

Tesis de Posgrado

Regulación de canales de K⁺- dependientes de calcio de músculo liso de coronaria

Scornik, Fabiana Silvia

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Scornik, Fabiana Silvia. (1993). Regulación de canales de K⁺-dependientes de calcio de músculo liso de coronaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2593_Scornik.pdf

Cita tipo Chicago:

Scornik, Fabiana Silvia. "Regulación de canales de K⁺-dependientes de calcio de músculo liso de coronaria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2593_Scornik.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS DE DOCTORADO

Titulo: Regulación de canales de K^+ -dependientes de calcio de músculo liso de coronaria

Tesista: Lic. Fabiana S. Scornik

Director: Dr. Enrico Stefani

1993

1
2
3

	PP
ÍNDICE	2
INTRODUCCIÓN	5
I. I Circulación coronaria	6
I.II Generalidades de las arterias coronarias.	7
I.III Propiedades electrofisiológicas	7
I.IV Regulación de la relajación-contracción	
I.IV.1. Mecanismos de vaso dilatación	10
I.IV.1.i. Vaso dilatación dependiente del endotelio	10
I.IV.1.ii. Relajación mediada por el flujo sanguíneo.	12
I.IV.1.iii. Vaso dilatación dependiente de la acción directa de agentes sobre el músculo liso vascular.	12
a) Dilatación mediada por agentes β-adrenérgicos.	12
b) Regulación colinérgica	13
c). Regulación purinérgica	14
d). Prostaglandinas y metabolitos del ácido araquidónico.	15
I.IV.1.iv. Vaso dilatación directa	16
I.IV.2. Mecanismos de vaso constricción.	17
I.IV.2.i Vaso constricción mediada por agentes β-adrenérgicos.	17
I.IV.2.ii. Serotonina, ergonovina y plaquetas	18
I.V Canales de potasio regulados por calcio. Generalidades.	20
a) modulación por ligando	22
Ácido araquidónico	22

Angiotensina II (AGII)	23
Protones	23
Alcoholes	24
Endotelina (ET)	24
Nitroglicerina y GMPc	25
Histamina	26
b) Ciclos de fosforilación-desfosforilación	28
Agentes β-adrenérgicos	29
Somatostatina	31
c) Modulación por proteína G	33
Regulación muscarínica	35
Estimulación β-adrenérgica	37
Figuras, Introducción	39
MATERIALES Y MÉTODOS	
II.I Obtención de microsomas de membranas de músculo liso de coronaria	46
II.II. Incorporación de canales iónicos en bicapas lipídicas	49
II.III. Registro de la actividad de canales únicos	51
Registro de corrientes unitarias.	52
Procesamiento del estímulo.	52
Protocolos de pulsos	52
Adquisición y análisis de datos	53
II IV. Soluciones y drogas	56

Soluciones para la obtención de membranas.	56
Soluciones experimentales	56
Figuras, Materiales y Métodos	59
RESULTADOS	
Parte 1. Relajación	
Resultados	73
Conclusiones	80
Figuras y Tablas	85
Parte 2. Contracción	
Resultados	121
Conclusiones	125
Conclusiones Generales	126
Figuras	129
Agradecimientos	149
Bibliografía	151

INTRODUCCIÓN

Las arterias coronarias cumplen el papel de proveer O_2 al corazón. Se ha observado que una gran cantidad de anomalías en la función cardíaca están relacionadas con disfunciones en el proceso de relajación-contracción de las arterias coronarias. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos que regulan el estado de relajación-contracción de estas arterias, así como de los agentes endógenos o farmacológicos que afectan a dicho proceso, es importante para la mayor comprensión del mismo, y para proveer posibles herramientas que sirvan para atacar a las patologías ocasionadas por fallas en el comportamiento fisiológico normal. Una parte importante en la regulación de la relajación-contracción son los mecanismos que conducen a la despolarización o hiperpolarización de la membrana celular. En estos mecanismos están involucrados los canales iónicos, los cuales son blanco de un gran número de agentes regulatorios de la contracción-relajación. En el presente trabajo de tesis se estudiarán distintos mecanismos de regulación de los canales de K^+ -dependientes de calcio (K_{Ca}) de músculo liso de la arteria coronaria porcina y se discutirá su importancia en el proceso de relajación-contracción. La Fig. 1 ilustra el contexto general en el cual se para sitúan los canales iónicos. En primer lugar (A) se muestra la ubicación de las arterias coronarias en el corazón; un corte transversal de estas arterias da una imagen como la que se observa en B, donde se ve un esquema generalizado de las distintas capas que conforman a las arterias; la parte C ilustra una célula de músculo liso, proveniente de la capa media de la coronaria (ver mas adelante). Finalmente se muestra un esquema de una sección de membrana celular en la que se puede observar la ubicación de un canal iónico generalizado (D). Este esquema general es el que se utiliza en la introducción que sigue a continuación.

I. I Circulación coronaria

La circulación en el corazón normal esta regulada principalmente por los vasos de resistencia coronaria como por ej., pequeñas arterias, arteriolas y capilares, de manera de proveer el oxígeno requerido por el miocardio. En la Fig. 1 se observan las dos arterias coronarias provenientes de los senos venosos que se encuentran atrás de las cúspides de la válvula aórtica situada en el nacimiento de la arteria aorta. Existen dos sistemas venosos de drenaje: un sistema superficial que drena al ventrículo izquierdo y termina en el seno coronario y las venas cardíacas anteriores; y un sistema profundo que drena al resto del corazón.

El aumento en el consumo de oxígeno por el miocardio provoca un aumento del el flujo sanguíneo. El calibre de los vasos de la coronaria y, consecuentemente, la tasa del flujo sanguíneo coronario esta influenciado no solo por cambios de presión de la arteria aorta sino también por factores metabólicos como por ej. CO_2 , adenosina, además de factores humorales y de la inervación autónoma. El estudio de los factores que regulan a la circulación coronaria es importante ya que las alteraciones del flujo coronario normal conducen a deficiencias en el consumo de oxígeno del miocardio, lo cual tiene como consecuencia el desarrollo de la enfermedad conocida como *angina pectoris*. Si la isquemia producida es prolongada resulta en un infarto de miocardio. Actualmente, una de las principales causas de muerte son las enfermedades de las arterias coronarias. La disminución del radio de las coronarias esta dada frecuentemente por la formación de trombosis que pueden deberse a espasmos de la coronaria, agregaciones plaquetarias transitorias en vasos esclerosados, rupturas de una placa arteriosclerótica o hemorragias dentro de la misma. Aunque no se conocen en detalle las causas de estas fallas en el comportamiento normal de la circulación coronaria, en los últimos años, se ha avanzado enormemente en conocer algunos de los mecanismos celulares y moleculares involucrados. Parte de estos mecanismos están brevemente expuestos en las siguientes secciones de la introducción.

I.II Generalidades de las arterias coronarias.

Antes de comenzar la descripción de los mecanismos celulares involucrados en el proceso de relajación-contracción de la arteria coronaria se presentarán algunas generalidades de estas arterias.

La estructura de las grandes arterias coronarias es similar a la estructura general de otras arterias y consta de tres capas principales (Fig 1 B): La capa interna o íntima, es la que se encuentra en contacto con el lumen de la arteria y está formada por una monocapa de células epiteliales (endotelio), una membrana basal subendotelial y la capa elástica interna compuesta por fibras elásticas. La segunda capa, o capa media contiene al músculo liso de la pared, responsable de la vasomoción. Esta capa muscular esta rodeada por la capa elástica interna, y la capa elástica externa que la separa de la tercer capa, la adventicia. Esta está compuesta principalmente de fibras de colágeno. Aunque las coronarias comparten con otras arterias esta estructura general, existen algunas diferencias que cabe señalar: la capa íntima de la arteria coronaria es mas gruesa que en otras arterias, el volumen celular es bajo, comparado con otras arterias de igual tamaño y la relación colágeno/elastina del tejido conectivo es mayor. Además, las arterias coronarias están especializadas, sus células musculares están orientadas longitudinalmente, éstas, junto con las fibras circulares, contribuyen a la regulación del calibre de la arteria. Es importante mencionar, que esta estructura general puede variar según las distintas especies, e incluso entre las diferentes ramificaciones de un mismo corazón.

I.III Propiedades electrofisiológicas

Debido a la dificultad que presentan las células de músculo liso para ser impaladas con micro electrodos, los datos que se tienen sobre la electrofisiología de las mismas es mucho menor comparado con los estudios realizados en músculo esquelético o cardíaco. A

pesar de esta dificultad se pueden señalar las siguientes características generales:

1. Las células de músculo liso vascular son pequeñas (alrededor de 200 μm) y por lo general tienen zonas especializadas por donde establecen contactos.
2. Las células musculares están inervadas por nervios del sistema autónomo, los cuales participan en la regulación del mecanismo de contracción-relajación del músculo. Estas fibras nerviosas se encuentran en su mayoría en el borde entre las capas media y adventicia. A lo largo de los vasos se pueden observar varicosidades que corresponden a las zonas donde se encuentran los terminales nerviosos.
3. Los cambios en el potencial de reposo de las células musculares controlan el nivel de contracción del músculo liso vascular (MLV). La despolarización induce un estado de mayor contracción, mientras que la hiperpolarización produce relajación.
4. Los cambios en la conductancia de ciertos iones a través de la membrana tienen efectos profundos en el grado de contracción de la célula.
5. La contracción producida por K^+ es de larga duración (hasta 30 min) comparada con lo observado en el músculo esquelético o el músculo liso visceral (ej. intestino).
6. El aumento en la concentración de calcio interna, necesario para que se produzca la contracción (desde 10^{-7} a más de 10^{-5} M), puede provenir de dos fuentes distintas: a) del influjo de calcio a través de la membrana, que a su vez puede ser a través de canales de calcio dependientes del voltaje, o dependientes de ligando; y b) por la liberación de calcio de compartimentos intracelulares como el retículo sarcoplásmico.
7. En algunos MLV los agentes vaso activos producen contracción sin provocar ningún cambio asociado en el potencial de membrana, este tipo de mecanismo se denomina acoplamiento farmacomecánico.
8. Según su excitabilidad, se puede clasificar al músculo liso dentro de dos grandes categorías: los que generan, y los que no generan potenciales de acción *in vitro*. En los casos en los que se desarrolla el potencial de acción, éste provoca contracción del músculo

liso, o aumenta el estado de contracción previo.

9. Aún, los MLV no excitables pueden desarrollar potenciales de acción *in situ* como respuesta a la sumatoria de varios potenciales de juntura.

10. Los MLV no excitables pueden desarrollar espigas *in vitro* si se disminuye la conductancia al potasio con bloqueantes como el Ba^{2+} o el tetraetilamonio (TEA). Esto implica que el músculo tiene canales lentos, dependientes del voltaje, que acarrearán una corriente entrante, y que es capaz de tener una actividad de excitación regenerativa.

11. Las células del MLV tienen potenciales de reposo relativamente bajos (alrededor de -55 mV) debido a una baja permeabilidad al K^+ .

12. En muchos MLV, existe una corriente entrante lenta, debida al flujo de Ca^{2+} que es responsable de la fase de despolarización de las espigas. No parece haber canales de Na^+ rápidos funcionales, sensibles a bloqueantes como la tetrodotoxina (TTX.) Por el contrario, el bloqueante de los canales de calcio, verapamil, disminuye y hasta bloquea los potenciales de acción desarrollados en el MLV.

I.IV Regulación de la relajación-contracción

I.IV.1. Mecanismos de vaso dilatación

Los mecanismos principales conocidos de la relajación del MLV se pueden clasificar dentro de tres grandes grupos: 1) vaso dilatación dependiente del endotelio; 2) vaso dilatación dependiente del flujo sanguíneo; y 3) vaso dilatación dependiente de la acción directa de agentes sobre el músculo liso vascular.

I.IV.1.i. Vaso dilatación dependiente del endotelio

El descubrimiento de que el endotelio cumple un papel como "mediador" de muchos estímulos que controlan al proceso de relajación-contracción (Furchgott & Zawadsky, 1980; Furchgott, 1983; Cocks & Angus, 1983; Cohen *et al*, 1983) se debe a estudios realizados a partir de la aparente paradoja entre los efectos *in vivo* e *in vitro* de la acetilcolina (ACh). En estos estudios se observó que mientras que la ACh. producía vaso constricción en preparaciones de vasos sanguíneos aislados (Ito *et al*, 1979; Foley *et al*, 1979), provocaba dilatación en las preparaciones *in vivo*. La importancia fisiológica del mecanismo de relajación dependiente del endotelio no se conoce aun por completo pero se ha observado que la remoción del mismo altera la función vascular normal. Por otro lado, se ha demostrado que la relajación de arterias aisladas en respuesta a la ACh (Furchgott & Zawadsky, 1980; Chand & Altura, 1981), ATP y ADP (De Mey & Vanhoutte, 1981), serotonina (Cohen *et al*, 1983), ácido araquidónico (AA) (De Mey *et al*, 1982) bradiquinina (Chand & Altura, 1981) y trombina (Ku, 1982) está mediada parcialmente o en su totalidad por la liberación de ciertos factores de las células endoteliales. Uno de los mecanismos de relajación mediados por el endotelio involucra la producción de prostaciclina. Este dato proviene de la observación de que la inhibición de la síntesis de este agente relajador, aumenta el tono basal, potencia las contracciones causadas por la prostaglandina F_2 (PF₂) en arterias coronarias aisladas (Rubanyi & Vanhoutte, 1985; Roberts *et al*, 1981), y disminuye el diámetro de la arteria en perros en estado conciente (Hintze & Vatner, 1984;

Holtz *et al*, 1984). Sin embargo, se ha observado que la prostaciclina produce relajación a pesar de remoción del endotelio, probablemente actuando como mediador del ácido araquidónico (AA). Gran parte de las acciones mediadas por el endotelio, están relacionadas con la liberación del factor de relajación derivado del endotelio (FRDE). Este factor es liberado por el endotelio como respuesta a varias hormonas o neurotransmisores, como por ejemplo bradiquinina (Selke *et al*, 1993), la sustancia P, serotonina y ACh. (Matsumoto, *et al*, 1993). Se observó que la bradiquinina produce relajación de las arterias coronarias porcinas, y que esta relajación está enormemente afectada, por la infusión intraluminal de saponina, que, debido a su acción como detergente, provoca daño del endotelio. Por otro lado, la acción del agente relajador independiente del endotelio nitroprusido de sodio no es afectada por el tratamiento con saponina, esto sirve para demostrar que la acción inhibitoria de la saponina está relacionada con el daño que causa al endotelio y no por algún otro efecto. En estos estudios se demostró por otra parte, que la relajación provocada por la bradiquinina, no está mediada, al menos en su mayor parte, por los mecanismos relacionados con la prostaciclina. Además, se observó que agentes que provocan la depleción de GMPc en el músculo liso, el cual sirve como mediador de la acción del FRDE (Furchgott, 1983; Ignarro *et al*, 1981), reducen significativamente la acción de la bradiquinina (Selke *et al*, 1993).

Los efectos mediados por el endotelio han dado lugar a controversias como es el caso de la ACh. y la serotonina. Ambos agentes producen en algunos casos contracción y en otros relajación y existen evidencias que señalan que estas diferencias se deberían a la presencia o ausencia de endotelio (Myers *et al*, 1991, ver en este texto "regulación colinérgica"; Cushing & Cohen, 1993). Desde hace unos años se acepta ampliamente que el FRDE es el óxido nítrico (NO), o algún análogo que libera NO en las células de músculo liso (Palmer *et al*, 1987; Ignarro *et al*, 1987). De todas formas cabe señalar que estudios recientes han demostrado que la relajación dependiente de endotelio causada por ciertos

agonistas, no siempre es suprimida por inhibidores de la síntesis de NO (Richard *et al*, 1990; Pawloski & Chapnick, 1991; Miller, 1991). Además de la acción del FRDE como mediador de los agonistas mencionados, se ha demostrado en trabajos recientes en los que se utilizaron inhibidores de la enzima que produce NO, la óxido nítrico sintetasa, que la producción de FRDE contribuye al tono vasorelajante de la coronaria (Winn *et al*, 1993)

I.IV.1.ii. Relajación mediada por el flujo sanguíneo.

Los cambios en el flujo sanguíneo a través de las grandes arterias producen cambios en el diámetro de los vasos en ausencia de estímulos farmacológicos. Aunque los mecanismos de este tipo de relajación no se conocen bien, se ha postulado que las células endoteliales funcionan como "sensores" de los cambios en el flujo sanguíneo y el "stress" (Holtz *et al*, 1983; Lamping *et al*, 1985). Aunque existen evidencias que apoyan esta hipótesis, no se ha comprobado la participación de las células endoteliales y la liberación de FRDE en la circulación coronaria intacta.

I.IV.1.iii. Vaso dilatación dependiente de la acción directa de agentes sobre el músculo liso vascular.

a) Dilatación mediada por agentes β -adrenérgicos.

La estimulación β -adrenérgica produce dilatación de las arterias coronarias. Aunque existen evidencias de que esta relajación esta dada por receptores β_2 (Feigl, 1983; Parratt, 1980; Ross, 1976), se ha demostrado, que en las grandes arterias coronarias los receptores β -adrenergicos son del tipo β_1 (Baron *et al*, 1972).

En un principio se creyó que la relajación causada por agentes β -adrenérgicos podía estar mediada por mecanismos que implicaran la demanda de oxígeno, o al flujo metabólico (Macho *et al*, 1982). Sin embargo, se observó que el agente β -adrenérgico isoproterenol produce relajación cuando es administrado en forma crónica a terneros a los que se les

mantiene el flujo sanguíneo constante, (Young *et al*, 1986; Vatner *et al*, 1986). Esta evidencia demuestra que la regulación β -adrenérgica puede ocurrir independientemente del flujo sanguíneo (Young & Vatner, 1986).

b) Regulación colinérgica

Como se señaló anteriormente, la regulación colinérgica de la arteria coronaria ha sido controvertida. Se ha demostrado en estudios realizados en segmentos aislados de la coronaria, que la ACh produce contracción (Ito *et al*, 1979; Kitamura & Kuriyama, 1979; Nakayama *et al*, 1978; Sakai, 1980). Por otro lado, estudios hechos sobre la circulación canina intacta, demostraron que la ACh produce relajación y aumento del flujo sanguíneo. Una explicación para esta aparente controversia podría ser que en los estudios de arterias aisladas se utilizaron únicamente grandes vasos, ya que estos pueden responder de manera distinta a los pequeños vasos. Debido a la acción vaso constrictora de la ACh se postuló que este agente, y la actividad parasimpática podían ser factores importantes en el desarrollo del vaso espasmo. Para probar esta hipótesis, se estudió el efecto de la administración subcutánea de metacolina en la coronaria y se observó que esta producía vaso espasmo (Yasue *et al*, 1974; Endo *et al*, 1976). El descubrimiento de que el endotelio debía estar intacto para que se produzca vasorrelajación inducida por ACh (Holz *et al*, 1983), sugirió que el vaso espasmo dependiente de los agentes colinérgicos debía ocurrir en zonas dañadas del endotelio.

A pesar de que las evidencias indican que la disparidad de los efectos observados en respuesta a la ACh, podrían deberse a la presencia o ausencia del endotelio, hay que considerar el hecho de que los estudios fueron hechos en diferentes especies. Por otro lado, aunque existe un gran número de evidencias que indican que la relajación causada por la ACh. estaría mediada por el FRDE, no se puede afirmar lo mismo sobre la hiperpolarización causada por este agonista. Al parecer este efecto estaría mediado por otro factor, también

liberado por el endotelio, pero diferente al NO ya que no se ha podido bloquear la hiperpolarización con agentes que capturan NO como la oxihemoglobina o el azul de metileno. Este factor se ha llamado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE) (Chen *et al*, 1988; Huang *et al*, 1988; Taylor & Weston, 1988). Por otro lado, el efecto hiperpolarizante del NO no ha sido demostrado por completo. Estudios realizados en distintos músculos lisos han dado resultados controvertidos (Brayden, 1990; Kimori *et al*, 1988; Tare *et al*, 1990). Recientemente, se ha demostrado que si bien el NO puede producir hiperpolarización en la arteria mesentérica, esta hiperpolarización es diferente a la observada en respuesta a la ACh. (Garland & McPherson, 1992).

Si bien los efectos de la regulación de la coronaria por la ACh han sido ampliamente demostrados, los efectos de la inervación parasimpática no son claros. Aunque se ha observado la presencia de terminaciones de los nervios del parasimpático en la capa adventicia de los pequeños y grandes vasos de la coronaria (Denn & Stone, 1976; Dolezel *et al*, 1978) , sólo se ha podido comprobar la acción vaso dilatadora de la estimulación vagal sobre los pequeños vasos (Reid *et al*, 1985), mientras que este tipo de regulación en los grandes vasos no ha sido aun encontrada.

c). Regulación purinérgica

Existen evidencias sobre la relajación de la coronaria en respuesta a los nucleótidos y nucleósidos de purina. Aunque el ATP y ADP son mas potentes que la adenosina en la relajación de la coronaria, probablemente su papel en la regulación de la actividad esta arteria no es muy grande debido a su rápida degradación a adenosina. Se cree que la adenosina es un regulador importante del flujo sanguíneo en respuesta al incremento de la actividad cardíaca, la isquemia oclusiva y la hipoxia (Berne, 1980). Sin embargo, aunque varios estudios han demostrado la acción de la adenosina en los grandes vasos (Foley *et al*, 1979; Detar, 1980; Herlihy *et al*, 1976), otros estudios han demostrado que el ATP puede

tener un efecto indirecto sobre la coronaria, mediado por el endotelio (De Mey & Vanhoutte, 1981; Rubanyi & Vanhoutte, 1985).

d). Prostaglandinas y metabolitos del ácido araquidónico.

El ácido araquidónico es el precursor de las prostaglandinas (PG), PGE₂, PGF₂α, prostaciclina y tromboxano A₂ (TxA₂), todos ellos, metabolitos del camino de la ciclooxigenasa. Además, el AA puede ser metabolizado por la lipooxigenasa y formar derivados del ácido eicosatetranoico y de los leucotrienos. Las acciones cardiovasculares de estos compuestos no se conocen por completo pero podrían estar involucrados en la vaso dilatación mediada por el endotelio (Furchgott, 1983), quimiotaxis de leucocitos (Moncada & Vane, 1978; Metha & Metha, 1981), y la inhibición de la síntesis de prostaciclina (Moncada & Vane, 1978). Debido a que el metabolismo del AA varía entre los distintos tejidos o especies, la acción de las prostaciclina en el músculo liso vascular es el resultado integrado de los componentes vaso dilatadores y vaso constrictores relativos. Se ha demostrado que la prostaciclina es el principal metabolito del AA en los vasos sanguíneos (Moncada & Vane, 1978; Metha & Metha, 1981) y su síntesis es mayor en la superficie de la capa íntima y en el endotelio. A pesar de que se sabe que la prostaciclina es un vaso dilatador de la coronaria, no se ha demostrado adecuadamente un papel fisiológico para las PG. La prostaciclina es liberada por los vasos de la coronaria en respuesta a la hipoxia, la oclusión coronaria transitoria, la bradiquinina y la angiotensina II, en estos estudios se observó que la inhibición de la ciclooxigenasa tuvo poco efecto en la respuesta del flujo sanguíneo de la coronaria frente a estos estímulos (Woodman *et al*, 1983).

En los grandes vasos de la coronaria, la inhibición de la ciclooxigenasa aumenta la tensión del reposo (Sakanashi *et al*, 1980; Kalsner, 1975; Rubanyi & Vanhoutte, 1985), pero no se conoce bien el significado de este hecho. Estudios realizados en coronaria canina aislada, han demostrado que la prostaciclina *in situ* produce solo pequeños aumentos en el diámetro

de la coronaria, aun a concentraciones a las cuales produce un reducción profunda en la presión arterial (Dusting & Angus, 1984). En este trabajo se observó también que la indometacina no varía el diámetro arterial. Estas observaciones sugieren que la prostaciclina es un vaso dilatador débil de los grandes vasos en comparación a su acción sobre los pequeños vasos.

I.IV.1.iv. Vaso dilatación directa

Ademas de la vaso dilatación mediada por el flujo sanguíneo o por el endotelio, existen agentes que provocan relajación de la coronaria directamente, a nivel de la membrana o intracelularmente sin la mediación de un receptor específico. Dentro de este tipo de mecanismo se encuentran los vaso dilatadores que contienen nitrato, la papaverina, y los bloqueantes de los canales de calcio. La habilidad de estos compuestos para aumentar el flujo sanguíneo de las coronarias es bien conocido. Sin embargo, la acción primaria de estos compuestos en el tratamiento de las enfermedades coronarias, estaría mas relacionado con su acción en los grandes vasos del epicardio y colaterales. Este efecto fue descrito en perros con isquemia crónica. En estos animales, la nitroglicerina produjo un incremento en el flujo colateral retrógrado sin producir ningún incremento en el flujo coronario total (Fam & McGregor, 1964). Esto indicaría que la nitroglicerina actúa principalmente a nivel de los grandes vasos.

La acción de los bloqueantes de los canales de calcio produce un aumento en el diámetro de la coronaria, debido a que impiden la entrada de calcio extracelular el cual es necesario para la contracción (Henry, 1980).

I.IV.2. Mecanismos de vaso constricción.

I.IV.2.i Vaso constricción mediada por agentes α -adrenérgicos.

Como se señaló anteriormente, los vasos de la coronaria están densamente inervados con fibras adrenérgicas simpáticas (Feigl, 1983; Dolezel *et al*, 1984; Denn & Stone, 1976). Los nervios que se observan en la capa adventicia de las arterias coronarias, representan tanto a terminales nerviosas como a nervios que corren a lo largo de los vasos para inervar a los pequeños vasos y al miocardio. Debido a esto, no es posible determinar hasta que punto se hallan inervados los grandes vasos de la coronaria. En preparaciones de coronarias aisladas, se observó que las catecolaminas producen vaso constricción de los grandes vasos, mientras que en los pequeños vasos se observó la respuesta opuesta, es decir, vaso relajación (Zuberbuhler & Bohr, 1965).

Esta diferencia entre la sensibilidad de los grandes y los pequeños vasos sugiere, que en ausencia de las influencias metabólicas que controlan a los vasos pequeños, los vasos del epicardio, serían un sitio primario para el control del flujo sanguíneo de la coronaria por los agentes adrenérgicos (Kelley & Feigl, 1978; Cohen & Kirk, 1973). Estudios hechos en perros, en una preparación en la que se mantuvo el flujo constante, demostraron que en presencia de bloqueantes β -adrenérgicos, la estimulación de los receptores de tipo α con norepinefrina o por estimulación del ganglio estrellado, produce una elevación de la resistencia de la coronaria grande, menor a la observada en los vasos distantes (Kelly & Feigl, 1978). Estos estudios sugieren que las arterias coronarias del epicardio no serían los blancos principales de la vaso constricción dependiente del sistema simpático. Esta conclusión ha sido apoyada por otros estudios en los que se trabajó con perros en estado consciente en los que se observó, mediante la medición ultrasónica del diámetro de la coronaria circunfleja, que el agonista α -adrenérgico, metoxamina, produce una disminución pequeña en el diámetro de la coronaria en relación con el gran aumento producido en la

presión arterial (Vatner *et al*, 1980; Young & Vatner, 1986). Por lo tanto, si bien los grandes vasos de la coronaria son susceptibles a la estimulación α -adrenérgica, no son el factor principal de la vasoconstricción causada por este tipo de estimulación.

I.IV.2.ii. Serotonina, ergonovina y plaquetas.

La ergonovina y otros alcaloides de *ergot* han sido utilizados para provocar vaso espasmos en coronarias humanas (Curry *et al*, 1979; Schroeder *et al*, 1977). Se observó que los efectos vaso constrictores de la ergonovina estaban mediados por receptores serotoninérgicos (Muller-Schweinitzer, 1974, Yokoyama *et al*, 1983). Esto dio lugar a que se investigara el papel de la serotonina en la vasoconstricción y en el vasoespasmo de la coronaria. Debido a que la fuente principal de serotonina que afecta a la coronaria son las plaquetas, se ha estudiado el papel de las mismas en la vasoconstricción. Sin embargo, las plaquetas también liberan histamina, tromboxano A₂ (TxA₂), ATP y ADP, por lo cual el estudio de su acción sobre la coronaria es complejo (Metha & Metha, 1981). El mecanismo de acción de la ergonovina en la vasoconstricción varía según las distintas especies y tejidos. En la vena femoral canina (Muller-Schweinitzer & Stumrmer, 1974), aorta de rata y arteria femoral de perro (Apperly *et al*, 1980), y en arterias carótida y femoral de conejo (Yokoyama *et al*, 1983), la acción de la ergonovina esta mediada por receptores α -adrenérgicos. En coronaria canina (Muller-Schweinitzer, 1980; Brazenor & Angus, 1981), y de conejo (Yokoyama *et al*, 1983), la acción de la ergonovina no es afectada por el bloqueo de los receptores α -adrenérgicos, mientras que si es inhibida por el antagonista serotoninérgico, metisergido. En humanos, el vasoespasmo inducido por la ergonovina puede ser revertido por el bloqueo de los receptores α -adrenérgicos, sugiriendo que existe un componente de la acción de la ergonovina que implica a este tipo de receptores. Por otro lado, se ha estudiado la acción directa de la serotonina en la vasoconstricción de las grandes

coronarias. Se observó que en segmentos aislados de coronaria, la serotonina provoca vasoconstricción (Brazenor & Angus, 1982; Van Neuten *et al*, 1980; Cohen *et al*, 1983). La vasoconstricción causada por la serotonina en arterias coronarias enteras (Lamping *et al*, 1985; Brum *et al*, 1984), y aisladas (Cohen *et al*, 1983; Cocks & Angus, 1983), es mayor en aquellos vasos que no poseen endotelio. (Cohen *et al*, 1983; Cocks & Angus, 1983). Por otro lado, se ha observado, que el antagonista específico del receptor 5-HT₂, quetanserina bloquea la contracción producida por la serotonina en ausencia del del endotelio (Brazenor & Angus, 1982; Van Neuten & Vanhoutte, 1984). Por el contrario, cuando el endotelio está presente la serotonina provoca vasodilatación. Se observó que, en presencia del endotelio la serotonina provoca relajación de las arterias coronarias aisladas precontraídas y que esta relajación dependiente del endotelio es bloqueada por los antagonistas serotoninérgicos inespecíficos metisergida y metiotepina (Houston *et al*, 1985; Cohen *et al*, 1983). Esta evidencias estarían indicando que la serotonina tiene dos tipos de acción en el tejido vascular: 1) vasoconstricción independiente del endotelio, mediada por receptores 5-HT₂ de las células del músculo liso y 2) vasodilatación dependiente del endotelio, mediada por receptores distintos a los 5-HT₂ del endotelio.

