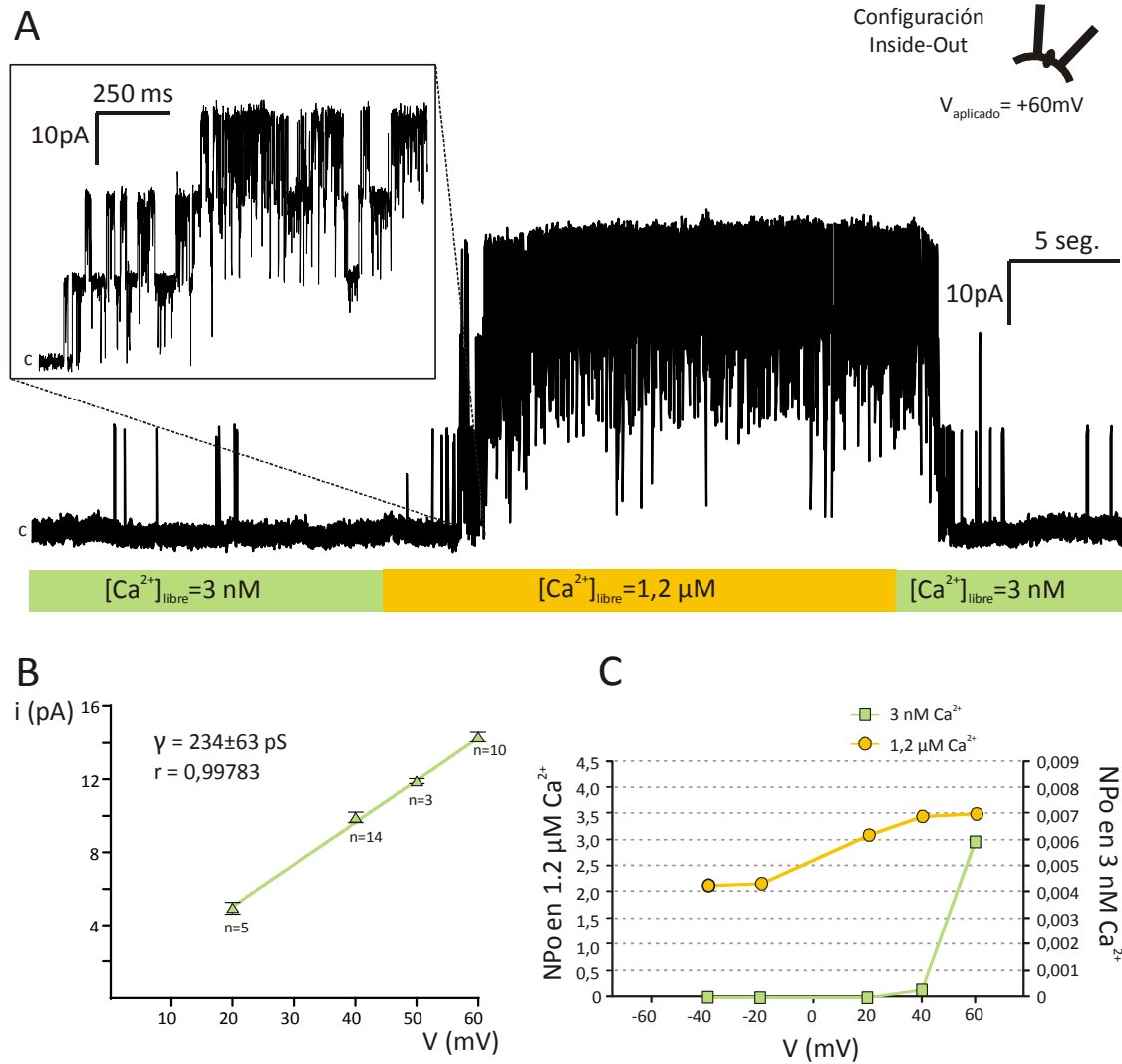
### 3.3: ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE EL CANAL BK<sub>Ca</sub> A NIVEL DE CANAL ÚNICO EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO (CML) DE LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH).

Tal como anticipamos en la sección 1 de este capítulo de resultados, en primer lugar, presentamos la exhaustiva caracterización de los canales del grupo 1 que se llevó a cabo para completar la identificación de los mismos como canales BK<sub>Ca</sub>, para posteriormente describir el efecto del AA sobre el mismo. En la figura 3.3.1 se presenta un registro típico de esta corriente a distintos potenciales de membrana, donde además se puede observar que el canal presenta mayor actividad al aumentar la despolarización de la membrana.



**Figura 3.3.1:** Registro típico del canal BK<sub>Ca</sub> en las CML de la AUH en configuración de IO, a distintos potenciales de membrana, en condiciones de K<sup>+</sup> simétrico. Se registró en presencia de 4-AP 5 mM en la solución de la pipeta y una concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular de 3 nM. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal.

Este canal, tal como se espera para un canal de  $K^+$  de tipo  $BK_{Ca}$ , tiene una alta conductancia ( $234 \pm 63$  pS, calculada a partir de la curva i-V promedio de la figura 3.3.2 B) y su probabilidad de apertura aumenta con la despolarización de la membrana (figura 3.3.2 C) y con el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (figura 3.3.2 A).



**Figura 3.3.2: Activación por el  $Ca^{2+}$  intracelular y propiedades biofísicas del canal  $BK_{Ca}$ .** A: registro típico de la activación de la corriente  $BK_{Ca}$  de las CML de la AUH por incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular de 3 nM a 1,2  $\mu$ M. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Curva i-V media obtenida en condiciones de  $K^+$  simétrico,  $n= 3-14$  células. La relación fue ajustada con una regresión lineal a partir de la cual se obtuvo un valor de conductancia media de  $234 \pm 63$  pS. C: Relación típica de NPo vs V (probabilidad de apertura vs voltaje de membrana) en las dos concentraciones de  $Ca^{2+}$  ensayadas.

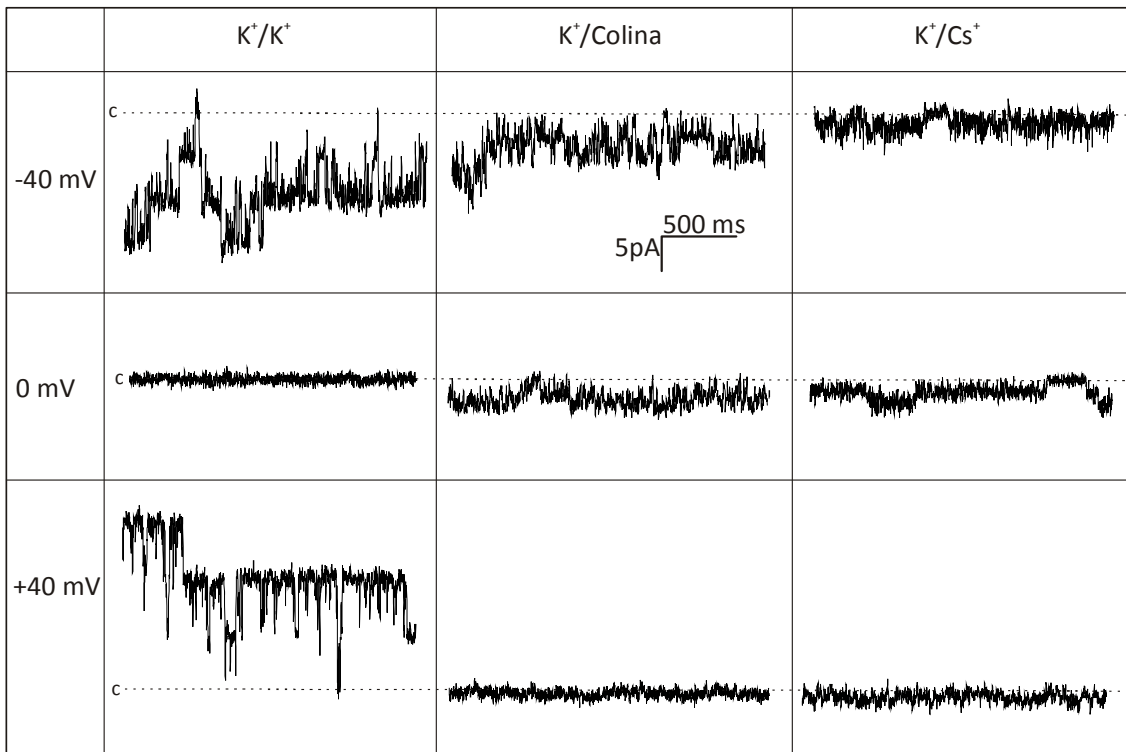
El valor de conductancia de 234 pS obtenido es de los mayores esperables para un canal de  $K^+$ , y su valor coincide con los valores descritos en la literatura para el

canal  $BK_{Ca}$  en condiciones simétricas de  $K^+$  [25]. La activación por  $Ca^{2+}$  genera un desplazamiento de la curva  $NPo$  vs  $V$  hacia la izquierda también característico del canal  $BK_{Ca}$ , que muestra que el incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  genera una mayor sensibilidad del canal al potencial de membrana.

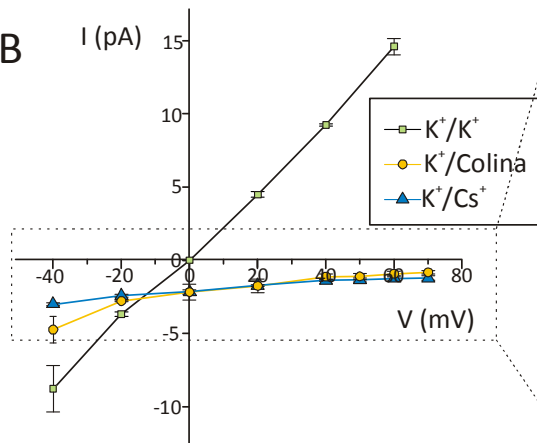
Teniendo en cuenta que la concentración de  $1,2 \mu M$  de  $Ca^{2+}$  intracelular permite observar la corriente a potenciales hiperpolarizados y con el objetivo de comprobar la selectividad de este canal al ión  $K^+$ , realizamos bajo estas condiciones de actividad del canal una serie de curvas  $i-V$  en condiciones biiónicas, reemplazando el  $K^+$  de la solución del baño, por  $Cs^+$  o por colina (catión monovalente), mientras que se mantuvo constante la concentración de  $K^+$  en la solución de la pipeta. En la figura 3.3.3 se muestran registros típicos de corrientes en las 3 condiciones ( $K^+/K^+$ ,  $K^+/Cs^+$  y  $K^+/colina$ ) a los potenciales de  $-40$ ,  $0$  y  $+40$  mV y las curvas  $i-V$ , correspondientes a estas 3 condiciones. En la figura 3.3.3 A observamos que a tres de los potenciales ensayados en las condiciones biiónicas asimétricas ( $K^+/Cs^+$  y  $K^+/colina$ ) la corriente es negativa, o cercana a 0, y por lo tanto entrante (de la pipeta al baño), lo cual marca un predominio en la selectividad del canal por el ión  $K^+$ . Cuando analizamos las curvas  $i-V$  completas en estas condiciones en el rango  $-40$  a  $+70$  mV (figura 3.3.3 B y C) observamos que la misma posee una rectificación y que el potencial de reversión fue superior a  $+70$  mV para ambas condiciones biiónicas en todas las células ensayadas. Este hecho indica una elevada selectividad del canal al  $K^+$ , siendo al menos 17 veces más selectivo al  $K^+$  que al  $Cs^+$  y a la colina. Estos valores, que indican una gran selectividad del canal por el ión  $K^+$ , también concuerdan con las características de selectividad del canal  $BK_{Ca}$  [25,134].



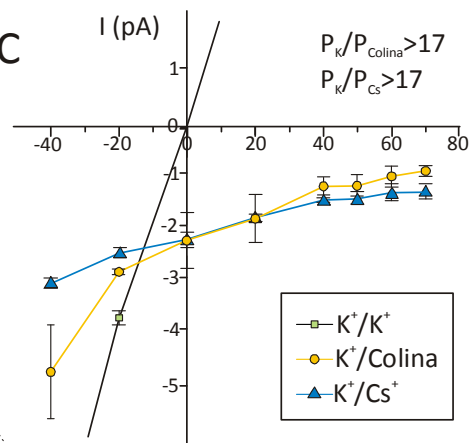
A



B



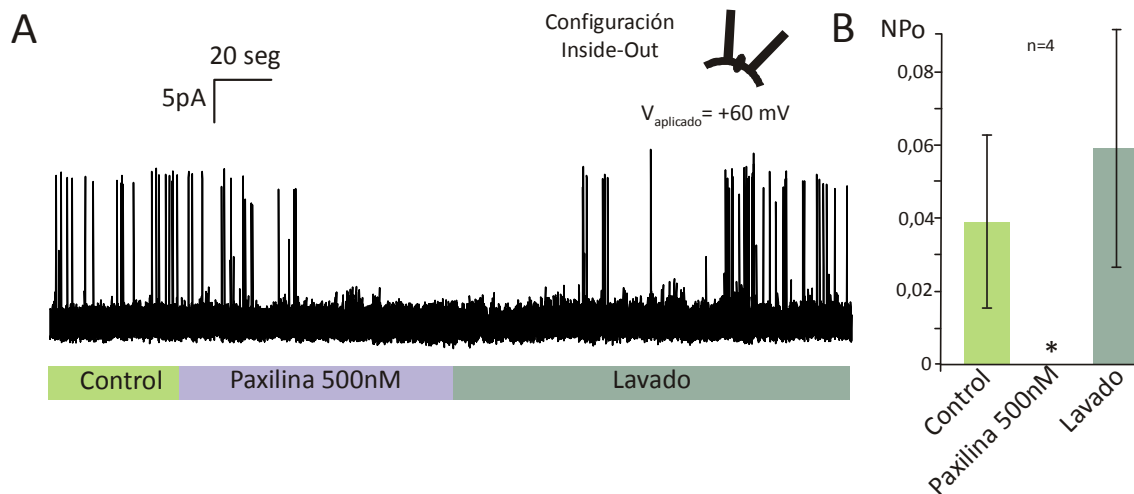
C



**Figura 3.3.3: Estudio de la selectividad iónica del canal  $BK_{Ca}$  en condiciones biiónicas.** A: registros típicos de la corriente  $BK_{Ca}$  de las CML de la AUH a los potenciales de -40, 0 y +40 mV, con una concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular de 1,2  $\mu$ M, registrado en  $K^+$  simétrico (panel de la izquierda) y en condiciones biiónicas reemplazando el  $K^+$  de la solución del baño por colina (panel central) o por  $Cs^+$  (panel de la derecha). c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Curva i-V (corriente vs. voltaje de membrana) de la corriente obtenida en las tres condiciones (n=2-3). C: Misma curva que B, pero con una mayor escala para observar la rectificación de las corrientes en condiciones biiónicas.

Por último, se demostró que la corriente mediada por este canal es inhibida por paxilina. En la figura 3.3.4 A observamos que la paxilina 500 nM aplicada desde la cara

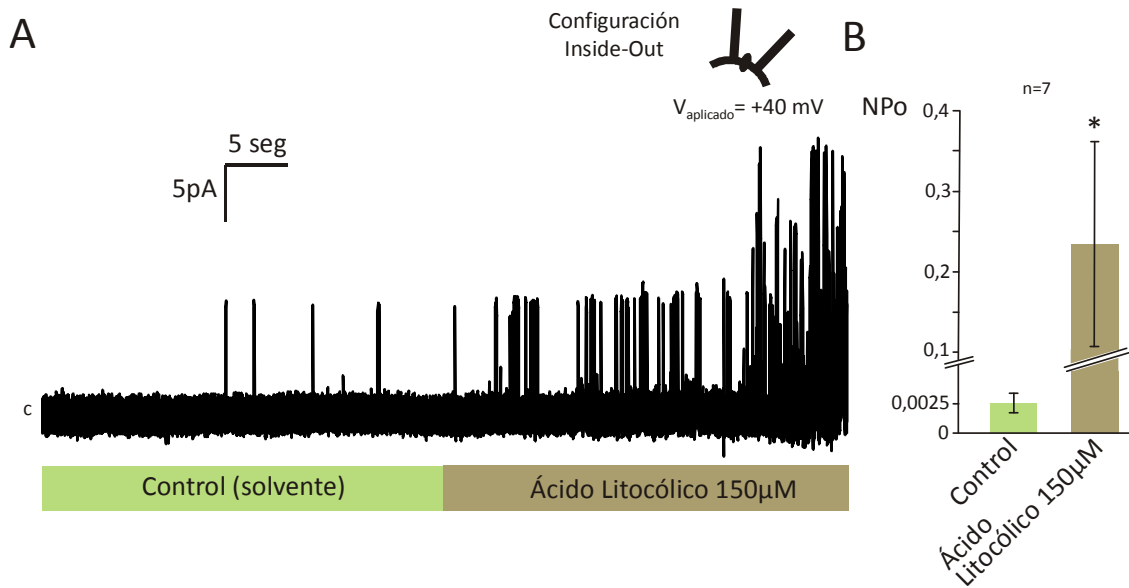
intracelular de la membrana inhibe completamente la actividad del canal. El bloqueo de paxilina 500 nM fue rápido (en menos de un minuto) en todas la células ensayadas (n=4), provocando una caída de la actividad del canal en estado estacionario registrado a +60mV desde una NPo inicial de  $0,03733 \pm 0,02341$  (n=4) a una NPo de 0. El efecto es completamente reversible, dado que al remover el bloqueante del baño la actividad del canal se recupera a una NPo de  $0,05752 \pm 0,3252$  (n=3) (figura 3.3.4 A y B).



