

## Registro de canales de $K^+$ y de uniones gap en la pared arterial

**Estéfano Pinilla Pérez. Pablo López Iscoa.**

Grado en Farmacia. Facultad de Farmacia. Complutense de Madrid.  
[estefanopinilla@gmail.com](mailto:estefanopinilla@gmail.com)

**Luis Rivera de los Arcos**

Facultad de Farmacia. Complutense de Madrid.  
[lrivera@farm.ucm.es](mailto:lrivera@farm.ucm.es)

**Resumen:** el endotelio regula el tono y el diámetro vascular en respuesta a necesidades y fuerzas hemodinámicas. Numerosos estudios electrofisiológicos han puesto de manifiesto la rica expresión de canales de  $K^+$  en células endoteliales (CEs) de diferentes lechos vasculares. Los canales de  $K^+$  que se han estudiado en mayor detalle han sido los canales rectificadores de entrada ( $K_{IR}$ ) y los diferentes tipos de canales de  $K^+$  activados por calcio ( $K_{Ca}$ ). El propósito del presente trabajo ha sido identificar y caracterizar electrofisiológicamente la actividad de los diferentes canales de  $K^+$  expresados en la superficie luminal de las CEs *'in situ'*. Hemos utilizado la técnica de *Patch-Clamp 'a ciegas'* en configuración de célula entera, y registrado electrofisiológicamente las corrientes expresadas en las CEs *'in situ'*. Estudiando la expresión y características de los canales de  $K^+$ , mediante la aplicación de pulsos y rampas de voltaje y de bloqueantes específicos de canales de  $K^+$ , y el papel de las *uniones gap* en la arteria mesentérica de la rata. En la superficie luminal de las CEs se expresan corrientes  $K_{IR}$ , responsables del mantenimiento del potencial de membrana, y  $K_{Ca}$  de intermedia ( $IK_{Ca}$ ) y baja ( $SK_{Ca}$ ) conductancia, que hiperpolarizan las CEs y liberan NO. Además, las células musculares lisas vasculares (CMLVs) subyacentes expresan corrientes hiperpolarizantes de  $K_{Ca}$  de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ). Las CEs están acopladas eléctricamente por *uniones gap* homocelulares responsables de la difusión electrotónica de señales en la pared arterial y heterocelularmente con las CMLVs, jugando un papel central en el mantenimiento del tono vasomotor.

**Palabras clave:** Arteria mesentérica. Endotelio. Patch-Clamp. Canales de  $K^+$  rectificadores de entrada ( $K_{IR}$ ). Canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ( $k_{Ca}$ ).

### INTRODUCCIÓN

La expresión de canales de  $K^+$  varía enormemente entre diferentes tipos de células endoteliales (CEs), e incluso entre CEs en cultivo de la misma cepa. En CEs

dispersadas enzimáticamente y en cultivo se ha descrito la expresión de canales de  $K^+$  rectificadores de entrada ( $K_{IR}$ ) y de canales de  $K^+$  activados por calcio ( $K_{Ca}$ ) de intermedia ( $IK_{Ca}$ ) y baja conductancias ( $SK_{Ca}$ ) <sup>(1)</sup>. Además, en la arteria mesentérica de rata se da una expresión asimétrica de canales de  $K^+$  en las CEs y las células musculares lisas vasculares (CMLVs). Así, en las CEs se expresan canales de  $K_{IR}$  y canales de  $IK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$ , mientras que en las CMLVs sólo se expresan canales de  $BK_{Ca}$  <sup>(2, 3)</sup>. Los canales de  $K_{IR}$  son los principales canales que determinan el potencial de membrana ( $V_m$ ) y la excitabilidad en la mayoría de las células excitables <sup>(3)</sup>. Por otro lado, los canales de  $K_{Ca}$  se activan por el incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Los canales de  $IK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$  se expresan en CEs, hiperpolarizándolas y liberando NO <sup>(4)</sup>.

Estudios previos con *neurobiotina* han mostrado que, en este lecho vascular, las CEs están acopladas eléctricamente a través de uniones gap homocelulares tanto en sentido longitudinal como radial creando, por tanto, un sincitio funcional<sup>(2)</sup>.

En el presente trabajo hemos conseguido registrar corrientes de  $K^+$  desde la superficie luminal de las CEs de la arteria mesentérica de rata 'in situ', y estudiar el efecto de distintos bloqueantes específicos de canales de  $K^+$ , y el papel de las uniones gap. Permittiéndonos una mayor comprensión del importante papel que juega el endotelio y su estrecha relación con el músculo liso vascular subyacente en la regulación del tono vasomotor.

## MATERIAL Y METODOS

Para la realización de los experimentos se han utilizado ratas Wistar (12-14 semanas de edad). Los animales fueron tratados de acuerdo con las normativa española para el cuidado de los animales de laboratorio.

Después del haber sacrificado al animal, se procedió a la extracción del lecho vascular mesentérico. Se colocó en una placa de Petri, con Solución Salina Fisiológica (PSS) a 4°C. Una vez fijada la preparación, la arteria fue disecada libre de tejido graso y conectivo. Se obtuvieron segmentos arteriales en anillo de ca. 3mm de longitud, que fueron montados en el miógrafo isométrico o de alambres de Mulvany y Halpern diseñado para tal fin.