La agregación de plaquetas en vasos aislados de la coronaria tiene una acción similar a la de la serotonina. Mientras que las suspensiones de plaquetas provocan contracción de los segmentos en reposo, producen relajación de los segmentos precontraídos con PGF₂ o norepinefrina (Cohen *et al*, 1983). En ausencia del endotelio la contracción se ve aumentada en ambos casos. Se piensa que la relajación producida por la agregación de plaquetas se debería en parte a la liberación de serotonina, pero principalmente a los efectos dependientes del endotelio del ATP y ADP liberados por las plaquetas.

I.V Canales de K regulados por calcio. Generalidades.

Las corrientes de K^+ dependientes de calcio de las células de músculo liso de coronaria son conspicuas. Wilde & Lee (1989) describieron dos tipos de corrientes de K_{Ca} en músculo liso de arteria coronaria de perro y notaron que este tipo de corrientes eran las predominantes en estas células. También se han encontrado este tipo de corrientes en células aisladas de coronaria porcina (Toro *et al.*, 1989), y en músculo liso de coronaria de conejo (Volk *et al.*, 1991). En estudios de canales únicos se observó que los canales de K_{Ca} son abundantes en membranas (Toro *et al.*, 1991), y en "patches" de células de coronaria porcina (Silberberg & Van Breemen, 1990; Fujino *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1991).

Los canales de K_{Ca} se encuentran en un gran número de tejidos tales como: cerebro, músculo esquelético y liso, epitelios y glándulas secretoras. Existen distintos tipos de canales de K_{Ca} y se pueden clasificar en primer término según su conductancia, en: "maxi" (≈ 150 - 300 pS, canales K_{Ca} en este texto), "intermedios" (≈ 100 pS) y "pequeños" (≈ 100 pS). (Ver revisión de Latorre *et al.* 1989; Cook & Young, 1990; Mc. Manus, 1991).

Debido a su gran conductancia, lo cual hace relativamente fácil su detección, el "maxi" K ha sido ampliamente caracterizado en distintos tipos de células. Una de las características principales de estos canales es que su probabilidad de apertura (P_o) aumenta en función de la concentración de calcio intracelular. La concentración de Ca^{2+} mínima necesaria para que el este canal se encuentre en el estado abierto, varía entre los distintos tipos celulares desde valores submicromolares a micromolares. La otra característica importante de los K_{Ca} es la dependencia de la P_o del potencial de membrana (V_m); siendo mayor a potenciales despolarizados y menor a potenciales hiperpolarizados.

Además de la regulación por Ca^{2+} y por el voltaje, existen herramientas farmacológicas que permiten caracterizar a los canales K_{Ca} . Algunas de estas herramientas farmacológicas son: a) la disminución en la amplitud del canal por concentraciones

micromolares de (TEA) externo, debido al bloqueo "rápido" del canal (Vergara *et al.*, 1984; Yellen, 1984), b) la aparición de estados cerrados prolongados debido al bloqueo "lento" causado por concentraciones nM del veneno del escorpión *Leirus quinquestratus*, caribdotoxina (Miller *et al.*, 1985) o de manera similar por la iberiotoxina (Candia *et al.*, 1992), c) bloqueo por el ion bario, interno (Vergara & Latorre, 1983), d) insensibilidad a la apamina (Pérez *et al.*, 1993) y e) insensibilidad a la 4-aminopiridina (Castle *et al.*, 1989; Perez *et al.*, 1993).

En líneas generales se puede decir que los canales K_{Ca} acoplan el potencial de membrana a la concentración interna de calcio, de manera que un aumento en la concentración de calcio intracelular provoca un eflujo de iones K^+ y despolarización de la membrana. Sin embargo esta relación no es siempre tan directa ya que existen otros factores que participan en la regulación de estos canales y por lo tanto el papel fisiológico de los canales K_{Ca} en músculo liso no ha sido, todavía, bien establecido. Debido a que la probabilidad de apertura de estos canales depende del potencial de membrana y de la concentración de calcio, varios autores han postulado que este canal participaría fundamentalmente en la fase de repolarización (Weigel *et al.*, 1979; Walsh & Singer, 1983; Carl *et al.*, 1990). Por otro lado, los canales K_{Ca} tienen una densidad por célula grande ($\approx 15,000/cel$), y una enorme conductancia ($\approx 300 pS$). Estas características, sumadas a la alta resistencia de entrada de las células de músculo liso ($\geq 1 G\Omega$), han sugerido para otros autores que los canales K_{Ca} cumplen un papel en la mantención del potencial de reposo del músculo liso (Trieschmann & Isenberg, 1989). Esta idea ha sido recientemente reforzada por el trabajo de Brayden & Nelson (1992), en el que observaron que los bloqueantes de los canales K_{Ca} , TEA y CTX producen despolarización en células de la arteria cerebral.

En los últimos años han aparecido un gran número de trabajos que demuestran que si bien el potencial de membrana y el calcio son factores importantes en la modulación de los canales de K_{Ca} , esta modulación es bastante mas compleja, y la lista de agentes moduladores

ha ido aumentando año a año. Se conocen hasta la fecha numerosos mecanismos de regulación por diferentes metabolitos como hormonas, neurotransmisores, nucleótidos y lípidos. Aunque los mecanismos moleculares subyacentes a esta regulación no se pueden explicar todavía en detalle, algunos mecanismos posibles ya han sido descritos, como por ejemplo: a) modulación por ligando, b) ciclos de fosforilación-desfosforilación, y c) modulación por proteínas G. Es importante remarcar que esta clasificación está hecha con fines de facilitar su estudio, pero que los mecanismos propuestos están muchas veces relacionados y que algunos de los moduladores del canal K_{Ca} podrían ser incluidos en más de una de estas clasificaciones.

a) modulación por ligando

Este es el más general de los tres mecanismos mencionados, e implica la unión de una molécula (ligando) a un sitio específico en la membrana (receptor). Este sitio específico puede ser el mismo canal u otro sitio cercano al mismo que a su vez puede interactuar directamente con el canal o iniciar un proceso donde intervengan segundos mensajeros que finalmente modulen al canal. Dentro de los mecanismos ligando dependiente que modifican al canal K_{Ca} , se puede incluir la acción de un gran número de metabolitos. En los siguientes párrafos se describirán brevemente las acciones de varios agentes que actúan por este mecanismo importantes en la regulación de los canales K_{Ca} de músculo liso vascular.

Ácido araquidónico

Como se señaló en la primer parte de esta introducción, el AA es un potente agente relajante del MLV. Esta acción relajadora ha sido relacionada, por lo general, con la producción de diferentes metabolitos de los caminos de la ciclo y lipooxigenasas. Sin embargo, existen evidencias de que el AA puede producir relajación activando directamente a canales K_{Ca} de coronaria incorporados en bicapas (Toro & Scornik, 1991) y a canales de

K_{Ca} de arteria pulmonar (Kirber *et al.*, 1992 ; Katz *et al.*, 1990). Estos autores demostraron que el canal de K_{Ca} de músculo liso vascular puede ser activado por concentraciones de 50 nM a 20 μ M de AA. Además, el hecho de que otros ácidos grasos que no son sustratos de la lipooxigenasa, también activan al canal K_{Ca} (Kirber *et al.*, 1992), sugiere que el AA tiene una acción directa sobre el canal (Kirber *et al.*, 1992).

Angiotensina II (AGII)

La angiotensina II es un péptido considerado como uno de los agentes vasoconstrictores mas potentes de la arteria coronaria. Se han encontrado receptores AGII en un gran número de músculos lisos vasculares, y su acción en el metabolismo celular ha sido ampliamente estudiada (Griendling *et al.*, 1989). La unión de la AGII a su receptor provoca la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual cataliza la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DG). A su vez, el IP3 provoca la liberación de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares, que resulta en un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Se sabe, por otro lado, que la AGII produce un incremento de las corrientes de calcio, bloqueo de las corrientes de potasio (Bkaily *et al.*, 1988; Ohya & Sperelakis, 1991) y despolarización de la membrana plasmática. En estudios de canales únicos incorporados en bicapas artificiales, se ha demostrado que la AGII puede inhibir a los canales K_{Ca} . Aunque no se ha demostrado por completo, estos estudios sugieren que el efecto de la AGII es una acción directa sobre el canal (Toro *et al.*, 1990). Tanto para la AGII como para el caso anterior del AA, el hecho de que existan evidencias de una acción directa no descarta la posibilidad de que existan otras vías de acción paralelas que involucren segundos mensajeros.

Protones

Varias líneas de investigación han demostrado que los canales K_{Ca} pueden ser

modulados por el pH. Estos estudios coinciden en su mayoría, en que la actividad del canal se reduce a pH ácido. La disminución de la actividad del canal se evidencia en un corrimiento en la curva de dependencia al voltaje (Cook *et al.*, 1984; Christensen & Zeuthen, 1987; Laurido *et al.*, 1991) y por cambios en la dependencia del Ca^{2+} . (Kume *et al.*, 1990; Laurido *et al.*, 1991) Por un lado, a pH mas bajo, la afinidad del canal por el calcio parece estar disminuida (la curva se corre hacia concentraciones de Ca^{2+} mas altas), y por el otro lado, la cooperatividad aparente de la unión del calcio a su sitio específico parece disminuir (disminuye el coeficiente de Hill). La importancia fisiológica de los cambios producidos pH sobre la actividad del canal no han sido aun dilucidados pero es probable que los H^+ afecten no solo directamente al canal, sino que puedan actuar como moduladores sobre la acción de otras moléculas con el mismo.

Alcoholes

Los alcoholes forman parte de los anestésicos generales. El mecanismo de acción no se conoce bien pero se ha relacionado la potencia anestésica con la solubilidad en la membrana, sugiriendo que el modo de acción estaría relacionado con los cambios causados en la membrana lipídica (Seeman, 1982; Roth, 1979; Janoff & Miller, 1982). Sin embargo Tas *et al* han demostrado que la solubilidad dentro de una serie homologa de alcoholes, en las membranas lipídicas, no es el único factor que determina sus efectos fisiológicos, ya que encontraron que la capacidad de una serie de alcoholes de inhibir el flujo de K^+ a través de canales de K_{Ca} no coincide con su solubilidad (Tas *et al.*, 1990)

Endotelina (ET)

Este péptido vasoactivo fue aislado del sobrenadante de células endoteliales en cultivo (Yanagisawa *et al.*, 1988). Se ha demostrado que la endotelina produce tanto contracción como relajación de los vasos de la coronaria (Kodama, *et al.*, 1989; Folta, *et al.*,

1989). Mientras que la relajación provocada por la endotelina se explica por la liberación de FRDE y prostaciclina de las células endoteliales (De Nucci *et al.*, 1988), la contracción se puede explicar por diferentes mecanismos que elevan la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ incluyendo la activación de canales de Ca^{2+} y la inducción del clivaje de los inositoles de fosfato por estimulación de la fosfolipasa C (PLC) (Goto *et al.*, 1989; Van Renterghem, *et al.*, 1988).

Recientemente, Hu *et al.* (1991) demostraron que la endotelina puede modular a la actividad de los canales de K_{Ca} de manera dual proveyendo una explicación posible para sus efectos opuestos en el músculo liso de la coronaria. El estudio de células de músculo liso de coronaria porcina disociadas enzimáticamente, utilizando el método de "cell attached patch clamp" demostró que la ET-1 aumenta la actividad (0.1 nM- 1 nM) de un canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de 216 pS de amplitud ($K_e=140$), en todo el rango de potenciales estudiados (desde 40 hasta 80 mV). Este aumento en la actividad del canal, no fue observado en la vena porta. Por otro lado, cuando la concentración de ET-1 fue aumentada a 10 nM se observó una disminución en la actividad del canal, lo cual estaría de acuerdo con la acción vasoconstrictora de la ET-1. Los autores de este trabajo, proponen que el incremento en la actividad del canal se debería a un aumento en la concentración de calcio ya que el bloqueante de los canales de calcio, PN 200-110, previno la acción de 1 nM de ET-1. Por el contrario, la acción inhibitoria de 10 nM de ET-1 no fue afectada por este bloqueante de los canales de calcio (Hu *et al.*, 1991).

Nitroglicerina y GMPc

Como se señaló en la primer parte de esta introducción, la identidad química del factor endotelial de relajación FRDE es el óxido nítrico, aunque datos mas recientes demuestran que este no sería el único componente del FRDE (Myers *et al.*, 1989). Se sabe que los compuestos que contienen NO como la nitroglicerina, tienen acción como

vasorelajantes. Estos compuestos activan la forma soluble de la guanilato ciclasa (GC), provocando un aumento en los niveles de GMPc, seguido de relajación (Rapoport, 1986; Murad, 1986). Además, se sabe que el NO produce hiperpolarización del músculo liso de coronaria en reposo, (Tare *et al.*, 1990) sugiriendo que podría estar activando canales de K^+ . De acuerdo con esto, Fujino *et al.* demostraron que los canales de K_{Ca} sensibles a la 4-aminopiridina de células de músculo liso de coronaria, son activados por $10 \mu M$ de nitroglicerina. Estos autores, también observaron que el análogo permeable del GMPc, Br-GMPc ($300 \mu M$) en "cell attached patches" y el GMPc ($300 \mu M$) en "inside-out patches" indujeron la activación del K_{Ca} . Por lo tanto la activación de estos canales por compuestos que contienen NO, y por el GMPc, podría estar involucrada en la relajación de la coronaria. Por otro lado, se ha relacionado la acción relajante del GMPc con la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), la cual disminuye la liberación de calcio de compartimentos intracelulares (Lincoln & Cornwell, 1991). No se ha podido establecer aún claramente si los efectos del GMPc sobre la vasodilatación, y en particular sobre la activación del canal de K_{Ca} se deben a la fosforilación por la PKG o si podría ejercer su efecto directamente sobre el canal. Sin embargo, se ha demostrado recientemente, que el agregado de PKG exógena (concentración final $300 U/ml$), en presencia de $50 \mu M$ de GMPc y $1 mM$ de ATP, incrementa la P_o de los canales de K_{Ca} de músculo liso de arteria coronaria (Taniguchi, *et al.*, 1993)

Histamina

Se ha observado que la histamina produce inhibición de corrientes salientes espontáneas transitorias (STOCs) las cuales han sido interpretadas como la activación simultánea de canales K_{Ca} en respuesta a una liberación periódica de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares (Benham & Bolton, 1986). Por otro lado, en experimentos de "voltage clamp" realizados en células aisladas de carótida se observó que $10 \mu M$ de

histamina, produce inhibición de una corriente saliente espontánea (I_{10}) e hiperpolarización transitoria (Desilets *et al.*, 1989).. De manera similar a las STOCs, la I_{10} se debe mayormente a la activación cíclica de canales de K_{Ca} por la activación de canales de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares. Esta observación está basada en el hecho de que el quelante de calcio EGTA y los agentes que impiden la liberación de Ca^{2+} interno por el retículo sarcoplásmico como la cafeína (10 mM) y la rianodina (1 μ M) suprimen a la I_{10} . Además, la I_{10} es dependiente del voltaje y sensible al TEA. Sin embargo, el mecanismo de inhibición de la I_{10} por la histamina no se conoce bien. Se cree que la histamina podría estar vaciando los compartimentos intracelulares de calcio y por lo tanto el calcio no podría activar a la I_{10} . Por otro lado, en células provenientes de una línea celular, DDT₁MF-2, la histamina activa una corriente saliente sensible al Ca^{2+} e independiente del voltaje.(Molleman *et al*, 1991). Esta acción no es afectada por el antagonista de los receptores H_2 , cimetidina (10 μ M), mientras que si lo es por el antagonista de los receptores H_1 , mepiramina (10 μ M), esto indicaría que los receptores involucrados son del tipo H_1 . La corriente inducida por la histamina no es afectada por apamina (300 nM), 3-4, diaminopiridina (100 μ M), ni por el bloqueante de los canales de K^+ sensibles al ATP, glicipida (100 μ M). La corriente saliente inducida por histamina ha sido asociada al incremento en la concentración interna de Ca^{2+} , inositol (1,3,,5)-trifosfato (IP_3) e inositol (1,3,4,5)-tetrafosfato (IP_4). Sin embargo, el aumento de la concentración de IP_3 es rápido y transitorio, y no coincide con el curso temporal de la corriente saliente. Por otro lado, el aumento en la formación de IP_4 , correlaciona con el aumento en la concentración de Ca^{2+} y la corriente saliente inducida por histamina. Estos hechos sugieren que el Ca^{2+} y el IP_4 , son reguladores importantes de la corriente saliente evocada por la histamina. Esquemáticamente, el mecanismo de acción estaría dado por la activación de una proteína G, luego de la unión de la histamina a su receptor, el clivaje de los inositoles de fosfato, la formación de IP_4 (luego de la fosforilación del IP_3) junto con la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares causada por el IP_3 , y la activación

de los canales de K^+ .

Se puede concluir que los canales de K_{Ca} , responsables de las corrientes salientes, sensibles a la inhibición y la activación por histamina son diferentes canales.

b) Ciclos de fosforilación-desfosforilación

Se sabe desde hace tiempo, que muchas hormonas y neurotransmisores actúan por medio de cierto tipo de enzimas (quinasas) que catalizan la incorporación de grupos fosfato de alta energía a las moléculas efectoras. Se sabe también, que en la activación de las quinasas intervienen segundos mensajeros, y muchas veces el nombre de las diferentes quinasas está relacionado con éstos. En el caso de los canales de K_{Ca} se conocen varias quinasas que intervienen en su regulación directamente, o actuando sobre alguna molécula asociada al canal. Entre estas quinasas se pueden mencionar: la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa G (PKG), la proteína quinasa C (PKC), y la proteína quinasa dependiente de calmodulina. De todas estas, la más estudiada con respecto al canal K_{Ca} es la PKA. El esquema general del mecanismo de la fosforilación dependiente de PKA es: 1) unión del agonista a su receptor; 2) activación de una proteína G asociada; 3) activación de la adenilato ciclasa y aumento de los niveles de AMPc; 4) activación de la PKA y 5) transferencia de una molécula de fosfato proveniente del ATP a la molécula efectora (Fig. 2).

Diferentes líneas de investigación han demostrado que los canales K_{Ca} pueden ser fosforilados por acción de la PKA, y que esta fosforilación puede resultar en una disminución, o en un aumento de la actividad del canal, según el tejido o el subgrupo de canales. Esta acción aparentemente paradójica podría deberse a la existencia de varias isoformas del canal K_{Ca} con diferentes sitios expuestos a la fosforilación, o a la existencia de proteínas regulatorias ligadas al canal que puedan expresarse o no según los diferentes tejidos. Se han publicado evidencias de la existencia de isoformas del canal K_{Ca} para

músculo liso de coronaria (Toro *et al.*, 1991) y cerebro (Farly and Rudy, 1988; Reinhart *et al.*, 1991), y estudios moleculares del canal K_{Ca} clonado de *Drosophila, slowpoke*, indican que pueden existir una gran número de isoformas del canal K_{Ca} (Atkinson *et al.*, 1991). Entre los canales que se inhiben luego de la fosforilación dependiente de PKA, se pueden mencionar: canales K_{Ca} de gonadotrofos de pituitaria ovina (Sikdar *et al.*, 1989), los canales K_{Ca} "tipo 2" de cerebro (Reinhart *et al.*, 1991) y canales K_{Ca} de miometrio de humano no preñado (Pérez *et al.*, 1992). Por otro lado, se ha observado activación de los canales K_{Ca} por fosforilación dependiente de PKA en una gran variedad de tejidos como: aorta, traquea y músculo colónico (Sadoshima *et al.*, 1988; Kume *et al.*, 1989; Carl *et al.*, 1991), células del conducto pancreático (Gray *et al.*, 1990), cerebro (Reinhart *et al.*, 1991; Chung *et al.*, 1991) y miometrio de rata preñada (Pérez *et al.*, 1993). Aunque no se conoce exactamente de que manera la fosforilación dependiente de PKA modifica la P_o del canal, se ha demostrado que para el caso de la activación, varía la afinidad del canal por el calcio, mientras que se mantiene igual el coeficiente de Hill (Reinhart, *et al.*, 1991). El hecho de que los canales K_{Ca} se puedan encontrar fosforilados o desfosforilados, y que esto estuviese afectando a la afinidad el canal por el calcio, podría explicar de alguna manera que en los estudios de canales únicos, se haya observado dentro de una misma familia de canales K_{Ca} , que exista variación en la afinidad para el calcio. Dentro de los agonistas que podrían modular a los canales K_{Ca} por medio de la fosforilación, se pueden mencionar a los agentes β -adrenérgicos y a la somatostatina:

Agentes β -adrenérgicos

La estimulación β -adrenérgica causa activación de los canales de K_{Ca} en músculo liso de aorta (Sadoshima *et al.*, 1988), tráquea (Kume *et al.*, 1989) y útero (Toro *et al.*, 1990; Anwer *et al.*, 1993). Estudios realizados en músculo liso de aorta de rata, utilizando la técnica de "ceil attached patches", demostraron que la aplicación extracelular de

isoproterenol (10^{-5} M) aumenta la P_o de los canales de K_{Ca} de manera reversible por lavado, o por el agregado del antagonista β -adrenérgico, propanolol (10^{-6} M). Este aumento de la P_o no fue observado en experimentos de "cell attached patches", cuando la droga fue agregada en la pipeta en lugar de en el baño. Estas observaciones sugieren que el mecanismo de acción de los agentes β -adrenérgicos involucraran la participación de segundos mensajeros. Para estudiar este punto, se observó directamente la acción de activadores de la adenilato ciclasa, como la forskolina, o de análogos del AMPc. En estos estudios se observó que tanto la perfusión de las células de músculo liso con forskolina (10^{-5} M), como el agregado de dibutiryl AMPc (10^{-4} M) u 8-bromo-AMPc ($5 \cdot 10^{-5}$ M), producen un aumento en la actividad del canal. Por otro lado, cuando se agrega AMPc (10^{-6} M) en el baño junto con la PKA ($5 \cdot 10^{-7}$), en "inside out patches", se observó un aumento de la P_o del canal que no fue provocado por el solo agregado de AMPc. (Sadoshima *et al.*, 1988). Recientemente, Fan *et al* (1993), reportaron experimentos similares realizados en miocitos de *Taenia Coli*. En este trabajo observaron en primer lugar, que el agente β -adrenérgico, isoproterenol, produce un aumento tanto de las corrientes salientes de K^+ observadas en registros de "whole cell" como de la NPo de los canales K_{Ca} observados en "cell attached patches". Ambos efectos fueron suprimidos por el agregado previo de la toxina colérica, la cual a bajas concentraciones (≈ 1 pM) disminuye la interacción entre el agonista y los receptores asociados a la proteína G_s (Stadel & Lefkowitz, 1981; Cote *et al.*, 1982; Shen & Crain, 1990). Por otro lado el agregado de esta toxina en una concentración 10 veces mayor, activa a la proteína G_s , por medio de la ribosilación de la misma, lo cual previene la hidrólisis del GTP y mantiene a la proteína G activada (Cassel & Selinger, 1977; Gill & Meren, 1978; Moss & Vaughan, 1988). Fan *et al* observaron que 10 pM de la toxina colérica aumentan la actividad de los canales de K_{Ca} , la cual permanece inalterada luego del agregado posterior del isoproterenol. Estos resultados sugieren la participación de la proteína G_s en el efecto del isoproterenol sobre los canales de K_{Ca} . Estos mismos autores

observaron que tanto la forskolina como el dibutililo de AMPc aumentan la actividad de los canales de K_{Ca} de manera similar a la observada para el agente β -adrenérgico. Sin embargo, en algunos experimentos, observaron que el cambio en la actividad del canal, cuando el isoproterenol y la forskolina son agregados simultáneamente, es mayor que el de ambos agentes por separado. Por lo tanto, si bien este trabajo demuestra que tanto la estimulación β -adrenérgica, como la activación directa de la vía adenilato ciclasa-proteína quinasa A, provocan la activación de los canales de K_{Ca} , no deja claro si la activación es el resultado de una única vía o existen distintos caminos luego de la estimulación β -adrenérgica que llevan a la activación de los canales de K_{Ca} .

Somatostatina

White *et al.* (1991) demostraron que el neuropéptido somatostatina aumenta las corrientes de K^+ por la activación de los canales maxi K_{Ca} (120 pS en 140/140 mM KCl), de células tumorales de pituitaria de rata (GH_4C_1). Estas células fueron estudiadas mediante la técnica de "patch clamp" perforado con nistatina, la cual permite la medición de las corrientes macroscópicas sin perder componentes intracelulares (White *et al.*, 1991), y en "patches" de membrana para estudiar a los canales únicos. Se observó que 100 μ M de somatostatina aumentan la corriente de K_{Ca} a todos los voltajes estudiados (0 a +40 mV). Los efectos de la somatostatina fueron bloqueados por 2 mM de $CoCl_2$; esto sugiere que la respuesta a la somatostatina involucra a los canales de K_{Ca} , que serían activados por el calcio que entra al citoplasma por los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. En concordancia con estas observaciones, tanto la corriente saliente, como el efecto de la somatostatina fueron bloqueadas por CTX (30 nM) y TEA (1 mM). A nivel de canal único, se observó que 100 nM de somatostatina agregada al baño en "cell attached patches" aumenta la P_o de los canales K_{Ca} . El hecho de que esta activación ocurra sin que la somatostatina este en contacto directo con el canal, indica que la acción de la somatostatina involucraría a la

acción de algún segundo mensajero. Este segundo mensajero, difícilmente podría ser el calcio, ya que la somatostatina reduce la entrada de este ion por los canales sensibles al voltaje. La existencia de un camino metabólico que involucre a segundos mensajeros en el efecto de la somatostatina es apoyada por varias líneas de evidencia: a) el pretratamiento de las células con 100 ng/ml de toxina pertusis suprime el efecto de la somatostatina, lo cual sugiere la presencia de una proteína G en este proceso; b) el inhibidor de la fosfatasa, ácido ocadaico previene la estimulación de los canales K_{Ca} por la somatostatina, indicando que la acción de la somatostatina podría involucrar a la desfosforilación del canal; y c) se observó que la somatostatina activa a los canales de K_{Ca} previamente inhibidos por un análogo del AMPc. Estos hechos indican que la fosforilación podría inhibir a estos canales y que la somatostatina induciría la desfosforilación provocando la activación de los canales. Hasta el presente el papel de la proteína G en la acción de la somatostatina no está claro. La posibilidad de que una proteína G active directamente al canal fue descartada por los siguientes hechos: 1) en experimentos de "cell attached patch", la somatostatina aplicada en el baño pudo estimular a los canales lo cual indicaría la acción de segundos mensajeros; y 2) el efecto de la somatostatina no se reprodujo en canales únicos por la adición de 100 μ M de GTP en el lado interno del canal. En resumen la somatostatina podría estar activando al canal por la activación de una fosfatasa o por la inhibición de una quinasa que mantendría al canal inhibido. El papel de la proteína G en cualquiera de los dos casos no queda aun claro.

Como se mencionó anteriormente, los canales K_{Ca} pueden ser fosforilados también por otras quinasas además de la PKA. Recientemente, Minami *et al* (1993) reportaron que el canal K_{Ca} es inhibido por la fosforilación dependiente PKC. En este trabajo, el agregado del activador de la PKC, forbol, 12-miristato, 13-acetato (PMA, 1 μ M), o de una fracción de PKC de cerebro rata, produjo una disminución de la actividad del canal de K_{Ca} de células cultivadas de músculo liso de coronaria porcina. Estos autores también observaron que los activadores de la PKC producen inhibición del canal de K_{Ca} previamente activado por el

ionóforo de calcio, A23187 o por el análogo del AMPc, dibutirilo de AMPc. Además de esta evidencia directa existen otras evidencias que indican que el canal de K_{Ca} es sustrato de la PKC. Se sabe que varios agonistas como la AGII, la bradiquinina y la histamina (Toro & Stefani, 1991), son moduladores del canal K_{Ca} y que el mecanismo conocido de su acción, es la estimulación de la fosfolipasa C, involucrada a su vez en la activación de la PKC. Otra evidencia indirecta es el hecho que en la secuencia clonada del *slowpoke*, se han encontrado varias secuencias consenso que serían sitios de fosforilación por PKC (Atkinson *et al.*, 1991).

c) Modulación por proteína G

Las proteínas dependientes de guanosin trifosfato son ubíquas dentro de todos los tipos celulares y han sido ampliamente estudiadas por su importancia en infinitos procesos de regulación metabólica. La regulación de los canales de K_{Ca} por estas proteínas forma parte del presente trabajo de tesis. Por lo tanto es importante, hacer una breve descripción sobre la naturaleza y los mecanismos de acción que se conocen para las mismas. Desde su descubrimiento en 1971 (Rodbell, *et al.*, 1971), se sabe que las proteínas membranales llamadas proteínas G, están involucradas en la transducción de señales hormonales, a la formación de AMPc por la acción de la enzima adenilato ciclasa, y que el nucleótido GTP es necesario en este proceso. El esquema general de este sistema de transducción de señales está dado por la presencia de: 1) la molécula receptora (R), 2) la proteína G (G) y 3) la molécula efectora (E) (Fig 3). La estructura heterotrimérica de la proteína G fue conocida en 1980. De estas tres subunidades, la α es variable entre las distintas proteínas G (Northup, *et al.*, 1980) mientras que las subunidades β y γ son muy similares (Manning & Gilman, 1983). Se conocen hasta la fecha 15 subunidades a diferentes, agrupadas dentro de las familias G_s , G_i , G_q y G_{12} (Wilkie *et al.*, 1992). En cuanto a su solubilidad, se sabe que las subunidades α y β son hidrosolubles, mientras que la subunidad γ es altamente hidrofóbica

por lo cual se cree que las proteínas G son proteínas de membrana periféricas ancladas a la membrana por la subunidad α . Se sabe también que las proteínas G tienen actividad de GTPasa (Godchaux & Zimmerman, 1979; Cassel & Selinger, 1976) y que se disocian luego de la interacción con el GTP, dejando por un lado a la subunidad α unida al GTP y por el otro lado al dímero formado por las subunidades $\beta\gamma$ (Northup *et al.*, 1983; Fung *et al.*, 1981). Además del sitio de unión para el GTP, la subunidad α posee la actividad GTPasa y los sitios de ribosilación de ADP por las toxinas pertusis y colérica.