**Figura 3.3.4: Bloqueo del canal BK<sub>Ca</sub> por paxilina 500 nM.** A: registro típico del bloqueo de paxilina 500 nM sobre la corriente BK<sub>Ca</sub> en las CML de la AUH registrado a un potencial de membrana de +60 mV y en condiciones de IO. El bloqueante fue agregado desde la solución del baño entrando en contacto con la cara intracelular de la membrana, y las soluciones control y lavado contenían el solvente de la paxilina. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Valores medios de NPo y sus respectivos errores en cada una de las condiciones ensayadas. El \* indica diferencia estadísticamente significativa vs la condición control (ANOVA, p<0,05).

Se encuentra descrito que el canal BK<sub>Ca</sub> está compuesto por 4 subunidades  $\alpha$  que forman el poro del canal, pero que además puede presentar asociación con diferentes subunidades  $\beta$  accesorias. En el caso de las CMLV numerosas evidencias bibliográficas muestran que el canal está asociado a subunidad  $\beta_1$ , la cual le otorga al mismo una mayor sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> intracelular. Bukiya *et al* (2007) han demostrado que la presencia de la subunidad  $\beta_1$  puede ponerse en evidencia funcionalmente mediante la inducción de la activación del canal por el ácido litocólico [65], ya que el mismo puede activar al canal sólo si está presente dicha subunidad. En la figura 3.3.5 A se muestra un registro típico de la actividad del canal BK<sub>Ca</sub> de las CML de la AUH en condiciones control y luego del agregado de ácido litocólico 150  $\mu$ M. Observamos claramente que el ácido litocólico produce un incremento significativo en la actividad

del canal BK<sub>Ca</sub> registrada a un potencial de membrana de +40mV, aumentando la NPo de  $0,00264 \pm 0,00087$  a  $0,23524 \pm 0,12673$  (n=7) (figura 3.3.5 B). No pudimos observar si el efecto del ácido litocólico es reversible, dado que luego de unos minutos posee una importante actividad desestabilizadora de la membrana que limita la utilidad de sello. Cabe aclarar que este canal en nuestras condiciones experimentales no presenta cambios significativos en el valor de NPo en función del tiempo.



**Figura 3.3.5: Activación del canal BK<sub>Ca</sub> por ácido litocólico 150 μM.** A: registro típico de la activación de la corriente BK<sub>Ca</sub> por el ácido litocólico 150 μM en las CML de la AUH registrado a un potencial de membrana de +40 mV y en condiciones de IO. El ácido litocólico fue agregado desde la solución del baño entrando en contacto con la cara intracelular de la membrana, y las soluciones control y lavado contenían el solvente del mismo. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Valores medios de las NPo y sus respectivos errores en cada una de las condiciones ensayadas. El símbolo \* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control (test de t de Student, p<0,05).

Estos resultados nos permiten confirmar la presencia y conocer en detalle la dependencia del voltaje, la sensibilidad a la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la selectividad iónica del canal BK<sub>Ca</sub> en las CML de la AUH. Además, demostramos funcionalmente que este canal se encuentra asociado a una subunidad accesoria β<sub>1</sub> como lo indica la activación por el ácido litocólico.

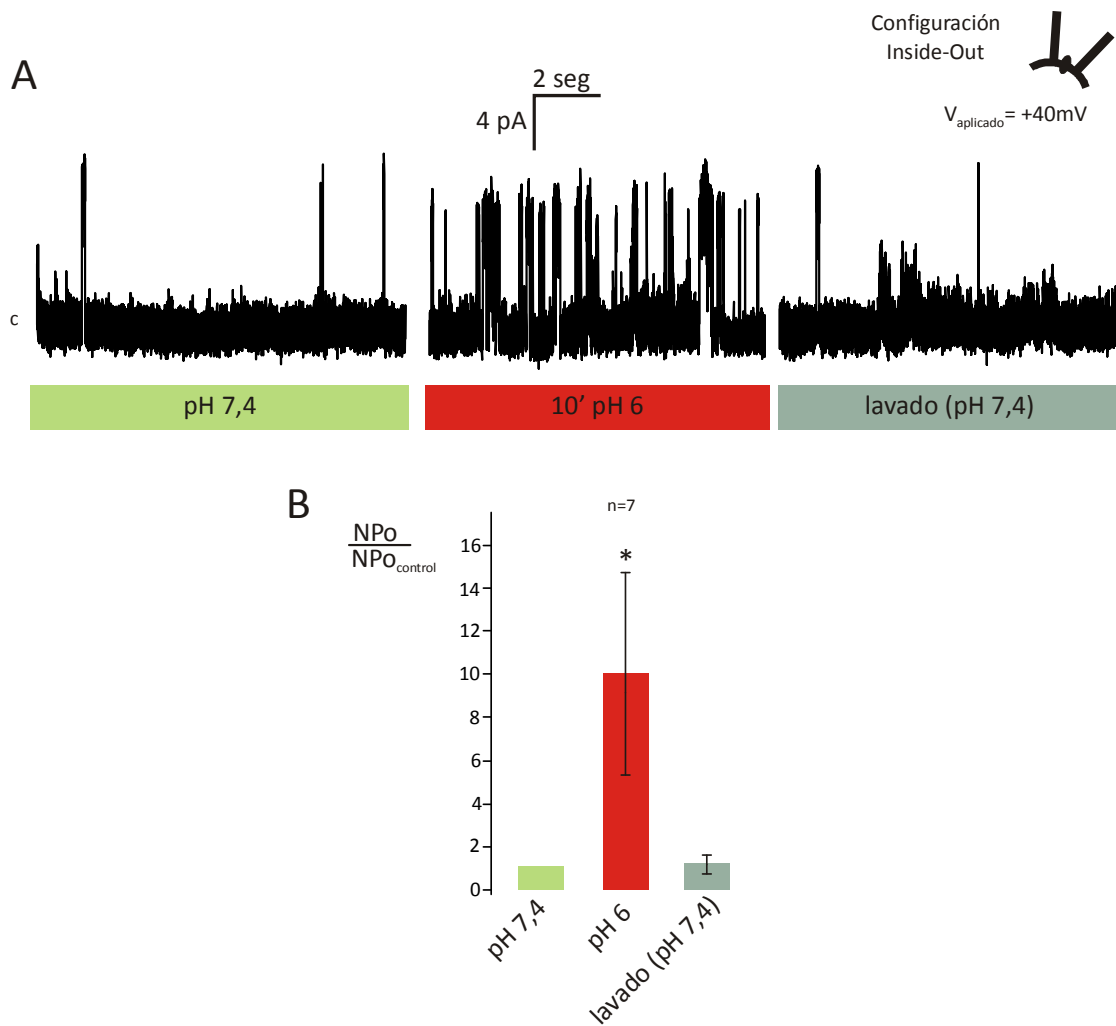
Otra de las características de este canal que puede variar según el tejido en que esté expresado, es su activación o inhibición inducida por el descenso del pH intracelular. Evaluamos el efecto de la disminución del pH intracelular de 7,4 a 6 en 11 células en la configuración de IO, observando que en 4 de las mismas, la modificación

del pH no tuvo efectos significativos sobre la actividad del canal BK<sub>Ca</sub>, mientras que en 7 mostró una clara activación llevando su actividad a valores, en promedio, 10 veces mayores, como se puede observar en la figura 3.3.6. En un trabajo previo, nuestro grupo demostró que la disminución del pH inhibe la actividad del canal BK<sub>Ca</sub> en las células de músculo liso de la arteria mamaria humana [142]; sin embargo, el efecto en las CML de la AUH parece ser el contrario. Esto señala que el efecto de la disminución del pH sobre la actividad de la corriente BK<sub>Ca</sub> no puede ser extrapolada de un tejido a otro sin un previo análisis.

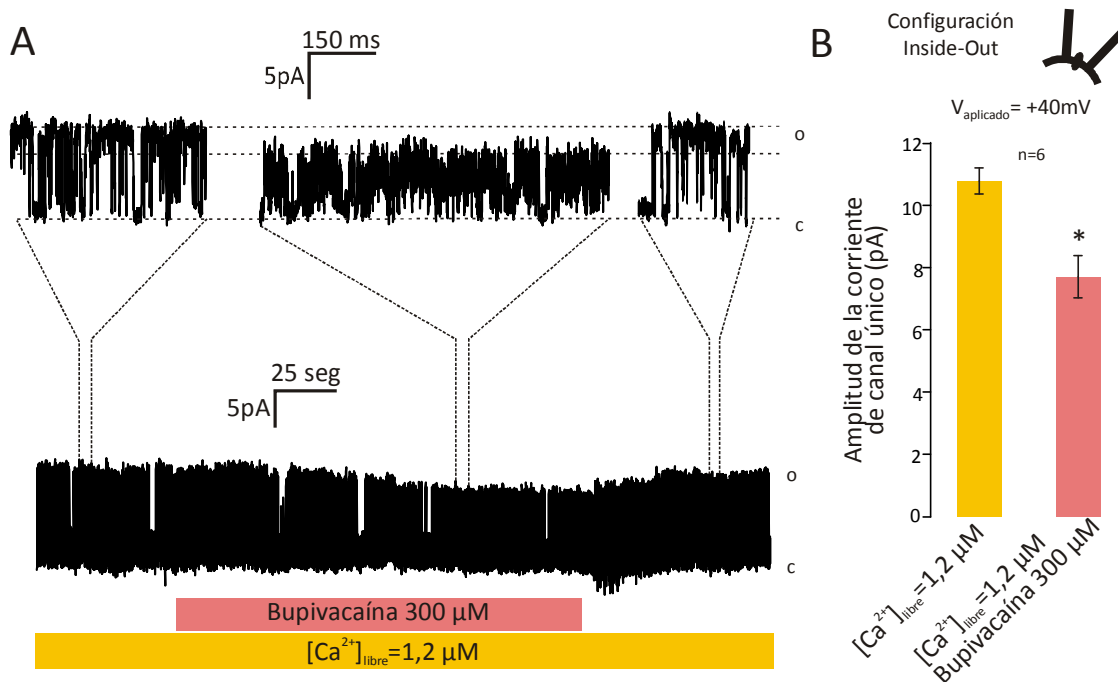
Otro resultado interesante y novedoso que encontramos durante los ensayos de sensibilidad farmacológica de este canal, es el efecto inhibitor que produce la bupivacaína. Esta droga es un anestésico local comúnmente utilizado en la anestesia epidural durante el parto que ha demostrado tener un efecto contráctil en anillos de AUH *in vitro* [143,144], aunque se desconocían los mecanismos por los cuales generaba este efecto. Por otro lado, la bupivacaína también se usa como inhibidor de canales de K<sup>+</sup> K<sub>2P</sub> para poner en evidencia este tipo de canales en distintos tipos celulares [22,40].

Como puede observarse en la figura 3.3.7, la bupivacaína 300 μM genera una disminución en la amplitud de corriente BK<sub>Ca</sub> de canal único induciendo un modo *flickery* del estado abierto del canal. Este comportamiento es típico de los bloqueantes rápidos con acción en el poro del canal, y difiere del mecanismo de bloqueo de esta droga descrito para otros tipos de canales de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> [145,146]. El efecto de la bupivacaína sobre el canal BK<sub>Ca</sub> es completamente novedoso y relevante desde el punto de vista fisiológico para el músculo liso vascular; por ello realizamos una caracterización farmacológica y biofísica del efecto del mismo que fue publicada recientemente y que se adjunta como anexo de resultados de esta tesis, ya que no formaba parte de los objetivos iniciales de la misma.





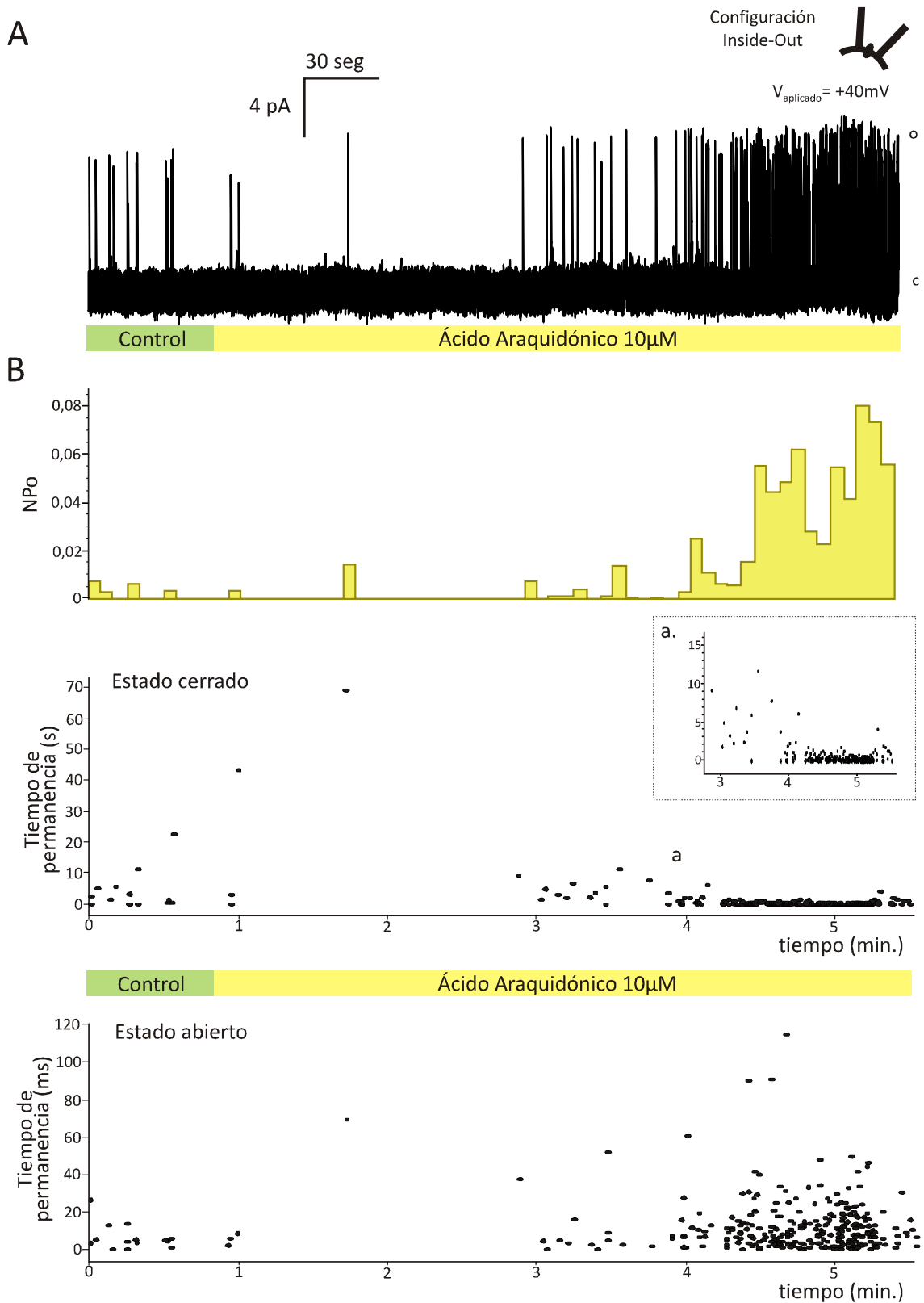
**Figura 3.3.6: Activación del canal BK<sub>Ca</sub> por disminución del pH intracelular.** A: registro típico de la activación de la corriente BK<sub>Ca</sub> por la disminución del pH intracelular de 7,4 a 6, en las CML de la AUH registrado en condiciones de IO a un potencial de membrana de +40mV. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Valores medios y sus respectivos errores de las relaciones entre las NPo en cada una de las condiciones, normalizadas respecto al valor del control en pH 7,4. El símbolo \* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control y al lavado (ANOVA, p<0,05).



**Figura 3.3.7: Inhibición del canal BK<sub>Ca</sub> por bupivacaína 300 μM.** A: Registro típico del efecto de bupivacaína 300 μM sobre la corriente BK<sub>Ca</sub> activado con 1,2 μM de Ca<sup>2+</sup> intracelular, en la configuración de IO a +40 mV de potencial de membrana. c y o indican los niveles de corriente de los estado cerrado y abierto respectivamente. B: Valores medios de la amplitud de la corriente BK<sub>Ca</sub> obtenidos a partir de 6 registros como los presentados en A, en condiciones control y en presencia de bupivacaína 300 μM. El símbolo \* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control (test de t de Student, p<0,05).

#### EFFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) SOBRE LA CORRIENTE BK<sub>Ca</sub> A NIVEL DE CANAL ÚNICO.

Para evaluar el efecto del AA sobre el canal BK<sub>Ca</sub>, trabajamos en la configuración de IO en presencia de 4-AP 5 mM en la pipeta. Una vez identificada la presencia del canal en el patch en base a su conductancia, se fijó el potencial de membrana a +40 mV y se perfundió en la solución del baño (en contacto con la cara intracelular de la membrana) la solución control con el agregado de AA 10 μM. En la figura 3.3.8 A se muestra un registro típico de la activación de la corriente BK<sub>Ca</sub> generada por AA y en la figura 3.3.8 B, un gráfico de NPo vs tiempo de perfusión. Observamos una lenta, pero clara activación del canal a partir de los 3 minutos de perfusión, que deriva en un incremento significativo en el valor de la NPo de 0,01433 ± 0,01030 en condiciones control a una NPo de 0,13098 ± 0,06342 (n=6) luego de 4 minutos en contacto con el AA 10 μM (p<0,05) (figura 3.3.9 A).



**Figura 3.3.8: Activación del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  por el ácido araquidónico  $10\mu\text{M}$ .** A: Registro típico de la activación del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  por el ácido araquidónico  $10\mu\text{M}$  en las CML de la AUH registrado a un potencial de membrana de  $+40\text{mV}$  y en condiciones de IO. El ácido araquidónico fue agregado desde la solución del baño entrando en contacto con la cara intracelular de la membrana, y la solución control contiene el solvente del mismo.....