Los segmentos vasculares se fijaron a dos cabezales por medio de dos alambres de 40µm, fijando uno de ellos a un transductor isométrico y el otro a un tornillo micrométrico. La solución PSS, (composición en mM: NaCl 119; KCl 4,6; MgCl<sub>2</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 24,9; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 1,5; Glucosa 11; EDTA 0,027), fue aireada con una mezcla de 5% de O<sub>2</sub> y 95% CO<sub>2</sub>, resultando un pH de 7,4 y se realizó un corte en 'U' en la superficie dorsal de la arteria para exponer la capa de CEs subyacente.

Para la elaboración de los microelectrodos de registro, se utilizaron capilares de cristal de borosilicato estirados en un estirador de electrodos con una punta, <1 µm de

diámetro interno. Los microelectrodos de registro tenían una resistencia de 4-8 MΩ al rellenarlos con una solución intracelular (composición en mM): KCl 141, Na<sub>2</sub>ATP 5, CaCl<sub>2</sub> 0,06, MgCl<sub>2</sub> 3, HEPES 10, EGTA 0,1, ajustando el pH a 7,4 con TRIS.

Los microelectrodos fueron situados en la superficie de las CEs con la ayuda de un micromanipulador mecánico, y se procedió al registro de las corrientes iónicas y de las variaciones de voltaje de las CEs mediante la técnica de *patch-clamp 'a ciegas'* en su configuración de célula entera. A pesar de la dificultad del registro, la ventaja de realizar esta técnica 'in situ' es que observamos el comportamiento de las corrientes en una situación muy parecida a la fisiológica, sin que la integridad y función de las CEs resulte alterada por los métodos de dispersión enzimática y cultivo celulares que se emplean cuando se registran corrientes en células aisladas, procedimientos que, además, no permiten discriminar la superficie luminal o abluminal de la CE en estudio.

Para la adquisición y posterior análisis de las corrientes iónicas se utilizó el programa Scope v3.6.4, que también permitía la generación de pulsos y rampas de voltaje. Los registros fueron digitalizados a 2-10 kHz y filtrados adecuadamente utilizando un amplificador Muticlamp 700A.

Las corrientes iónicas de CEs se registraron utilizando la técnica de *Patch Clamp 'a ciegas'* en configuración de 'voltage-clamp' o '*fijación de voltaje*'. El voltaje (Vh) se fijó a -40 mV y se aplicaron dos tipos de protocolos de estimulación: pulsos de voltaje, hiper- y despolarizantes, de 20 mV de amplitud y una duración de 400 milisegundos (ms) y rampas de voltaje hiper- y despolarizantes de 200 - 300 mV de amplitud y 200 ms de duración en incrementos de 1,5 mV/ms. Los fármacos bloqueantes fueron aplicados directamente con la ayuda de una micropipeta.

Para el registro de las corrientes iónicas, se llevó a cabo el siguiente protocolo. En primer lugar, en condiciones basales se registraron corrientes de salida y entrada aplicando los dos tipos de protocolo de estimulación; a continuación, según la morfología de la corriente obtenida, se bloquearon de forma individual o en combinación los canales K<sub>IR</sub> con Cs<sup>+</sup> o Ba<sup>2+</sup>, los canales I<sub>KCa</sub> y S<sub>KCa</sub> con TRAM 34 y apamina (Apa) respectivamente, los canales B<sub>KCa</sub> con iberiotoxina (IbTx) y las *uniones gap* con carbenoxolona (CBX), estudiando el efecto de estos bloqueos sobre la amplitud de corriente (pA) a distintos tiempos.

Los resultados mostrados en el presente trabajo corresponden a experimentos realizados en 15 CEs de la arteria mesentérica de la rata.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de Patch Clamp 'a ciegas', hemos registrado corrientes de K<sup>+</sup> desde la superficie luminal de las CEs 'in situ'. Observando que la aplicación de pulsos de voltaje hiper- y despolarizantes indujo corrientes de entrada no inactivantes y que

la pendiente de la relación corriente-voltaje disminuyó con la despolarización de la membrana, indicando una rectificación de entrada y la expresión de canales  $K_{IR}$ . Con el fin de comprobar si las corrientes registradas eran de  $K^+$ , se bloquearon con  $Cs^+$  20 mM, y con el bloqueante selectivo de los  $K_{IR}$ ,  $Ba^{2+}$  30  $\mu$ M. Ambos inhibieron las corrientes a través de canales  $K_{IR}$  expresados en la superficie luminal de las CE, indicando que estos canales participan en el mantenimiento de su potencial de membrana (Fig. 1 A) <sup>(2)</sup>.

Por otro lado, el endotelio además de liberar NO y prostaciclina libera el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) regulando el tono vascular. Para el estudio del papel y la expresión de los canales de  $K_{Ca}$  en CE 'in situ', bloqueamos los canales  $IK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$  con TRAM 34 y Apa lo que motivó una inhibición significativa de este tipo de corrientes de  $K_{Ca}$  expresadas en las CE, que sugieren que participan en la hiperpolarización de las CE y en la liberación de NO (Fig. 1 B) <sup>(4)</sup>.