Sobre la base de estos estudios, varios grupos han construido modelos describiendo el ciclo de activación-inactivación de las proteínas G (Cassel and Selinger, 1978; Birnbaumer, 1990; Bourne *et al.*, 1990). Este proceso ha sido observado tanto en solución como en membranas nativas. El hecho de que en el primer caso, los análogos no hidrolizables del GTP pero no el mismo GTP activaran a la proteína G, mientras que en el segundo caso, la presencia del GTP fuera suficiente para activar a la proteína G, sugirió que un receptor membranal estuviese involucrado en el proceso de activación. Efectivamente, el primer paso de este ciclo está dado por la unión del ligando al receptor lo cual produce un cambio en la afinidad del complejo proteína G-receptor (GR) por el GDP (disminuye la afinidad) y el GTP (aumenta la afinidad). En la figura 3 se representa dicho ciclo. Este está dado entre la forma inactiva (unida al GDP) y la forma activa (unida al GTP) de la proteína G. La unión del GTP con el heterotrímero provoca el clivaje del mismo quedando por un lado la subunidad α unida al GTP y por el otro el dímero compuesto por las subunidades $\beta\gamma$; en esta etapa del proceso es importante la presencia del ion Mg^{2+} cuyo requerimiento también está afectado (disminuido) por la unión ligando-receptor (Iyengar & Birnbaumer, 1982). La terminación del ciclo está dada por la actividad ATPasa intrínseca de la subunidad α que libera una molécula de fosfato (P_i) del GTP, quedando un complejo α -GDP que tiene una alta afinidad por el receptor, al cual se une para luego acoplarse nuevamente con el dímero $\beta\gamma$ volviendo al punto de iniciación del ciclo. Aunque en la mayoría de los sistemas

estudiados está clara la participación de la subunidad α como efectora del proceso de transducción (Northup *et al.*, 1983b; 1981; Hescheler *et al.*, 1987 ; Yatani *et al.*, 1988), existen evidencias en otros sistemas de que pueden ser regulados tanto por la subunidad α como por las subunidades $\beta\gamma$ (Jelsema & Axelrod, 1987; Kim *et al.*, 1989).

La participación de las proteínas G en procesos celulares se conocen desde hace tiempo, sin embargo, la acción directa de dichas proteínas en la modulación de los canales iónicos fue propuesta recientemente para el canal de K^+ modulado por muscarina, de células del atrio (ver revisión de Birnbaumer *et al.*, 1987; Brown & Birnbaumer, 1990). Este mecanismo implica que luego de la unión del agonista a su receptor, se activa una proteína G que modifica directamente las propiedades de apertura y cierre del canal. Con respecto al canal de K_{Ca} , se han demostrado hasta ahora dos tipos de receptores que modulan al canal por medio de la acción directa de una proteína G: muscarínico y β -adrenérgico. Esto no significa que no puedan existir otros mecanismos de modulación paralelos y/o adicionales por parte de estos receptores sobre el canal de K_{Ca} .

Regulación muscarínica

Se ha demostrado que la estimulación muscarínica inhibe a los canales K_{Ca} de músculo liso colónico (Cole *et al.*, 1989; Cole & Sanders, 1989) y de tráquea (Kume & Kotlikof, 1991). En experimentos de "patch clamp", Cole *et al.* (1989), demostraron que la acetilcolina (ACh, 10 μ M), producía una disminución en la P_o del canal K_{Ca} , cuando la droga era introducida en la solución interna de la pipeta y en el baño. Por el contrario, esta inhibición no era observada si la ACh. se encontraba solamente en la pipeta en experimentos de "inside-out patches" o solamente en el baño en experimentos de "cell attached". Mas aún, la inhibición por ACh. en experimentos de "whole cell", se observó únicamente en presencia de GTP o de análogos no hidrolizables como el GTP γ S, en la solución de la pipeta (Cole & Sanders, 1989). Estos estudios indican que: 1) En los experimentos de "inside-out", se

pierde/n algun/os componente/s intracelulares esencial/es en la regulación muscarínica y 2) para que la ACh. ejerza su acción inhibitoria el receptor y el canal debían estar próximos en la membrana, por lo cual no se observó inhibición en los experimentos de "cell attached" cuando la ACh. no se encontraba en la pipeta sino unicamente en el baño. El conocimiento previo de que el receptor muscarínico está ligado a una proteína G junto con las observaciones anteriores sostienen la hipótesis de que hay una proteína G actuando de intermediaria entre el receptor y el canal, y que la acción de la proteína G sobre el canal es directa y no por medio de algún otro segundo mensajero.

De manera similar, Kume y Kotlikoff (1991) en estudios de canal único en "outside-out patches", demostraron que los canales K_{Ca} podían inhibirse por metacolina, y que aunque esta inhibición podía observarse en ausencia de GTP en la pipeta, era mas prolongado si se agregaba el nucleótido en el lado interno del canal. Es interesante notar que en el caso del "outside-out patch" en que el lado interno del canal queda dentro de la pipeta, parecería que el medio interno no es completamente reemplazado por el medio de la pipeta y que moléculas como el GTP podrían permanecer en el microambiente del canal.

La hipótesis de que el efecto de inhibición muscarínica esta mediado por una proteína G, fue confirmado por Cole & Sanders, (1989) y Kume & Kotlikoff, (1991) independientemente. Estos autores encontraron, que la diálisis intracelular o la incubación de las células con toxina pertusis, suprime la inhibición del canal K_{Ca} en respuesta a la estimulación muscarínica. Por otro lado cabe mencionar que aunque el efecto directo de la ACh. sobre el canal K_{Ca} es inhibitorio, estudios hechos en células de traquea porcina, con el método de "cell attached perforado", demostraron que la ACh. activa a los canales K_{Ca} por medio del aumento del calcio intracelular, ya que la respuesta fue bloqueada por heparina (Muraki *et al.*, 1992)

Estimulación β -adrenérgica

La regulación de los canales de K_{Ca} por el receptor β -adrenérgico, ya ha sido tratada en la sección de "ciclos de fosforilación-desfosforilación". Sin embargo, debido a que la regulación de los canales de K_{Ca} por el receptor β -adrenérgico y por la proteína G forma parte del presente trabajo experimental, en esta sección se agregarán algunos aspectos generales de la estimulación adrenérgica y la función de la proteína G en dicha modulación.

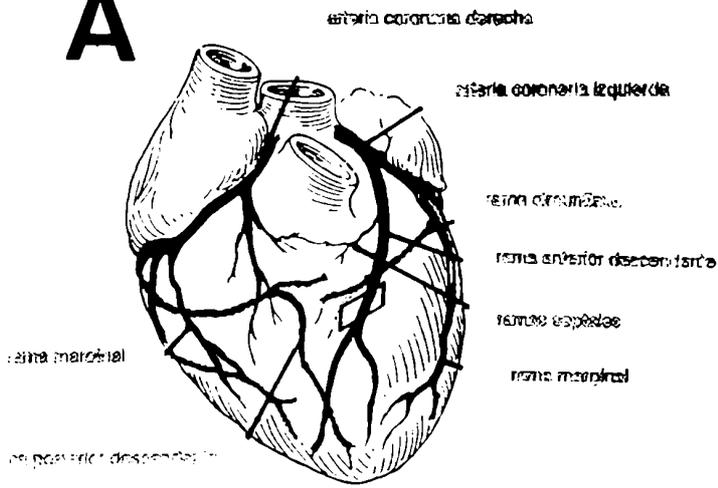
Existen diferentes tipos de receptores adrenérgicos (β_1 , β_2 , α_1 y α_2) que a su vez pueden estar acoplados a distintos tipos de proteínas G (Gs y Gi) y tener efectos exitatorios como inhibitorios. La subunidad α de la proteína Gs esta acoplada al receptor adrenérgico β_2 y activa a la enzima adenilato ciclasa provocando un aumento en los niveles intracelulares de AMPc (Sibley & Lefkowitz, 1985); por el contrario, el receptor α_2 -adrenérgico está acoplado a una proteína Gi que al activarse inhibe a la adenilato ciclasa provocando una disminución en los niveles intracelulares de AMPc (Simonds *et al.*, 1989; Hadcock *et al.*, 1990). Además de la adenilato ciclasa existen otros efectores modulados por el complejo receptor adrenérgico-proteína G, como por ejemplo la proteína Gq acoplada a la fosfolipasa C (Smrcka *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1991), que provoca la activación de la PKC. A su vez, existen interrelaciones dentro de estos mecanismos regulatorios, por ej. ha sido observado que el receptor adrenérgico β_2 es sustrato para la fosforilación por la PKC, lo cual resulta en una desensibilización del receptor (Bouvier *et al.*, 1991). Otro aspecto importante en la regulación mediada por proteína G, es el acoplamiento funcional entre la misma y el receptor involucrado. La realización de estudios de mutagénesis han permitido identificar los sitios dentro del receptor que confieren la especificidad del acoplamiento de éste con la proteína G. Se ha observado, por ej., que el cambio de una secuencia de aa en el segmento amino terminal del receptor muscarínico M1, por la secuencia homóloga del receptor b-adrenérgico de pavo, altera el acoplamiento con la proteína G (Wong *et al.*, 1990), de manera que al ser estimulado por un agente muscarínico, puede activar tanto a la fosfolipasa C (propiedad del

receptor muscarínico) como a la adenilato ciclasa (propiedad del receptor β -adrenérgico). En resumen se puede decir que distintos tipos de receptores pueden estar acoplados con diferentes tipos de proteínas G y que estas pueden, a la vez, tener distintos efectores dentro de los cuales se encuentran los canales iónicos. Por otro lado una molécula puede ser efectora y al mismo tiempo ser regulada por otra molécula efectora acoplada a la misma proteína G con lo cual el patrón de interacciones posibles es enorme y complejo. Esto hace necesario estudiar no solo las interacciones moleculares entre los distintos componentes del sistema regulatorio sino también como los distintos niveles de regulación se coordinan (*ver* revisiones: Brown & Birnbaumer, 1988; Brown, 1991; Kobilka, 1992; Brown, 1993).

FIGURAS: Introduccion

Fig. 1. De lo macroscópico a lo microscópico. La Fig. muestra esquemáticamente una proteína de membrana que ejemplifica a los canales iónicos (**D**) y su ubicación en la membrana plasmática de una célula de músculo liso vascular (**C**), proveniente de la capa media de una arteria muscular como se observa en el corte transversal de una arteria (**B**) del tipo de las arterias coronarias, cuya situación en el corazón se muestra en **A**.

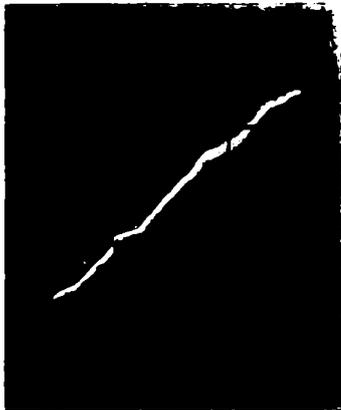
A



B



C



D

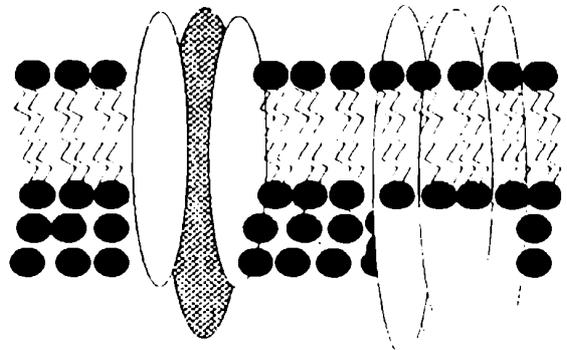


Fig. 2. Vía de activación de la proteína quinasa A. El esquema muestra la vía de activación de la PKA, comenzando por la unión de un agonista a un receptor específico acoplado a la proteína G_s , que activa a la adenilato ciclasa, la cual cataliza la formación de AMPc, que se une a la subunidad regulatoria de la PKA, dejando libre la subunidad catalítica que une una molécula de fosfato de alta energía, formado a partir de una molécula de ATP, a la molécula efectora.

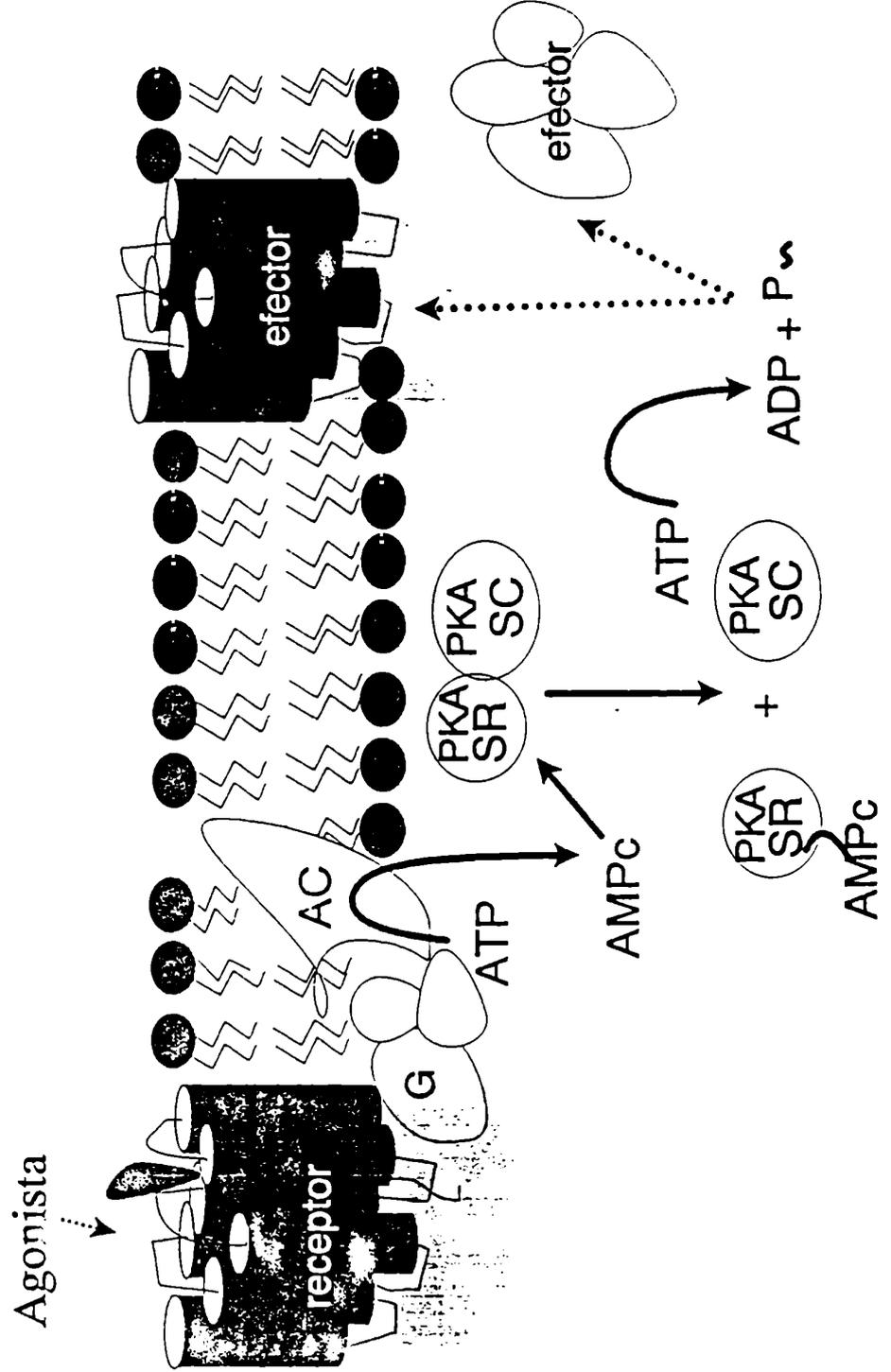
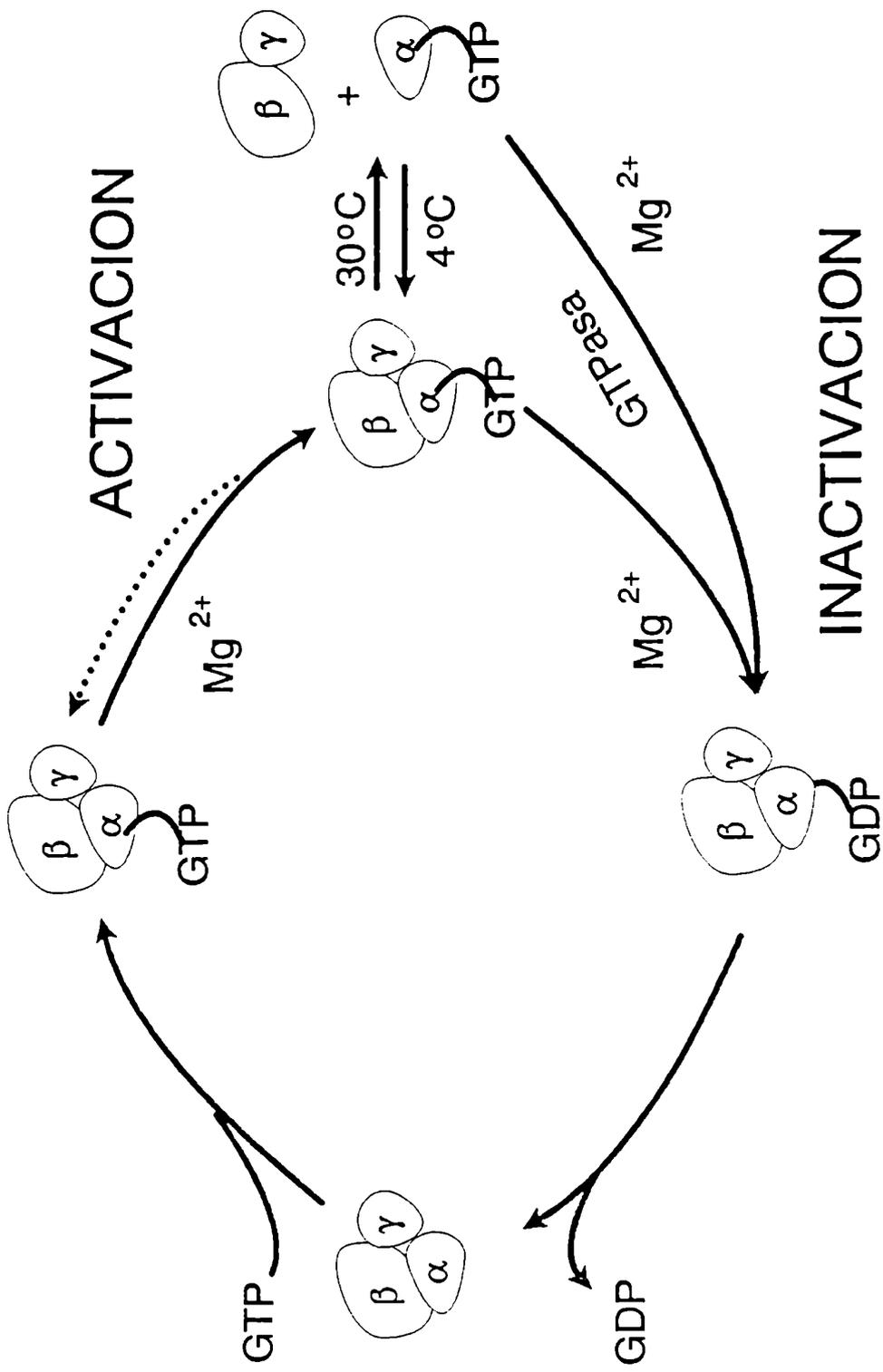


Fig. 3. Via de activación de la proteína G. El esquema muestra el ciclo de activación generalizado de las proteínas G. Este ciclo comienza con la unión de un agonista a un receptor específico acoplado a una proteína G, formada por las subunidades α , β y γ . La unión del agonista al receptor aumenta la afinidad de la proteína G por el nucleótido GTP, cuya unión al trímero provoca su clivaje quedando por un lado el dímero $\beta\gamma$ y por el otro lado la subunidad α unida al GTP (activada). En este paso es necesaria la participación del ion Mg^{2+} . La actividad GTPasa de la subunidad da lugar a la formación del complejo α -GDP, el cual tiene una afinidad alta por el dímero $\beta\gamma$, al cual se une para formar de nuevo la proteína trimérica y acoplarse nuevamente al receptor.



MATERIALES Y MÉTODOS

II.I Obtención de microsomas de membranas de músculo liso de coronaria

Las vesículas de membrana de músculo liso de coronaria se obtienen a partir de corazones de porcinos recién sacrificados en un matadero comercial. Una vez que los animales son sacrificados el personal del matadero limpia y eviscera los cerdos; se separa rápidamente el corazón y se inicia la disección de la arteria coronaria. Las arterias disecadas son colectadas en un recipiente enfriado en hielo con una solución Ringer-Krebs suplementada con inhibidores de proteasas. El procedimiento desde la muerte del animal hasta el enfriado de las arterias dura aproximadamente 10 minutos. Se utilizan habitualmente de 20 a 30 corazones porcinos adultos de ambos sexos. Una vez recolectada esa cantidad de material las arterias son trasladadas en frío hasta el laboratorio para su limpieza y disección. Las arterias obtenidas son disecadas en frío bajo lupa para separar el tejido adiposo, tejido conectivo y restos de músculo cardíaco que hayan quedado adheridos a la arteria. Una vez que la parte externa está limpia se abren longitudinalmente y se quita el endotelio raspándolo con un isopo de algodón. Las arterias ya limpias son transferidas a la solución A (ver "soluciones experimentales") cortadas en trozos de aproximadamente 1 cm y trituradas en una licuadora convencional. Este tratamiento se realiza en varios pasos para evitar el calentamiento por fricción, hasta lograr que la preparación quede homogénea. Cada paso de trituración dura aproximadamente treinta segundos, entre los cuales el tejido se vuelve a enfriar durante un minuto. Este procedimiento está ideado para preservar la integridad de las proteínas y obtener un máximo rendimiento, el esquema 1 muestra de forma resumida los principales pasos de este protocolo experimental. El homogenato obtenido es centrifugado a 4.000 rpm durante 30 minutos utilizando un rotor JA20. De este paso se colecta el sobrenadante (S_1), el precipitado se rehomogeneiza y se centrifuga nuevamente a 4.000 rpm durante 30 min. a fin de obtener el segundo sobrenadante (S_2). Ambos sobrenadantes (S_1 y S_2), se centrifugan con el mismo rotor JA20 a 20.000 rpm durante 40 minutos y luego a 17.000 rpm por

20 minutos. Se asume que la mayor parte de membrana plasmática sedimenta durante los primeros 40 minutos y que la contaminación con mitocondria disminuye en los segundos 20 minutos. El precipitado (microsomas pesados) (p_1) se resuspende en frío en la solución hipertónica **B** con un homogenizador manual de "teflon pestle" y luego se incuba por una hora en hielo. Al término de esta incubación se centrifuga el homogenato por una hora a 33.000 rpm con un rotor 70,1 Ti. El sobrenadante se descarta y el precipitado (microsomas) (p_2) obtenido se resuspende en la solución **G**. Los microsomas resuspendidos son colocados en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa (20, 25, 30, 35 y 40%) y centrifugados a 27.000 rpm durante 14 a 18 horas con un rotor SW28,1. Al término de la sedimentación se colectan las fracciones microsomales de las distintas interfases, se diluyen en solución **F** y se centrifugan a 32.000 rpm durante una hora con un rotor 70,1 Ti. Finalmente los precipitados obtenidos se resuspenden en solución **D**. Estas fracciones resuspendidas son congeladas en N_2 líquido y almacenadas a $-80^\circ C$ hasta su utilización (ver esquema 1). Los volúmenes obtenidos son de aproximadamente 100 μl por fracción partiendo de 30 arterias coronarias (aproximadamente 20 g de tejido ya limpio) Todas las centrifugaciones son realizadas a $4^\circ C$. El contenido promedio de proteínas de las fracciones determinado con el método de Lowry (1951), utilizando suero de albúmina bovina (BSA) como standard, es de ≈ 35 mg/ml.

Esquema 1. Obtención de membranas de músculo liso de coronaria

1. Disección y limpieza de las arterias en Ringer-Krebs + inhibidores de las proteasas

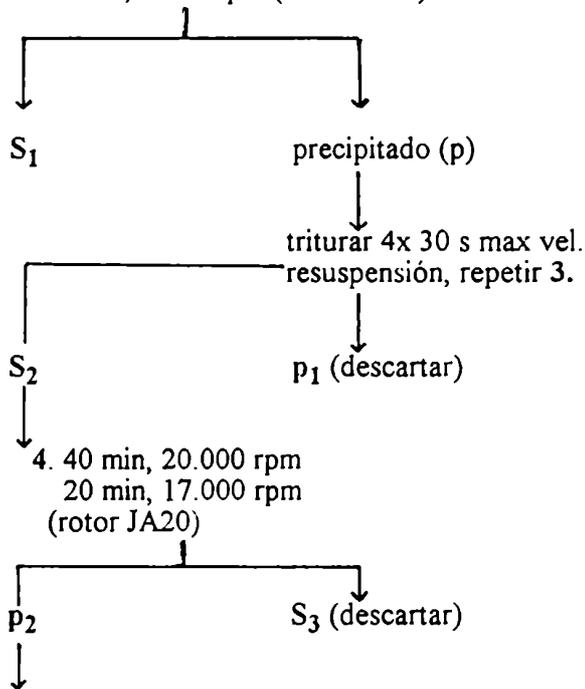
2. Homogeneización en sl. A

trituration 1x 30 s

2x 15 s

6x 30 s, max vel

3. 30 min, 4.000 rpm (rotor JA20)



5. homogeneizar p en sl. B

6. incubar en hielo 1 hora

7. centrifugar 1 hora, 33.000 rpm (rotor 70,1 Ti)

8. resuspender en sol G

9. centrifugar en gradiente de sacarosa 14-18 horas 27.000
(rotor SW28,1)

10. obtener las fracciones por separado y diluir en solución F

11. centrifugar 1 hora, 32.000 rpm (rotor 70,1 Ti)

12. resuspender p en sl D.

Para la reconstitución de canales en bicapas se utilizan las fracciones del gradiente de sacarosa 20:25 y 25:30. Estas fracciones presentan la mayor actividad de fijación ligando-receptor a dihidropiridinas. ($[^3\text{H}]$ -PN200-110, 25-50 pM/mg, K_d 0,5 nM) y baja fijación de rionidina marcada (0,4- 0,9 pM/mg) indicando que las fracciones más ligeras contienen la mayor parte de la membrana plasmática. Por su parte la fracción mas pesada (35:40%) presenta la mayor fijación de rionidina, indicando que esta fracción corresponde a la cisterna terminal del retículo sarcoplásmico (Hamilton et al, 1989).

En las siguientes secciones se expondrá brevemente el método de incorporación de canales iónicos en bicapas lipídicas y el sistema de registro de canales según Alvarez; Hanke; Moczyłowski; White, (1986).

II.II. Incorporación de canales iónicos en bicapas lipídicas

El método de incorporación en bicapas consiste básicamente en establecer un sistema en el cual se obtienen 2 fases acuosas separadas por una membrana lipídica en la cual se van a incorporar las vesículas de membrana que contienen a los canales iónicos. El diseño del sistema puede variar pero el esquema general consiste en dos cámaras separadas por un orificio. Sobre este orificio se esparce una "solución formadora" que consiste en una mezcla de lípidos, cuya composición varía de acuerdo a las condiciones experimentales, organizados formando micelas "dentro" de un solvente no polar.

En el presente trabajo el sistema utilizado está compuesto por una cámara cilíndrica hecha de Delrin con una capacidad de 0,5 ml denominada por convención *trans* que se introduce en un bloque de material plástico, el cual a su vez tiene una cavidad con una capacidad de 1 ml (cámara *cis*) de tal forma que ambas piezas quedan perfectamente ensambladas y comunicadas únicamente a través de un orificio de aproximadamente 200 μm de diámetro y 50 μm de espesor (Fig 1). Las soluciones contenidas en las cámaras *cis* y *trans* se conectan a través de puentes de agar (1% en 1 M KCl), a diferentes orificios que contienen una solución 3 M de KCl. A su vez estos orificios se conectan al

amplificador por medio de electrodos de Ag/AgCl de manera que las cámaras, *cis* y *trans*, quedan conectadas entre sí a través de un pequeño orificio y cada una de ellas conectada a su vez al sistema de estimulación y registro eléctrico donde la cámara *cis* está conectada a la entrada negativa del amplificador 11 y la *trans* a la tierra virtual (Esquemas 2 y 3). Es importante aclarar que el sistema descrito se encuentra dentro de una especie de jaula de Faraday para evitar las interferencias provocadas por las líneas de electricidad, y todo se ubica sobre una mesa antivibratoria para prevenir las interferencias de tipo mecánico.

Las soluciones iniciales en ambas cámaras son de idéntica composición (ver soluciones). La mezcla de lípidos es aplicada directamente sobre el orificio de la cámara *trans* con un capilar de vidrio cuyo extremo se halla cerrado. La corriente registrada durante la estimulación con rampa de voltaje rápida entre ambas cámaras antes de la formación de la bicapa es infinita y satura el amplificador, al formarse la bicapa el orificio queda "sellado" de manera que las dos soluciones quedan eléctricamente separadas. Esta separación se evidencia por un cambio en la resistencia eléctrica que es seguido desde un osciloscopio conectado en paralelo al sistema de registro. Al formarse la bicapa la corriente registrada varía, cayendo a un valor proporcional a la capacidad de la bicapa (≈ 200 pF). La capacidad de la bicapa es función directa de la distancia de las monocapas de fosfolípidos; y a del área de las mismas que está limitada por el orificio rígido (Fig 1) Por otro lado el espesor de la bicapa depende de la cantidad de solvente dentro de la misma. Una vez formada la bicapa, se agrega KCl a la cámara *cis* de manera de generar un gradiente osmótico que favorezca la fusión de los microsomas con la bicapa. La incorporación de las vesículas de membrana plasmática en las bicapas lipídicas se realiza siguiendo el procedimiento de Miller y Racker (1976); y Latorre (1982). Los microsomas se "pintan" en la bicapa de manera similar a como se hace con la solución lipídica, es decir utilizando un capilar de vidrio con el extremo cerrado a modo de "pincel". La Fig. 2 muestra esquemáticamente el proceso de incorporación de una vesícula conteniendo un canal, a la bicapa preformada. Los cambios producidos en la señal eléctrica en el osciloscopio dan idea de la cercanía del capilar al orificio donde se forma la bicapa. Una

vez aplicadas las vesículas de sobre el orificio donde se halla preformada la bicapa, se utilizan indistintamente dos protocolos diferentes de voltaje para favorecer la incorporación de los canales a la membrana lipídica; uno es la aplicación de una rampa de voltaje lenta (4 s de duración total) de ± 70 mV y el otro consiste en la aplicación de un pulso de voltaje de ± 100 mV (2 s de duración total). La corriente que circula entre las cámara cis y trans es seguida a través del osciloscopio, de modo tal que la polaridad de los eventos registrados es el primer indicador de la identidad del canal. En las condiciones de registro iniciales es decir, con un gradiente de KCl 250/50 mM entre la cámara *cis* y la *trans* las corrientes llevadas por cationes (K^+) son de signo positivo mientras que las corrientes aniónicas (Cl^-) tienen polaridad negativa. Las vesículas obtenidas por el procedimiento descrito en la primer parte de esta sección pueden estar formadas de manera de mantener la orientación de la membrana con respecto al medio intra y extracelular, o pueden quedar invertidas, es decir, que el lado de la membrana que "miraba" a la parte extracelular queda orientada hacia adentro de la vesícula. Esto significa que los canales contenidos en las vesículas que se incorporan en la bicapa pueden quedar con la parte interna "mirando" hacia la cámara *cis* y la externa a la *trans* o viceversa. Esto puede complicar el estudio de algunos canales pero en el caso de los canales de K_{Ca} la orientación se puede determinar de acuerdo a su dependencia del voltaje y su sensibilidad a calcio (ver Introducción: canales de K_{Ca} : generalidades).