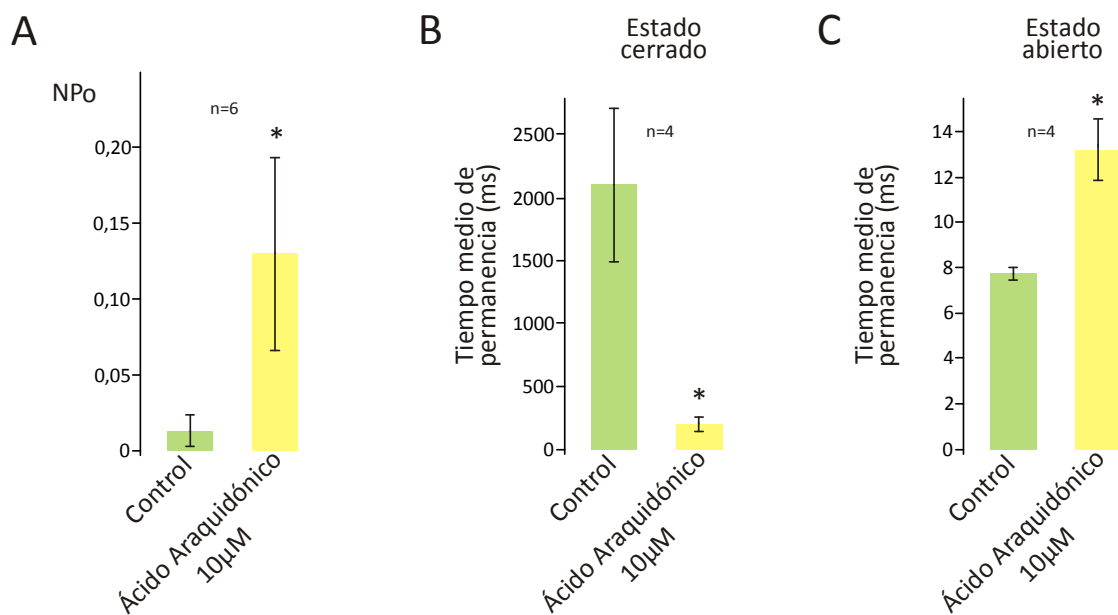
Cabe destacar, que el AA posee además un efecto desestabilizador de la membrana, que lleva a que luego de unos 7 minutos en contacto con la misma se observe, en la mayoría de los casos, la destrucción del sello. Esto dificulta mucho el análisis del efecto del mismo, dado que como se observa claramente en la figura 3.3.8 B, la NPo está aún llegando al estado estacionario en los tiempos en que la desestabilización se hace visible. Esto genera una mayor dispersión en los resultados dado que el análisis se realizó a los 4 minutos, donde la activación ya es significativa y el daño en la membrana no está presente, pero aún no se ha llegado a un estado estacionario de activación.

Con el fin de determinar si el aumento en la actividad del canal BK<sub>Ca</sub> generado por el AA se debe a un aumento del tiempo de permanencia (en inglés, *dwell time*) en el estado abierto del canal, a una disminución del tiempo de permanencia en el cerrado o al conjunto de las dos, se realizaron gráficos de estabilidad de tiempo de permanencia de estado cerrado y de estado abierto durante el agregado de ácido araquidónico en la células que presentaban una sola copia del canal. Los datos para dichos gráficos se obtuvieron a partir de los registros idealizados generados por el criterio del 50% de la amplitud como valor umbral (en inglés *half-amplitude threshold criterion*). Luego de obtener los datos del tiempo de permanencia en el estado cerrado y abierto de cada apertura o cierre del canal, se construyen estos gráficos que simbolizan la secuencia temporal de los tiempos de permanencia del canal en los estados cerrado o abierto que suceden a lo largo del registro donde se agrega el AA. En la figura 3.3.8 C y D se presentan los gráficos de estabilidad típicos, donde observamos que a medida que se perfunde la solución con AA, el canal permanece una menor cantidad de tiempo en el estado cerrado (C) y una mayor cantidad de tiempo en el estado abierto (D). En la figura 3.3.9 B y C podemos observar los tiempos de

---

**Figura 3.3.8 (continuación):** c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Gráfico de estabilidad de NPo durante el agregado de AA obtenido a partir de los valores de NPo calculados cada 5 segundos del registro, graficados en función del tiempo de perfusión. C y D: Gráficos de estabilidad de tiempo de permanencia (en inglés, *dwell time*) en los estados cerrado (C) y abierto (D) durante el agregado de AA. Cada punto representa el tiempo en el cual el evento (de apertura o cierre) se inició y el tiempo que permaneció en ese estado. Los mismos se obtuvieron a partir del registro idealizado presentado en A bajo el criterio del 50% de la amplitud como valor umbral.

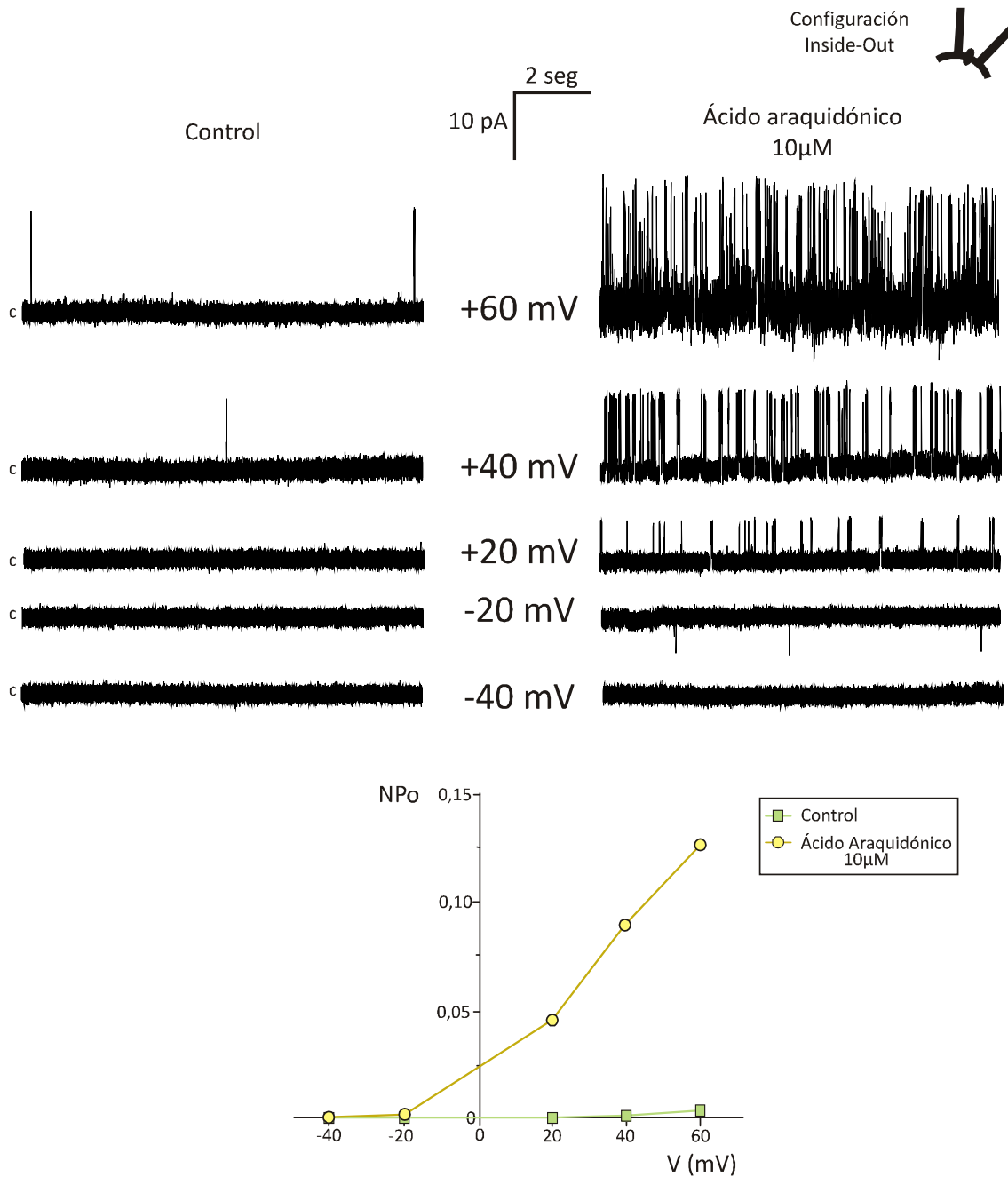
permanencia medios para el estado cerrado y el estado abierto obtenidos en las condiciones control y luego de 4 minutos de perfusión de AA en 4 células diferentes. Se observa que la disminución en el tiempo de permanencia en el estado cerrado (de 2090,86 a 208,32 ms) fue superior al aumento del tiempo de permanencia del estado abierto (de 7,78 a 13,23 ms). Este análisis permite observar que tanto la disminución del tiempo de permanencia en el estado cerrado, como el aumento del mismo en el estado abierto son responsables del aumento en la probabilidad de apertura del canal, aunque el efecto sobre el estado cerrado parece ser el más relevante.



**Figura 3.3.9: Valores medios de NPo y tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado del canal BK<sub>Ca</sub> generados por la activación por el ácido araquidónico 10 µM.** A: Valores medios de las NPo y sus respectivos errores en la condición control y luego de 4 minutos de perfusión con AA 10 µM obtenidos a partir de 6 patches. B y C: Valores medios de los tiempos de permanencia en los estados cerrados (B) y abierto (C) y sus respectivos errores en la condición control y luego de 4 minutos de perfusión con AA 10 µM obtenidos a partir de los registros idealizados de 4 patches. El símbolo \* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control (test de t de Student, p<0,05).

Si bien fue imposible obtener un estado estacionario de la actividad del canal en presencia de AA debido a la inestabilidad que genera en el sello, se pudieron obtener registros a varios potenciales de membrana alrededor de los 4 minutos. A partir de estos registros se pudo obtener una curva NPo vs voltaje en condiciones control y en presencia de AA que se muestra en la figura 3.3.10. Como surge claramente de la curva, la activación por AA no sólo potencia la actividad del canal a

los potenciales donde el mismo había sido registrado en la condición control, sino que además permite observar actividad significativa del canal a potenciales hiperpolarizados, donde inicialmente era muy baja.

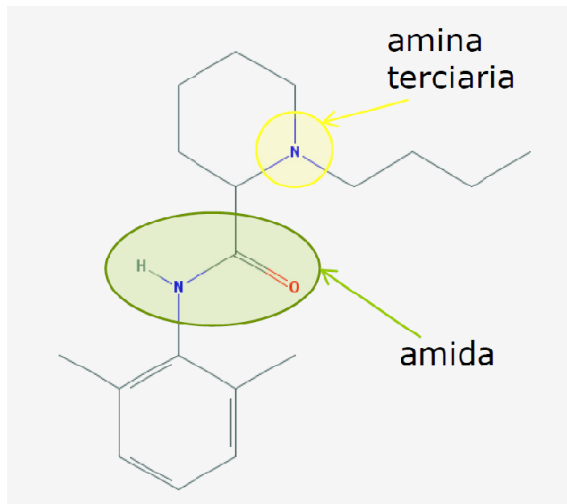


**Figura 3.3.10: Dependencia del voltaje de la activación del canal BK<sub>Ca</sub> por AA 10 µM.** A: Registros típicos a distintos valores de potencial de membrana de la activación del canal BK<sub>Ca</sub> por el AA 10 µM en las CML de la AUH registrado en condiciones de IO. El AA fue agregado desde la solución del baño entrando en contacto con la cara intracelular de la membrana, y la solución control contiene el solvente del AA. c indica el nivel de corriente del estado cerrado del canal. B: Curvas NPo -V obtenida a partir los registros de 30 segundos similares a los presentados en A.

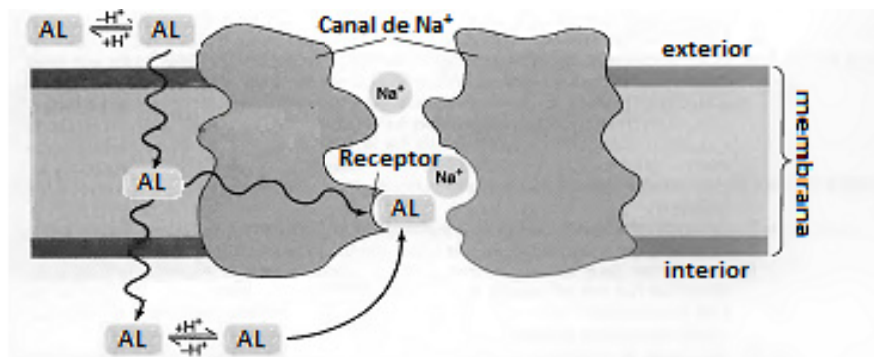
### 3.4: ANEXO DE RESULTADOS:

#### CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN POR BUPIVACAÍNA DEL CANAL BK<sub>Ca</sub> EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO (CML) DE LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH).

La bupivacaína es un anestésico local perteneciente al grupo de las aminoamidas (figura 3.A.1). Su acción terapéutica como anestésico generalmente se relaciona con su capacidad de inhibir los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje al unirse a su estado inactivado desde la región intracelular de la membrana (figura 3.A.2) [146]. Sin embargo, existen evidencias bibliográficas de que además la bupivacaína puede inhibir distintos canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Kv1.1, KCNQ2/Q3 y HERG) [147], canales K<sub>ATP</sub> y canales K<sub>2P</sub> [148,149]. El único mecanismo de bloqueo de canales de K<sup>+</sup> conocido es el propuesto por Nilsson *et al.* [145] para dos tipos de canales K<sub>V</sub> donde se observa un bloqueo del estado abierto del canal, que se caracteriza por un bloqueo dependiente del tiempo en las corrientes macroscópicas (figura 3.A.2, esquema central). Por otro lado, como se mencionó en el capítulo de resultados de esta tesis, esta droga posee efectos contráctiles en la arteria umbilical humana (AUH) *in vitro*, cuyo mecanismo aún no está dilucidado [143,144]. El efecto de bupivacaína sobre el canal de K<sup>+</sup> de alta conductancia sensible al voltaje y al calcio (BK<sub>Ca</sub>), altamente expresado en el músculo liso vascular, no había sido descrito ni explorado en ningún tipo celular. Recientemente hemos publicado un trabajo utilizando las células de músculo liso (CML) de la AUH con resultados que demuestran que bupivacaína tiene un efecto inhibitor sobre dicho canal mediante un mecanismo de acción diferente al descrito para otros tipos de canales [150]. A continuación se describen en detalle los resultados obtenidos.

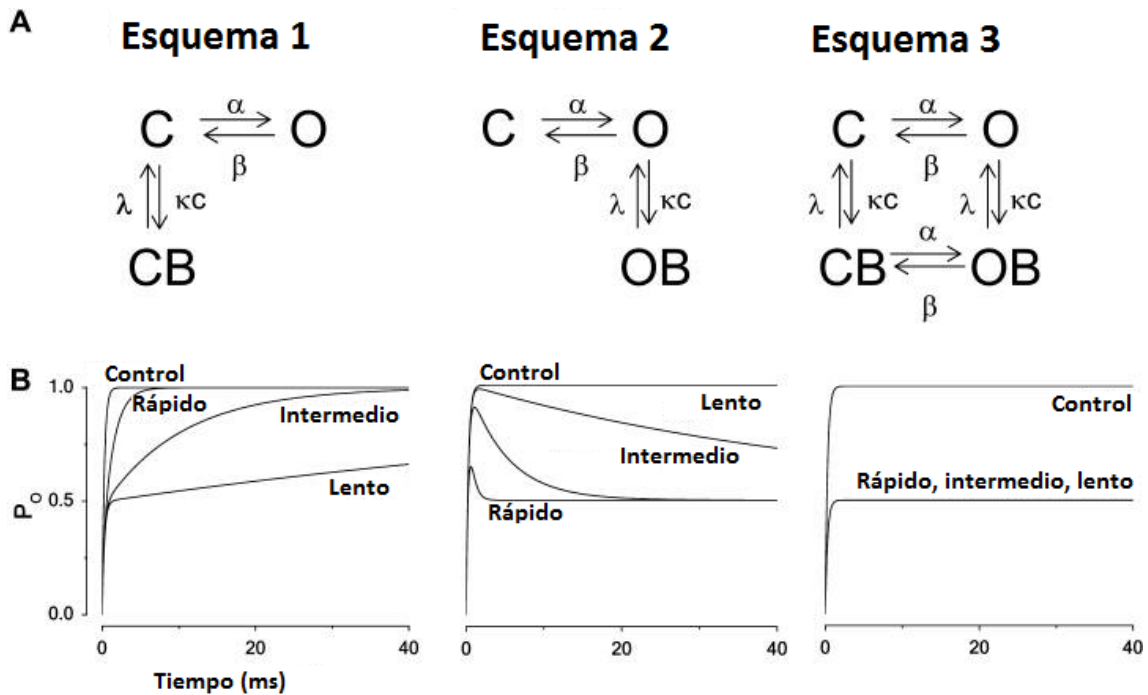


**Figura 3.A.1:** Estructura química de la bupivacaína.



**Figura 3.A.2:** Mecanismo de acción de la bupivacaína como anestésico local. Los anestésicos locales ejercen su acción terapéutica mediante el bloqueo de los canales de Na<sup>+</sup> a nivel neuronal. Al ser bases débiles difunden a través de la membrana en su forma no cargada, y una vez en el espacio intracelular se protonan. Esta última forma cargada es la que finalmente se une al canal en el estado inactivado, dificultando la recuperación de la inactivación y a consecuencia de ello, disminuyendo la excitabilidad del canal y la célula.