Además, la IbTx inhibió significativamente las corrientes de salida a través de canales  $BK_{Ca}$ , expresados en las CMLVs, registradas desde la superficie luminal de las CE, indicando que éstas participan en la hiperpolarización y en el control de la contracción en las CMLVs (Fig. 1 C) <sup>(3)</sup>.

El CBX 100  $\mu$ M, bloqueante de las *uniones gap* indujo una disminución considerable de las corrientes de  $K_{Ca}$ , sugiriendo que las CE están acopladas eléctricamente a través de uniones gap homo-y heterocelulares (Fig. 1 B) <sup>(2)</sup>.

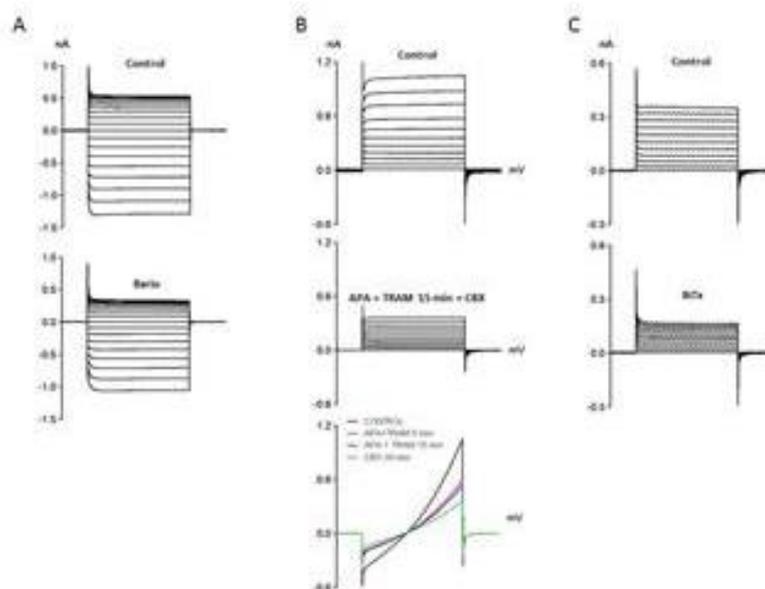


Figura 1. Registro de la actividad de canales de  $K^+$  expresados en la pared de la arteria mesentérica de la rata. A, Efecto del bloqueo con  $Ba^{2+}$  de las corrientes a través de canales  $K_{IR}$ . B, La combinación de Apa y TRAM34 inhibió las corrientes a través de canales  $K_{Ca}$  tipo  $IK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$ ; el bloqueo de las uniones gap con CBX redujo aún más la amplitud de las corrientes. C, Registro, desde la superficie luminal de las CE, de corrientes de  $BK_{Ca}$  expresadas en las CMLVs que indica la comunicación entre ambos tipos celulares. La IbTx bloqueó las corrientes a través de canales  $BK_{Ca}$ .

## CONCLUSIONES

Hemos sido capaces de registrar corrientes iónicas expresadas en la superficie luminal de células endoteliales (CEs) 'in situ', utilizando la configuración de célula entera de la técnica de Patch Clamp 'a ciegas'.

En la superficie luminal de las CEs se expresan corrientes de  $K_{IR}$ , responsables del mantenimiento del potencial de membrana.

También se expresan corrientes de  $IK_{Ca}$   $SK_{Ca}$ , cuya activación ejerce un papel en la hiperpolarización de la célula endotelial y en la liberación de NO y, por tanto, regula la actividad de las CMLVs subyacentes.

A las corrientes de  $K^+$  expresadas en las CEs contribuyen también las células que están acopladas eléctricamente a ellas por medio de *uniones gap* formando un sincitio funcional. Así, desde el endotelio hemos registrado corrientes de  $BK_{Ca}$ , expresadas en las CMLVs, lo cual podría indicar la existencia de una transmisión de la información entre ambos tipos celulares.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nilius B, Viana F, Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium. Annual Review of Physiology. 1997; 59:145-170.
2. Climent B, Zsiros E, Stankevicius E, de la Villa P, Panyi G, Simonsen U, García-Sacristán A, Rivera L. Intact rat superior mesenteric artery endothelium is an electrical syncytium and expresses strong inward rectifier  $K^+$  conductance. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011; 410(3):501-507.
3. Climent B, Schubert R, Stankevicius E, García-Sacristán A, Simonsen U, Rivera L. Large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels modulate endothelial cell outward currents and nitric oxide release in the intact rat superior mesenteric artery. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012; 417(3):1007-1013.
4. Stankevicius E, Lopez-Valverde V, Rivera L, Hughes AD, Mulvany MJ, Simonsen U. Combination of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel blockers inhibits acetylcholine-evoked nitric oxide release in rat superior mesenteric artery. British Journal of Pharmacology. 2006; 149(5):560-572.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.