II.III. Registro de la actividad de canales únicos

El sistema de estimulación y registro eléctrico está esquematizado en el esquema 2 y 3 y consiste en: un generador de ondas, un convertidor corriente-voltaje, y un amplificador de voltaje.

En el presente trabajo, el amplificador utilizado para el registro de los canales incorporados en la bicapa fue diseñado en el laboratorio a fin de optimizar la relación señal/ruido y mejorar la velocidad de la respuesta, éste consta de dos partes fundamentales: registro de corriente y procesamiento del estímulo.

Registro de corrientes unitarias. El sistema de registro consiste básicamente en dos circuitos: a) convertidor corriente-voltaje (amplificador No. 11) localizado en el cabezal de registro (recuadro), el cual registra la corriente que cruza la bicapa como la caída de voltaje a través de la resistencia de retroalimentación ($1\text{ G}\Omega$); y b) rectificador de frecuencias (amplificador No 2), el cual restaura la información de frecuencia perdida durante el proceso de conversión corriente-voltaje. Este sistema permite la utilización de dos ganancias, 10 y 100 mV/pA mediante la selección de las resistencias A o B (100 y $10\text{ K}\Omega$, respectivamente).

Procesamiento del estímulo. El potencial a través de la bicapa (cámara *cis* y *trans*) es modificado de dos formas: por un generador de rampas (amplificadores Nos. 8 y 9), y mediante un pulso comando externo (entradas $\pm V_{\text{com}}$). El generador de rampas se utiliza, como ya se mencionó, para registrar la capacidad de las bicapas y en algunos casos también para favorecer la incorporación de los canales. Las entradas del pulso comando se utilizan tanto para fijar el potencial de mantenimiento como para aplicar diferentes protocolos de pulsos experimentales. El circuito de voltaje comando fue diseñado con una ganancia de 50 mV/V, e incluye los amplificadores 6 y 7. El potencial en la cámara *cis* se registra como el potencial invertido de la cámara *trans* (amplificador No. 4) multiplicado por un factor de 50. El pulso de comando externo es operado desde una computadora personal mediante un conversor analógico-digital digital-analógico de 12 bits (Axon Instruments, Burlingame, California).

Protocolos de pulsos

Los experimentos de bicapas son de dos tipos en relación al voltaje, a potencial constante, es decir en condiciones estacionarias; y a potencial variable, utilizando pulsos de voltaje. Para los primeros, el potencial de mantenimiento está dentro de un rango de $\pm 60\text{ mV}$, rango en el cual la bicapa se mantiene estable. El protocolo de aplicación de pulsos de voltaje permite un rango mayor (entre -80 y $+80\text{ mV}$) ya que al ser breves no desestabilizan las bicapas. Este protocolo consiste en la aplicación de pulsos de voltaje

desde -80 a + 80 mV a intervalos de 20 mV, de 2 s de duración cada pulso. El diseño de los protocolos de estimulación se realiza utilizando los programas de computación disponibles comercialmente (Fetchex o Clampex, P-Clamp, Axon Instruments, Burlingame CA).

Adquisición y análisis de datos

Los registros continuos (potencial constante) son convertidos digitalmente mediante un conversor, adquiridos en video grabadora y almacenados en cintas magnéticas. Paralelamente la señal es filtrada a 500 Hz. con un filtro Bessel de 8 polos, para su seguimiento en línea en el osciloscopio y su adquisición en línea en una computadora personal utilizando el programa Fetchex, con una frecuencia de muestreo de 1 ms/punto. La Fig 3 muestra un ejemplo de como se observa un canal adquirido con el programa Fetchex en esas condiciones de adquisición (500 Hz, 1 ms/pt).

La conductancia de los canales se obtiene de la relación corriente-voltaje (curvas I-V), de los valores obtenidos con el protocolo de pulsos de voltaje señalado en la sección anterior. Las amplitudes de los eventos son medidas con el programa Fetchan (P-Clamp, Axon Instruments, Burlingame CA) Los valores de corrientes así obtenidos para cada potencial se ajustan por regresión lineal. En este rango de voltaje las curvas I-V son lineales.

La conductancia de los canales K_{Ca} estudiados es de ≈ 300 pS (en 250 mM KCl, simétrico); en estudios previos se observó que estos canales son sensibles a concentraciones nanomolares de caribdotoxina y a concentraciones micromolares de tetraetilamonio cuando son aplicados en el lado externo del canal (Toro *et al.*, 1991). Como se mencionó anteriormente el lado interno del canal se determina por su sensibilidad al Ca^{2+} y la dependencia del voltaje. La probabilidad de apertura (P_o) inicial del canal es variable entre los distintos canales; en algunos casos es necesario variar el voltaje y/o la concentración interna de Ca^{2+} para tener una P_o inicial determinada.

La actividad de los canales únicos se analiza utilizando el programa TRANSIT

(A.M.J. VanDongen, Dept. Pharmacology, Duke Univ.). Este programa utiliza un algoritmo basado en la estimación de la pendiente entre dos puntos sucesivos del trazo a analizar. La desviación estándar de estas pendientes en trazos que no contengan aperturas de canales, permite establecer el nivel medio de la línea de base, correspondiente al nivel cero de corriente iónica. De esta forma se puede determinar el grado de desviación de la línea de base en cada trazo y de ser necesario corregirlo por sustracción analógica. Para la detección de transiciones el umbral de detección es tomado como un múltiplo de la desviación estándar de las pendientes de las fluctuaciones en la línea de base (*slope coefficient*), aquellas fluctuaciones cuya pendientes sean mayores que el umbral son convertidas en transiciones. Esto permite dividir al trazo en *transiciones* y *niveles*. El siguiente paso es definir la amplitud de cada *nivel*, esto se realiza promediando los puntos entre dos *transiciones*. Debido al filtrado de la señal, estas *transiciones* no son instantáneas, por lo que se divide en dos la duración de la *transición*, asignándose cada mitad a la duración de los *niveles* adyacentes. En la última fase de la idealización se eliminan las *transiciones* espurias que puedan existir entre dos *niveles* consecutivos, comparando si las diferencias entre dichos niveles es mayor que un umbral de amplitud relativa, un múltiplo (*amplitude coefficient*) de la desviación estándar del ruido de la línea de base. Si la diferencia es menor, los dos niveles se concatenan. Tanto el *slope coefficient* como el *amplitude coefficient* pueden ser manualmente ajustados. Una idealización aun más ajustada, que toma en cuenta el número de niveles de conductancia y su amplitud promedio, se logra utilizando el módulo de interpretación, en el cual el umbral de detección de los eventos se fija en el 50% de la amplitud del canal con lo que se construye un trazo interpretado (Fig. 4A). Los registros interpretados o idealizados se analizan, a partir de lo cual se obtiene el valor de la P_o promedio como la relación entre el tiempo en que el canal permanece en el estado abierto y el tiempo total del registro. El análisis de la P_o da un gráfico como el de la Fig. 4B que representa la P_o del canal en cada intervalo de tiempo. La duración de los intervalos de tiempo se puede variar (en este trabajo se utilizan intervalos de 2 s). Para el cálculo de la P_o promedio se utilizan experimentos donde haya

preferentemente uno o a lo sumo dos canales activos. El análisis de la distribución de los tiempos abierto y cerrado del canal se realiza únicamente en aquellos experimentos en los cuales sólo se registra la actividad de un solo canal. Los registros idealizados son corregidos por el tiempo muerto debido a la frecuencia de muestreo y las características del filtro (Colquhoun & Sigworth, 1983).

Los datos de la Po están expresados como media \pm ES. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de una cola para muestras apareadas, y la prueba estadística D para el caso del ajuste de las exponenciales en el análisis cinético. Las muestras se consideraron significativamente diferentes a un nivel de $p \leq 0.05$. Para las curvas de voltaje se ajustaron los valores experimentales a una función de Boltzmann, $P_o = 1 / \{1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]\}$, donde $V_{1/2}$ es el potencial de activación medio, y k es una medida de la pendiente.

Solución experimental 2: cámara *cis* (mM): 250 KCl; 10 K-MOPS; 0,5 K₂EGTA; 0,6 CaCl₂; pH 7,4; pCa 4; cámara *trans* (mM): 50 (antes de la incorporación), 250 (después de la incorporación) KCl; 10 MOPS-K; 0,5 K₂EGTA; 0,6 CaCl₂; pCa 4; pH 7.4.

Solución experimental 3 (libre de Mg²⁺) (mM): 250 KCl; 10 mM MOPS-K; 10 mM HEDTA; 9.17 CaCl₂, pCa 4.8, pH 7.4. En algunos casos, la concentración de Ca²⁺ libre se modifica para fijar la P_o inicial de los canales, el cálculo de la misma se realizó utilizando el programa Fabiato (Fabiato, 1988).

Las subunidades α_i y α_s activadas se obtuvieron por el tratamiento de las proteínas G heterotriméricas correspondientes con [³⁵S] (100 μ M) y 50 mM MgCl₂ seguido de la separación de los dímeros $\beta\gamma$ por cromatografía en DEAE, y diálisis extensiva para eliminar el GTP γ S residual. Los dímeros $\beta\gamma$ fueron obtenidos de dos fuentes diferentes, de segmentos externos de bastones de retina bovina y de cerebro bovino (Codina *et al.*, 1984; Codina *et al.*, 1984; Yatani *et al.* 1988).

El GTP γ S fue provisto por Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN); el Rp-cAMP[S] fue provisto por Research Biomedicals Inc. (Natick, MA); el PKI de músculo de conejo (crudo y péptido purificado), el SQ 29548 fue un amable obsequio de Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ) y todas las demás drogas fueron provistas por SIGMA (St. Louis, MO).

FIGURAS: Materiales y Métodos

Fig. 1. Esquematización de las cámaras utilizadas para el método de incorporación en bicapas. A: representación de la cámara *cis*, B: representación de la cámara *trans*, en donde se observa el orificio donde se forma la bicapa lipídica.

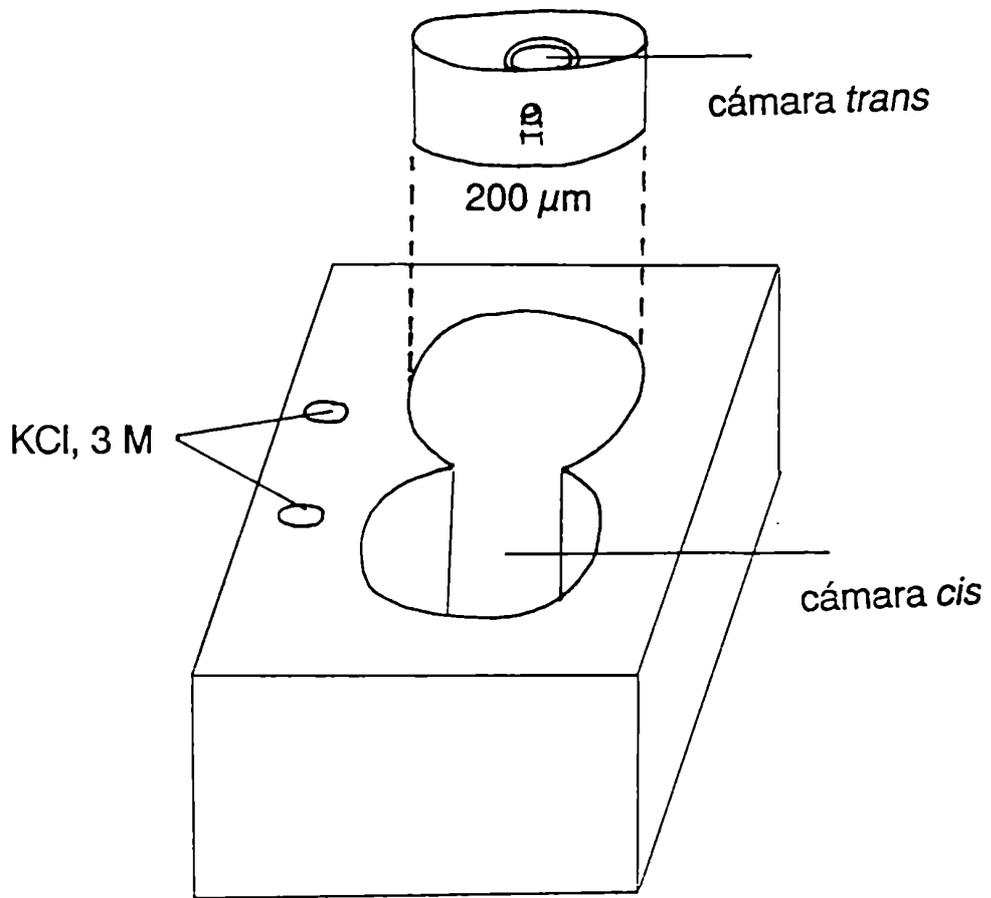


Fig. 2. Esquema de la incorporación de una vesícula de membrana en una bicapa lipidica. Se observa una vesícula membranal conteniendo a un canal generalizado. Se muestra como al entrar la vesícula en contacto con la bicapa, se produce una fusión y ruptura con lo cual la vesícula queda incorporada en la bicapa.

bicapa
preformada

canal



vesícula de
membrana

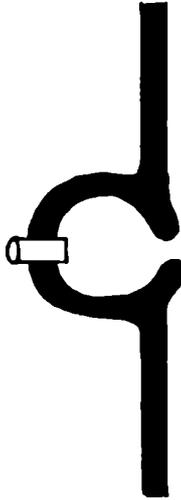
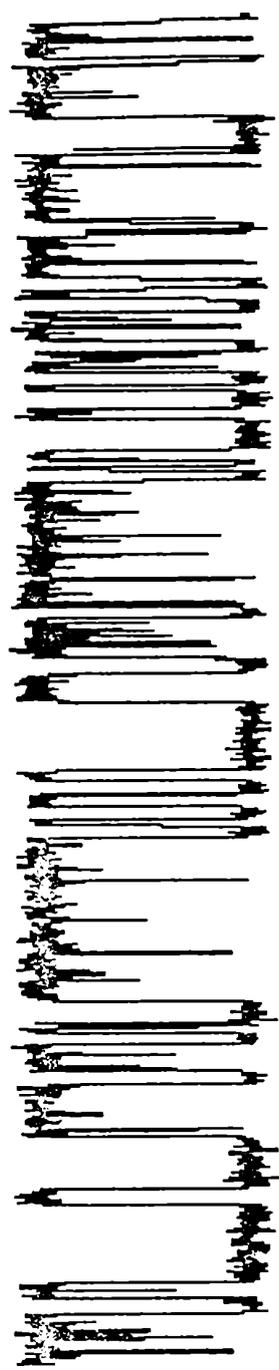


Fig. 3. Ejemplo de un registro de canal único, filtrado a 500 Hz y adquirido con el programa FETCHEX a una frecuencia de muestreo de 1 ms/pt y leído con el programa FETCHAN.

File: G1708F10



40.00 pA/Win
2560.0 ms/Trc
2560 Pt/Trc
2560.0 ms |
Z% of File

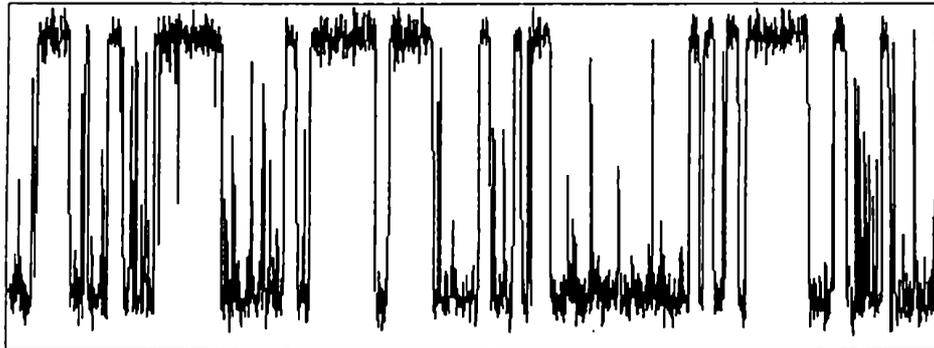
Browse Menu
Forward
Backward
Jump
Plot
Measure
ExportASCII
Autoscale
Continuous
DisplayOpts

Fig. 4. A: Ejemplificación de como se efectúa la idealización de un registro de canal adquirido con el programa FETCHEX, utilizando el programa TRANSIT. **B:** ejemplo de como se observa un gráfico de la Po de un canal en un intervalo de tiempo luego del análisis con el programa TRANSIT.

A

C:\NGUILLEN\G1708F10.DAT [1, 64]

Registro original



+ .84 pA
rec # 2
filter OFF
E rev 0
events 188

Registro idealizado

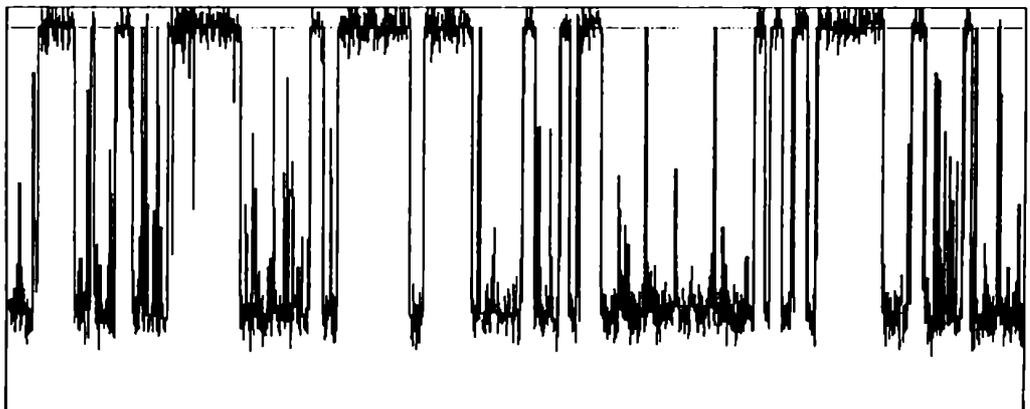


-8.35 pA
Amplitude
coef 3.00
std .313
thr .940
Slope
coef 2.00
std .459
thr .919

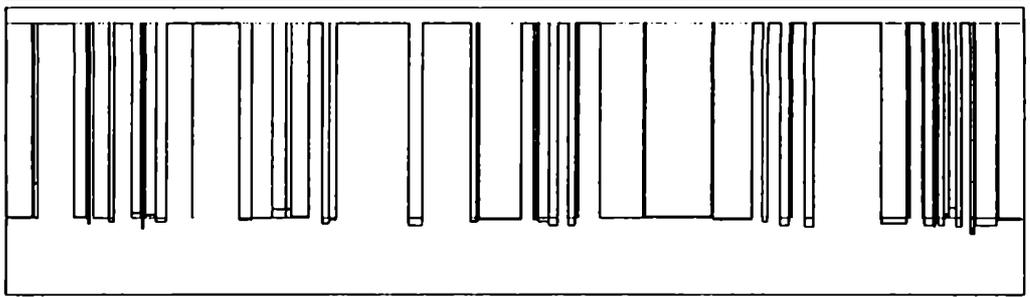
0.0 time [insec] 2048.0
eXpand Compress * <home> <end> Points Full <enter>=Next <esc>=main
Overlap Hi-lite Write Reset !!! PageUp/Dn = change Amplitude Slope

RECORD 2 Input: 188 Output: 95

Registros original + idealizado

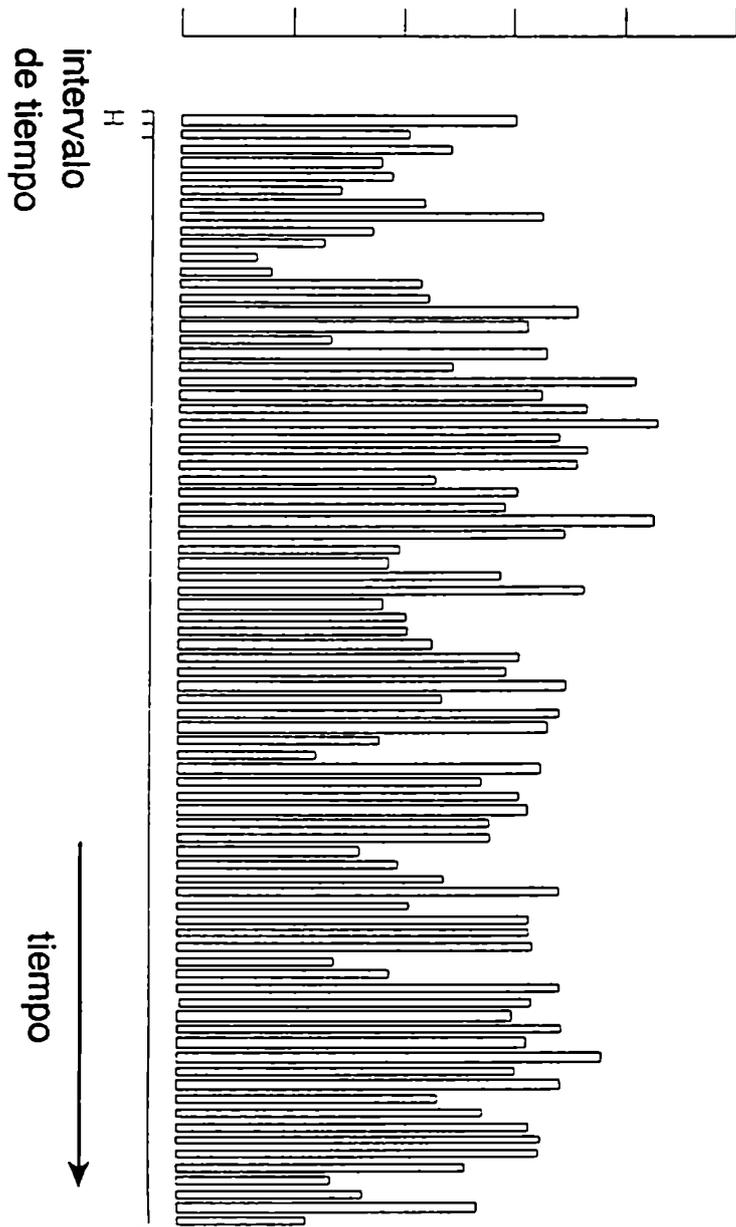


Registro interpretado

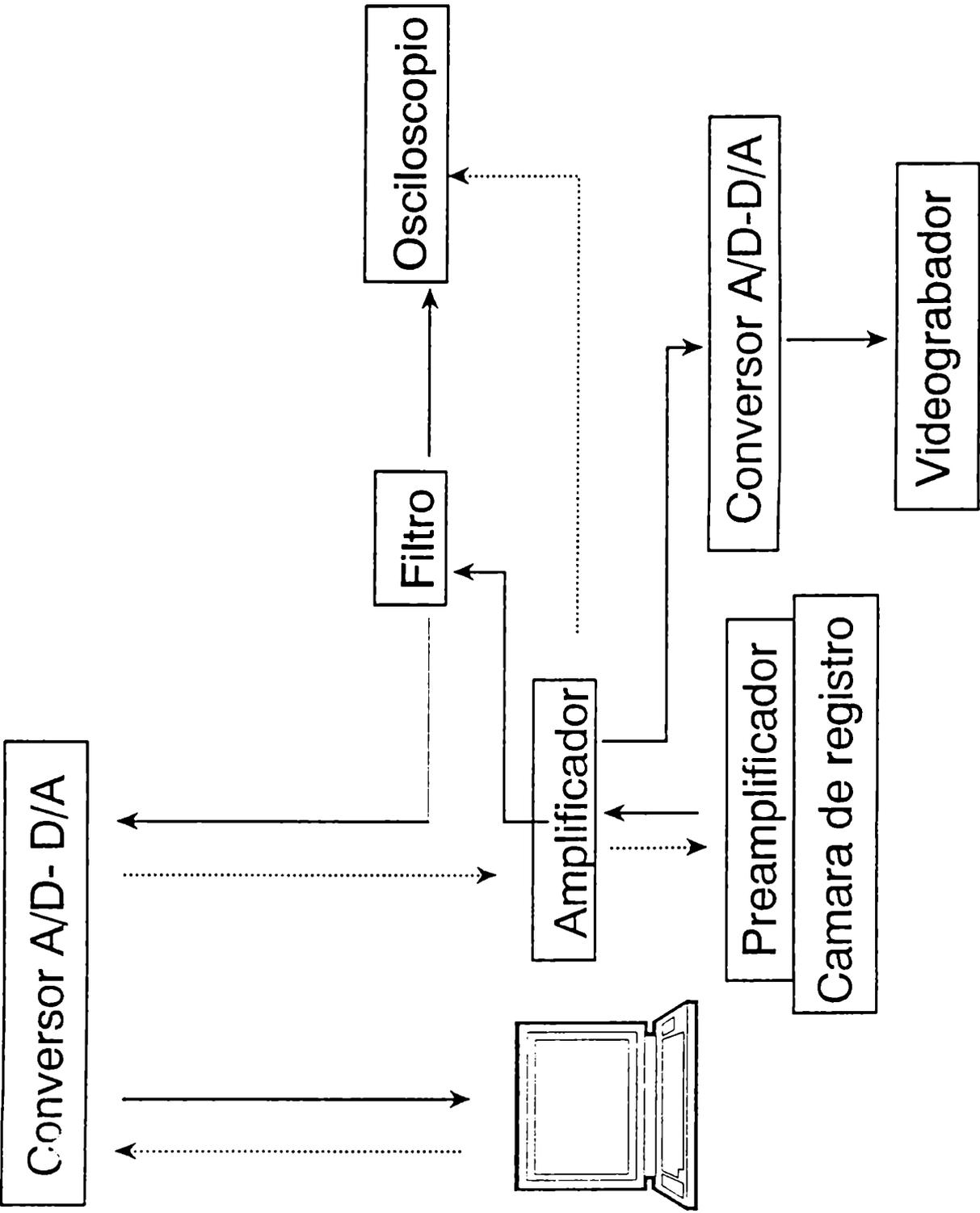


Quit Auto Swap colors Parameters top: raw data+Int
eXpand Compress <home> <end> <- -> <enter>

Probabilidad de apertura
(promedio de c / intervalo de tiempo)



Esquema 1. Esquema general de un "set up" de bicapas. El sistema consta de una cámara experimental (Fig. 1) donde se genera la señal eléctrica (corriente) y los distintos sistemas de procesamiento y almacenamiento de esta señal (líneas sólidas) por un lado, y por otro lado de un sistema de estimulación (voltaje; líneas punteadas).



Esquema 2. Esquema del circuito electrico del amplificador utilizado para el registro de los canales incorporados en bicapas. Ver detalles en el texto.

RESULTADOS

Parte 1

Relajación

Como se señaló en la introducción, existen evidencias que indican que el canal K_{Ca} juega un papel importante en el proceso de relajación-contracción del músculo liso de coronaria. En la presente tesis se estudió el posible papel que tendría este canal en la relajación del músculo liso de coronaria, en relación a la modulación por agentes β -adrenérgicos y al mecanismo molecular de dicha modulación. En segundo término se estudió el papel del canal K_{Ca} en el proceso opuesto, es decir en la contracción, en respuesta a la modulación por el agente vasoconstrictor, TxA_2 .

Se sabe que las células de músculo liso vascular, expresan receptores β -catecolaminérgicos que inducen la activación del complejo G_s /adenilato ciclasa que una vez activado, provoca el aumento de la concentración intracelular de AMPc y produce relajación. Esta relajación está facilitada por una hiperpolarización de la membrana asociada posiblemente a la activación de los canales de K_{Ca} (Honda *et al.*, 1986; Sadoshima *et al.*, 1988; Kume *et al.*, 1989). Esta acción relajante puede ser mimetizada por agentes que aumentan la concentración de AMPc intracelular en forma independiente a la activación de la proteína G_s , como la forskolina, por lo tanto se acepta comúnmente que la relajación inducida por los receptores β -adrenérgicos está mediada por el segundo mensajero AMPc. Sin embargo existen evidencias, de que en músculo liso, el efecto de la forskolina sobre la hiperpolarización de la membrana es 1/10 del efecto causado por el agonista β -adrenérgico isoproterenol (Honda *et al.*, 1986). Esto sugiere que podría existir una acción adicional de estos agentes, independiente del aumento del AMPc y de la activación concomitante de la proteína quinasa A (PKA). Es decir que la activación de los canales K_{Ca} por agentes β -adrenérgicos, involucra por lo menos dos mecanismos: 1) la acción indirecta por aumento de AMPc, y posterior fosforilación mediada por la PKA, y 2) la acción directa de la proteína G sobre el canal.