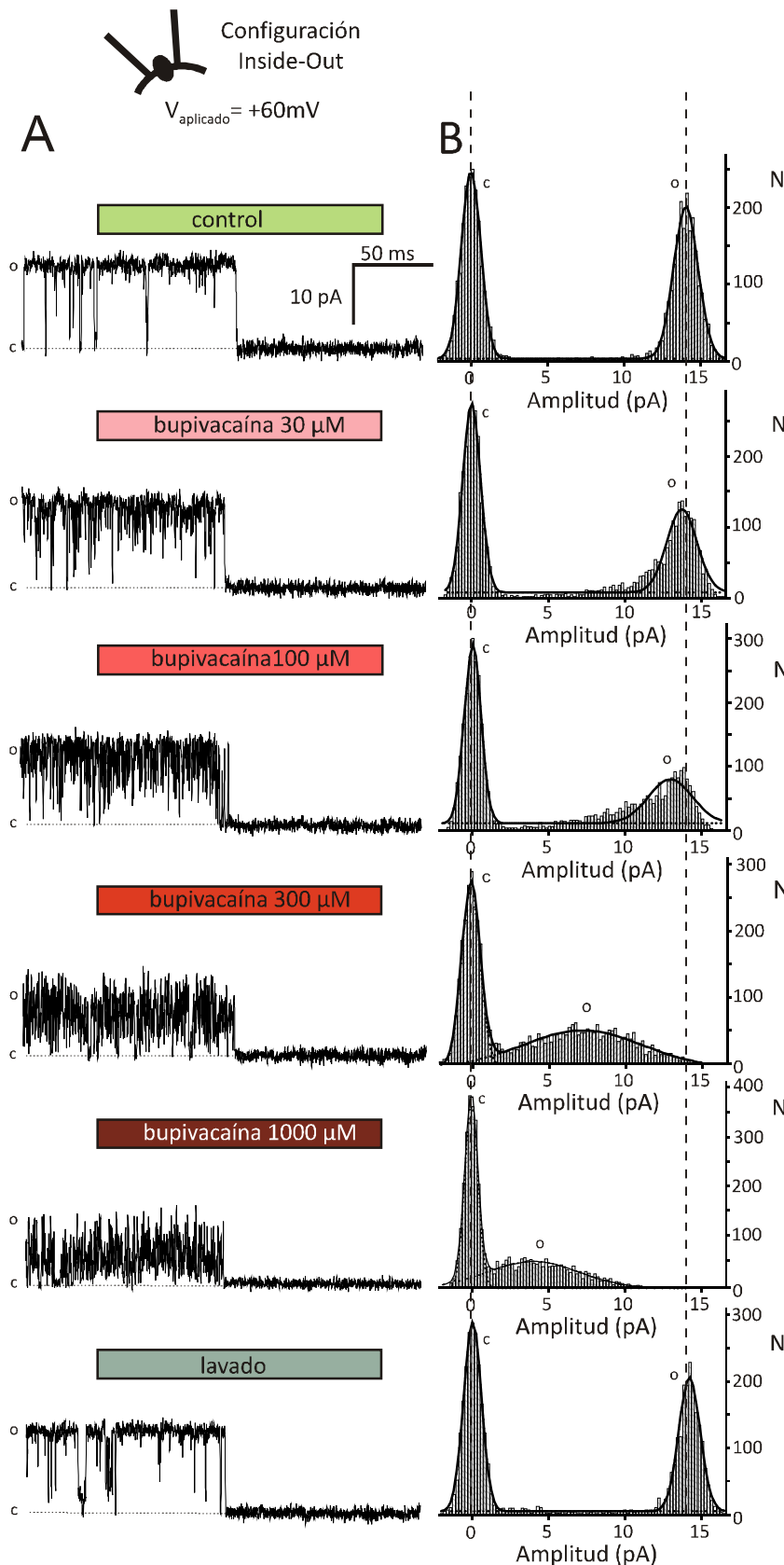


**Figura 3.A.3: Mecanismos principales de bloqueo de canales sin inactivación:** A. Esquemas cinéticos, donde C y O representan los estados cerrado (en inglés, closed) y abierto (en inglés, open) del canal sin unión del bloqueante y, CB y OB representan los estados cerrado y abierto (pero no conductivo) del canal unido al bloqueante;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son las constantes de velocidad y  $c$  es la concentración de bloqueante. B. Cursos temporales de la probabilidad de apertura para los distintos esquemas presentados en A.

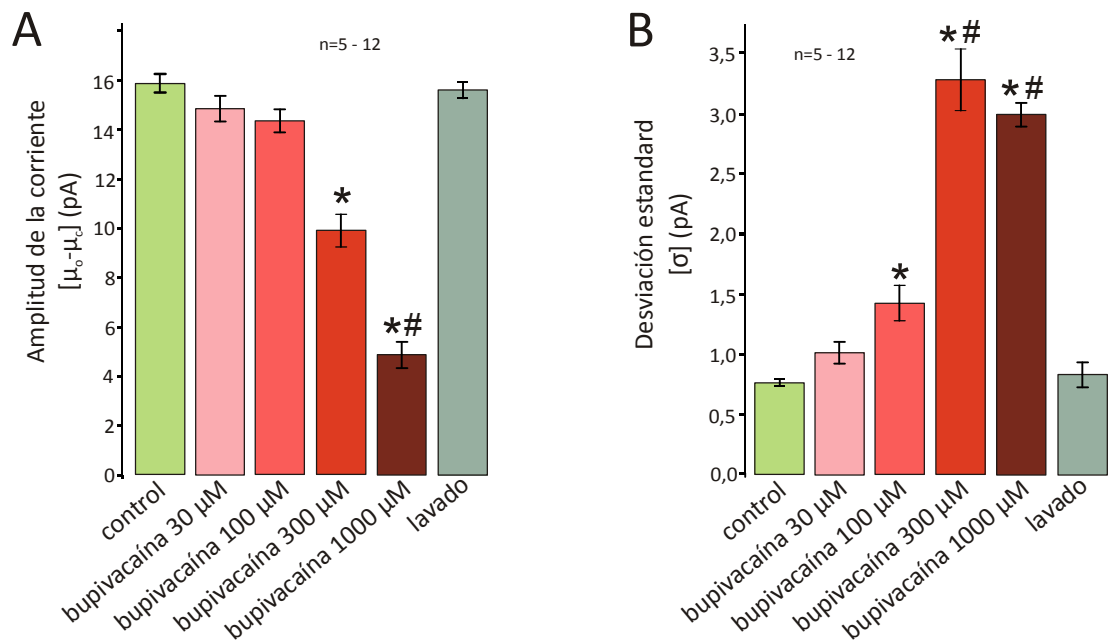
Para caracterizar el efecto de la bupivacaína sobre la corriente mediada por canales  $BK_{Ca}$ , utilizamos la técnica de patch-clamp en las configuraciones de *inside-out* (IO) y *whole-cell* (WC) utilizando CML aisladas de la AUH. En la configuración de IO, mediante protocolos de fijación de voltaje a distintos valores de potencial (+20, +40, +60 y +80 mV) registramos las corrientes de canal único, en ausencia y en presencia de la droga, utilizando concentraciones de  $K^+$  simétrico. El efecto de bupivacaína se estudió agregando a la solución del baño la droga en distintas concentraciones: 30, 100, 300 y 1000  $\mu$ M.

En la figura 3.A.4. A, se presentan registros típicos de una apertura de canal único a un potencial de +60 mV en las condiciones control; en presencia de bupivacaína 30, 100, 300 y 1000  $\mu$ M en la solución del baño; y luego del lavado de la droga. Estos registros nos permitieron observar que la bupivacaína, en forma dependiente de la concentración, produce una disminución de la amplitud de la corriente unitaria generando un comportamiento *flickery* del estado abierto del canal, el cual se observa como un aumento del ruido en el nivel de corriente. Para cuantificar

estos efectos, realizamos histogramas de distribución de amplitud tomando una porción de registro de canal único de 250 ms, donde el canal permaneciera el 50% del tiempo en el estado abierto. Luego, realizamos un ajuste no lineal de los histogramas con una distribución de Gauss de dos componentes por el método de cuadrados mínimos Levenberg-Marquardt, que permitió obtener el valor medio ( $\mu$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ) de los picos de amplitud de corriente correspondientes a los estados cerrado y abierto (figura 3.A.4 B). De esta manera, el valor de la amplitud de la corriente unitaria a distintos potenciales y, en ausencia y en presencia de las diferentes concentraciones de bupivacaína ensayadas, fue calculado como la diferencia entre los valores medios de los estados abierto y cerrado ( $\mu = \mu_o - \mu_c$ ), mientras que el efecto *flickery* inducido en el estado abierto del canal fue cuantificado con el valor de la desviación estándar del pico de corriente del histograma correspondiente al estado abierto ( $\sigma_o$ ). En las figuras 3.A.5 A y B, se presentan los valores medios de amplitud de corriente de canal único ( $\mu = \mu_o - \mu_c$ ) y de ruido ( $\sigma_o$ ) en función de la concentración de bupivacaína obtenidos a un potencial de +60 mV. Podemos observar que a medida que se aumenta la concentración de bupivacaína ensayada, la amplitud de la corriente disminuye y el ruido ( $\sigma_o$ ) aumenta de manera dependiente de la concentración; además se observa que estos efectos son completamente reversibles luego del lavado de la droga. La máxima concentración de bupivacaína ensayada (1000  $\mu$ M) reduce la amplitud de la corriente de canal único a un tercio de su valor inicial, mientras que aumenta aproximadamente cuatro veces el ruido de la misma en el estado abierto.



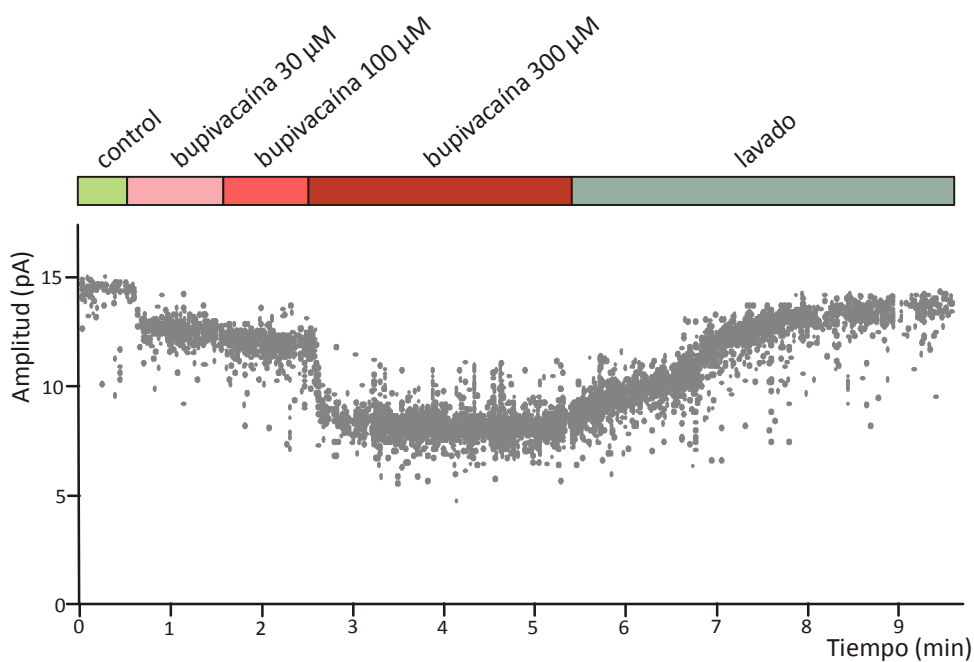
**Figura 3.A.4:** Inhibición dependiente de la concentración del canal BK<sub>Ca</sub> por bupivacaína. A: registros típicos de una apertura de canal único de la corriente BK<sub>Ca</sub> en las CML de la AUH registrado en condiciones de IO a un potencial de membrana de +60mV. En los distintos paneles se muestra el efecto del aumento de la concentración de bupivacaína, y su posterior lavado, sobre el estado abierto del canal. Todos los registros provienen de un mismo patch, y representan 250 ms de registro elegidos de manera que el canal permanezca la mitad del tiempo en el estado abierto. B: Histogramas de amplitud correspondientes a los registros mostrados en A (ancho del cajón de 0,2 pA) y su respectivo ajuste con una función de Gauss. Los niveles correspondientes a los estados cerrado y abierto se indican con c y o respectivamente.



**Figura 3.A.5: Valores medios de la inhibición dependiente de la concentración del canal BK<sub>Ca</sub> por la bupivacaína.** A: Valores medios de amplitud de corriente de canal único a +60 mV ( $\mu_o - \mu_c$ ) con sus respectivos errores en condición control, en presencia de bupivacaína 30, 100, 300 y 1000  $\mu$ M y su posterior lavado, obtenidos a partir del ajuste de 5-12 histogramas equivalentes a los presentados en la figura 3.A.4 B, todos obtenidos de distintos patches. Los símbolos \* y # indican diferencia estadísticamente significativa respecto al valor de la condición control y a bupivacaína 300  $\mu$ M, respectivamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ). B: Valores medios de desviación estándar de amplitud de corriente de canal único en estado abierto a +60 mV ( $\sigma_o$ ) con sus respectivos errores en condición control, en presencia de bupivacaína 30, 100, 300 y 1000  $\mu$ M y su posterior lavado, obtenidos a partir del ajuste de 5-12 histogramas equivalentes a los presentados en la figura 3.A.4 B. Los símbolos \* y # indican diferencia estadísticamente significativa respecto al valor de la condición control y a bupivacaína 100  $\mu$ M respectivamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

El efecto inhibitorio de la bupivacaína es veloz, tanto en su aparición como en su recuperación posterior al lavado. Luego de 30 segundos de perfusión con bupivacaína a las distintas concentraciones se llega a un estado estacionario en la disminución del valor de la amplitud, mientras que el efecto desaparece completamente luego de 1 minuto de lavado. Esto puede observarse en la figura 3.A.6 donde se muestra un gráfico típico de estabilidad del valor de la amplitud de canal único para la corriente BK<sub>Ca</sub> durante el agregado de bupivacaína 30, 100 y 300  $\mu$ M y su posterior lavado. Los gráficos de estabilidad son una herramienta útil para analizar los cursos temporales de diversos fenómenos. Básicamente consisten en el seguimiento de un único parámetro (NPO, tiempo de permanencia en un estado, amplitud de corriente, etc.) durante el tiempo del registro donde se ensayan distintas condiciones.

De esta manera permiten identificar en qué momento el parámetro que se está analizando llega a un valor constante (que no varía en el tiempo) ante un cambio de condición, lo que se define como un estado estacionario y, a su vez permiten analizar el tiempo transcurrido en el pasaje de un estado estacionario al otro generado por un cambio de condición. En este caso en particular, se presentan los valores de amplitud de corriente de canal único en función del tiempo en un registro donde se probaron las concentraciones de bupivacaína antes mencionadas y su posterior lavado. Los valores del gráfico fueron obtenidos a partir de un registro idealizado por medio del criterio del 50% de amplitud como valor umbral, y del análisis del mismo podemos observar la rapidez con la cual la disminución en la amplitud de la corriente generada por las diversas concentraciones de la droga alcanza el estado estacionario, como así también ocurre con la velocidad de recuperación de la misma por el lavado de la droga.



**Figura 3.A.6: Curso temporal de la inhibición del canal BK<sub>Ca</sub> por la bupivacaína.** Gráfico típico de estabilidad de amplitud de corriente de canal único durante el agregado de bupivacaína 30, 100 y 300 µM, y su posterior lavado. Cada punto representa el valor de la amplitud de corriente unitaria de cada apertura del registro donde se agregaron las distintas concentraciones de bupivacaína, y su posterior lavado, en función de su respectivo tiempo de aparición en el mismo. Los valores se obtuvieron a partir del registro idealizado bajo el criterio del 50% de la amplitud como valor umbral.

Estudiamos también la dependencia del voltaje de la inhibición de la corriente BK<sub>Ca</sub> por bupivacaína. A partir de los valores medios de amplitud de corriente de canal

único obtenidos para cada concentración de bupivacaína a distintos valores de potencial, construimos las curvas dosis-respuesta de inhibición normalizando los valores de amplitud de corriente en presencia de bupivacaína ( $i_B$ ) respecto a la amplitud de corriente inicial sin bloqueo ( $i_C$ , control). Para cada potencial evaluado, graficamos esta relación ( $i_B/i_C$ ) en función del logaritmo de la concentración de bupivacaína (figura 3.A.7 A) y ajustamos las mismas con la siguiente función sigmoidea, que nos permite obtener la constante de disociación ( $K_D$ ) de la droga:

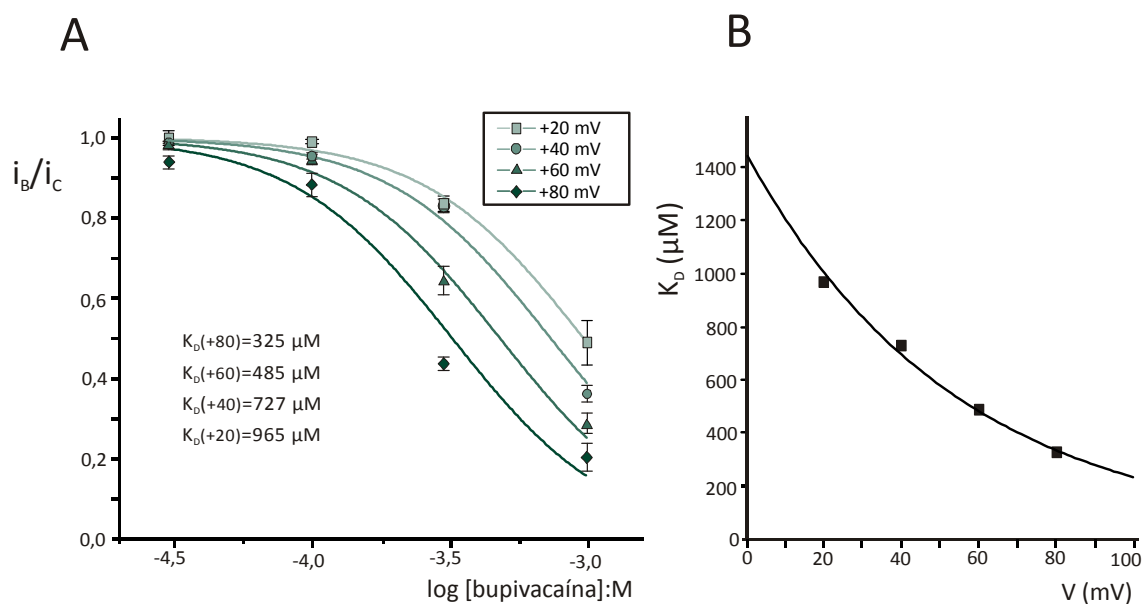
$$\frac{i_B}{i_C} = \frac{1}{1 + 10^{(\log CI_{50} - x) \times h}}$$

$K_D$  es la concentración de bupivacaína que produce una inhibición del 50% de la corriente de canal único ( $CI_{50}$ ,  $x$  es el logaritmo decimal de la concentración de bupivacaína y  $h$  es el coeficiente de Hill [151,152]. Observamos un claro desplazamiento de las curvas hacia la izquierda a medida que el potencial de membrana se hace más positivo, lo que indica un bloqueo dependiente del voltaje. Los valores de  $K_D$  calculados para cada valor de potencial testeado mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, mientras que no fue así para los valores del coeficiente de Hill (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

En la figura 3.A.7 B, se presentan los valores de  $K_D$  de la bupivacaína sobre el canal  $BK_{Ca}$  graficados en función del potencial de membrana. Esta relación puede ser ajustada con la siguiente función de decaimiento exponencial [151,152]:

$$K_D(V) = K_D(0) e^{\left(\frac{z\delta F(-V)}{RT}\right)}$$

donde  $K_D(0)$  es el valor de  $K_D$  a 0 mV,  $z$  es la valencia del bloqueante (+1 en este caso),  $V$  es el voltaje a través de la membrana,  $\delta$  es la distancia eléctrica (en inglés, *electrical distance*), que indica la localización del sitio de bloqueo de la bupivacaína expresada en términos de la fracción del campo eléctrico medidos desde la cara interna de la membrana, y  $RT/F$  es igual a 25,3 mV a 22°C [151,152]. A partir del mejor ajuste de la función (figura 3.A.7 B) obtuvimos una  $K_D(0)$  de 1444  $\mu$ M y un  $\delta$  de 0,46. El ajuste sugiere que el bloqueo de la corriente  $BK_{Ca}$  por bupivacaína es dependiente del voltaje, de manera tal que la despolarización de la membrana aumenta la afinidad de la droga por su sitio de acción.