El procedimiento experimental ha sido detallado en la sección de "métodos". En esta parte del trabajo, las vesículas de membrana fueron incorporadas a la cámara experimental que contenía una solución salina con una concentración de calcio libre de 16

μM (pCa 4.8) y una concentración de Mg^{2+} libre de 1 mM. Estudios previos demostraron que los canales de músculo liso reconstituidos en membranas lipídicas pueden permanecer acoplados funcionalmente a los receptores β -adrenérgicos y a proteínas G endógenas (Toro, *et al*, 1990). La persistencia de este camino de transducción aun después de la reconstitución permite la activación de una proteína G endógena en ausencia de los componentes citosólicos; por lo tanto, el método de incorporación en bicapas artificiales permite estudiar de manera mas restringida a aquellos mecanismos que involucran componentes dentro de los límites de la membrana. En estas condiciones se estudió el efecto de 10 μM de (-)isoproterenol, agregado al lado externo al canal, en presencia de 0.5 μM GTP en el lado interno, el cual no provocó ningún cambio en la actividad del canal por si mismo. Se encontró que en un 30% de los canales estudiados, el agonista aumentó la probabilidad de apertura del canal ($n=13$), y que este efecto se pudo revertir al agregar el antagonista β -adrenérgico, propranolol (100 μM) (ver Tabla 1). La figura 1 muestra un ejemplo de dicha activación y reversión. En este experimento, el canal fue registrado durante 5 minutos en condiciones control, en presencia de GTP en el lado interno. El agregado subsiguiente del agonista a la solución correspondiente al lado externo del canal provocó un aumento de la P_o del canal. La adición posterior del antagonista restauró la P_o hasta valores cercanos a los del control. Estos datos demuestran que el canal K_{Ca} de músculo liso de coronaria, es susceptible a la modulación por agentes β -adrenérgicos como había sido observado anteriormente para el canal de K_{Ca} de músculo liso de útero. Como se mencionó anteriormente, la modulación por agentes β -adrenérgicos está relacionada con la activación de la proteína G_s que a su vez activa a la adenilato ciclasa, produciendo un aumento en la concentración de AMPc, y la subsecuente activación de la PKA. Por otro lado se ha demostrado, que la fosforilación mediada por PKA puede aumentar o disminuir la actividad de los canales de K_{Ca} en otros sistemas (ver "Introducción, ciclos de fosforilación-desfosforilación"). Si el aumento en la P_o del canal de K_{Ca} de coronaria causado por el isoproterenol fuera causado por la activación de la PKA, era de esperar que el agregado directo de la subunidad catalítica de esta proteína

produjera el mismo tipo de efecto, por lo tanto se estudio, en primer término, si las vesículas de membrana de músculo liso de coronaria eran susceptibles, y de que manera, a la fosforilación por la PKA. En la figura 2 se muestra el aumento de la P_o del canal provocado por el agregado de la subunidad catalítica de la PKA (SC-PKA) (20 nM), en presencia de ATP-Mg (500 μ M) en el lado interno al canal. Este aumento de la P_o fue revertido por el agregado de 40 u/ml de fosfatasa alcalina. Además, el agregado previo de 2.6 μ g/ml del inhibidor de la PKA (PKI) previno la activación mediada por la PKA (Fig 3). La P_o aumentó de 0.25 ± 0.09 a 0.56 ± 0.1 luego del agregado de la CS-PKA (n=4); mientras que en presencia del PKI la P_o del canal no varió ($P_{o-PKI} = 0.45 \pm 0.22$ vs. $P_{o-CS-PKA} = 0.4 \pm 0.18$, n=3). De manera similar, la presencia de 0.2 μ g/ml del fragmento de 20 aa derivado del PKI, IP20, previno el aumento de la actividad del canal por la SC-PKA ($P_{o-IP20} = 0.26 \pm 0.07$ vs. $P_{o-CS-PKA} = 0.27 \pm 0.06$, n=5) (tabla 2). Estas evidencias, indican que el aumento en la actividad del canal causado por la PKA se debería efectivamente a la fosforilación del mismo.

Aunque la evidencia indique que el canal K_{Ca} de coronaria pueda ser activado tanto por la CS-PKA como por el agente β -adrenérgico isoproterenol, no es suficiente para probar que la activación causada por el isoproterenol sobre los canales de K_{Ca} de músculo liso de coronaria en estas condiciones experimentales se deba a la fosforilación del canal mediada por la PKA, ya que esto implicaría que en las vesículas incorporadas a la bicapa estén presentes la PKA, la adenilato ciclasa y que haya ATP. Sin embargo, tampoco se puede descartar por completo esta posibilidad ya que la PKA y la adenilato ciclasa podrían permanecer asociadas al canal aún luego de su incorporación en la bicapa, y podría existir cierta contaminación de ATP suficiente para desencadenar el proceso de fosforilación. La otra posibilidad es que exista una proteína G que permanezca unida al canal incorporado y que su acción directa sobre el mismo sea la que este causando el aumento en la P_o . En este caso, la activación de la hipotética proteína G endógena tendría que resultar en un aumento de la actividad del canal K_{Ca} . Para comprobar esta hipótesis, se estudió el efecto del GTP γ S sobre la actividad del canal. En un 50% de los canales

estudiados (n=34) este nucleótido produjo un incremento de la P_o cuando fue agregado a la solución interna al canal en presencia de 1 mM de Mg^{2+} interno. Este incremento fue de 3 ± 0.4 , cuando la P_o inicial estaba entre 0.1 y 0.3 (n=11) (Fig. 3; Tabla 1). Ya que el ion Mg^{2+} es necesario para la activación de la proteína G, el mismo protocolo experimental se repitió en condiciones en las que este ion no estuviese presente en la solución. En estas condiciones la misma concentración utilizada anteriormente de GTP γ S, no produjo ningún cambio en la P_o del canal (Fig. 4) (n=3); lo cual representa una fuerte evidencia de que el efecto estimulador del GTP γ S sobre el canal K_{Ca} está mediado por una proteína G endógena. La siguiente pregunta fue, entonces, cuál es la naturaleza de dicha proteína G. Dado que la proteína G asociada a los receptores β -adrenérgico es una proteína G_s se pensó que esta podría ser la proteína G asociada a la acción del GTP γ S en los canales de K_{Ca} de músculo liso de coronaria. En primer lugar se comprobó que la proteína G_s se hallaba presente en las vesículas de membrana utilizadas para la incorporación de los canales K_{Ca} . Esto se hizo mediante la incubación de las vesículas membranales con la toxina colérica marcada radioactivamente, ya que esta toxina se une a la subunidad α de la proteína G_s . Este estudio reveló la presencia de dos bandas de 42 y 50 kDa que corresponden a la subunidad α_s . Teniendo esto en cuenta, se estudió directamente el efecto de la subunidad α purificada de la proteína G_s , previamente activada con GTP γ S (α_s^*). La Fig. 5 muestra el aumento de la P_o del canal de K_{Ca} en presencia de α_s^* en el medio correspondiente al lado interno del canal. Esta activación fue observada en un 60% de los canales estudiados (n=10) y fue de 4 ± 1 (Tabla 1). Para descartar la posibilidad de que este efecto de la α_s^* sea inespecífico se hicieron una serie de controles consistentes en agregar a la solución interna del canal incorporado, la misma proteína α_s , luego de su inactivación por calor (40 min a 100°C); 0.5 μ M de GTP γ S correspondiente a la máxima contaminación de GTP γ S que presente en la preparación de la proteína $G\alpha$ -GTP γ S-activada ; o la subunidad α de la proteína G_{i3} (α_{i3}^*). No se observó aumento en la P_o luego del agregado de 300 pM de α_s^* hervida ($P_{o-control} = 0.16 \pm 0.08$; $P_{o-tratado} = 0.16 \pm 0.1$; n = 5); 0.5 μ M GTP γ S ($P_{o-control} = 0.2 \pm 0.07$; $P_{o-tratado} = 0.16 \pm 0.03$, n = 4), o 310

pM α_{13}^* ($P_{o-control} = 0.44 \pm 0.06$, $P_{o-tratado} = 0.43 \pm 0.06$, $n = 6$). Mas aun, en otros 5 experimentos, la subunidad α_{13}^* produjo una inhibición del canal (ver RESULTADOS, parte 2)

Para entender si el mecanismo involucrado en el efecto causado por el GTP γ S y por la α_5^* sobre el canal de K_{Ca} era el mismo fue necesario hacer un análisis mas detallado. Con este propósito se comparó la cinética de la activación del canal K_{Ca} por el GTP γ S y por la α_5^* , así como la dependencia del voltaje del canal en presencia de los mismos. El análisis cinético de la actividad del canal K_{Ca} en ausencia, y luego del agregado de GTP γ S o α_5^* se muestra en las figuras 6 y 7, respectivamente. Se observó que en ambos casos el aumento de la P_o esta relacionado con una disminución de los tiempos cerrados mas que con un aumento de los tiempos abiertos. El tiempo medio cerrado disminuyó 3.8 ± 1 veces con GTP γ S ($n=6$) y 7.9 ± 2 veces con α_5^* ($n=5$); mientras que el tiempo medio abierto solo aumentó en un factor de 1.7 ± 0.3 con el GTP γ S ($n=6$) y 2.9 ± 1.5 ($n=5$) con α_5^* . Por otro lado, el estudio de la dependencia del voltaje del efecto del GTP γ S y de la α_5^* también muestra una gran similitud. Se observó que luego del agregado del GTP γ S la curva de activación por voltaje se corre hacia valores mas negativos (Fig. 8). De la misma manera, el agregado de la α_5^* provocó un corrimiento de la curva de activación por voltaje hacia valores negativos con respecto a la curva control (Fig. 9). Este corrimiento fue similar al producido por el GTP γ S no sólo en el sentido sino también en valor (≈ 13 mV). Esta es una fuerte evidencia que indica que el efecto observado para el GTP γ S podría deberse a la activación de la subunidad α de una proteína G_s endógena, lo cual no significa que ademas de la proteína G_s no haya en la membrana otras proteínas G de otro tipo que también sean activadas por el GTP γ S y que también puedan afectar a la actividad del canal de K_{Ca} . Debido a las evidencias citadas en la literatura de que existen canales que pueden ser modulados por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G (Logothetis *et al.*, 1987a; Ito, *et al.*, 1992) se estudio la posibilidad de que parte del efecto causado por el GTP γ S estuviese mediado por las subunidades $\beta\gamma$, ya que estas se encontrarían presentes en la proteína G endógena y ademas, podrían encontrarse

como contaminación en la preparación de la subunidad α_s^* purificada. Para esto se hicieron experimentos similares a los realizados con la subunidad α pero en este caso las subunidades β y fueron agregadas al lado interno del canal en una concentración final de 7 nM. En ninguno de los experimentos realizados se observó aumento en la P_o del canal (Tabla 1, Fig. 10).

Los resultados anteriores demuestran que tanto la fosforilación mediada por la PKA, como la acción directa de la proteína G, provocan un aumento en la actividad del canal K_{Ca} de músculo liso de coronaria. Sin embargo, como se indicó anteriormente, existe la posibilidad de que haya cierta contaminación de ATP en la preparación y por lo tanto, que la acción de la proteína G no sea directa sino que este mediada por fosforilación. Para descartar que la activación del canal mediada por GTP γ S o por α_s^* involucre la fosforilación mediada por la PKA, se repitieron los experimentos con GTP γ S o con α_s^* en presencia del PKI. En las Fig. 11 y 12 se ve que tanto el GTP γ S como la α_s^* produjeron un aumento en la P_o del canal aún en presencia del inhibidor de la fosforilación, este aumento fue de 2.2 ± 0.4 (n=2) para el GTP γ S y 4.1 ± 1.3 (n=3) para la α_s^* . Se realizo otra serie de experimentos similares con distintos inhibidores de la fosforilación y se obtuvieron los mismos resultados (Tabla 2). Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de la proteína G endógena sobre los canales K_{Ca} no parece estar mediado por fosforilación dependiente de la PKA, sino debido a un efecto directo sobre el canal o alguna otra molécula estrechamente asociada al mismo.

Los objetivos de la última etapa de esta primer parte del trabajo estuvieron dirigidos, en primer termino, a comprobar que el efecto provocado por el GTP γ S o la α_s^* sobre el canal de K_{Ca} de músculo liso de coronaria era reproducible en otro sistema, aunque experimentos similares fueron realizados por otro grupo de investigadores en el canal de traquea paralelamente a este trabajo (Kume, *et al.*, 1992); en segundo termino, se investigo si la acción de la α_s^* es una interacción directa de la proteína y el canal o existe una o mas moléculas estrechamente asociada/s al canal y que sirven de intermediarias entre este y la proteína G. Con este propósito se realizaron experimentos sobre el canal

purificado de tráquea (García Calvo, *et al.*, 1993, en prensa). Este es un sistema mucho más "limpio" en el sentido de que la probabilidad de que exista alguna proteína diferente al canal es extremadamente baja, lo cual permite interpretar de manera más clara los efectos de las interacciones entre el canal y las distintas moléculas agregadas en el medio. Debido a que el tipo de preparación es diferente a la obtención de membranas nativas, y que a su vez, la composición de estas no es igual a la de los liposomas en los que se encuentra reconstituido el canal se considero necesario estudiar, en primer lugar algunas de las propiedades más características de los canales K_{Ca} y comprobar si este canal purificado presentaba grandes diferencias con el canal de coronaria estudiado en la sección anterior. Se observó que tanto la conductancia, como la dependencia al calcio interno y al voltaje son similares a lo observado para el canal K_{Ca} de coronaria (Fig. 13). En segundo término, se estudió el efecto de la α_s^* sobre la actividad del canal. Al igual que en la coronaria, el agregado de la α_s^* al lado interno del canal, en presencia de 1 mM de Mg^{2+} , produjo un aumento en la P_o (Fig 14). El aumento de la P_o promedio, luego del agregado de la α_s^* , significativo aunque menor al valor observado en la coronaria (1.7 ± 0.2 veces). Por otro lado, al igual que en la coronaria, este efecto de la α_s^* parece ser específico ya que el agregado de la α_s^* hervida no produjo ningún cambio en el promedio de la P_o . Tampoco se observaron cambios en la actividad del canal luego del agregado de 7 nM (concentración final) de las subunidades $\beta\gamma$ de transducina $\beta\gamma_t$. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 3. Con respecto a la cinética de activación, se observó que, aunque los cambios en los tiempos medios causados por el agregado de la α_s^* , fueron menores que lo observado en la coronaria cualitativamente fueron similares, es decir que la media de los tiempos cerrados disminuyó luego del agregado de la α_s^* con respecto al control ($t_{mc_{control}} = 162 \pm 76$ ms; $t_{mc_{\alpha_s^*}} = 71.2 \pm 39$ ms; $n = 5$), mientras que no se evidenciaron modificaciones significativas en los tiempos abiertos ($t_{ma_{control}} = 34.6 \pm 8.5$ ms; $t_{ma_{\alpha_s^*}} = 39 \pm 9.5$ ms; $n = 5$). La figura 15 ejemplifica un histograma de tiempos cerrados del canal K_{Ca} purificado de tráquea, comparados con los histogramas correspondientes del canal de coronaria antes y luego de la activación por α_s^* . Un

hallazgo importante fue el hecho de que el GTP γ S no provocó ningún cambio en la P_o del canal purificado (Fig. 14), esto era de esperar si el efecto del GTP γ S observado en la coronaria estuviese mediado por una proteína G endógena que se encuentra ausente en los liposomas.

Conclusiones

Los datos obtenidos muestran que los canales de K_{Ca} de músculo liso de coronaria incorporados en una bicapa lipídica, pueden ser activados por tres vías que pueden, o no, estar relacionadas entre sí. Estas tres vías son: a) estimulación de los receptores β adrenérgicos; b) activación de una proteína G endógena (que podría estar acoplada a un receptor β -adrenérgico) y c) fosforilación mediada por la PKA (que podría ser activada por la proteína G). La presente evidencia experimental sugiere que al igual que lo observado en otros sistemas (ver introducción), en el músculo liso de coronaria, la estimulación β -adrenérgica provoca la activación de una proteína G (mas probablemente del tipo G_s) y que esta actuar por lo menos sobre dos posibles efectores: por un lado sobre la adenilato ciclasa que aumenta el nivel de AMPc intracelular y por otro lado, como se demuestra en este trabajo, puede actuar directamente sobre el canal de K_{Ca} provocando un aumento en la probabilidad de apertura del mismo. El resultado del aumento en la actividad de estos canales de K^+ provocaría una hiperpolarización de la membrana celular y consecuentemente la relajación de la célula muscular. Es interesante observar que este tipo de mecanismo en el cual la probabilidad de apertura del canal de K_{Ca} aumenta directamente por la acción de una proteína de membrana explicaría el hecho aparentemente paradójico de que este aumento se produzca en condiciones en que la concentración intracelular de calcio se encuentra disminuida como ocurre durante la relajación inducida por los agentes β -adrenérgicos (Sadoshima *et al.*, 1988).

El estudio de los mecanismos que involucran a la acción directa de la proteína G sobre el canal o sobre una molécula estrechamente asociada al mismo son difíciles de estudiar debido a que la activación de esta proteína G puede disparar diferentes caminos

metabólicos como por ejemplo el de la adenilato ciclasa/PKA mencionado anteriormente. La principal dificultad esta dada por el hecho de que en "patches" aislados de membrana el recambio de soluciones puede estar significativamente limitado por la geometría del "patch" y que no se sabe con certeza que componentes celulares permanecen unidos a la membrana luego de formado el "patch" mientras que, en el sistema de reconstitución en bicapas ocurre algo similar ya que aunque el control del medio externo e interno del canal es bueno, no se puede descartar que ciertos componentes celulares permanezcan en el microambiente del canal luego de la incorporación en la bicapa. De todas formas, teniendo esto en cuenta, se puede asumir que gracias al manejo de las soluciones a ambos lados del canal que permite la técnica utilizada en el presente trabajo se puede tener un cierto control sobre el microambiente del canal incorporado en la bicapa. Esta ventaja experimental, junto con las observaciones realizadas sobre la acción de la proteína G en presencia de varios inhibidores de la fosforilación que actúan en diferentes niveles de la cascada metabólica (AMP-P(NH)P; Rp-cAMP[S]; IP20, PKI), y al hecho de que el AMPc no impidió la acción directa de la proteína G sobre el canal, llevaron a la conclusión de que al menos uno de los mecanismos de acción de la proteína G en la modulación del canal de K_{Ca} es directo, es decir que no involucra la participación de la vía adenilato ciclasa/PKA. Esto no significa que la fosforilación de los canales de K_{Ca} por la PKA sea parte del mecanismo de relajación inducido por los agentes β -adrenérgicos vía proteína G_s . Por el contrario, es este mismo trabajo se observó que efectivamente el canal de K_{Ca} de músculo liso de coronaria es susceptible a fosforilación por la PKA, la cual aumenta la P_o del canal.

La identidad molecular de la proteína G involucrada como G_s se apoya en el hecho de que se encontraran en la preparación de membranas de coronaria 2 bandas (de 42 y 50 kDa) que fueron marcadas radioactivamente luego de la ribosilación causada por la incubación con toxina colérica y [^{32}P]ADP. Por el otro lado los experimentos en los que se observo el efecto directo de la subunidad α_s^* sobre el canal de K_{Ca} , particularmente el hecho de que la cinética de activación con GTP γ S y con α_s^* sean tan similares, proveen una fuerte evidencia en favor de la hipótesis de que la proteína G endógena es una

proteína G_s . Como se señalo en la sección de resultados, la subunidad que interactuaría con el canal de K_{Ca} es la α ya que no se observó ningún cambio en la P_o del canal por el agregado de las subunidades $\beta\gamma$. Esto no significa que en la célula entera las subunidades $\beta\gamma$ no puedan cumplir algún papel como reguladoras de la actividad del canal, pero en este caso la acción no sería una interacción directa con el mismo, ni con otra molécula con un grado de asociación lo suficientemente estrecho para permanecer unido a la membrana luego de la obtención de las vesículas y la incorporación en la bicapa. Cabe señalar que las subunidades $\beta\gamma$ utilizadas para este trabajo no son las correspondientes a la proteína G_s , sin embargo, como se mencionó en la introducción (*ver* INTRODUCCIÓN: modulación por proteína G), si bien existen grandes diferencias a nivel molecular entre las subunidades α , no pasa lo mismo entre las subunidades β y γ , que son muy similares entre las distintas proteínas G.

Finalmente, en la última etapa de esta sección experimental se demostró que la acción de la α_s^* sobre el canal de K_{Ca} no es exclusiva del músculo liso de la coronaria ya que fue observado en canales de músculo liso de traquea, purificados e incorporados a liposomas. Si bien el aumento en la P_o del canal de K_{Ca} purificado causado por la α_s^* fue menor que en la coronaria, el hecho de que el cambio en la cinética de activación fuera cualitativamente tan parecido sugiere que se trata del mismo fenómeno. La diferencia cuantitativa podría deberse a diferencias en el entorno lipídico del canal que influyen en la interacción entre este y la subunidad α_s^* , o bien a que en el caso del músculo liso de la coronaria existen otras moléculas en el entorno de la membrana que interactúan positivamente en la acción de la proteína G sobre el canal. Uno de los hallazgos más relevantes de esta parte experimental fue el hecho de que no se observara ningún cambio causado por el $GTP\gamma S$. Ya que los canales de coronaria y de traquea parecen ser, al menos desde el punto de vista biofísico, muy similares, este resultado experimental apoya fuertemente la hipótesis de que el efecto observado en la coronaria no es un fenómeno inespecífico causado por el nucleótido sino que es necesaria la presencia de la proteína G en la membrana, la cual se encuentra ausente en el caso del canal purificado. Además este

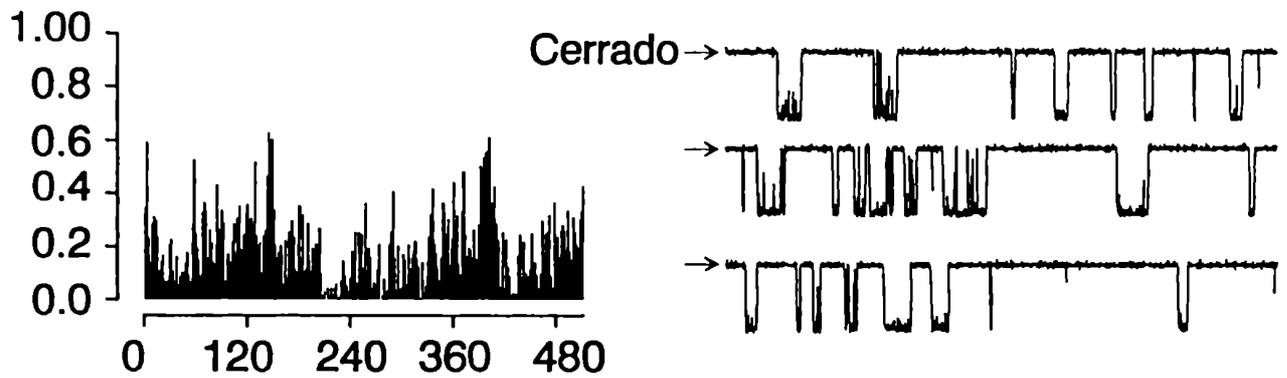
hecho explicaría que en la coronaria el efecto del GTP γ S haya sido observado en el 50% de los canales estudiados, ya que es de esperar que la proteína G endógena no se encuentre funcionalmente acoplada al canal en el 100% de las vesículas de membrana. Finalmente, la activación del canal de K_{Ca} purificado por la subunidad α_s^* sugiere que la subunidad α de la proteína G interactúa directamente con el canal ya que la posibilidad de una contaminación en los liposomas con otra molécula asociada al canal en el 86% de los canales tratados con la α_s^* es muy remota. El esquema 1 muestra una sección de membrana nativa, donde se podrían encontrar otros componentes además del canal, y un liposoma donde se ha reconstituido un canal purificado.

Desde el punto de vista fisiológico, la modulación dual de los canales de K_{Ca} por la proteína G propuesta en base a los presentes resultados provee una explicación molecular a los hallazgos reportados por Honda *et al* (1986) que indican que el isoproterenol es un agente relajante del músculo liso de las vías aéreas más potente que los agentes que aumentan la concentración de AMPc en un paso de la cadena metabólica posterior a la activación de la proteína G. De todas formas, es importante tener en cuenta que la respuesta a los agentes β -adrenérgicos en diferentes tejidos puede ser distinta. Se ha demostrado, por ejemplo, que el aumento en la concentración interna de AMPc causada por la estimulación β -adrenérgica, y la concomitante disminución en la concentración de calcio interna en la coronaria, no se observa en el músculo liso de arteria aorta, donde por el contrario la respuesta a la estimulación β -adrenérgica es la opuesta, es decir, aumenta la concentración de calcio intracelular. De todas formas, esta diferencia parecería estar más bien relacionada con diferencias en las poblaciones de receptores adrenérgicos, que en la aorta sería mayor la de tipo α (Shogakiuchi *et al.*, 1991). El tipo de modulación dual propuesto en este trabajo ha sido también observado en otros tipos de músculo como el esquelético y el cardíaco (Yatani, *et al.*, 1987; Yatani, *et al.*, 1988).

RESULTADOS Parte 1: FIGURAS Y TABLAS

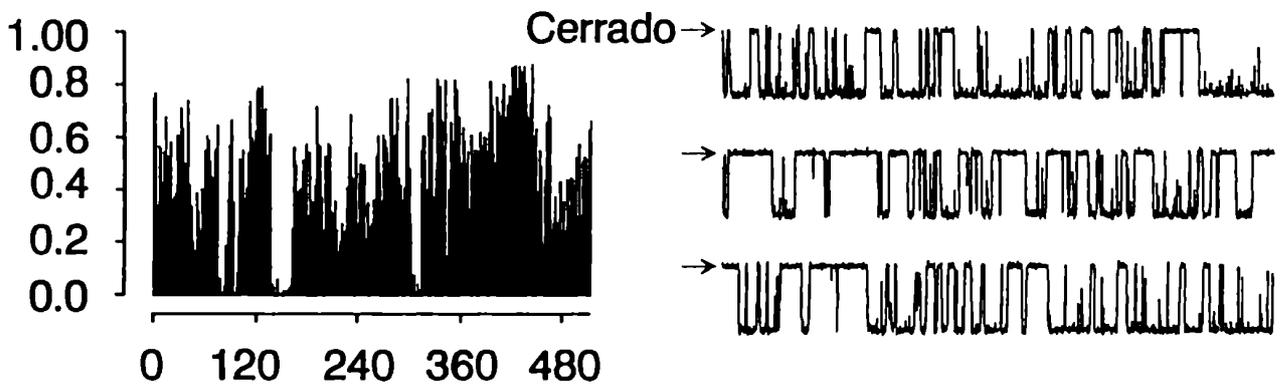
Fig. 1. El agonista β -adrenérgico isoproterenol, activa los K_{Ca} en presencia de GTP y Mg^{2+} . La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control, GTP + Mg^{2+} ; A) y luego del agregado secuencial de (-)isoproterenol (10 μM) (B) y propranolol (100 μM) (C) al lado externo del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.2 (control), 0.5 (isoproterenol) y 0.2 (propranolol). Potencial de membrana (V_H) = -40 mV. En esta y en las siguientes figuras, las flechas horizontales en los registros indican el estado cerrado del canal.

A Control (GTP + Mg²⁺)



B + Isoproterenol

Probabilidad de apertura



C + Propranolol

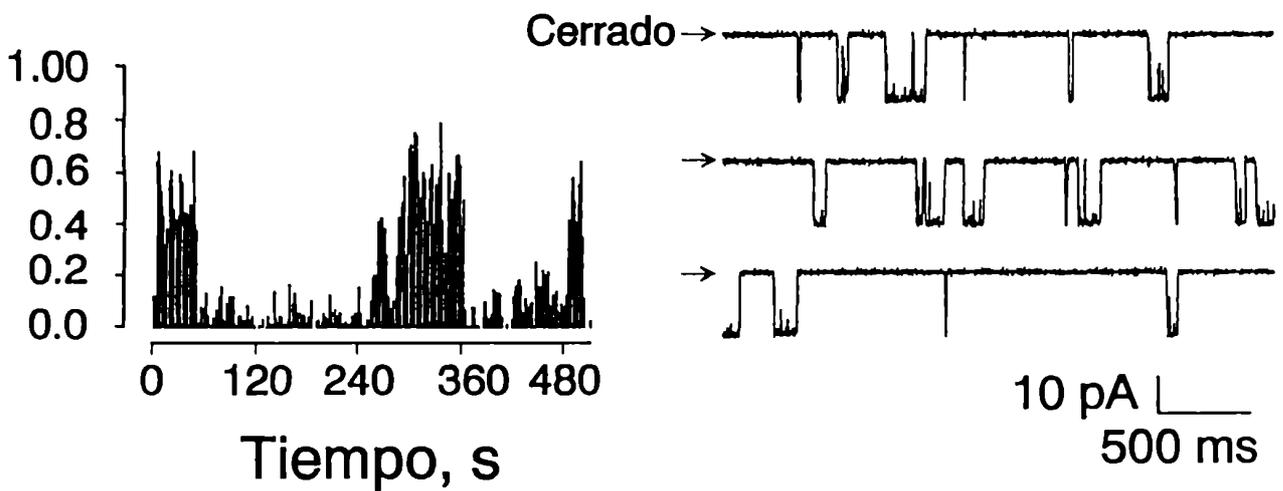


Fig. 2. La subunidad catalítica de la PKA activa a los canales K_{Ca} de músculo liso de coronaria. Esta activación es prevenida por el inhibidor de la PKA (PKI). A: La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} y los registros correspondientes (insertos) en ausencia (control + 500 μ M Mg-ATP) (izquierda) y en presencia de CS-PKA (20 nM) (derecha) agregado al lado interno del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.08 (control) y 0.35. (CS-PKA). $V_H = 20$ mV. **B:** La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} y los registros correspondientes (insertos) en presencia del inhibidor PKI (2.6 μ g/ml) (izquierda) y luego del agregado de 20 nM PKA (derecha) al lado interno del canal. $V_H = -20$ mV. En esta y en las siguientes figuras, las flechas verticales indican el agregado de la droga que corresponda..

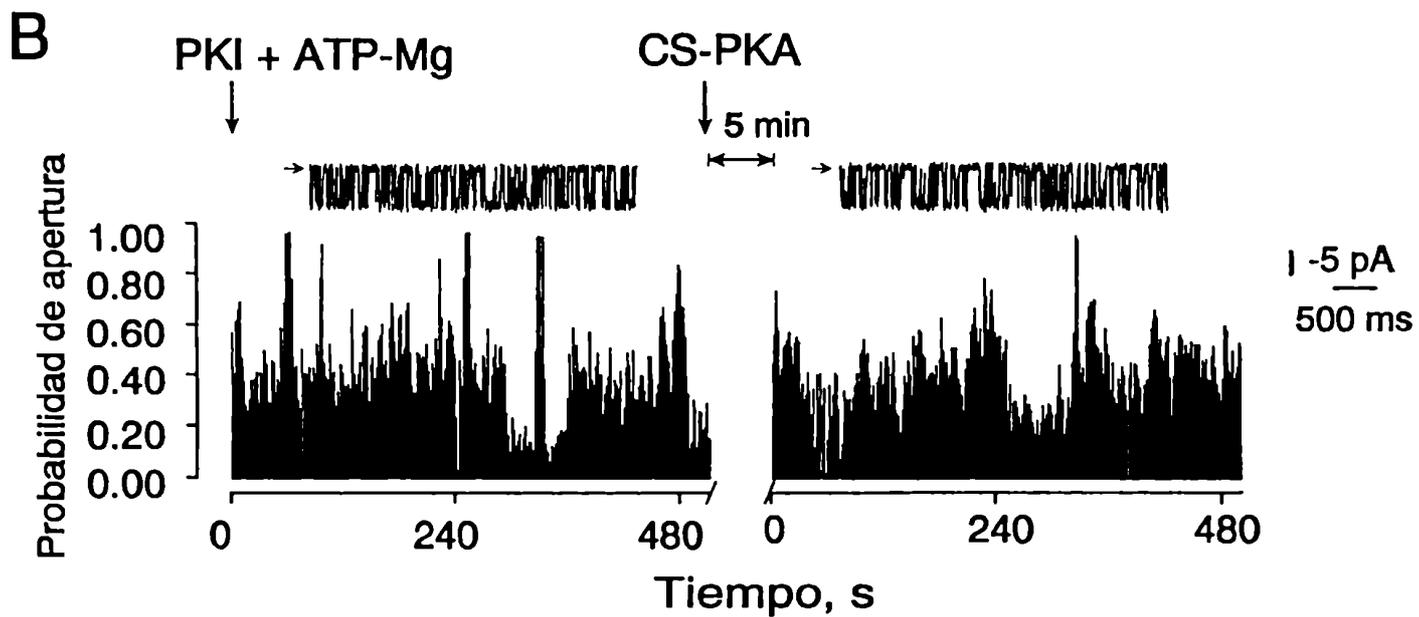
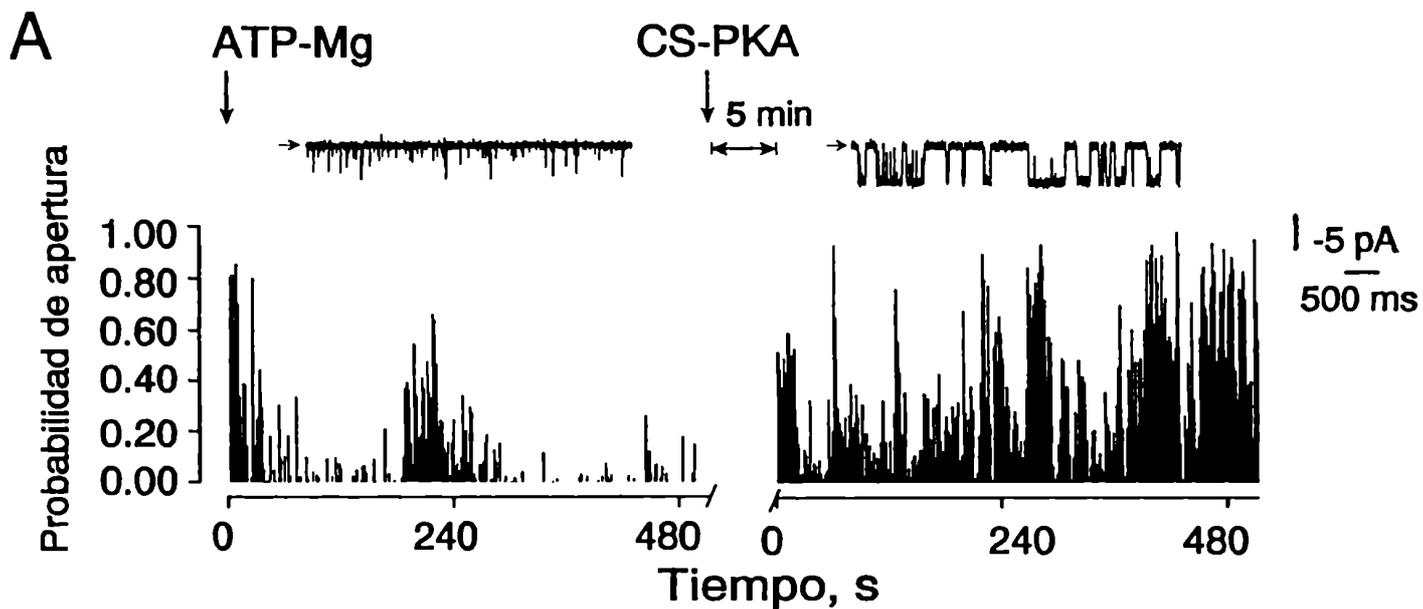


Fig. 3. Activación del canal K_{Ca} por efecto del $GTP\gamma S$ en presencia de Mg^{2+} La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control, Mg^{2+}) (**A**) y en presencia de $GTP\gamma S$ (100 μM) (**B**) agregado al lado interno del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.2 (control) y 0.5 ($GTP\gamma S$). $V_H = -60$ mV.

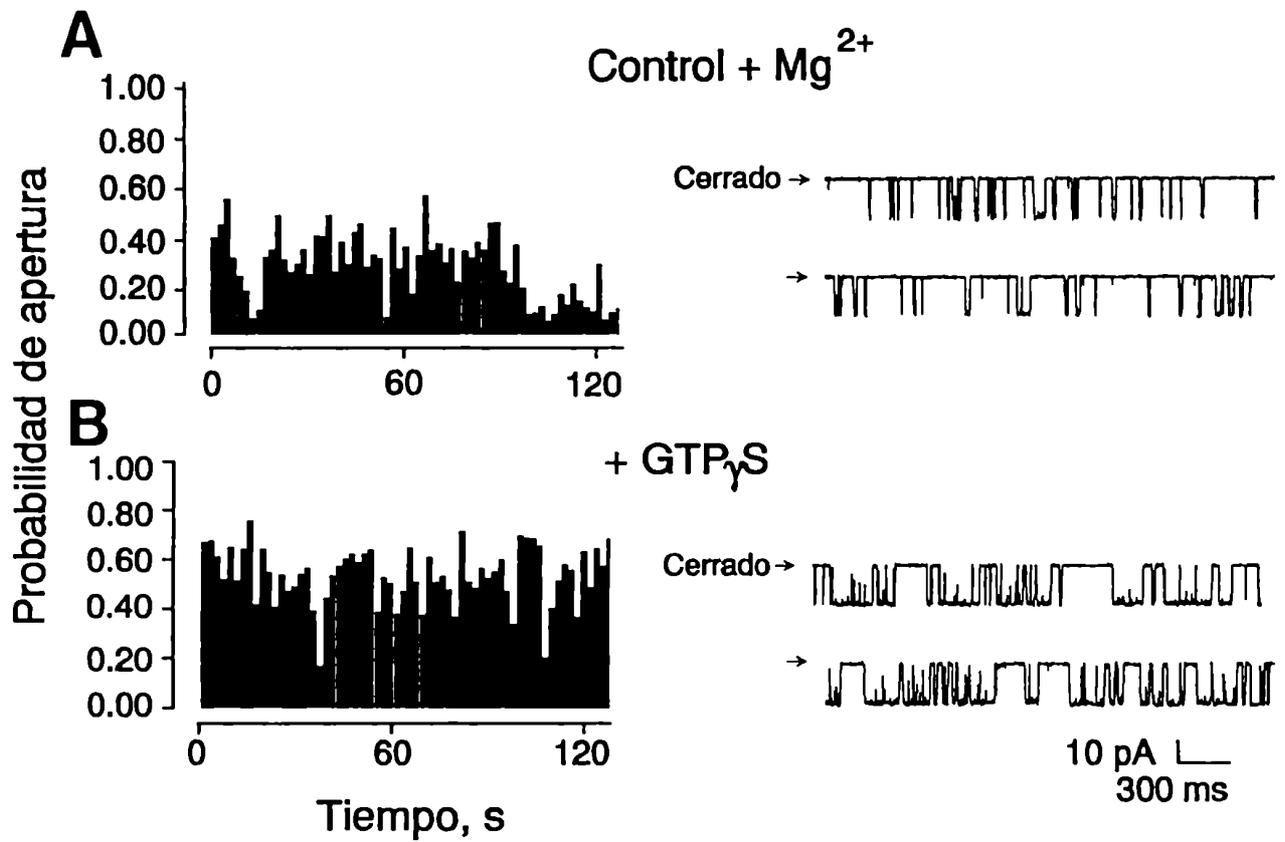


Fig. 4. El efecto del GTP γ S sobre el K $_{Ca}$ requiere la presencia de Mg $^{2+}$ libre. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (Po) del canal K $_{Ca}$ (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control) (A) y en presencia de GTP γ S (100 μ M) (B) agregado al lado interno del canal, en ausencia de Mg $^{2+}$ en la solución experimental. No se observaron cambios en las Po correspondientes que permanecieron cercanas a 0.1. V $_H$ = -40 mV.

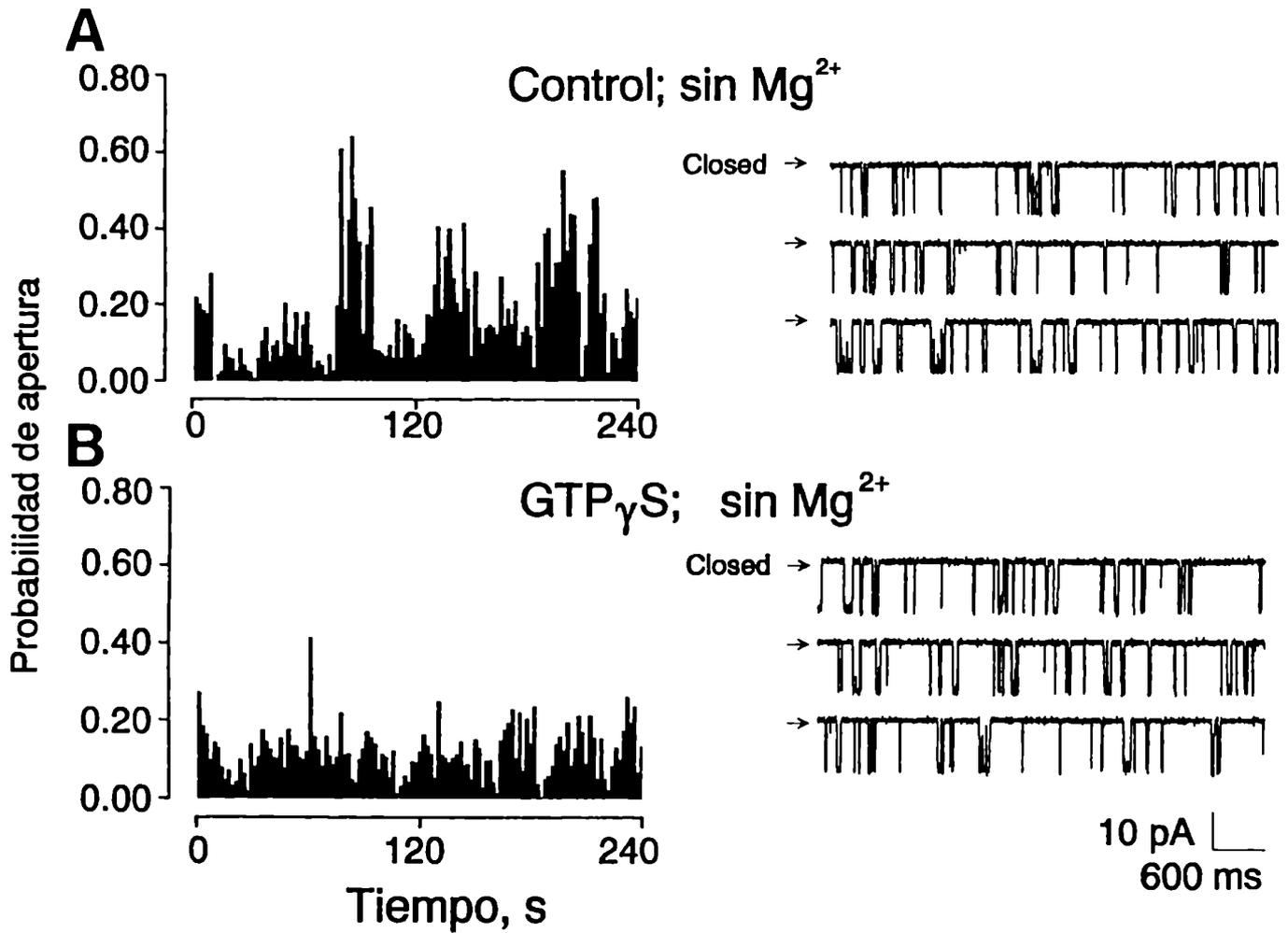


Fig. 5. Activación del K_{Ca} por efecto de la subunidad α de la proteína G activada (α_s^*) en presencia de Mg^{2+} La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control, Mg^{2+}) (A) y en presencia de α_s^* (400 pM) (B) agregada al lado interno del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.14 (control) y 0.6 (α_s^*). $V_H = -60$ mV.

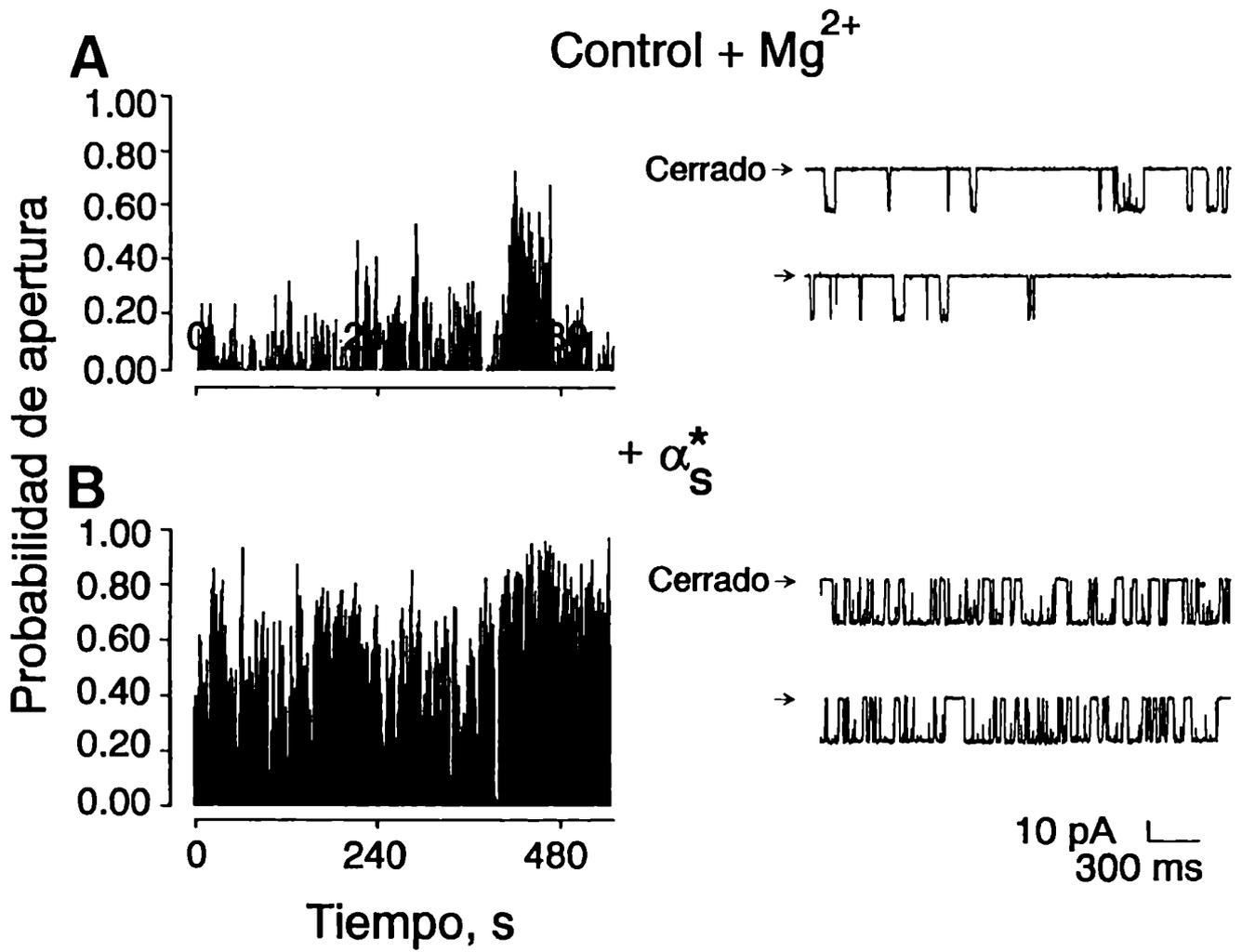
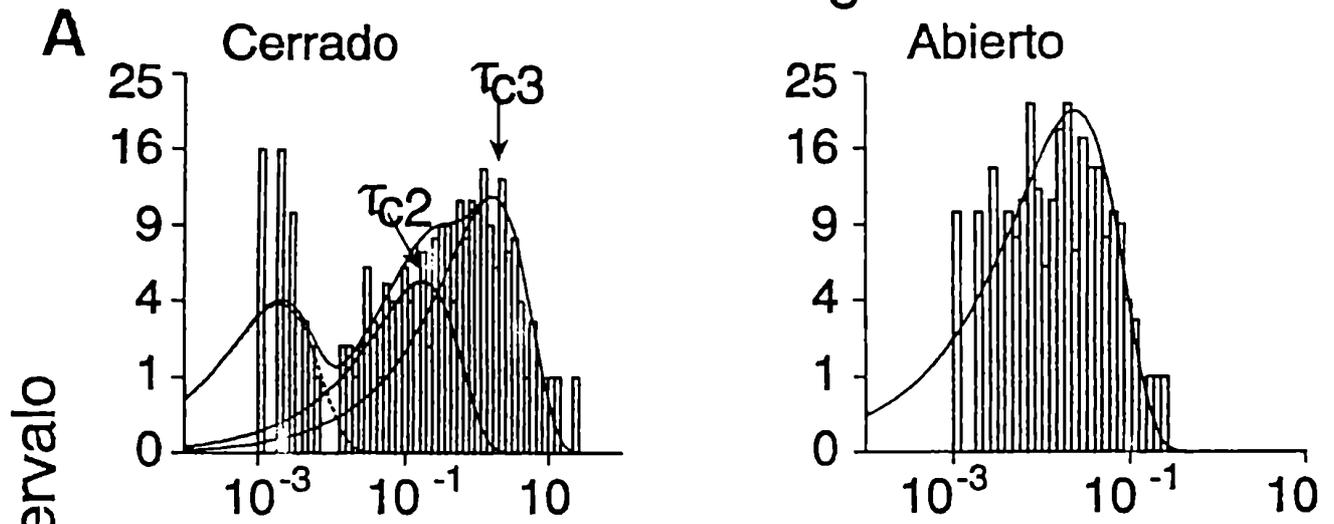


Fig. 6. Cinética del K_{Ca} luego de la activación por GTP γ S. La figura muestra los histogramas de los tiempos cerrados (izquierda) y abiertos (derecha) de un canal en ausencia (control) (A) y en presencia de GTP γ S (B). Los eventos fueron agrupados en intervalos logarítmicos y graficados utilizando la raíz cuadrada de la ordenada. Las barras representan los datos experimentales, mientras que las líneas continuas representan el mejor ajuste. Los picos corresponden a las constantes de tiempo. Ambas τ_{c2} y τ_{c3} fueron reducidas luego de la activación por GTP γ S de 156 ms a 38 ms y de 768 ms a 180 ms, respectivamente. τ_{c1} permaneció prácticamente invariable (1.7 ms antes y 1.6 ms después de la estimulación). El número de eventos es 569 (control + Mg $^{2+}$) y 2325 (+ GTP γ S). $V_H = -40$ mV.

Control + Mg²⁺



+ GTP_γS

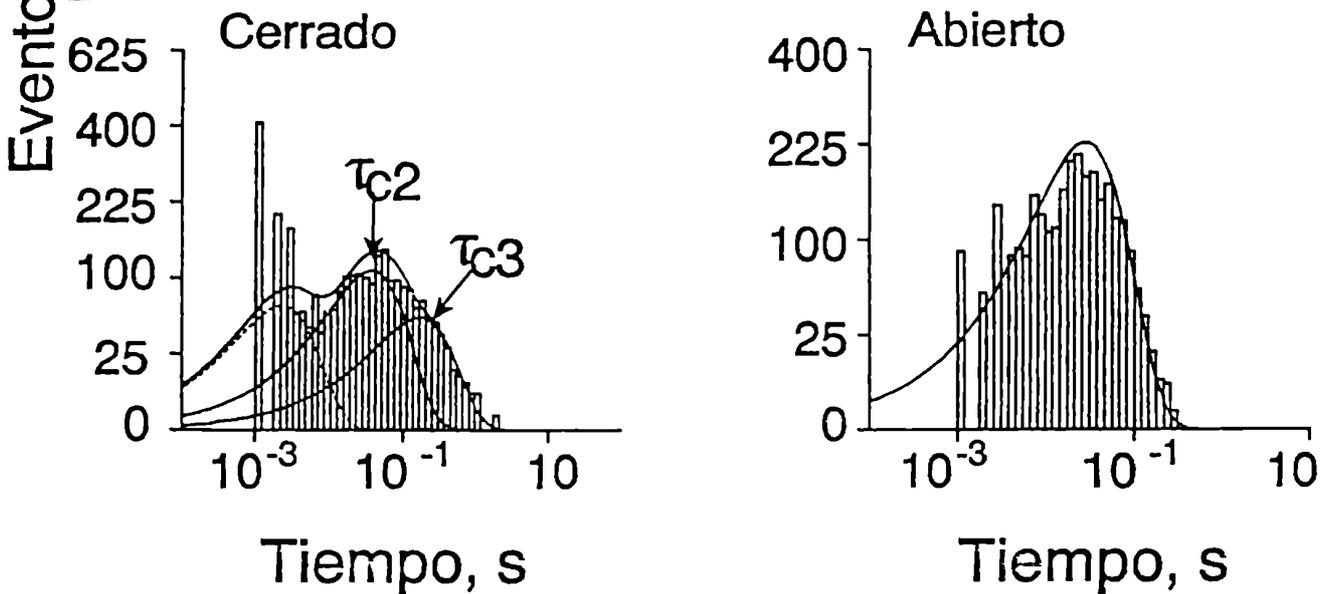


Fig. 7. Cinética del K_{Ca} luego de la activación por α_s^* . La figura muestra los histogramas de los tiempos cerrados (izquierda) y abiertos (derecha) de un canal en ausencia (control) y en presencia de α_s^* . Los eventos fueron agrupados en intervalos logarítmicos y graficados utilizando la raíz cuadrada de la ordenada. Las barras representan los datos experimentales, mientras que las líneas continuas representan el mejor ajuste. Los picos corresponden a las constantes de tiempo. La activación por α_s^* redujo la duración de τ_{c2} y τ_{c3} de 87 ms a 27 ms y de 545 ms a 146 ms. τ_{c1} permaneció prácticamente invariable (1.9 ms antes y 2.1 ms luego de la estimulación). El número de eventos es de 2888 (control + Mg^{2+}) y 7331 (+ α_s^*). $V_H = -60$ mV.

Control + Mg²⁺

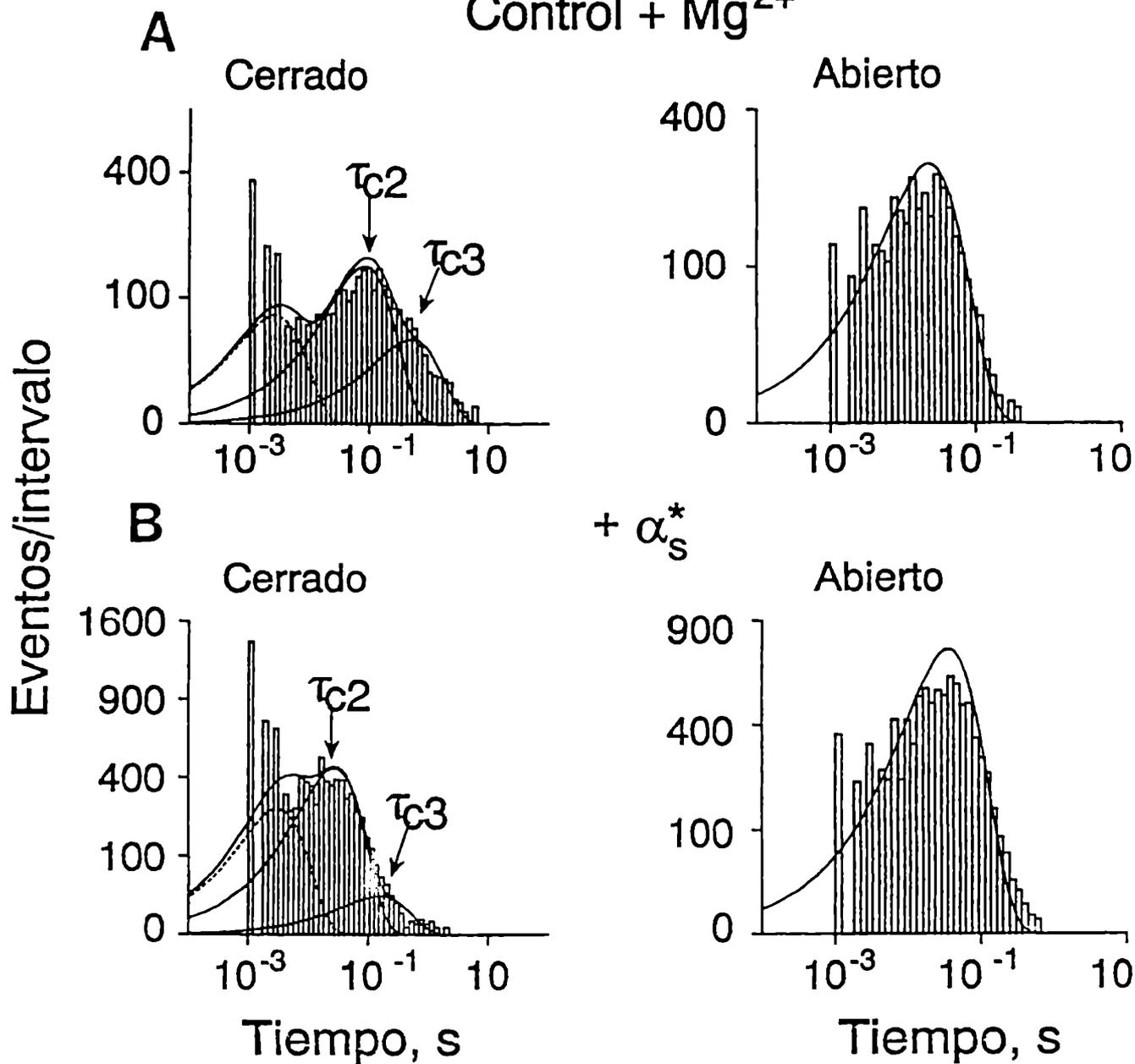


Fig. 8. Corrimiento de la curva de activación por voltaje por el agregado de GTP γ S. El gráfico representa la P_o en función del voltaje aplicado en ausencia (círculos llenos) y en presencia (triángulos abiertos) de GTP γ S (100 μ M). La actividad del canal fue registrada a distintos potenciales en ambas condiciones y los datos experimentales fueron ajustados a una distribución de Boltzmann (líneas continuas). El $V_{1/2}$ varió de -10 a -33 mV después del agregado del GTP γ S, mientras que no se observaron cambios en la pendiente (k 17 mV).

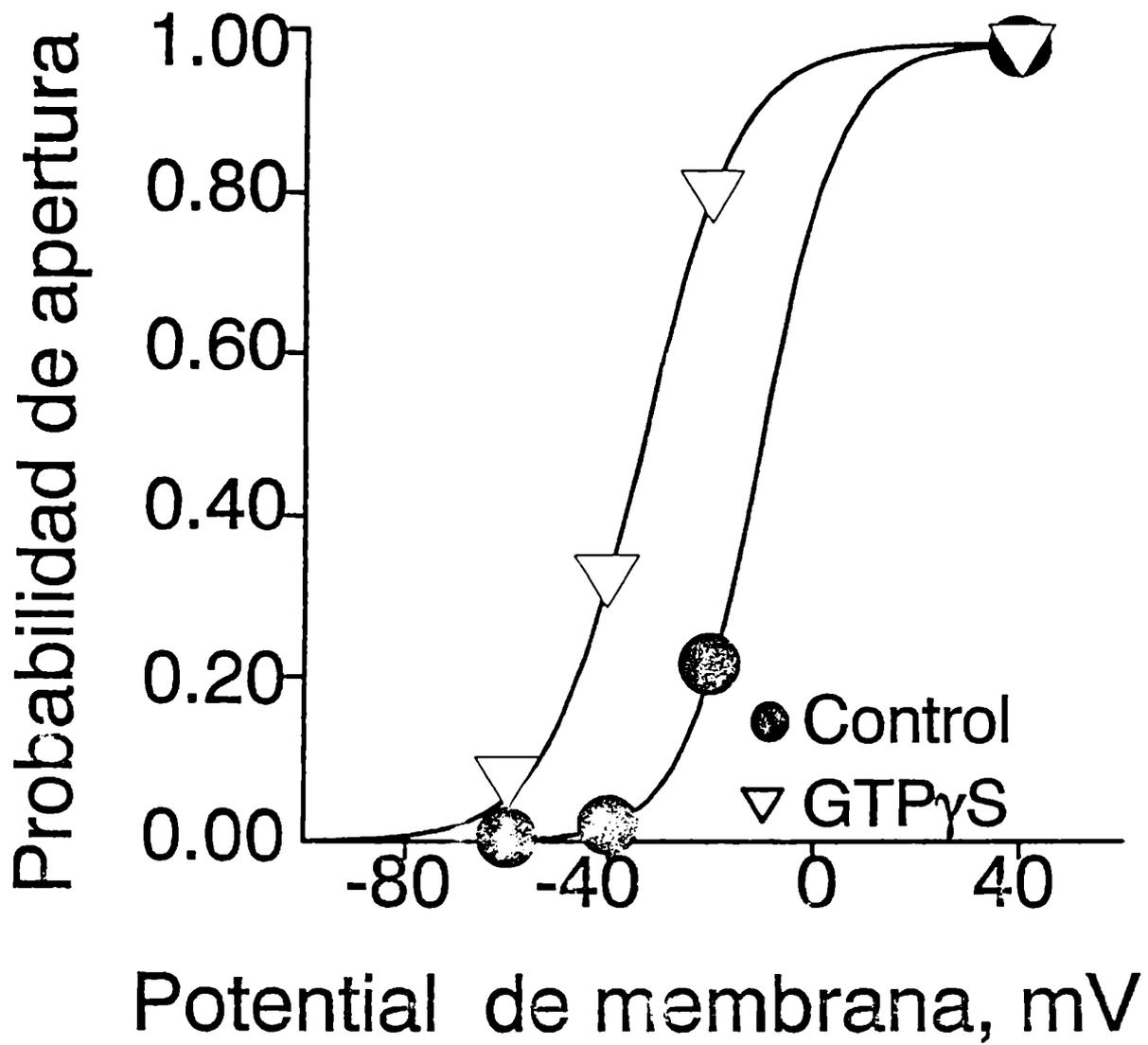


Fig. 9. Corrimiento de la curva de activación por voltaje por el agregado de α_s^* . El gráfico representa la P_o en función del voltaje aplicado en ausencia (círculos llenos) y en presencia (triángulos abiertos) de α_s^* (400 pM). La actividad del canal fue registrada a distintos potenciales en ambas condiciones y los datos experimentales fueron ajustados a una distribución de Boltzmann (líneas continuas). El $V_{1/2}$ vario de -9 a -34 mV después del agregado del α_s^* , mientras que no se observaron cambios en la pendiente (k 17 mV).