**Figura 3.A.7: Inhibición dependiente del voltaje del canal BK<sub>Ca</sub> por la bupivacaína.** A: Curvas dosis-respuesta de reducción de la amplitud de la corriente BK<sub>Ca</sub> por bupivacaína a distintos potenciales, con el respectivo ajuste de una curva sigmoidea.  $i_c$  e  $i_B$ , indican la amplitud de la corriente en ausencia y presencia de bupivacaína. Se indica, además, el valor de la constante de disociación ( $K_D$ ) de la droga para cada voltaje obtenido a partir del ajuste ( $n=3-9$ ). B: Gráfico de los valores de las  $K_D$  obtenidas en C vs. voltaje y su ajuste a una función de decaimiento exponencial, que permite obtener la localización del sitio de bloqueo de la bupivacaína en el canal en términos de distancia eléctrica ( $\delta$ ).

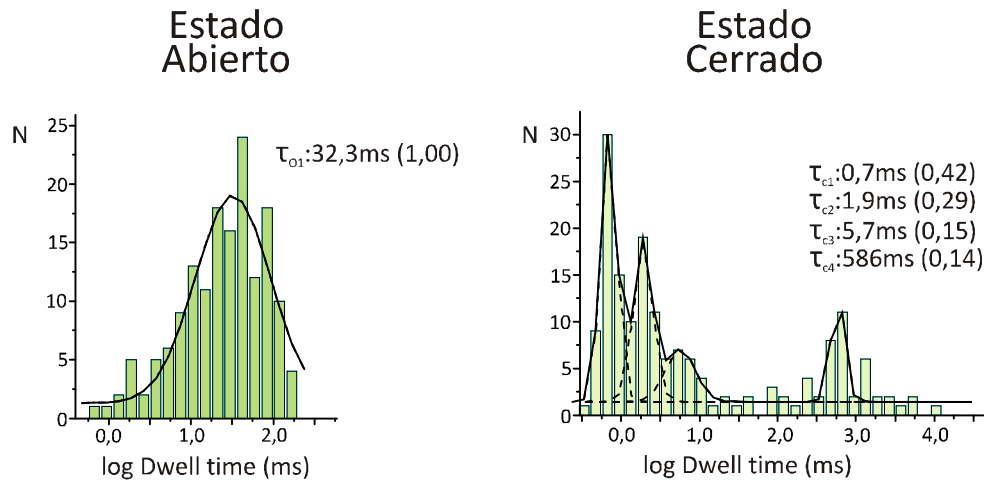
También analizamos el efecto de la bupivacaína sobre las propiedades cinéticas de canal único del canal BK<sub>Ca</sub>. Para ello obtuvimos los valores de tiempo de permanencia, en el estado abierto o cerrado, de cada apertura o cierre del canal a partir de los registros idealizados por medio del criterio del 50% de amplitud como valor umbral en las condiciones control y en presencia de bupivacaína 300  $\mu$ M. A partir de estos valores construimos las distribuciones de tiempo de permanencia de los estados abierto y cerrado en las condiciones control y en presencia de bupivacaína 300  $\mu$ M que se presentan en la figura 3.A.8. Estas distribuciones se logran generando un histograma donde los intervalos de clase (o cajones, en inglés, *bin*) representan el logaritmo decimal del tiempo de permanencia en el estado abierto o cerrado según corresponda. Cabe destacar que solo pudimos llevar a cabo dicho análisis en los casos en que el *patch* presentase una única copia del canal a estudiar, caso contrario generaría una subestimación en las distribuciones del estado cerrado.

El análisis de las distribuciones de tiempo de permanencia permite obtener el número de diferentes estados abiertos y cerrados que presenta el canal en las condiciones analizadas, como así también la constante de *dwell time* ( $\tau$ ) de cada uno de esos estados y su contribución al estado abierto o cerrado. Estos parámetros surgen del ajuste de la distribución con una función de Gauss con el mínimo número de componentes con los que se logre la mejor correlación entre la distribución y el ajuste (en inglés, *maximal likelihood ratio test*). Dicho análisis indica que el canal presenta, en las condiciones analizadas, tantos estados abiertos o cerrados (según la distribución que se esté analizando) como componentes presente el ajuste. Además, cada componente representa y caracteriza cada uno de estos estados, dado que su media ( $\mu$ ) es el logaritmo de la constante de *dwell time*, y el área bajo la curva representa la frecuencia (normalizada en 1) con la que el canal se presenta en dicho estado sobre el total de las veces que se abre o se cierra. La constante de *dwell time* es indicativa del tiempo que el canal permanece cerrado o abierto cuando se presenta en dicho estado.

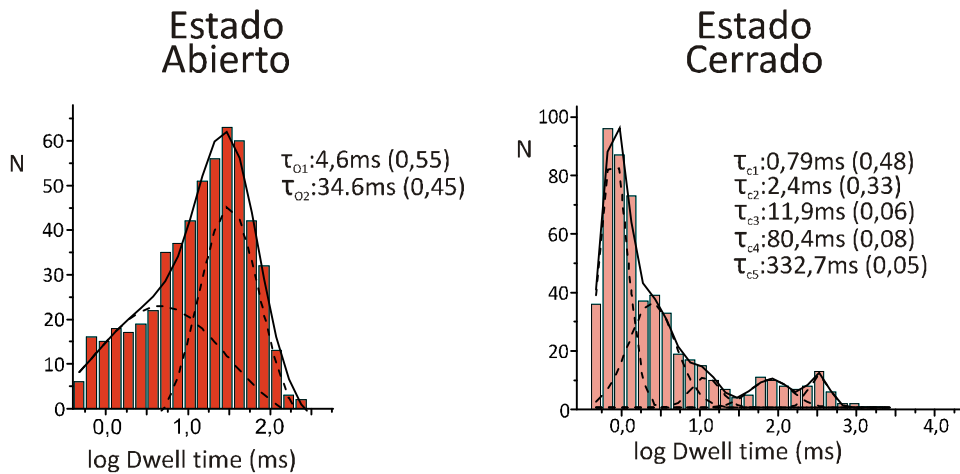
En base a lo presentado en la figura 3.A.8 podemos observar que en las condiciones control el canal BK<sub>Ca</sub> presenta al menos 4 estados cerrados y 1 abierto, mientras que en presencia de bupivacaína 300  $\mu$ M aparece un nuevo estado abierto de corta duración ( $\tau_{O1}$ = 4,6 ms) y un nuevo estado cerrado de duración intermedia ( $\tau_{C4}$ = 80 ms), además de modificarse la proporción y duración de los estados respecto a la condición control favoreciendo tiempos menores de cerrado y abierto.



## CONDICIONES CONTROL



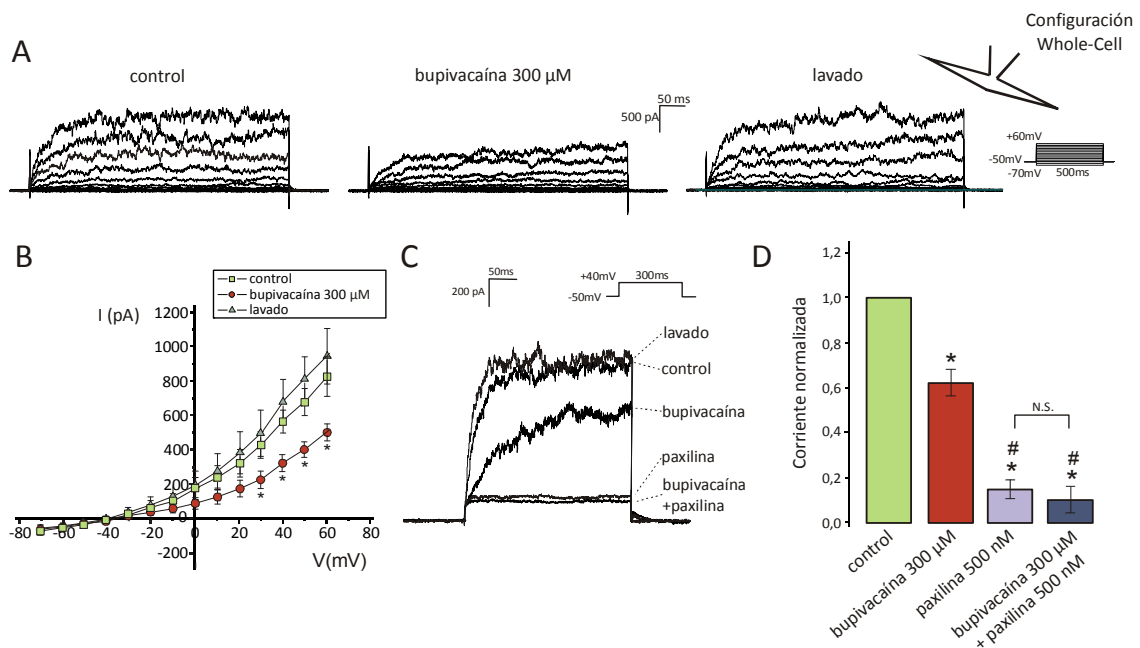
## BUPIVACAÍNA 300 $\mu\text{M}$



**Figura 3.A.8: Análisis cinético de canal único de la corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y su modificación por bupivacaina 300  $\mu\text{M}$ .** Histogramas representativos de los tiempos de permanencia en los estados abierto (izquierda) y cerrado (derecha) del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en ausencia (A) o en presencia (B) de bupivacaina 300  $\mu\text{M}$  y sus respectivos ajustes con una función de Gauss. Los datos fueron obtenidos a partir de un registro de *inside-out* a un potencial de +60 mV. Las líneas punteadas representan la distribución de los distintos componentes exponenciales, determinados por el “*maximal likelihood ratio test*”.  $\tau_o$  y  $\tau_c$  indican los valores de constante de *dwell time* para cada componente abierto (open) y cerrado respectivamente, acompañado de su peso relativo (entre paréntesis).

Con el objetivo de probar si la reducción en la amplitud de la corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  de canal único es suficiente para inducir la inhibición de las corrientes macroscópicas llevadas por este canal, realizamos una serie de experimentos donde registramos el

efecto de la bupivacaína 300  $\mu\text{M}$  sobre la corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en las CML de la AUH en la configuración de *whole cell*. Para ello trabajamos registrando las corrientes evocadas por una serie de pulsos (en inglés, *steps*) de voltaje de 500 ms de duración entre -70 mV y +60 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento (en inglés, *holding*) de -50 mV, y usando como control una solución extracelular estándar con el agregado de 4-AP 5 mM y una solución intracelular estándar con el agregado de ATP 5 mM, para bloquear los canales  $\text{K}_{\text{V}}$  y  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , respectivamente. Como podemos observar en la figura 3.A.9 C y D, en estas condiciones cerca del 85% de la corriente control, a potenciales despolarizados, es llevada por los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  sensibles a paxilina 500 nM (inhibidor selectivo para este tipo de canales). Esta corriente macroscópica fue parcialmente bloqueada al perfundir durante 3 minutos con una solución de bupivacaína 300  $\mu\text{M}$  (figura 3.A.9 A) y dicho efecto fue claramente reversible luego de 3 minutos de lavado (figura 3.A.9 A, B y C). En la figura 3.A.9 B se presentan las curvas obtenidas a partir de los valores medios de densidad de corriente vs. voltaje (I-V) para el estado estacionario de la corriente macroscópica en las condiciones control, luego del efecto estable de bupivacaína 300  $\mu\text{M}$  y luego del lavado de la droga. Posteriormente, perfundimos la misma célula con una solución con paxilina 500 nM y, luego de su estabilización, con paxilina 500 nM más bupivacaína 300  $\mu\text{M}$  con el objetivo de comparar los efectos de ambas drogas. Podemos observar que, mientras que paxilina bloquea prácticamente toda la corriente de *whole cell*, la bupivacaína inhibe sólo el 44% de la corriente control y que el efecto del agregado de las dos drogas juntas no presenta diferencias estadísticamente significativas con el agregado de paxilina sola (figura 3.A.9 C y D).



**Figura 3.A.9: Inhibición del componente BK<sub>Ca</sub> de las corrientes macroscópicas totales de las CML de la AUH por bupivacaína 300µM.** A: Registros representativos superpuestos de las corrientes macroscópicas obtenidas tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 10 mV, de 500 ms, entre -70 y +60 mV partiendo un potencial de mantenimiento de -50mV en condiciones control (panel izquierdo), luego del agregado de bupivacaína 300µM (panel central) y tras el lavado de la misma (panel derecho). B: Curvas de corriente media vs. voltaje en el estado estacionario, obtenidas en las mismas condiciones que en A (n=8). El símbolo \* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control (test de t de Student, p<0,05). C: Registros típicos superpuestos de corriente evocada por un pulso único de voltaje desde un potencial de mantenimiento de -50 mV hasta +40 mV en una célula que fue expuesta secuencialmente a las condiciones control, luego a bupivacaína 300 µM, al lavado de la bupivacaína, luego a paxilina 500 nM y finalmente a bupivacaína 300 µM más paxilina 500 nM. A la solución control y a la solución de bupivacaína 300 µM se les adicionó el solvente de la paxilina. D: Valores de corriente normalizados (respecto al control) medios con sus respectivos errores para el protocolo ensayado en C (n=3 - 10). Los símbolos \* y # representan diferencia estadísticamente significativa respecto al control y a bupivacaína 300 µM, respectivamente. (ANOVA, p<0,05)

Los resultados publicados en esta sección muestran que el anestésico local, bupivacaína posee una acción inhibitoria sobre el canal BK<sub>Ca</sub> en las CML de la AUH. Demostramos dicho efecto tanto en la configuración de *inside-out*, como a nivel de célula completa. La publicación de estos datos consiste en el primer antecedente bibliográfico que describe este efecto sobre este tipo de canal de elevada expresión e importante relevancia en el funcionamiento de las CMLV, como regulador de la contracción celular en la mayoría de los vasos sanguíneos.

Los resultados presentados a nivel de canal único demuestran que la bupivacaína es capaz de producir rápidamente y de manera reversible una reducción de la amplitud de la corriente unitaria del canal, induciendo además un modo *flickery* para el estado abierto del canal, indicado por un marcado aumento del ruido en el registro de las aperturas del canal. Pudimos observar este efecto tanto sobre el canal activado por una elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como a bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, donde la probabilidad de apertura es baja. Además, demostramos que el efecto inhibitorio de la bupivacaína sigue un mecanismo concentración y voltaje dependiente. Este último se caracterizó por una caída exponencial en el valor de  $K_D$  ( $\text{CI}_{50}$ ) con la despolarización de la membrana, favoreciéndose el bloqueo a potenciales más despolarizados (la  $K_D$  cae e-veces por cada despolarización de 54,7 mV). Es probable que esta dependencia del voltaje ponga en evidencia una facilitación de la entrada de la droga a la región del poro del canal generada por el campo eléctrico a través de la membrana. El cálculo de la distancia eléctrica permite sugerir que el sitio de unión para esta droga está localizado en, aproximadamente, un 46% del trayecto del campo eléctrico de la membrana medido desde su cara interna. Estos resultados concuerdan con los hallados para otros bloqueantes intracelulares rápidos del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  como el  $\text{Cs}^+$  y el  $\text{TEA}^+$  [153]. Finalmente, observamos que la bupivacaína, además de producir un cambio aparente de la conductancia del canal, también afectó a la cinética del mismo, induciendo a la aparición de dos nuevos estados (uno cerrado y otro abierto) y favoreciendo el pasaje del canal hacia los estados de duraciones más breves, tanto para los cierres como para las aperturas.