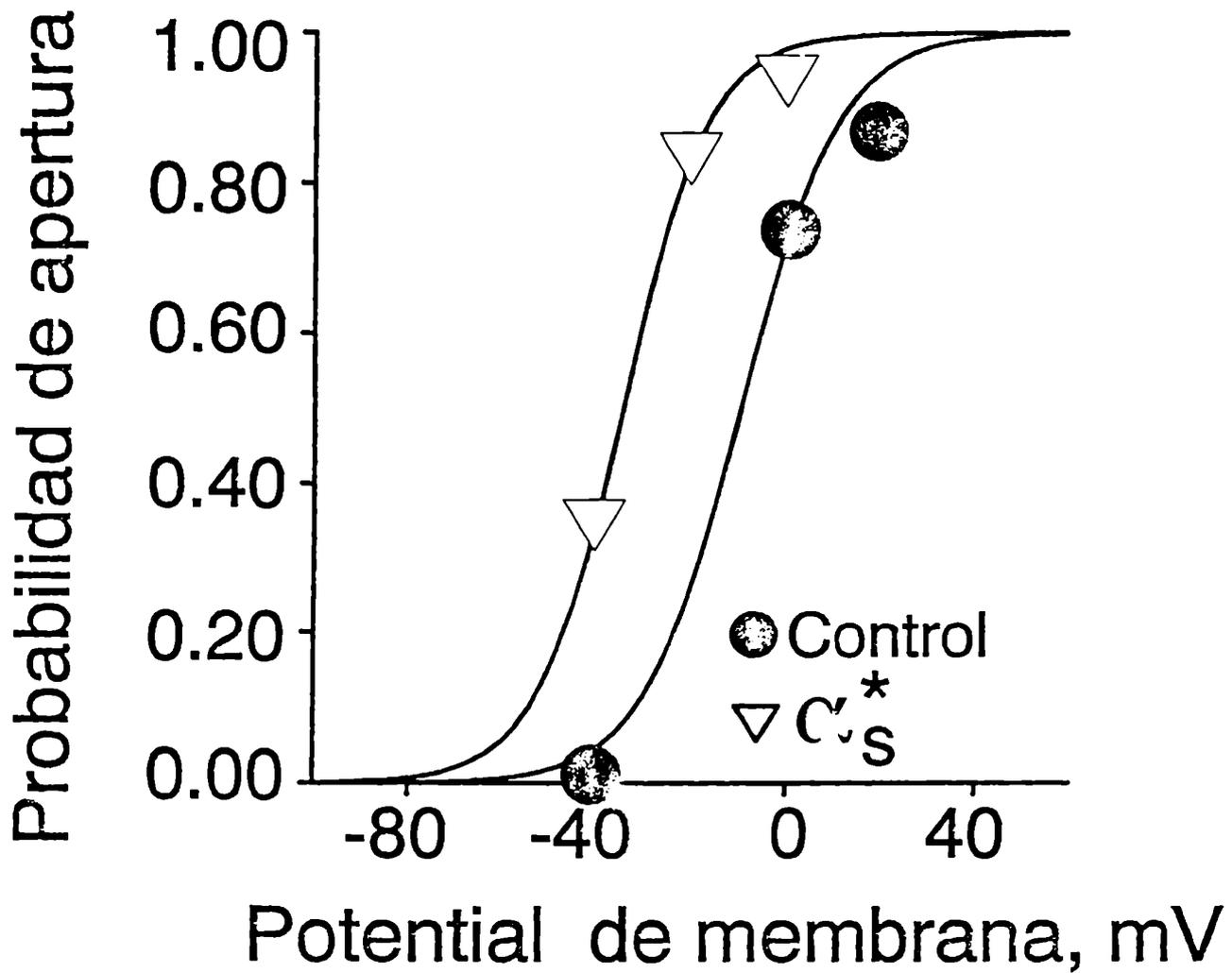


Fig. 10. Las subunidades $\beta\gamma$ no activan al canal K_{Ca} de coronaria. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control) (A) y en presencia del dímero $\beta\gamma$ (7 nM) (B) agregado al lado interno del canal, en ausencia de Mg^{2+} en la solución experimental. No se observaron cambios en las P_o correspondientes que permanecieron cercanas a 0.3. $V_H = -20$ mV.

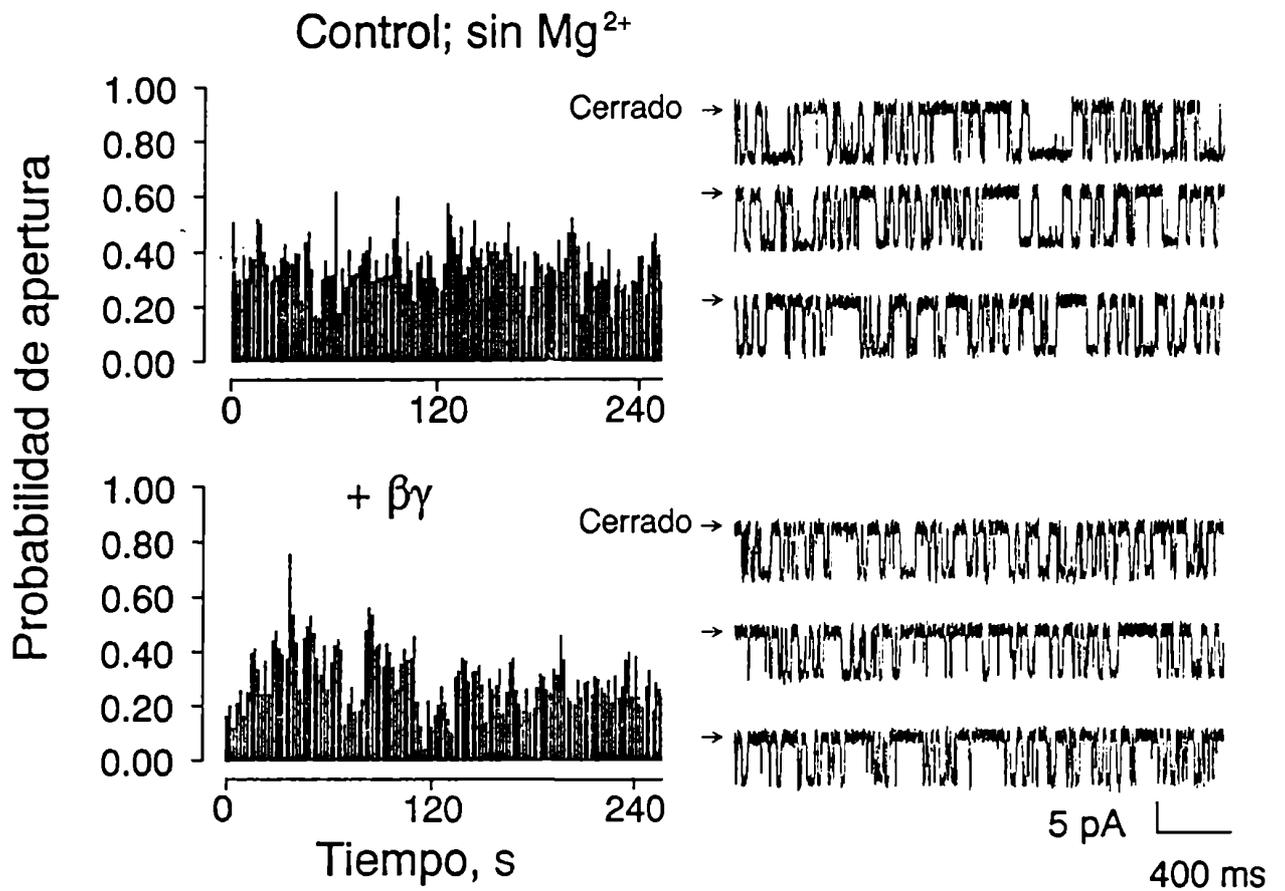


Fig. 11. El PKI no previene la activación del canal K_{Ca} por $GTP\gamma S$. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en presencia del PKI (2.6 $\mu g/ml$) y Mg^{2+} (**A**) y luego del agregado de $GTP\gamma S$ (**B**) en el lado interno del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.35 (PKI), y 0.68 ($GTP\gamma S$). $V_H = -40$ mV.

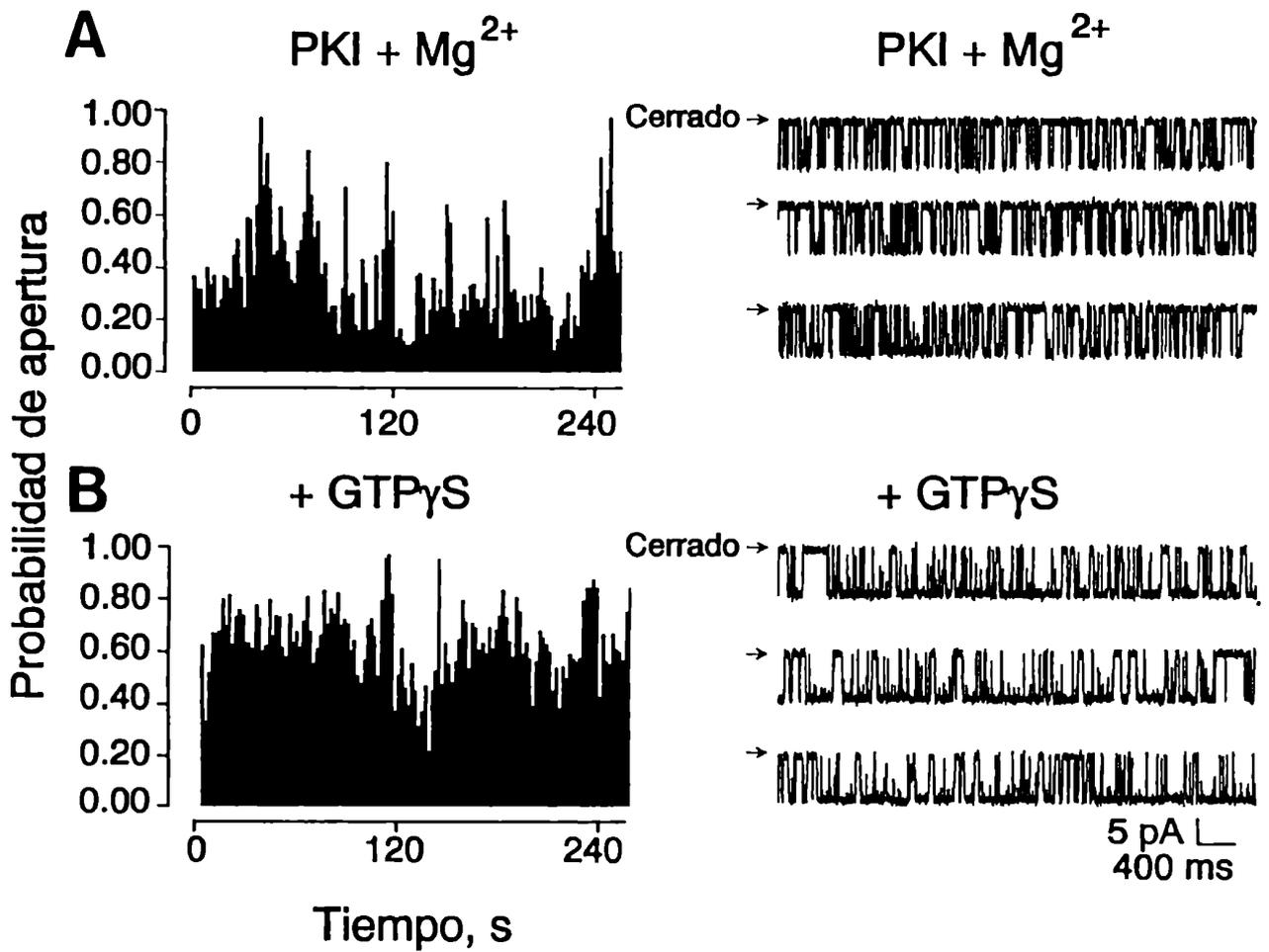


Fig. 12. El inhibidor de la proteína quinasa A (PKA), PKI, no previene la activación del canal K_{Ca} por α_s^* . La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en presencia del PKI (2.6 $\mu\text{g/ml}$) y Mg^{2+} (A) y luego del agregado de α_s^* (B) al lado interno del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.35 (PKI), y 0.68 (α_s^*). $V_H = -20 \text{ mV}$.

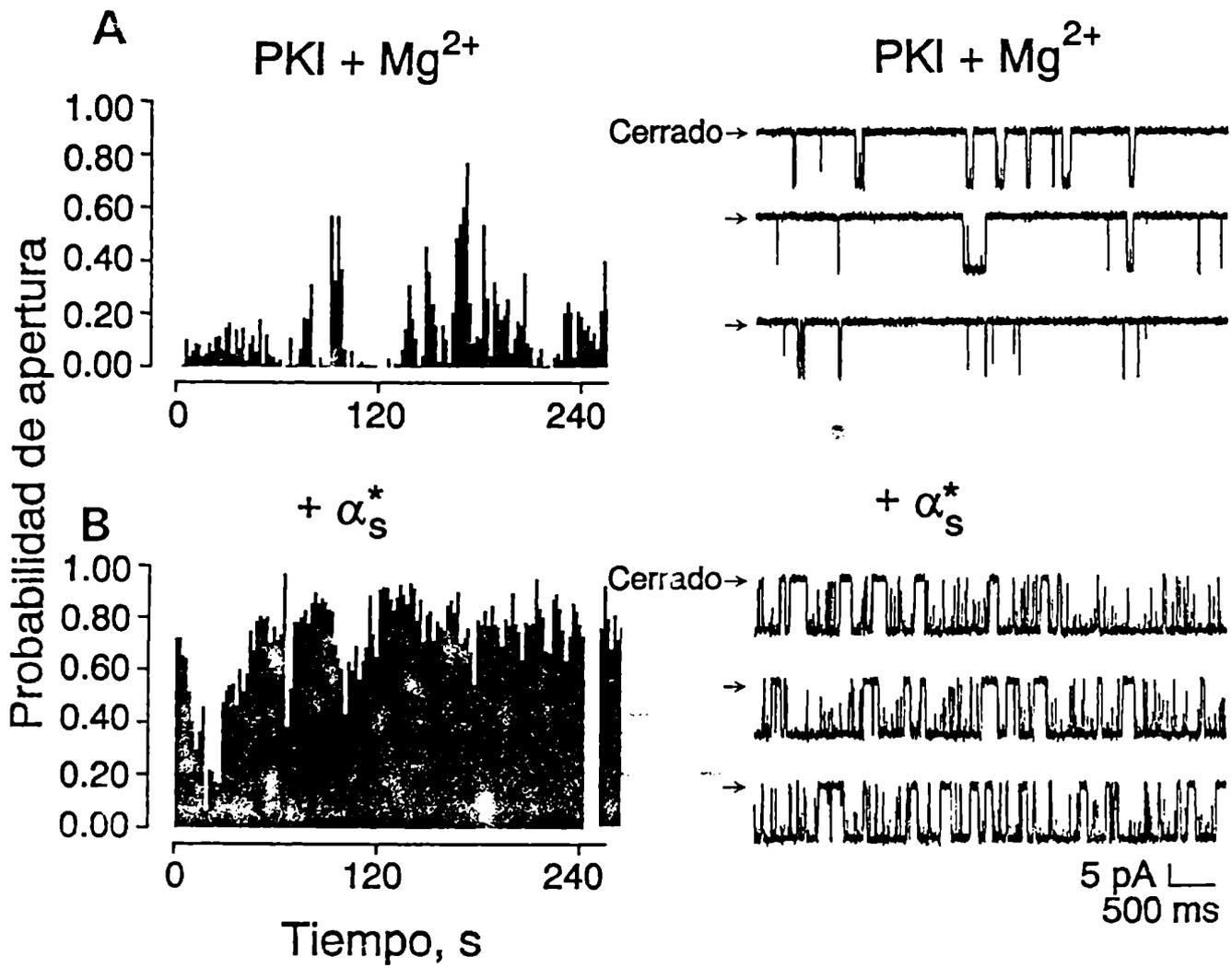
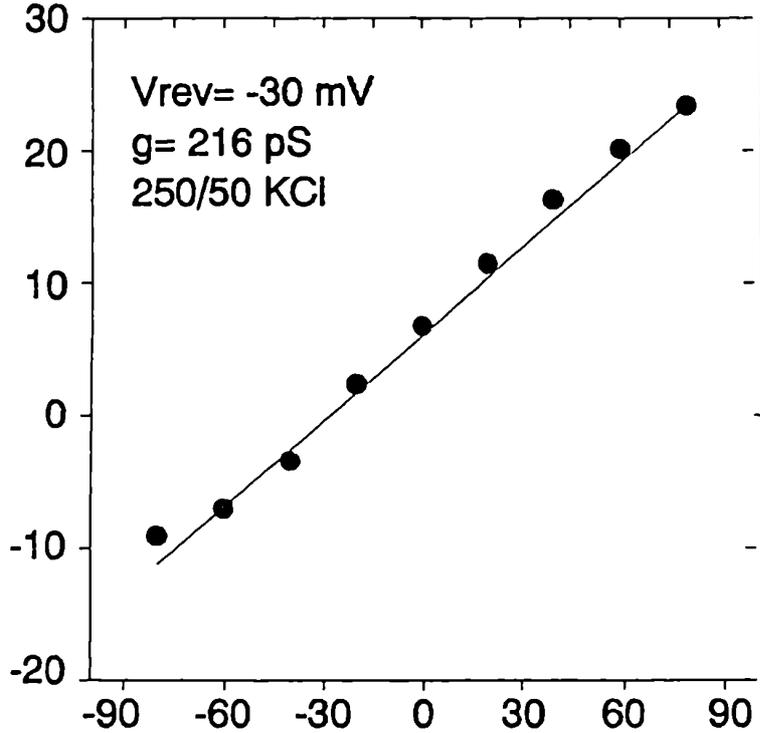


Fig. 13. Características del canal K_{Ca} purificado de tráquea. La figura muestra la curva corriente-voltaje (I-V) del canal K_{Ca} purificado de tráquea (A). Los círculos, representan la amplitud promedio ($n= 6$) a distintos potenciales, medidas en un gradiente de K^+ de 250 mM la cámara *cis* y 50 mM en la cámara *trans*. Los registros a la izquierda (B) ejemplifican la dependencia de la P_o del canal de la concentración de Ca^{2+} interno; $V_H= -40$. Los registros a la derecha (C) ejemplifican la dependencia del voltaje de la P_o del canal. La línea de puntos marca el estado cerrado del canal.

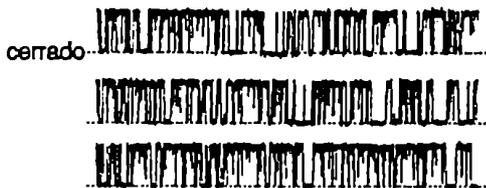
Canal purificado (traquea)

A

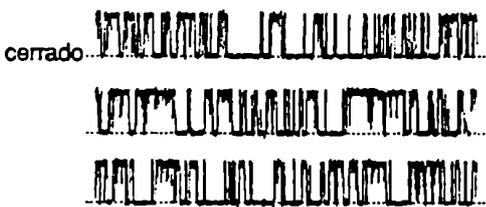


B

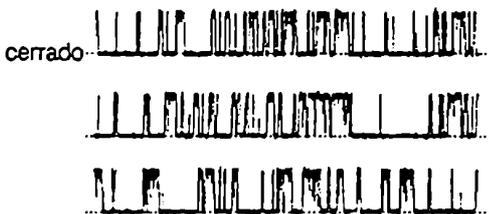
20 μM Ca^{2+} libre



17.6 μM Ca^{2+} libre



15 μM Ca^{2+} libre

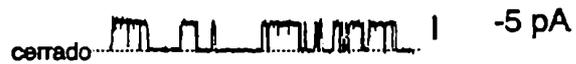


2.5 pA

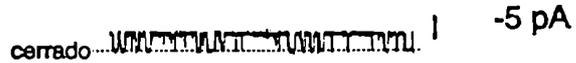
500 ms

C

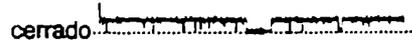
-80 mV 250/50 KCl



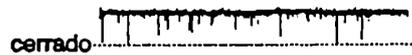
-60 mV



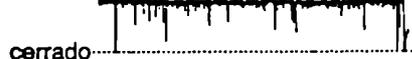
-20 mV



0 mV



20 mV



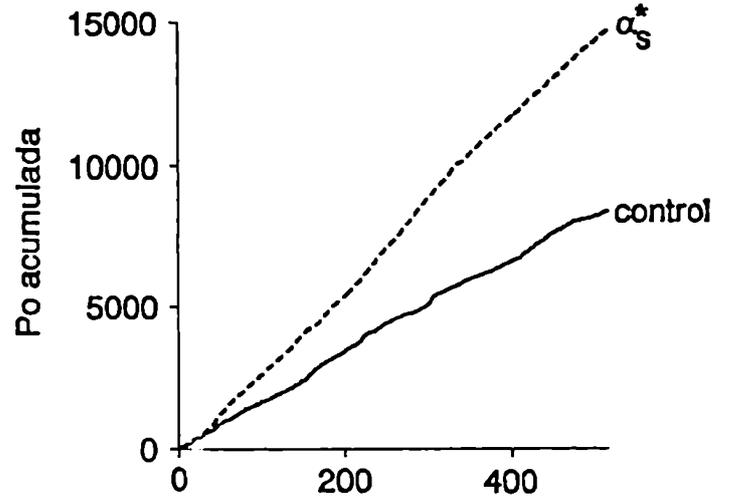
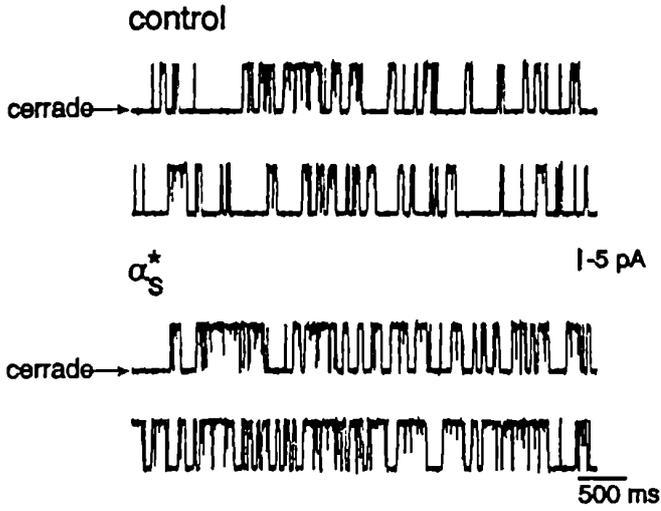
40 mV



5 pA

Fig. 14. La α_s^* activa al canal K_{Ca} purificado de tráquea. Este efecto no es mimetizado por el $GTP\gamma S$. La figura muestra el curso temporal de la P_o acumulada del canal K_{Ca} purificado de tráquea (derecha) y los registros correspondientes (izquierda) en ausencia (control, Mg^{2+}) y en presencia de α_s^* (400 pM) agregada al lado interno del canal (A); y en ausencia (control, Mg^{2+}) y presencia de $GTP\gamma S$ (B). El agregado de α_s^* aumento la P_o de 0.33 a 0.57, mientras que el $GTP\gamma S$ no produjo ningún cambio ($P_{o_{control}} = 0.3$; $P_{o_{GTP\gamma S}} = 0.37$). $V_H = -40$ mV (A), 40 mV (B).

A



B

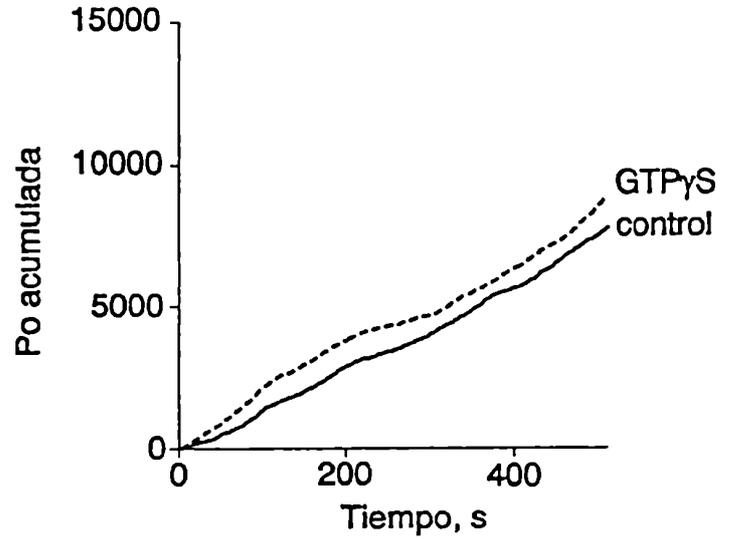
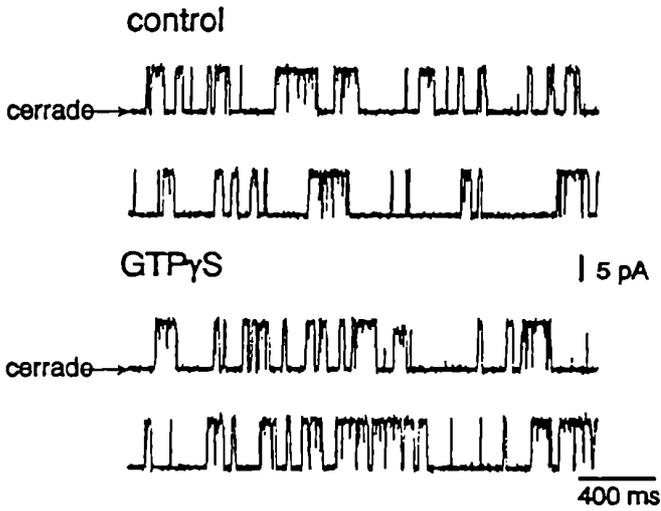
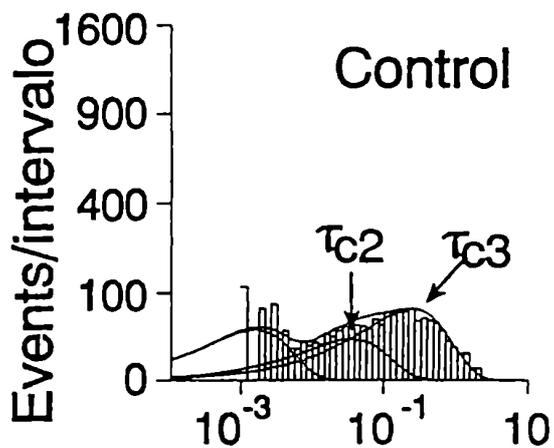
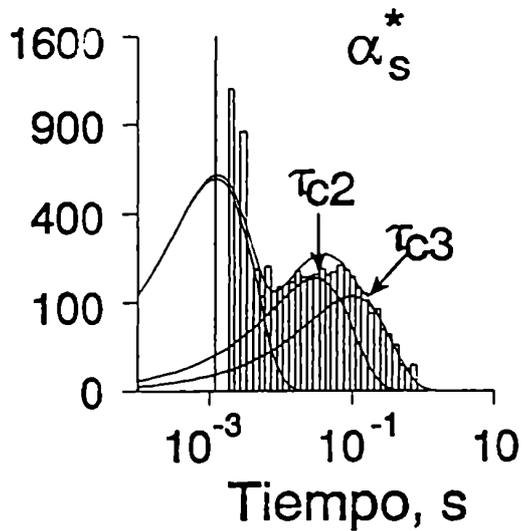
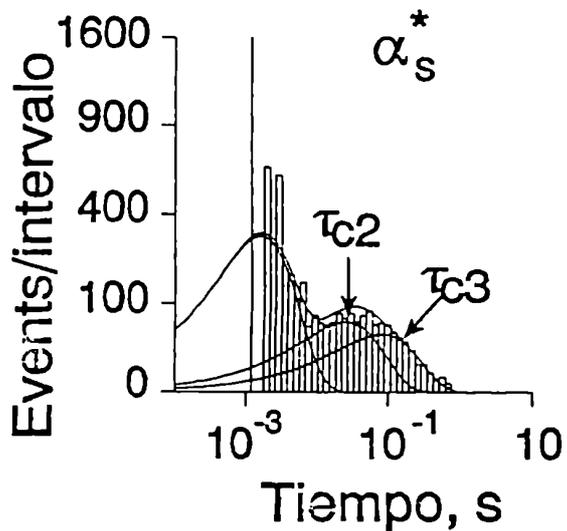
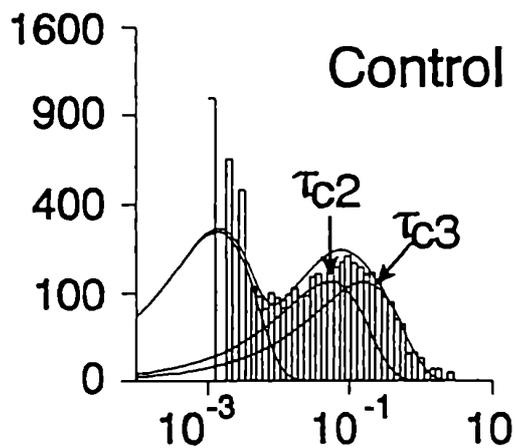


Fig. 15. La cinética de activación del canal K_{Ca} purificado de traquea y del canal K_{Ca} de coronaria por α_s^* es similar. La figura muestra los histogramas de los tiempos cerrados (izquierda) de un canal purificado de tráquea en ausencia (control) y en presencia de α_s^* . Los eventos fueron agrupados en intervalos logarítmicos y graficados utilizando la raíz cuadrada de la ordenada. Las barras representan los datos experimentales, mientras que las líneas continuas representan el mejor ajuste. Los picos corresponden a las constantes de tiempo. La activación del canal purificado de traquea por la α_s^* redujo la duración de τ_{c2} y τ_{c3} de 57 a 34 ms y de 171 a 113 ms, respectivamente. τ_{c1} permaneció prácticamente invariable (≈ 1.5 ms). El número de eventos es de 4282 (control + Mg^{2+}) y 5397 (+ α_s^*). $V_H = -40$ mV. A fines comparativos se muestran a la derecha, histogramas de tiempos cerrados correspondientes al canal de coronaria control y en presencia de y α_s^* . En este caso la α_s^* redujo la duración de τ_{c2} y τ_{c3} de 39 a 29 ms y de 272 a 90 ms, respectivamente. τ_{c1} permaneció prácticamente invariable (≈ 1.5 ms). El número de eventos es de 1231 (control + Mg^{2+}) y 2796 (+ α_s^*). $V_H = -40$ mV.