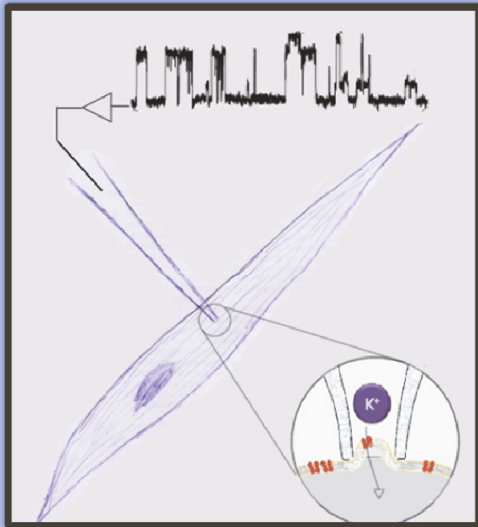
A nivel de célula completa, donde en nuestras condiciones de registro la corriente  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  representa cerca del 85% del total, la bupivacaína también presentó un efecto inhibitorio. Teniendo en cuenta que en presencia de paxilina 500 nM, no se observó un efecto inhibitorio aditivo de la bupivacaína al de este bloqueante selectivo de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , podemos concluir que la bupivacaína 300  $\mu\text{M}$  bloquea parcialmente la corriente macroscópica  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , en concordancia con los resultados obtenidos en canal único. Como mencionamos anteriormente, en algunos de los canales  $\text{K}_V$  había sido demostrado un bloqueo dependiente del tiempo, que indicaba una mayor afinidad de la droga por el estado abierto del canal [145]. Sin embargo, en

nuestras condiciones no observamos ningún tipo de bloqueo tiempo dependiente durante el pulso de despolarización; en contraste, observamos que la corriente en presencia de bupivacaína 300  $\mu\text{M}$  disminuye el valor de su amplitud respecto al control, pero manteniendo su cinética de activación para cada pulso. Así podemos concluir que el mecanismo de acción de la bupivacaína depende del tipo de canal que se esté estudiando. En base a los resultados de la cinética de canal único y del bloqueo independiente del tiempo observado en *whole cell*, podemos sugerir que en el caso del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , nos encontraríamos con que la bupivacaína se une tanto al estado cerrado como al abierto de canal (figura 3.A.3, panel de la derecha).

Focalizándose en la accesibilidad de la droga a su sitio de acción en el canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , a partir de los resultados de canal único respecto a distancia eléctrica y velocidad de establecimiento de un bloqueo estable, podemos sugerir que el sitio de acción está localizado en la cara interna del canal. Por otro lado, se encuentra descrito que al igual que el resto de los anestésicos locales, la bupivacaína puede atravesar la membrana celular y ejercer su mecanismo de bloqueo desde el lado intracelular de la misma [146]. Esto permitiría explicar por qué el efecto inhibitorio de la droga sobre el canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  se sigue observando en la configuración de célula completa aunque con mayor demora respecto al de *inside-out* (3 minutos vs. 30 segundos).

Como se detalló en la introducción de esta tesis, el canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  es un importante modulador de la función contráctil del músculo liso vascular, dado que su activación genera hiperpolarización de la membrana celular que indirectamente regula la contractilidad vascular. El efecto inhibitorio de la bupivacaína sobre este canal, permite explicar los resultados anteriores de Rossner *et al.* quienes describieron que la bupivacaína genera contracciones y despolarización en la AUH [143]. Esta droga es comúnmente utilizada en obstetricia durante el trabajo de parto [146]. Si bien muchos estudios indican que el uso de bupivacaína es seguro para la madre y el feto [154,155,156], también existen datos bibliográficos que describen la presencia de la droga en la sangre del cordón umbilical luego del parto [157]. Por su parte, Monuszko *et al.* [144], sugieren que una inyección intravascular accidental de bupivacaína ante un intento de anestesia epidural, puede generar concentraciones plasmáticas lo suficientemente elevadas como para causar contracción de los vasos umbilicales con

efectos adversos para el feto. Por lo tanto, los efectos de la bupivacaína sobre la AUH y el canal BK<sub>Ca</sub> deben ser tenidos en cuenta al utilizar esta droga como anestésico.



1. Introducción y objetivos
  2. Materiales y métodos
  3. Resultados
  - 4. Discusión y conclusiones**
  5. Bibliografía
-

## 4.1: DISCUSIÓN

El potencial de membrana ( $V_m$ ) de las células de músculo liso (CML) que forman la capa media de los vasos sanguíneos es fundamental en la regulación del tono vascular. Pequeñas variaciones, pueden generar cambios significativos en el diámetro de los mismos. Por este motivo, los canales de  $K^+$ , determinantes en la génesis y mantenimiento del mismo, tienen una gran relevancia en la fisiología vascular [18,19]. Los primeros resultados presentados en este trabajo de tesis muestran la existencia de una importante diversidad de canales iónicos en CML provenientes de un vaso humano. Del análisis de los registros de corriente de canal único obtenidos en el estado estacionario, pudimos estimar una densidad de 2 canales iónicos por *patch*. Este valor se puede utilizar para estimar la densidad general de canales en la membrana celular completa. Considerando que el área de membrana del *patch* es de aproximadamente  $1,5 \mu m^2$  (estimado en base al diámetro promedio de la punta de la micropipeta) y que el valor medio del área de membrana de una CML de la AUH es de  $2375 \mu m^2$  (obtenido a partir de los valores de capacidad de membrana medidos), un cálculo simple nos permite proponer la presencia de al menos 1,3 canales iónicos por  $\mu m^2$  y aproximadamente 3100 canales por célula. Este valor se encuentra incluido en el rango de valores propuesto por Nelson & Quayle (1995) como estimación del número de canales de  $K^+$  en una célula de músculo liso arterial (entre 1000 y 10.000 canales de  $K^+$  por célula) [18].

Por otro lado, la distribución de los valores de conductancias obtenidas a partir de las curvas de relación corriente voltaje (*i-V*), nos permitió diferenciar al menos 6 grupos distintos de conductancias que probablemente correspondan a 6 grupos diferentes de canales iónicos. El grado de dispersión en los valores de conductancia que forman cada grupo, sumado a los diferentes comportamientos observados dentro de los mismos (dependencia del voltaje de la actividad del canal, tiempos de apertura, rectificación de las curvas *i-V*), indicaría que los grupos podrían estar compuestos por más de un tipo de canal iónico.

Es importante señalar que si bien los valores de conductancia iónica son muy importantes como orientación para establecerla pertenencia de los canales encontrados a las distintas familias o subfamilias de canales de  $K^+$ , la identificación



final de los mismos debe ser confirmada por medio del estudio de las características biofísicas del canal y de su sensibilidad farmacológica, en el caso de que existan inhibidores selectivos comprobados.

Haciendo un análisis detallado de la bibliografía se observa que la conductancia de los canales iónicos a nivel de canal único, considerada una característica biofísica elemental del canal, puede variar significativamente dependiendo, fundamentalmente, de dos tipos de fenómenos: los fisiológicos o los derivados de las condiciones experimentales. Dentro de la variabilidad fisiológica encontramos que, el *splicing* alternativo, la formación de heteromultímeros, la asociación con subunidades accesorias y la modulación por segundos mensajeros, entre otros, pueden ser causa de dicha variabilidad [22,23,24,25]. Por otro lado, las condiciones experimentales de registro de corrientes de canal único, pueden ser determinantes del valor de conductancia. Factores importantes de este tipo de variación pueden ser, entre otros, el estudio de los canales expresados en sistemas heterólogos, la asimetría o simetría iónica del ion  $K^+$ , y la presencia de otros iones moduladores.

Del análisis realizado para los canales presentes en cada grupo en base a los valores de conductancia, sumado al grado de activación observado a distintos valores de potencial de membrana, podemos postular que, en general, se ha logrado identificar en las CML de la AUH distintos canales iónicos, que podrían ser responsables de funciones elementales dentro de este tipo celular. Por ejemplo, la determinación del potencial de membrana en el reposo (aquellos canales que presentan activación a potenciales hiperpolarizados); la modulación de la respuesta contráctil inducida por la despolarización (aquellos canales con actividad dependiente del voltaje y del calcio intracelular); y otras funciones independientes del grado de polarización de la membrana celular como pueden ser las respuestas a los estímulos mecánicos, de roce y estiramiento, o a diversos mediadores químicos.

En particular, los canales de baja conductancia que presentan una probabilidad de apertura ( $P_o$ ) mayor a potenciales hiperpolarizados que a despolarizados (grupo 6, figura 3.1.11), podrían tratarse de miembros de las familias  $K_{IR}$  y/o  $K_{2P}$  rectificadores entrantes.

Por otro lado, un canal de alta conductancia y de elevada actividad a todos los potenciales de membrana (grupo 2, figura 3.1.5) podría ser un miembro de la subfamilia TREK de los canales  $K_{2P}$ , los cuales, hasta ahora, han sido caracterizados funcionalmente solo en la arteria cerebral media de rata como ejemplo de rol de estos canales en las CMLV [42].

Las conductancias bajas, intermedias y altas cuya actividad se presenta solo a potenciales despolarizados (grupos 3, 4, 5 y 6, figuras 3.1.6, 8, 9 y 12) son candidatas a ser representativas de canales  $K_V$ , los cuales son sensibles al potencial de membrana y se activan con la despolarización. Si bien los valores de conductancia que hemos incluido en la tabla para estos canales (basados en revisiones de la *International Union Phramalogy*, [22,23,24,25]) no superan los 30 pS, son numerosos los trabajos científicos realizados en distintos tipos celulares, y en particular en CMLV, que describen canales de tipo  $K_V$  con valores de conductancia mayores a dicho valor [18,158,159], reafirmando la necesidad del desarrollo de un estudio más amplio de las características biofísicas y farmacológicas para confirmar la identidad de un canal en particular.

Si consideramos, además, que los canales que estamos describiendo no presentan inactivación significativa en el tiempo (los registros fueron realizados en el estado estacionario) tenemos un importante indicio sobre los posibles subtipos de canales  $K_V$  presentes, los cuales podrían corresponder a:  $Kv1$  (excepto el  $Kv1.4$  que presenta inactivación),  $Kv2$ ,  $Kv3.1$ ,  $Kv3.2$ ,  $Kv7$ ,  $Kv10$ ,  $Kv11$  y  $Kv12$ . La serie de experimentos que presentamos realizada en un número comparable de células y en presencia de 4-AP (capítulo 3.1, figura 3.1.13), nos permitió avanzar en su identificación. De los canales citados más arriba sólo los correspondientes a las subfamilias  $Kv1$ ,  $Kv2$  y  $Kv3$  son sensibles a 4-AP [23,26]. Por lo tanto, los grupos de canales con conductancia de aproximadamente 76 pS y 45 pS que se inhiben en presencia de 4-AP, podrían ser miembros de alguna de estas subfamilias (11 posibles subtipos de canales diferentes). Este resultado nos permite acotar la búsqueda para la identificación final de los distintos subtipos de canales  $K_V$  y nos orienta para estudios futuros donde se ensayarán drogas y toxinas selectivas de alto costo comercial para poner en evidencia cada subtipo puntual y el rol funcional de los mismos en la AUH.

Es interesante señalar que la importancia de la coexistencia de múltiples componentes de canales  $K_v$  dentro de un mismo tipo celular plantea nuevos interrogantes acerca de su función, no solo como estructuras que contribuyen a la repolarización del  $V_m$ , sino también en otros fenómenos celulares, como por ejemplo la participación de canales de tipo  $K_v1.3$  en la regulación de la proliferación celular en distintas arterias que se ha demostrado recientemente [53].

La profundización del estudio de las propiedades biofísicas y la distribución precisa de los distintos subtipos de canales  $K_v$  en las CML de la AUH constituye para nosotros un nuevo punto de partida en la generación de conocimiento en el campo de la fisiología vascular. El estudio de esta arteria, si bien pertenece a un lecho circulatorio especial, nos permite trabajar con un vaso humano que, tal como demuestran nuestros trabajos precedentes así como datos bibliográficos provenientes de otros grupos de investigación, comparte propiedades bioeléctricas y contráctiles con otros tipos arteriales humanos y de otras especies. En particular, la expresión y función de los canales  $K_v$  en las CML de la AUH podrían tener puntos en común con las arterias pulmonares (dado que la AUH es una arteria que también transporta sangre poco oxigenada, en este caso desde el feto a la placenta). Se sabe que los canales de tipo  $K_v$  están involucrados en la respuesta de vasoconstricción inducida por hipoxia en las arterias pulmonares [160] y en las arterias de la placenta [161]. Estudios de desarrollo de fuerza realizados en anillos arteriales de la AUH *in vitro* han demostrado que la misma presenta vasoconstricción inducida por hipoxia [162], aunque no ha sido dilucidado el mecanismo a partir del cual se genera esta respuesta. Una hipoxia crónica puede representar importantes consecuencias en el desarrollo fetal. Por ejemplo, el retardo en el crecimiento intrauterino, así como el bajo peso al nacer que presentan los neonatos de madres fumadoras (debido a la hipoxia crónica que produce el cigarrillo) [163,164] podrían deberse a este fenómeno.

En cuanto al rol de los canales  $K_v$  en procesos proliferativos, la AUH constituye un excelente modelo de estudio *in vitro* con células humanas. Es nuestra intención para el futuro inmediato, a partir del conocimiento adquirido en este trabajo, estudiar el rol de los canales  $K_v$  en la proliferación de las CML de la AUH en cultivo, ya que entendemos que los resultados serán importantes para comprender su desarrollo

durante la gestación en condiciones fisiológicas y/o fisiopatológicas asociadas al embarazo.

Otro canal que aparece con una frecuencia del 20 % en nuestros registros es el canal BK<sub>Ca</sub>, del cual realizamos un estudio detallado de sus propiedades. En particular, demostramos su alta selectividad al ion K<sup>+</sup>, que es característica de este canal a pesar de su alta conductancia, la posible presencia de estados de sub-conductancia, de acuerdo a lo reportado para este canal en la bibliografía [165], y su inhibición completa por paxilina, un inhibidor selectivo. Por otro lado, observamos que el canal BK<sub>Ca</sub> en la AUH presenta activación por el descenso del pH intracelular y se encuentra asociado funcionalmente con la subunidad β<sub>1</sub>; estas últimas características varían según el tejido donde se expresa el canal. La presencia del canal BK<sub>Ca</sub> asociado a la subunidad β<sub>1</sub> es característica del músculo liso vascular y el rol de la misma es muy importante en la respuesta al aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, así como también es blanco de efectos moduladores, tal como se describió en la introducción. En particular, en la AUH este canal podría estar implicado en funciones vasculares generales como la regulación del tono contráctil y por ende del flujo fetoplacentario, así como en funciones especiales de la misma. Un ejemplo de estas últimas, es la presencia de ondas de contracción rítmicas descritas en la AUH y en la vena umbilical [166], las cuales, teniendo en cuenta la estructura morfológica del cordón umbilical, podrían contribuir a impulsar el flujo sanguíneo desde la placenta al feto. El canal BK<sub>Ca</sub>, en función de su sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> y al voltaje podría participar en la generación y modulación de dichas ondas contráctiles (ver [167] para una revisión completa de este mecanismo).

Tal como hemos discutido, los canales de K<sup>+</sup> son estructuras fundamentales en la regulación del tono contráctil de las arterias, siendo un blanco común de numerosos factores endoteliales, y uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar el efecto directo, del AA sobre los mismos, como posible EDHF.

La relevancia del estudio de la función de los EDHF surge de la observación de que varias patologías cardiovasculares como la diabetes, la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la hipertensión pulmonar y la eclampsia, entre otras, presentan una disfunción endotelial caracterizada por una disminución en la producción de NO y/o en sus efectos biológicos [168]. Si bien la función del NO ha sido el centro de atención en

los últimos 30 años y actualmente es un mecanismo de vasorrelajación bien descrito y reconocido, se postula que las alteraciones en la producción de los EDHF contribuyen a la disfunción endotelial tanto por la disminución en su actividad normal, como también por la pérdida de la actividad compensatoria que tienen los EDHF sobre la disminución de la actividad de la vía del NO [83,84,85,168]. Esto último se sustenta en la descripción de una actividad inhibitoria constante del NO sobre las vías del EDHF [169,170]. Por su parte, la disfunción endotelial en la producción y actividad del EDHF se observa con el aumento de la edad y bajo varias situaciones patológicas como hipertensión, aterosclerosis, hipercolesterolemia, falla cardíaca, fenómeno de isquemia/reperfusión, angioplastía, eclampsia, diabetes y sepsis [77,168].

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que a nivel de la corriente macroscópica de las CML de la AUH, el AA es capaz de activar significativamente una corriente saliente cuando los canales de la familia  $K_v$  han sido inhibidos con 4-AP, mientras que este efecto se pierde por completo en células expuestas a paxilina, el inhibidor de canales  $BK_{Ca}$ . Este resultado nos permite postular que en las CML de la AUH el AA afecta solamente a la corriente mediada por canales  $BK_{Ca}$  y que los canales  $K_v$  no son afectados de manera significativa, a pesar de la existencia de citas bibliográficas donde se demuestra un efecto inhibitorio del AA sobre algunos subtipos de estos canales [23]

Además, el hecho de que la célula en presencia de AA asuma valores de potencial de reposo más hiperpolarizados que en las condiciones control, refuerza la idea de que el AA puede ser un EDHF en este tejido.

Los resultados a nivel de célula completa permiten evaluar la respuesta al AA en una condición cercana a la fisiológica, dado que se conservan la integridad de la célula, los gradientes iónicos y la presencia de potencial de membrana en reposo que permite evaluar el impacto del AA directamente sobre el parámetro fisiológico que modifican los EDHF. Sin embargo, no es posible establecer en dicha configuración si el efecto del AA es directo o si el mismo está mediado por alguno de sus metabolitos generados por la acción de enzimas, que podrían estar presentes a nivel de las CMLV, y cuyo sustrato es el AA. Los resultados obtenidos a nivel de canal único nos permitieron responder este interrogante al observar que el AA activa de manera directa el canal

BK<sub>Ca</sub>. Este dato permite explicar la persistencia, en algunos lechos vasculares, de una vasorrelajación inducida por AA aun cuando todas las enzimas que metabolizan el mismo se encuentran inhibidas (ver introducción, tabla de la sección 1.3).

El efecto activador directo del AA sobre el canal BK<sub>Ca</sub> está basado en un aumento de la probabilidad de apertura del canal y en el desplazamiento de la curva de relación NP<sub>o</sub> vs V hacia valores hiperpolarizados, de manera consistente con los resultados obtenidos a nivel de célula entera. Un análisis detallado de los tiempos de permanencia del canal en los estados cerrado y abierto en condiciones control y en presencia de AA, muestra que el aumento de la probabilidad de apertura del canal se genera a partir de una significativa reducción en los tiempos de permanencia del estado cerrado, acompañado de un aumento en el correspondiente al estado abierto.

En conjunto, estos resultados sostienen que el AA en forma directa puede constituir un EDHF en el músculo liso vascular humano. También podría ser una herramienta terapéutica importante en patologías cardiovasculares donde el AA, favoreciendo la disminución de la resistencia periférica, contribuiría a la disminución de la presión arterial. Este hecho podría explicar el éxito de estrategias terapéuticas no farmacológicas actuales como el suplemento de la dieta con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6 [17].

En la AUH, el AA podría ejercer un rol vasodilatador y por ende regulador del flujo feto-placentario. El efecto hiperpolarizante que produce en las CML de dicha arteria permite postularlo como un posible EDHF. Varios interrogantes surgen a partir de este hallazgo, como por ejemplo de qué manera y en qué situaciones podría el AA cumplir este rol en la AUH; y qué tipo de células, y en respuesta a qué estímulos, serían capaces de generar AA libre. Puntualmente, sustancias que estimulan la PLA<sub>2</sub>, podrían producir un efecto vasodilatador en esta arteria mediado por el AA. Es importante recordar que los agonistas exógenos que en la mayoría de los vasos sanguíneos generan vasorrelajación mediada por endotelio, como son la acetilcolina, histamina y bradikinina, producen vasoconstricción en la AUH. Es interesante entonces ampliar el conocimiento acerca de sustancias que efectivamente generan vasodilatación en esta arteria. El AA, en forma directa podría ser uno de ellos, pudiendo ser liberado por el endotelio, por las mismas CML o llegar a través del flujo sanguíneo. Se ha demostrado

que la madre puede transferir este ácido graso al feto a través de la placenta, observándose su presencia en muestras de sangre del cordón umbilical [171,172].

Nuestros futuros estudios estarán focalizados en la búsqueda de sustancias o estímulos específicos que puedan inducir la liberación de AA en esta arteria. Los efectos del AA descritos a nivel celular son muchos y diversos. Tiene efectos indirectos sobre varios tipos de canales iónicos, por lo cual es importante tener en cuenta que el efecto final del AA sobre una determinada función celular como es la contracción en este caso, va a depender de cada tejido y de las condiciones en que se encuentre.

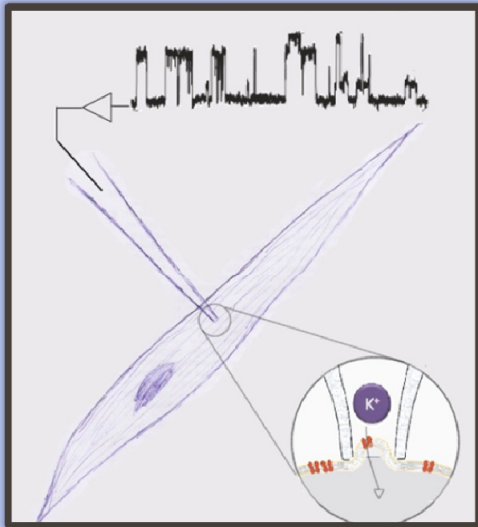
## 4.2: CONCLUSIONES

Este trabajo constituye un importante aporte al conocimiento de las propiedades bioeléctricas de una CMLV humano. Nos permitió demostrar la diversidad de canales que pueden coexistir funcionalmente en la misma. La actividad de los mismos a distintos valores del potencial de membrana celular, confirman su función como generadores y/o sensores de esta propiedad fundamental para la regulación de numerosas funciones celulares. Hemos expandido en gran medida el conocimiento de nuestro objeto de estudio, encontrando que se distinguen al menos seis tipos diferentes de canales iónicos tal como se infiere del estudio a nivel de canal único. Además, las características generales de los mismos, permiten postular distintos tipos de familias de canales para los comportamientos observados. Más certero aún, fue para el caso de la familia de los canales  $K_v$ , donde la inhibición por 4-AP acota los posibles subtipos implicados. Estos datos suponen un punto de partida para la adecuada identificación puntual de cada tipo de canal, para posteriormente estudiar su rol funcional.

Hemos caracterizado en detalle el canal  $BK_{Ca}$  presente en este tipo celular, demostrando que este canal es activado en forma directa por el AA, lo cual nos permite postular al mismo como posible EDFH en esta arteria humana. Dicha función se encontraría avalada por la hiperpolarización observada del potencial de membrana.

Por último, hemos contribuido también al conocimiento detallado de un mecanismo de acción novedoso para un fármaco de amplio uso clínico, como es la bupivacaína, sobre un canal de  $K^+$  altamente expresado en el musculo liso vascular.





1. Introducción y objetivos
  2. Materiales y métodos
  3. Resultados
  4. Discusión y conclusiones
  - 5. Bibliografía**
-

- [1] M. Spivak, The anatomic peculiarities of the human umbilical cord and their clinical significance., *Am J Obstet Gynecol.* 52 (1946 ) 387-401.
- [2] J. Hib, Cap 9: Placenta y anexos extraembrionarios, Editorial Interamericana- Mc Graw Hill, 1994.
- [3] K. Moore, T. Persaud, Cap 7, Editorial Mc Graw Hill-Interamericana1999., 1999.
- [4] R. Frederick, Cap 6: Placental pathology., 2004.
- [5] T. Todros, S.L. Adamson, C. Guiot, E. Bankowski, L. Raio, E. Di Naro, H. Schneider, Umbilical cord and fetal growth--a workshop report, *Placenta* 23 Suppl A (2002) S130-132.
- [6] A.J. Sexton, M. Turmaine, W.Q. Cai, G. Burnstock, A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels, *J Anat* 188 ( Pt 1) (1996) 75-85.
- [7] J. Watras, Cap. 12, Editorial Mosby, 2004.
- [8] A.P. Somlyo, Smooth muscle structure and function, Ed. Raven Press, 1986.
- [9] W. Lehman, R. Criag, P. Vibert, M. Bárány, Cap. 4, Editorial Academic Press, 1996.
- [10] J.T. Stull, P.J. Gallagher, B.P. Herring, K.E. Kamm, Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation, *Hypertension* 17 (1991) 723-732.
- [11] B.G. Allen, M.P. Walsh, The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction, *Trends Biochem Sci* 19 (1994) 362-368.
- [12] H. Jiang, N.L. Stephens, Calcium and smooth muscle contraction., *Mol Cell Biochem.* 135 (1994 ) 1-9.
- [13] S. Kanoh, M. Ito, E. Niwa, Y. Kawano, D.J. Hartshorne, Actin-binding peptide from smooth muscle myosin light chain kinase, *Biochemistry* 32 (1993) 8902-8907.
- [14] P. Lin, K. Luby-Phelps, J.T. Stull, Properties of filament-bound myosin light chain kinase, *J Biol Chem* 274 (1999) 5987-5994.
- [15] L. Smith, X. Su, P. Lin, G. Zhi, J.T. Stull, Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle myosin light chain kinase, *J Biol Chem* 274 (1999) 29433-29438.
- [16] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980) 373-376.
- [17] M. Feletou, P.M. Vanhoutte, EDHF: an update, *Clin Sci (Lond)* 117 (2009) 139-155.
- [18] M.T. Nelson, J.M. Quayle, Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle, *Am J Physiol* 268 (1995) C799-822.
- [19] V. Milesi, E.A. Aiello, A. Rebolledo, A. Gomez Alvis, A.O. Grassi de Gende, Role of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells, *Pflugers Arch* 437 (1999) 455-461.
- [20] H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kummerlen, S. Hinnah, D. Muller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. Wagner, A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBO J* 14 (1995) 5170-5178.
- [21] D.A. Doyle, J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity, *Science* 280 (1998) 69-77.

- [22] S.A. Goldstein, D.A. Bayliss, D. Kim, F. Lesage, L.D. Plant, S. Rajan, International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 527-540.
- [23] G.A. Gutman, K.G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L.A. Pardo, G.A. Robertson, B. Rudy, M.C. Sanguinetti, W. Stuhmer, X. Wang, International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 473-508.
- [24] Y. Kubo, J.P. Adelman, D.E. Clapham, L.Y. Jan, A. Karschin, Y. Kurachi, M. Lazdunski, C.G. Nichols, S. Seino, C.A. Vandenberg, International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 509-526.
- [25] A.D. Wei, G.A. Gutman, R. Aldrich, K.G. Chandy, S. Grissmer, H. Wulff, International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 463-472.
- [26] C. González, D. Baez-Nieto, I. Valencia, I. Oyarzún, P. Rojas, D. Naranjo, R. Latorre, K<sup>+</sup> CHANNELS: FUNCTION-STRUCTURAL OVERVIEW, *Comprehensive Physiology en prensa* (2012).
- [27] S.A. Goldstein, L.A. Price, D.N. Rosenthal, M.H. Pausch, ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13256-13261.
- [28] A.N. Lopatin, E.N. Makhina, C.G. Nichols, The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines., *J Gen Physiol.* 106 (1995) 923-955.
- [29] H. Hibino, A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay, Y. Kurachi, Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles., *Physiol Rev.* 90 (2010) 291-366.
- [30] S. Hagiwara, K. Takahashi, The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell, *J Membr Biol* 18 (1974) 61-80.
- [31] Z. Lu, R. MacKinnon, Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel, *Nature* 371 (1994) 243-246.
- [32] B.A. Wible, M. Tagliatela, E. Ficker, A.M. Brown, Gating of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels localized to a single negatively charged residue, *Nature* 371 (1994) 246-249.
- [33] K. Ho, C.G. Nichols, W.J. Lederer, J. Lytton, P.M. Vassilev, M.V. Kanazirska, S.C. Hebert, Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel, *Nature* 362 (1993) 31-38.
- [34] R. Preisig-Muller, G. Schlichthorl, T. Goerge, S. Heinen, A. Bruggemann, S. Rajan, C. Derst, R.W. Veh, J. Daut, Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 7774-7779.
- [35] H.J. Knot, P.A. Zimmermann, M.T. Nelson, Extracellular K<sup>(+)</sup>-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K<sup>(+)</sup> channels, *J Physiol* 492 ( Pt 2) (1996) 419-430.

- [36] H.M. Prior, N. Webster, K. Quinn, D.J. Beech, M.S. Yates, K<sup>+</sup>-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K<sup>+</sup> channels., *Cardiovasc. Res.* 37 (1998 ) 780–790.
- [37] P. Beguin, K. Nagashima, M. Nishimura, T. Gono, S. Seino, PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation, *EMBO J* 18 (1999) 4722-4732.
- [38] E.A. Ko, J. Han, I.D. Jung, W.S. Park, Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells, *J Smooth Muscle Res* 44 (2008) 65-81.
- [39] L.D. Plant, S. Rajan, S.A. Goldstein, K<sub>2</sub>P channels and their protein partners., *Curr Opin Neurobiol.* 15 (2005 ) 326-333.
- [40] D.P. Lotshaw, Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K<sup>+</sup> channels, *Cell Biochem Biophys* 47 (2007) 209-256.
- [41] M.J. Gardener, I.T. Johnson, M.P. Burnham, G. Edwards, A.M. Heagerty, A.H. Weston, Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries, *Br J Pharmacol* 142 (2004) 192-202.
- [42] R.M. Bryan, Jr., J. You, S.C. Phillips, J.J. Andresen, E.E. Lloyd, P.A. Rogers, S.E. Dryer, S.P. Marrelli, Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (2006) H770-780.
- [43] S. Muhammad, M.I. Aller, C. Maser-Gluth, M. Schwaninger, W. Wisden, Expression of the *kcnk3* potassium channel gene lessens the injury from cerebral ischemia, most likely by a general influence on blood pressure., *Neuroscience.* 167 (2010 ) 758-764. .
- [44] R. MacKinnon, Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel, *Nature* 350 (1991) 232-235.
- [45] J. Rettig, S.H. Heinemann, F. Wunder, C. Lorra, D.N. Parcej, J.O. Dolly, O. Pongs, Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit, *Nature* 369 (1994) 289-294.
- [46] S.H. Heinemann, J. Rettig, H.R. Graack, O. Pongs, Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain, *J Physiol* 493 ( Pt 3) (1996) 625-633.
- [47] T. Bhalla, J.J. Rosenthal, M. Holmgren, R. Reenan, Control of human potassium channel inactivation by editing of a small mRNA hairpin, *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004) 950-956.
- [48] Y. Amarillo, J.A. De Santiago-Castillo, K. Dougherty, J. Maffie, E. Kwon, M. Covarrubias, B. Rudy, Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K<sup>+</sup> channels in cerebellar granule neurons, *J Physiol* 586 (2008) 2093-2106.
- [49] Y. Lu, S.T. Hanna, G. Tang, R. Wang, Contributions of Kv1.2, Kv1.5 and Kv2.1 subunits to the native delayed rectifier K(+) current in rat mesenteric artery smooth muscle cells, *Life Sci* 71 (2002) 1465-1473.
- [50] W.F. Jackson, Potassium channels in the peripheral microcirculation, *Microcirculation* 12 (2005) 113-127.
- [51] J.E. Brayden, Potassium channels in vascular smooth muscle., *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 23 (1996 ) 1069-1076.
- [52] E.A. Aiello, A.T. Malcolm, M.P. Walsh, W.C. Cole, Beta-adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol* 275 (1998) H448-459.

- [53] P. Ciudad, A. Moreno-Dominguez, L. Novensa, M. Roque, L. Barquin, M. Heras, M.T. Perez-Garcia, J.R. Lopez-Lopez, Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (2010) 1203-1211.
- [54] E. Miguel-Velado, F.D. Perez-Carretero, O. Colinas, P. Ciudad, M. Heras, J.R. Lopez-Lopez, M.T. Perez-Garcia, Cell cycle-dependent expression of Kv3.4 channels modulates proliferation of human uterine artery smooth muscle cells, *Cardiovasc Res* 86 (2010) 383-391.
- [55] L. Salkoff, A. Butler, G. Ferreira, C. Santi, A. Wei, High-conductance potassium channels of the SLO family, *Nat Rev Neurosci* 7 (2006) 921-931.
- [56] N.S. Atkinson, G.A. Robertson, B. Ganetzky, A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus, *Science* 253 (1991) 551-555.
- [57] H. Berkefeld, B. Fakler, U. Schulte, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: from protein complexes to function, *Physiol Rev* 90 (2010) 1437-1459.
- [58] R. Latorre, C. Vergara, C. Hidalgo, Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 805-809.
- [59] R. Lu, A. Alioua, Y. Kumar, M. Eghbali, E. Stefani, L. Toro, MaxiK channel partners: physiological impact, *J Physiol* 570 (2006) 65-72.
- [60] Y. Tanaka, K. Koike, L. Toro, MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms., *J Smooth Muscle Res.* 40 (2004) 125-153.
- [61] J.H. Jaggar, V.A. Porter, W.J. Lederer, M.T. Nelson, Calcium sparks in smooth muscle., *Am J Physiol Cell Physiol.* 278 (2000) C235-256.
- [62] J. Ledoux, M.E. Werner, J.E. Brayden, M.T. Nelson, Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone, *Physiology (Bethesda)* 21 (2006) 69-78.
- [63] J. Tseng-Crank, C.D. Foster, J.D. Krause, R. Mertz, N. Godinot, T.J. DiChiara, P.H. Reinhart, Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel isoforms from human brain, *Neuron* 13 (1994) 1315-1330.
- [64] P. Orio, P. Rojas, G. Ferreira, R. Latorre, New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits, *News Physiol Sci* 17 (2002) 156-161.
- [65] A.N. Bukiya, J. Liu, L. Toro, A.M. Dopico, Beta1 (KCNMB1) subunits mediate lithocholate activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and dilation in small, resistance-size arteries, *Mol Pharmacol* 72 (2007) 359-369.
- [66] V.N. Uebele, A. Lagrutta, T. Wade, D.J. Figueroa, Y. Liu, E. McKenna, C.P. Austin, P.B. Bennett, R. Swanson, Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel, *J Biol Chem* 275 (2000) 23211-23218.
- [67] S. Plugger, J. Faulhaber, M. Furstenau, M. Lohn, R. Waldschutz, M. Gollasch, H. Haller, F.C. Luft, H. Ehmke, O. Pongs, Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure, *Circ Res* 87 (2000) E53-60.
- [68] R. Brenner, G.J. Perez, A.D. Bonev, D.M. Eckman, J.C. Kosek, S.W. Wiler, A.J. Patterson, M.T. Nelson, R.W. Aldrich, Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel, *Nature* 407 (2000) 870-876.

- [69] A.L. Blatz, K.L. Magleby, Single apamin-blocked Ca-activated K<sup>+</sup> channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle, *Nature* 323 (1986) 718-720.
- [70] Y.B. Park, Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2<sup>+</sup>)-activated K<sup>+</sup> channels in cultured rat adrenal chromaffin cells, *J Physiol* 481 ( Pt 3) (1994) 555-570.
- [71] B.M. Zhang, V. Kohli, R. Adachi, J.A. López, M.M. Udden, R. Sullivan, Calmodulin binding to the C-terminus of the small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel hSK1 is affected by alternative splicing., *Biochemistry*. 40 (2001 ) 3189-3195.
- [72] S.M. Marchenko, S.O. Sage, Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta, *J Physiol* 492 ( Pt 1) (1996) 53-60.
- [73] S.L. Sandow, C.B. Neylon, M.X. Chen, C.J. Garland, Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function?, *J Anat* 209 (2006) 689-698.
- [74] J.L. Beny, C. Pacicca, Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery., *Am. J. Physiol.* 266 (1994) H1465-1472.
- [75] G.G. Emerson, S.S. Segal, Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. , *Circ. Res.* 87 (2000) 474–479.
- [76] J. Bellien, C. Thuillez, R. Joannides, Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans, *Fundam Clin Pharmacol* 22 (2008) 363-377.
- [77] M. Feletou, P.M. Vanhoutte, Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture), *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (2006) H985-1002.
- [78] S. Moncada, J.R. Vane, Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin., *Pharmacol Rev* 30 (1979) 293-331.
- [79] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev* 43 (1991) 109-142.
- [80] S.G. Taylor, A.H. Weston, Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium, *Trends Pharmacol Sci* 9 (1988) 272-274.
- [81] G. Chen, H. Suzuki, A.H. Weston, Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels, *Br J Pharmacol* 95 (1988) 1165-1174.
- [82] M. Feletou, P.M. Vanhoutte, Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006) 1215-1225.
- [83] G.J. Waldron, H. Ding, F. Lovren, P. Kubes, C.R. Triggle, Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase, *Br J Pharmacol.* 128 (1999) 653-658.
- [84] R.P. Brandes, F.H. Schmitz-Winnenthal, M. Félétou, A. Gödecke, P.L. Huang, P.M. Vanhoutte, I. Fleming, R. Busse, An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice., *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 9747-9752.

- [85] R.A. Cohen, P.M. Vanhoutte, Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP, *Circulation* 92 (1995) 3337-3349.
- [86] T. Nagao, S. Illiano, P.M. Vanhoutte, Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats, *Am J Physiol* 263 (1992) H1090-1094.
- [87] S.L. Sandow, C.E. Hill, Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses., *Circ Res.* 86 (2000) 341-346.
- [88] W.B. Campbell, J.R. Falck, Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors, *Hypertension* 49 (2007) 590-596.
- [89] F.M. Faraci, D.D. Heistad, Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels., *Physiol Rev.* 78 (1998 ) 53-97.
- [90] T. Michel, Cap. 31: Tratamiento de la isquemia de Miocardio, 11<sup>a</sup> edición ed., 2005.
- [91] M.R. Lee, L. Li, T. Kitazawa, Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase, *J Biol Chem* 272 (1997) 5063-5068.
- [92] A. Drouin, N. Thorin-Trescases, E. Hamel, J.R. Falck, E. Thorin, Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mouse cerebral arteries, *Cardiovasc Res* 73 (2007) 73-81.
- [93] L.S. Capettini, S.F. Cortes, M.A. Gomes, G.A. Silva, J.L. Pesquero, M.J. Lopes, M.M. Teixeira, V.S. Lemos, Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295 (2008) H2503-2511.
- [94] J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, P. Martasek, The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications, *Free Radic Res* 37 (2003) 121-127.
- [95] A. Ellis, C.R. Triggle, Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone., *Can J Physiol Pharmacol.* 81 (2003) 1013-1028.
- [96] P.A. Lucchesi, S. Belmadani, K. Matrougui, Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries., *J Hypertens* 23 (2005) 571-579.
- [97] T. Matoba, H. Shimokawa, H. Kubota, K. Morikawa, T. Fujiki, I. Kunihiro, Y. Mukai, Y. Hirakawa, A. Takeshita, Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries., *Biochem Biophys Res Commun.* 290 (2002) 909-913.
- [98] H. Miura, J.J. Bosnjak, G. Ning, T. Saito, M. Miura, D.D. Gutterman, Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles, *Circ Res* 92 (2003) e31-40.
- [99] A. Takaki, K. Morikawa, Y. Murayama, H. Yamagishi, M. Hosoya, J. Ohashi, H. Shimokawa, Roles of endothelial oxidases in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses in mice, *J Cardiovasc Pharmacol* 52 (2008) 510-517.
- [100] L. Wu, R. Wang, Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 585-630.

- [101] W. Durante, F.K. Johnson, R.A. Johnson, Role of carbon monoxide in cardiovascular function, *J Cell Mol Med* 10 (2006) 672-686.
- [102] W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang, The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener., *EMBO J.* 20 (2001) 6008-6016.
- [103] M.L. Honing, P. Smits, P.J. Morrison, J.C. Burnett, T.J. Rabelink, C-type natriuretic peptide-induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels., *Hypertension.* 37 (2001) 1179-1183.
- [104] A. Ahluwalia, A.J. Hobbs, Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor., *Trends Pharmacol Sci.* 26 (2005) 162-167.
- [105] M.D. Randall, D.A. Kendall, S. O'Sullivan, The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids, *Br J Pharmacol* 142 (2004) 20-26.
- [106] K. Varga, K. Lake, B.R. Martin, G. Kunos, Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide, *Eur J Pharmacol* 278 (1995) 279-283.
- [107] J.A. Wagner, K. Varga, E.F. Ellis, B.A. Rzigalinski, B.R. Martin, G. Kunos, Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock, *Nature* 390 (1997) 518-521.
- [108] C. Lagneux, D. Lamontagne, Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide, *Br J Pharmacol* 132 (2001) 793-796.
- [109] D. Gebremedhin, A.R. Lange, W.B. Campbell, C.J. Hillard, D.R. Harder, Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current, *Am J Physiol* 276 (1999) H2085-2093.
- [110] E.M. Smyth, A. Burke, G.A. FitzGerald, Cap. 25: Autacoides derivados de lípidos: eicosanoides y factor activador plaquetario, 11<sup>a</sup> edición ed., 2005.
- [111] D. Panigrahy, A. Kaipainen, E.R. Greene, S. Huang, Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer, *Cancer Metastasis Rev* 29 (2010) 723-735.
- [112] A. Koller, D. Sun, G. Kaley, Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro, *Circ Res* 72 (1993) 1276-1284.
- [113] D. Sun, A. Huang, C.J. Smith, C.J. Stackpole, J.A. Connetta, E.G. Shesely, A. Koller, G. Kaley, Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice, *Circ Res* 85 (1999) 288-293.
- [114] M.H. Zink, C.L. Oltman, T. Lu, P.V. Katakam, T.L. Kaduce, H. Lee, K.C. Dellsperger, A.A. Spector, P.R. Myers, N.L. Weintraub, 12-lipoxygenase in porcine coronary microcirculation: implications for coronary vasoregulation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2001) H693-704.
- [115] X. Tang, B.B. Holmes, K. Nithipatikom, C.J. Hillard, H. Kuhn, W.B. Campbell, Reticulocyte 15-lipoxygenase-I is important in acetylcholine-induced endothelium-dependent vasorelaxation in rabbit aorta., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (2006) 78-84.
- [116] I. Fleming, Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol Res.* 49 (2004) 525-533.
- [117] J.R. Falck, U.M. Krishna, Y.K. Reddy, P.S. Kumar, K.M. Reddy, S.B. Hittner, C. Deeter, K.K. Sharma, K.M. Gauthier, W.B. Campbell, Comparison of vasodilatory properties of 14,15-EET analogs: structural requirements for dilation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (2003) H337-349.



- [118] B.T. Larsen, W.B. Campbell, D.D. Gutterman, Beyond vasodilatation: non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system., *Trends Pharmacol Sci* 28 (2007) 32-38.
- [119] P.L. Li, W.B. Campbell, Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein., *Circ Res.* 80 (1997) 877-884.
- [120] A. Luria, S.M. Weldon, A.K. Kabcenell, R.H. Ingraham, D. Matera, H. Jiang, R. Gill, C. Morisseau, J.W. Newman, B.D. Hammock, Compensatory mechanism for homeostatic blood pressure regulation in Ephx2 gene-disrupted mice, *J Biol Chem* 282 (2007) 2891-2898.
- [121] M. Rosolowsky, W.B. Campbell, Role of PGI<sub>2</sub> and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid, *Am J Physiol* 264 (1993) H327-335.
- [122] A.J. Lonigro, N.L. Weintraub, C.A. Branch, A.H. Stephenson, L. McMurdo, R.S. Sprague, Endothelium-dependent relaxation to arachidonic acid in porcine coronary artery: is there a fourth pathway?, *Pol J Pharmacol.* 46 (1994) 567-577.
- [123] H. Miura, D. Gutterman, Human Coronary Arteriolar Dilation to Arachidonic Acid Depends on Cytochrome P-450 Monooxygenase and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels, *Circulation Research* 83 (1998) 501-507.
- [124] C.L. Oltman, N.L. Kane, J.L. Fudge, N.L. Weintraub, K.C. Dellsperger, Endothelium-derived hyperpolarizing factor in coronary microcirculation: responses to arachidonic acid, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (2001) H1553-1560.
- [125] J. You, S.P. Marrelli, R.M. Bryan Jr., Role of cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub> in endothelium-derived hyperpolarizing factor dilations of rat middle cerebral arteries, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22 (2002) 1239-1247.
- [126] J. You, E.M. Golding, R.M. Bryan, Jr., Arachidonic acid metabolites, hydrogen peroxide, and EDHF in cerebral arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289 (2005) H1077-1083.
- [127] M.T. Kirber, R.W. Ordway, L.H. Clapp, J.V.J. Walsh, J.J. Singer, Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett.* 297 (1992) 24-28.
- [128] X. Xu, K.S. Lee, Dual effects of arachidonic acid on ATP-sensitive K<sup>+</sup> current of coronary smooth muscle cells, *Am J Physiol* 270 (1996) H1957-1962.
- [129] T. Tuvemo, K. Strandberg, M. Hamberg, B. Samuelsson, Maintenance of the tone of the human umbilical artery by prostaglandin and thromboxane formation, *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1 (1976) 425-428.
- [130] K. Bjoro, Prostacyclin and thromboxane formation in human umbilical arteries following stimulation with vasoactive autacoids, *Prostaglandins* 31 (1986) 699-714.
- [131] U. Klockner, Intracellular calcium ions activate a low-conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery, *Pflugers Arch* 424 (1993) 231-237.
- [132] V. Milesi, J. Raingo, A. Rebolledo, A.O. Grassi de Gende, Potassium channels in human umbilical artery cells, *J Soc Gynecol Investig* 10 (2003) 339-346.
- [133] B.S. Pallota, A.L. Blatz, K.L. Magleby, *Cap. 12 Ed. Academic Press, 1992.*

- [134] A.L. Blatz, K.L. Magleby, Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle, *J Gen Physiol* 84 (1984) 1-23.
- [135] B. Hille, Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations, *J Gen Physiol* 61 (1973) 669-686.
- [136] D.E. Goldman, Potential, Impedance, and Rectification in Membranes, *J Gen Physiol* 27 (1943) 37-60.
- [137] A.L. Hodgkin, B. Katz, The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid, *J Physiol* 108 (1949) 37-77.
- [138] S.D. Silberberg, K.L. Magleby, Preventing errors when estimating single channel properties from the analysis of current fluctuations., *Biophys J.* 65 (1993 ) 1570-1584.
- [139] F.J. Sigworth, S.M. Sine, Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms, *Biophys J* 52 (1987) 1047-1054.
- [140] J. Raingo, V. Milesi, A. Gómez Alvis, A. Rebolledo, F. Speroni, A.O. Grassi de Gende, Participación del retículo sarcoplásmico en la respuesta contráctil a 4-aminopiridina en aorta de rata, *Medicina (Buenos Aires)* 60 (2000) 745.
- [141] P. Petkova-Kirova, H. Gagov, U. Krien, D. Duridanova, T. Noack, R. Schubert, 4-aminopyridine affects rat arterial smooth muscle BK(Ca) currents by changing intracellular pH, *Br J Pharmacol* 131 (2000) 1643-1650.
- [142] J. Raingo, A. Rebolledo, A.O. Grassi de Gende, N. Sanz, J. Tommasi, V. Milesi, pH effects on high conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in human internal mammary artery smooth muscle cells, *Life Sci* 77 (2005) 1993-2003.
- [143] K.L. Rossner, E. Natke, M. Liu-Barnett, K.J. Freese, A proposed mechanism of bupivacaine-induced contraction of human umbilical artery smooth muscle cells, *Int J Obstet Anesth* 8 (1999) 24-29.
- [144] E. Monuszko, S. Halevy, K. Freese, M. Liu-Barnett, B. Altura, Vasoactive actions of local anaesthetics on human isolated umbilical veins and arteries, *Br J Pharmacol* 97 (1989) 319-328.
- [145] J. Nilsson, M. Madeja, F. Elinder, P. Arhem, Bupivacaine blocks N-type inactivating Kv channels in the open state: no allosteric effect on inactivation kinetics., *Biophys J.* 95 (2008 ) 5138-5152.
- [146] W.A. Catterall, K. Mackie, Cap. 14: Anestésicos Locales, 11<sup>a</sup> edición ed., 2005.
- [147] L. Sintra Grilo, P.A. Carrupt, H. Abriel, A. Daina, Block of the hERG channel by bupivacaine: Electrophysiological and modeling insights towards stereochemical optimization, *Eur J Med Chem* 46 (2011) 3486-3498.
- [148] A. Olschewski, H. Olschewski, M.E. Brau, G. Hempelmann, W. Vogel, B.V. Safronov, Effect of bupivacaine on ATP-dependent potassium channels in rat cardiomyocytes, *Br J Anaesth* 82 (1999) 435-438.
- [149] C.H. Kindler, C.S. Yost, A.T. Gray, Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem, *Anesthesiology* 90 (1999) 1092-1102.
- [150] P. Martín, N. Enrique, A.R. Roldán Palomo, A. Rebolledo, V. Milesi, Bupivacaine inhibits large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels in human umbilical artery smooth muscle cells, *Channels* 6 (May/June 2012 (*en prensa*)).
- [151] A.M. Woodhull, Ionic blockage of sodium channels in nerve, *J Gen Physiol* 61 (1973) 687-708.

- [152] D.Y. Sanchez, A.L. Blatz, Voltage-dependent block of fast chloride channels from rat cortical neurons by external tetraethylammonium ion, *J Gen Physiol* 100 (1992) 217-231.
- [153] G. Yellen, Ionic permeation and blockade in Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of bovine chromaffin cells, *J Gen Physiol* 84 (1984) 157-186.
- [154] J.W. Scanlon, G.W. Ostheimer, A.O. Lurie, J.R. Brown wu, J.B. Weiss, M.H. Alper, Neurobehavioral responses and drug concentrations in newborns after maternal epidural anesthesia with bupivacaine, *Anesthesiology* 45 (1976) 400-405.
- [155] T.K. Abboud, S.S. Khoo, F. Miller, T. Doan, E.H. Henriksen, Maternal, fetal, and neonatal responses after epidural anesthesia with bupivacaine, 2-chloroprocaine, or lidocaine, *Anesth Analg* 61 (1982) 638-644.
- [156] S. Alahuhta, J. Rasanen, P. Jouppila, T. Kangas-Saarela, R. Jouppila, P. Westerling, A.I. Hollmen, The effects of epidural ropivacaine and bupivacaine for cesarean section on uteroplacental and fetal circulation, *Anesthesiology* 83 (1995) 23-32.
- [157] D.H. Ralston, S.M. Shnider, The fetal and neonatal effects of regional anesthesia in obstetrics, *Anesthesiology* 48 (1978) 34-64.
- [158] C.H. Gelband, J.R. Hume, Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery, *Circ Res* 71 (1992) 745-758.
- [159] T. Ishikawa, J.R. Hume, K.D. Keef, Modulation of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels by histamine H1-receptor stimulation in rabbit coronary artery cells, *J Physiol* 468 (1993) 379-400.
- [160] M. Sweeney, J.X. Yuan, Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels, *Respir Res* 1 (2000) 40-48.
- [161] V. Hampl, J. Bibova, Z. Stranak, X. Wu, E.D. Michelakis, K. Hashimoto, S.L. Archer, Hypoxic fetoplacental vasoconstriction in humans is mediated by potassium channel inhibition, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2002) H2440-2449.
- [162] S. De Moraes, J.C. Carvalho, R.S. Mathias, M.T. Cavalcante, Relative hypoxia-induced contraction of the isolated human umbilical artery, *Pharmacol Toxicol* 76 (1995) 218-220.
- [163] V. Hampl, V. Jakoubek, Regulation of fetoplacental vascular bed by hypoxia, *Physiol Res* 58 Suppl 2 (2009) S87-93.
- [164] T. Zdravkovic, O. Genbacev, M.T. McMaster, S.J. Fisher, The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review, *Placenta* 26 Suppl A (2005) S81-86.
- [165] O.B. McManus, K.L. Magleby, Kinetic states and modes of single large-conductance calcium-activated potassium channels in cultured rat skeletal muscle, *J Physiol* 402 (1988) 79-120.
- [166] D.N. Garcia-Huidobro, M.T. Garcia-Huidobro, J.P. Huidobro-Toro, Vasomotion in human umbilical and placental veins: role of gap junctions and intracellular calcium reservoirs in their synchronous propagation, *Placenta* 28 (2007) 328-338.
- [167] R.E. Haddock, C.E. Hill, Rhythmicity in arterial smooth muscle, *J Physiol* 566 (2005) 645-656.
- [168] P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, E.H. Tang, M. Feletou, Endothelial dysfunction and vascular disease., *Acta Physiol* 196 (2009) 193-222.

- [169] J. Bauersachs, R. Popp, M. Hecker, E. Sauer, I. Fleming, R. Busse, Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor, *Circulation* 94 (1996) 3341-3347.
- [170] Y. Nishikawa, D.W. Stepp, W.M. Chilian, Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2000) H459-465.
- [171] P. Haggarty, J. Ashton, M. Joynson, D.R. Abramovich, K. Page, Effect of maternal polyunsaturated fatty acid concentration on transport by the human placenta, *Biol Neonate* 75 (1999) 350-359.
- [172] M.D. Al, A.C. van Houwelingen, A.D. Kester, T.H. Hasaart, A.E. de Jong, G. Hornstra, Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status, *Br J Nutr* 74 (1995) 55-68.