Coronaria

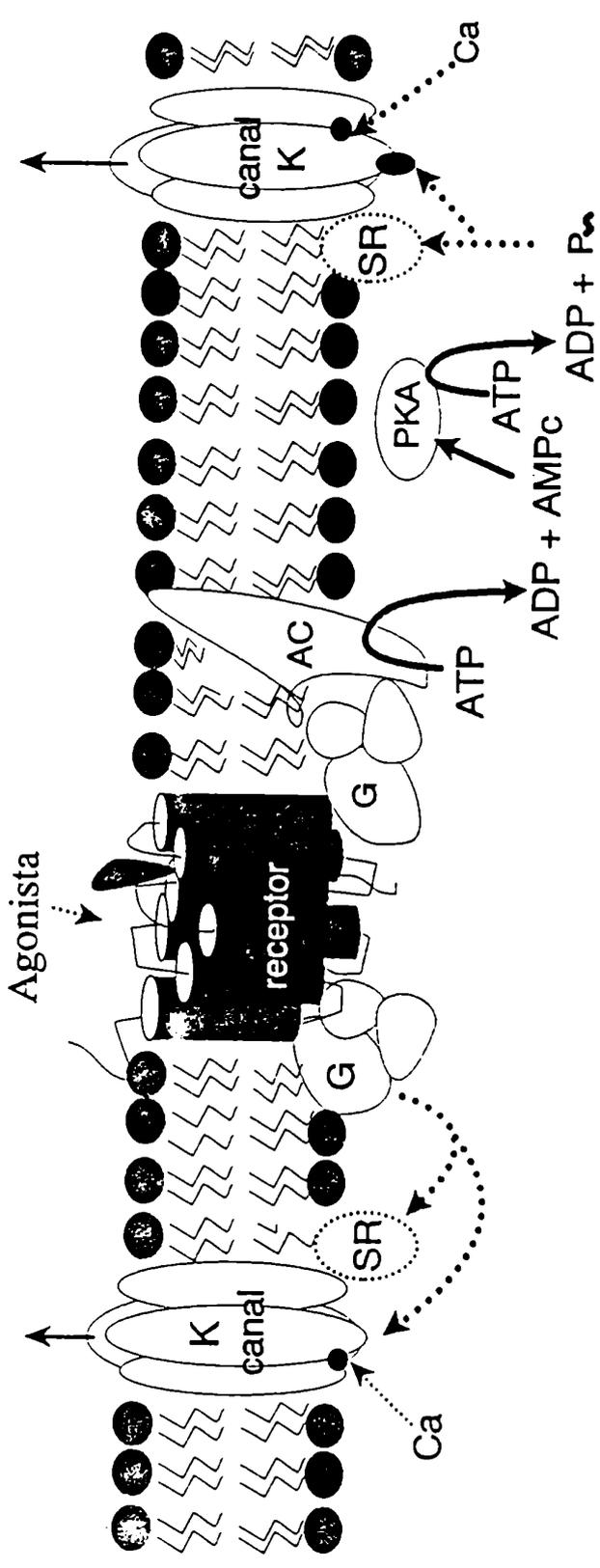


Canal purificado



Esquema 1. Modelo de una sección de una vesícula de membrana nativa y de un canal reconstituido en un liposoma. El esquema muestra los componentes hipotéticos de una vesícula de membrana nativa, en donde existirían otras proteínas además del canal iónico, comparado con un liposoma en donde solo se observa al canal reconstituido.

Canal de K_{Ca} de vesículas de membrana nativa



Canal de K_{Ca} purificado

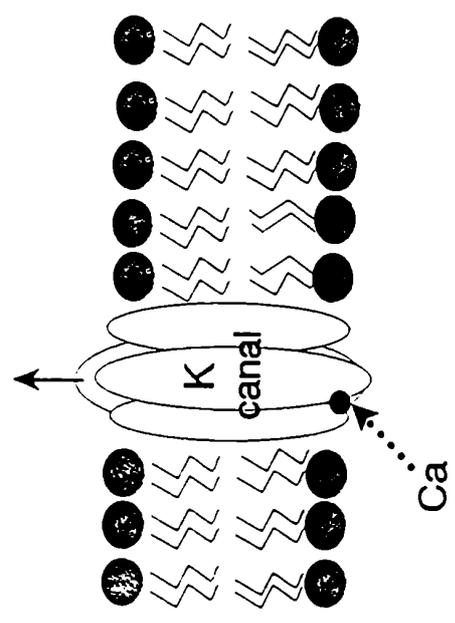


Tabla 1. Estimulación β -adrenérgica y por proteína G de los canales K de músculo liso de coronaria.

	antes	después	n
Isoproterenol, 10 μ M ^Ψ	0.22 ± 0.1	0.56 ± 0.16 [§]	4
GTP γ S, 100 μ M	0.22 ± 0.03	0.56±0.05 [§]	11
α_s^* , 300 pM	0.22 ± 0.1	0.54 ± 0.1 [§]	6
$\beta\gamma$, 7 nM	0.43 ± 0.09	0.34 ± 0.09	8

^Ψ Se estudió en dos experimentos la reversión por 100 μ M propranolol (Fig.): $P_{o-control}$ 0.1 ± 0.09, $P_{o-isoproterenol}$ = 0.44 ± 0.05, $P_{o-propranolol}$ = 0.08 ± 0.07. Los valores corresponden a la P_o media ± SEM; n = número de experimentos; [§] significativamente diferente con respecto al control, p < 0.05

Tabla 2. Activación de los canales K_{Ca} de músculo liso de coronaria mediada por proteína G independiente de la fosforilación o del AMPc.

Condición Inicial	activación relativa	n
<u>por CS-PKA</u>		
Control	$2.8 \pm 0.6^{\S}$	5
PKI, 2.6 $\mu\text{g/ml}$ (o IP20, 0.2 $\mu\text{g/ml}$)	1.1 ± 0.1	8
<u>por 100 μM GTPγS</u>		
Control	$2.9 \pm 0.4^{\S}$	11
PKI, 2.6 $\mu\text{g/ml}$ (o IP20, 0.2 $\mu\text{g/ml}$) Ψ	$2.4 \pm 0.5^{\S}$	4
AMP-P(NH)P, 100 μM Ψ	$2.7 \pm 0.4^{\S}$	6
Rp-AMPc[S], 100 μM Ψ	$3.7 \pm 1.2^{\S}$	3
AMPc, 10 μM $\Psi\Psi$	$1.9 \pm 0.1^{\S}$	3
<u>Por 300 pM α_s^*</u>		
Control	$4.0 \pm 1^{\S}$	6
PKI, 2.6 $\mu\text{g/ml}$	$4.1 \pm 1.3^{\S}$	3

Ψ Estos compuestos por si mismos no tuvieron efectos significativos sobre la P_o del canal. Los valores para el PKI fueron: $P_{o\text{-control}} = 0.34 \pm 0.1$, $P_{o\text{-PKI}} = 0.33 \pm 0.1$ (n=5); para el IP20, $P_{o\text{-control}} = 0.59 \pm 0.09$, $P_{o\text{-IP20}} = 0.51 \pm 0.06$ (n=3); para el AMP-P(NH)P, $P_{o\text{-control}} = 0.26 \pm 0.2$, $P_{o\text{-AMP-P(NH)P}} = 0.1 \pm 0.12$ (n=5); para el Rp-cAMP[S], $P_{o\text{-control}} = 0.24 \pm 0.1$, $P_{o\text{-Rp-cAMP[S]}} = 0.3 \pm 0.1$ (n=2). $\Psi\Psi$ el AMPc por si mismo pudo bien activar (0.1 ± 0.01 vs. 3 ± 0.03 , n=3), inhibir (0.44 ± 0.1 vs. 0.18 ± 0.05 , n=5) o no tener ningún efecto (n=3) sobre la actividad del canal. Estos efectos del AMPc no parecen estar relacionados a la fosforilación ya que también fueron observados en presencia del antagonista del AMPc, Rp-AMPc[S] (n=2). Independientemente del efecto del AMPc, el GTP γ S provocó un aumento en la P_o del canal. Los valores expresan la media \pm E.S; n = número de experimentos. \S La activación fue significativa en todos los casos a $p \leq 0.05$ (ver Métodos). PKI, inhibidor de la proteína quinasa; IP20, fragmento de 20 amino ácidos del PKI; AMP-P(NH)P, adenilato; Rp-AMPc[S], isómero Rp del adenosin-3',5'-monofosfothioato cíclico.

Tabla 3. Estimulación del canal de K_{Ca} de músculo liso de tráquea purificado, reconstituido en liposomas e incorporado en bicapas por la subunidad α de la proteína G_s .

	Before	After	n
α_s^* , 300 pM	0.29 ± 0.07	$0.45 \pm 0.1^{\S}$	6
α_s^* (h), 300 pM	0.21 ± 0.09	0.28 ± 0.17	4
GTP γ S, 100 μ M	0.24 ± 0.05	0.27 ± 0.06	8
$\beta\gamma_t$, 7 nM	0.14 ± 0.05	0.12 ± 0.04	6

\S La activación fue significativa en todos los casos a $p \leq 0.05$ (ver Métodos).

Parte 2

Contracción

Como se indico anteriormente, los canales de K_{Ca} no sólo son importantes en el proceso de relajación sino también en el proceso opuesto, es decir la contracción. Es importante recordar que las células de músculo liso vascular no generan potenciales de acción *in situ*, y que por lo tanto el estudio de la modulación de estos canales es importante en la comprensión del proceso de modulación de la excitabilidad celular. En esta segunda parte del trabajo experimental se estudió el efecto del agente vasoactivo TxA_2 , sobre el canal K_{Ca} de músculo liso de coronaria.

Los métodos utilizados en esta parte del trabajo son muy similares a los usados en la sección anterior, con algunas modificaciones en las soluciones experimentales, las cuales están indicadas en la sección de "MÉTODOS" o en el texto.

La incorporación de los canales de K_{Ca} en la bicapa lipídica fue realizada como se indico en la parte 1 de los resultados, pero en este caso la concentración de Ca^{2+} libre fue de $100 \mu M$ y el Mg^{2+} libre fue el contaminante. En estas condiciones la P_o inicial del canal es en promedio de 0.8. En primer lugar se estudio la acción del U46619, un agonista del TxA_2 , sobre la actividad del canal K_{Ca} de músculo liso de la coronaria. El U46619 fue agregado a la solución externa al canal luego de 10 min de registro continuo en condiciones control (250 mM KCl simétrico). La concentración final del agonista fue desde 25 hasta 150 nM y se tomaron registros de hasta 90 min. En estas condiciones se observó un efecto inhibitorio sobre la probabilidad de apertura del canal alrededor de 5 min después del agregado del agonista. La figura 16 ejemplifica la acción del U46619 (50 nM) sobre un canal registrado continuamente durante 10 minutos a -40 mV. Se observo un efecto similar en un 80% de los canales estudiados (n=25).

Para entender que tipo de cambios ocurren en el canal debido a la acción del agonista se hizo un estudio de la cinética del canal en condiciones control y luego del agregado del U46619. La Fig. 17 muestra los histogramas de tiempos abiertos y cerrados de un canal en el cual la probabilidad de apertura vario de 0.96 en el control a a 0.26 luego del subsiguiente agregado del agonista U46619 al lado externo del canal. Para el control,

el histograma de tiempos abiertos fue ajustado a dos exponenciales cuyas constantes τ_{a1} y τ_{a2} fueron 120 y 360 ms respectivamente, correspondiendo la primera al 76% y la segunda al 26% de un total de 14805 eventos. Luego del agregado del agonista, τ_{a1} se redujo a 9 ms correspondiendo al 99.6% del total eventos (18967). La cantidad de eventos restantes, 0.4%, es muy pequeña para ser considerado en el ajuste. Para los tiempos cerrados se ajusto una sola exponencial en el control, de 3 ms, mientras que luego del agregado del U46619 fue posible ajustar 2 exponenciales, siendo τ_{c1} de 20 ms y τ_{c2} de 77 ms, con el 74% y el 26% respectivamente. Esta tendencia a la reducción en los tiempos abiertos, y al aumento de los tiempos cerrados fue observada en el total de los canales estudiados (n=25).

Debido a que, como se menciona anteriormente, estos canales son dependientes del voltaje, se estudio si esta dependencia era afectada por el agonista del TxA_2 . En la Fig. 18 se muestra la relación entre el voltaje y la P_o en condiciones control y luego del subsiguiente agregado del U46619 a la solución del lado externo del canal. Se observa que el agonista del TxA_2 produce un corrimiento hacia potenciales más positivos con respecto a la curva control. La variación del $V_{1/2}$ fue de -82 para el control a -24 mV para el tratado, mientras que el factor de la pendiente k permaneció casi sin modificaciones (≈ 16 mV). En la parte inferior de la figura se muestran trazos representativos de registros a dos potenciales diferentes donde se ve que el efecto inhibitorio es mas evidente a potenciales hiperpolarizantes, o sea cuando la P_o del canal es menor.

Debido a que el U46619 es un compuesto altamente lipofílico (ver estructura en Fig. 24), se realizaron experimentos para determinar si el efecto inhibitorio sobre el canal no se debía a cambios inespecíficos provocados por el compuesto en el ambiente lipídico. Para resolver este punto se estudió, en primer lugar, la lateralidad del efecto del U46619, es decir, si la inhibición causada por el agonista, cuando era agregado del lado externo del canal se observaba también al agregarlo en la solución correspondiente al lado interno del canal. La Fig. 19 muestra la variación de la P_o durante 5 min de registro continuo y luego del subsiguiente agregado del U46619 (100 nM) en el lado interno del canal y del lado

externo del mismo. Se observa que cuando el U46619 es agregado del lado interno la P_o permanece constante ($n=5$), mientras que el posterior agregado del lado externo produce una disminución de la P_o (entre un 30-96%, $n=3$). El hecho de que en el mismo canal, el agonista actúa únicamente cuando es agregado del lado externo, es una fuerte evidencia de la especificidad del compuesto. Por el otro lado, se estudio el efecto del metabolito inactivo del TxA_2 , el TxB_2 (ver estructura en Fig. 26). Esto se muestra en la Fig. 20. La P_o no cambia con el agregado del TxB_2 ($1 \mu M$) al lado externo del canal ($n=5$), mientras que se evidencia un cambio en la P_o cuando se agrega del compuesto activo, U46619 ($0.1 \mu M$, entre un 15-73%, $n=4$).

Si bien los experimentos anteriores demuestran que el efecto inhibitorio del U46619 es específico, no son suficientes para comprobar que esta especificidad esta dada por la unión del agonista al receptor específico del TxA_2 , Para esto se realizaron experimentos con el antagonista competitivo de dicho receptor, SQ29,548. Se analizó por un lado, la capacidad del antagonista de prevenir el efecto inhibitorio del TxA_2 , y por el otro lado, la reversión de la inhibición. En el primer caso, los canales incorporados fueron registrados en presencia del SQ29,548 en el lado externo del canal, durante un tiempo que varió entre 20 y 45 min para descartar el posible efecto del antagonista *per se*. El U46619 fue agregado subsiguientemente del mismo lado que el antagonista. La Fig. 21 muestra que no se observaron cambios apreciables de la P_o en presencia del antagonista, ni con el posterior agregado del U46619, aún cuando las concentraciones fueran mayores que aquellas en las que se había observado anteriormente el efecto inhibitorio ($n=8$). Por otro lado, la inhibición del canal causada por el U46619 (100 nM) fue revertida por el SQ29,548 ($1 \mu M$). La Fig. 22 muestra el curso temporal de la reversión del efecto inhibitorio del U46619, que comienza recién luego de 1 hora de incubación con el antagonista. Se observaron resultados similares en 3 experimentos realizados con este protocolo experimental.

Debido a que el canal estudiado esta regulado por el calcio interno, se investigó la posibilidad de que el aumento de este ion, revirtiera el efecto inhibitorio del U46619. Esto

esta mostrado en la Fig. 23, donde se ve que partiendo de un pCa de 5.6, el U46619 disminuyó la P_o del canal. Luego de 10 min de registro continuo en estas condiciones, se agrego CaCl_2 al lado interno del canal hasta llegar a un pCa de 4.5. Como resultado la P_o del canal fue restaurada hasta valores cercanos al control.

Los resultados mostrados en la primer parte de este trabajo demostraron la existencia de proteínas G que permanecen acopladas al canal aún luego del proceso de obtención de membranas. Se sabe que el TxA_2 , activa a la fosfolipasa C, que esta ligada a una proteina G inhibitoria. Por lo tanto se estudio, finalmente, el efecto de la subunidad α activada de la proteina G_{i3} (α_{i3}^*) sobre el canal K_{Ca} de músculo liso de coronaria. Se observo un efecto inhibitorio sobre la actividad del canal en 5 de 13 experimentos ($P_{o\alpha_{i3}^*}/P_{o\text{control}} = 0.44 \pm 0.11$)(fig 25). Si bien esto es mucho menos del porcentaje de canales que son inhibidos por el TxA_2 , es un indicio de que los canales K_{Ca} son susceptibles también a la modulación por proteínas G inhibitorias. Este dato aún no es concluyente sobre el papel de la proteína G_{i3} en el efecto inhibitorio del TxA_2 , sin embargo es importante tenerlo en cuenta para futuras investigaciones.

Conclusiones

Los resultados presentados en esta segunda sección apoyan la idea de que la inhibición de los canales K_{Ca} puede estar involucrada en la acción vasoconstrictora del TxA_2 . Esto se basa en los siguientes hechos experimentales: 1) El análogo del TxA_2 , U46619 inhibe la actividad de los canales incorporados a una bicapa lipídica; 2) Esta inhibición no parece deberse a cambios en el entorno lipídico del canal, ya que el U46619 sólo produjo inhibición cuando fue agregado del lado externo del canal, y el TxB_2 , cuya estructura es similar a la del agonista, no produjo ningún cambio en la P_o ; 3) El efecto inhibitorio del U46619 parece involucrar la unión específica del agonista con un receptor del TxA_2 , ya que su antagonista competitivo, SQ29,548, es capaz de prevenir y revertir el efecto inhibitorio del U46619.

De estos resultados no se puede concluir si el receptor involucrado es el mismo canal o es una molécula asociada. Se sabe de otros estudios, que el receptor para el TxA_2 está asociado a una fosfolipasa C acoplada a una proteína G insensible a la toxina pertusis. Aunque la solución experimental utilizada no contiene GTP ni Mg^{2+} , no se puede descartar que estos se encuentren como contaminantes y que la inhibición del canal por el U46619 involucre a una proteína G.

Por otro lado, de los experimentos anteriores, se deduce que la acción inhibitoria del U46619 no se debe a un simple bloqueo del canal del tipo del bloqueo por tetraetilamonio o caribdotoxina, ya que el corrimiento de la curva de voltaje luego de la inhibición por el U46619 fue de forma paralela a la curva control, y la P_o máxima observada en el control, fue alcanzada en el tratado con pulsos de voltaje despolarizantes. Por lo tanto es mas probable que la inhibición se deba a cambios en la actividad del canal. El hecho de que la inhibición haya sido revertida por el agregado de calcio interno también apoya la idea de que el U46619 produce cambios en la actividad del canal, mas que un bloqueo, aunque esta reversión podría también explicarse por cambios en la afinidad del agonista por el receptor debidos al aumento de calcio.

Estudios realizados por otros grupos de investigación, han demostrado que la

entrada de calcio a la célula desde el espacio extracelular es importante en la acción vasoconstrictora del TxA_2 , aunque se ha observado que el bloqueo de los canales de calcio no suprime por completo la contracción inducida por el TxA_2 (Bian & Toda, 1989; Smith *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 1984). Esto sugiere que el TxA_2 podría tener más de una vía de acción. En base a la bibliografía y a los presentes resultados se pueden proponer por lo menos dos modos de acción: 1) la activación de la PLC por medio de una proteína G, que resultaría en un aumento de la concentración interna de calcio debido a la producción de inositol-trifosfato y 2) la inhibición de los canales K_{Ca} . Es interesante considerar que la activación de la PLC produce, además del inositol-trifosfato al diacilglicerol, el cual induce la activación de la PKC lo cual produciría inhibición del canal (ver INTRODUCCIÓN: ciclos de fosforilación-desfosforilación). Aunque la evidencia experimental no es suficiente, este sería un mecanismo de control de la contracción interesante ya que el aumento en la concentración de calcio produce en sí mismo contracción pero a la vez activaría a los canales de K_{Ca} . La inhibición de este canal por otro mecanismo que funcione al mismo tiempo que se libera el calcio sería importante para mantener la función celular.

Conclusiones generales

Aunque el papel de los canales K_{Ca} en el músculo liso vascular no se conoce por completo, la inhibición del canal por el TxA_2 sería acorde a la conocida acción como vasoconstrictor de este compuesto. Si como proponen algunos autores, el canal K_{Ca} estuviese involucrado en la repolarización, su inhibición resultaría en una despolarización prolongada de la membrana; si en cambio, el canal participa en el mantenimiento del potencial de reposo, el cierre de los mismos causaría una despolarización de la membrana, con la concomitante apertura de los canales de calcio activados por voltaje, y como resultado, la contracción de la arteria. De la misma manera, la apertura de los canales por los agentes β -adrenergicos aceleraría la repolarización o bien provocaría una hiperpolarización dando como resultado un efecto relajante.

En cualquiera de los casos, queda evidenciado que el canal de K_{Ca} cumple un

papel importante en el proceso de relajación-contracción del músculo liso de coronaria en ambas fases de este proceso. Este trabajo muestra además que existen macrocomplejos moleculares que permanecen íntimamente asociados aun luego del proceso de fraccionamiento celular (canal-receptor TxA_2 , canal-proteína G-receptor β -adrenérgico). Por último este trabajo da una idea de la complejidad de la regulación de los canales iónicos y de su importancia en la fisiología celular.

FIGURAS: RESULTADOS Parte 2

Fig. 16 Inhibición del canal de K activado por calcio (K_{Ca}) por el agonista del tromboxano A₂ (TxA₂), U46619. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control) (A) y luego del agregado de U46619 (50 nM) (B). Las P_o correspondientes fueron: 0.88 (control), y 0.49 (tratado). $V_H = -40$ mV.

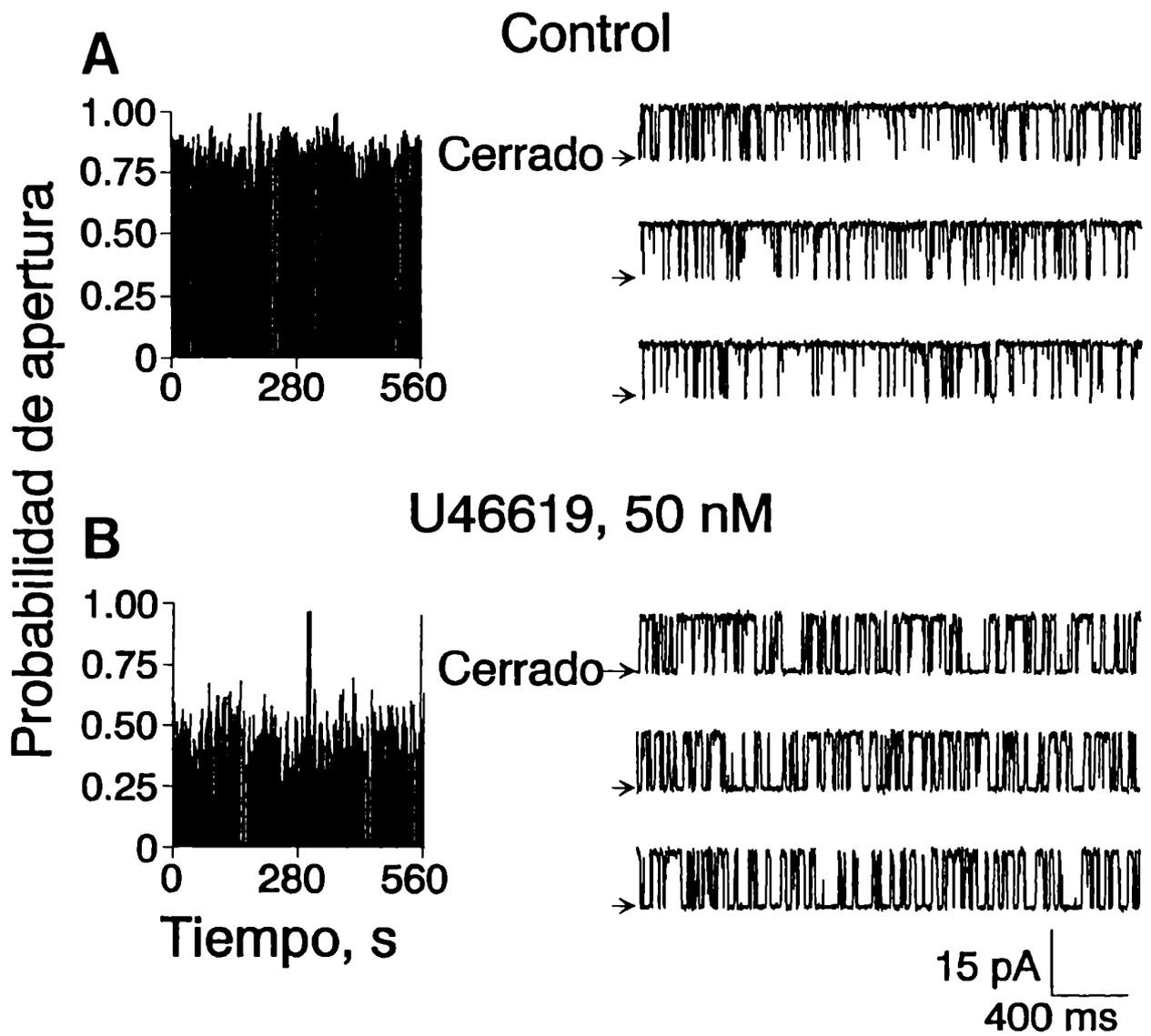
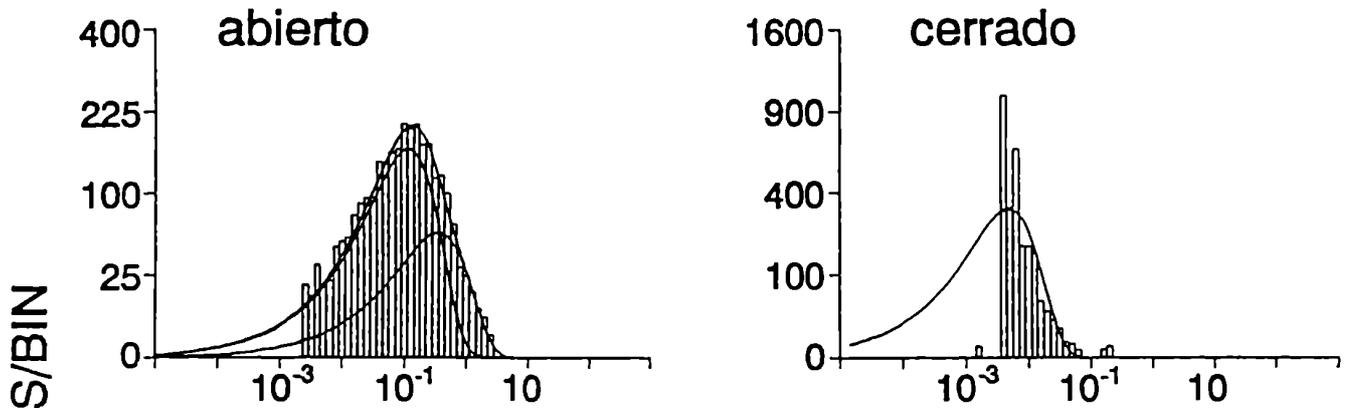


Fig. 17. Cinética del K_{Ca} luego de la inhibición por el U46619. La figura muestra los histogramas de los tiempos abiertos (izquierda) y cerrados (derecha) de un canal en ausencia (control) y en presencia del agonista U46619. Los eventos fueron agrupados en intervalos logarítmicos y graficados utilizando la raíz cuadrada de la ordenada. Las barras representan los datos experimentales, mientras que las líneas continuas representan el mejor ajuste. Las líneas punteadas representan las componentes individuales en los casos en que se ajustó más de una exponencial. Los picos corresponden a las constantes de tiempo (ver texto). El número de eventos fue de 14,805 y 18,967 para el control y el tratado respectivamente. $V_H = -40$ mV.

Control



U46619, 50 nM

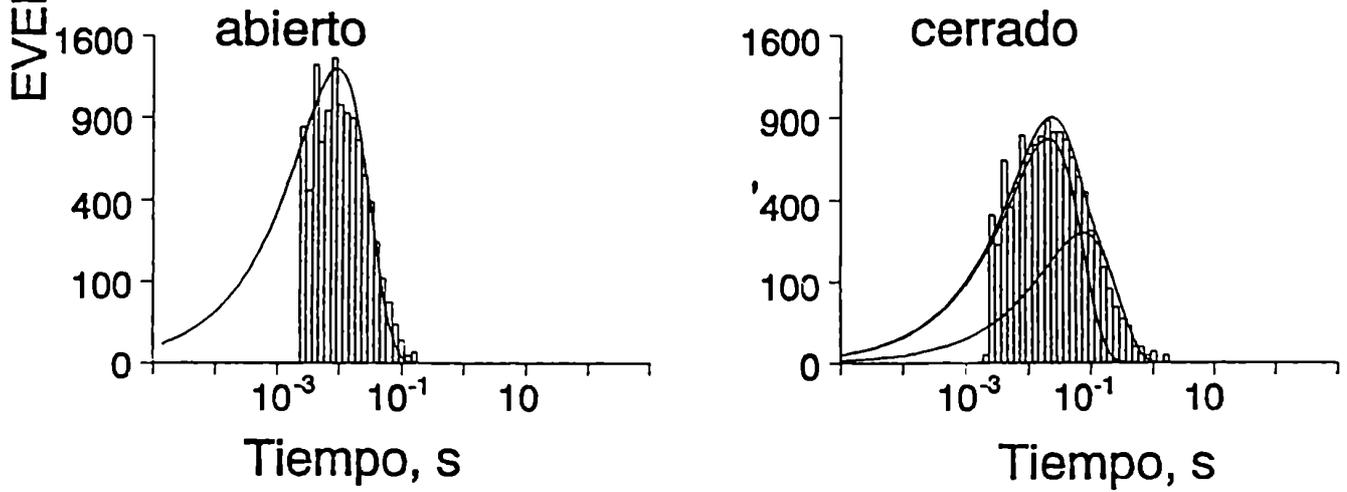


Fig. 18. Corrimiento de la curva de activación por voltaje por el tratamiento con el agonista U46619. El gráfico representa la P_o en función del voltaje aplicado en ausencia (círculos llenos) y en presencia (triángulos abiertos) del agonista U46619. Los datos experimentales fueron ajustados a una distribución de Boltzmann (lineas continuas), Los valores de $V_{1/2}$ y de k estan indicados en el texto. La parte inferior de la figura muestra registros representativos a dos diferentes potenciales, en ausencia y luego del agregado del agonista.

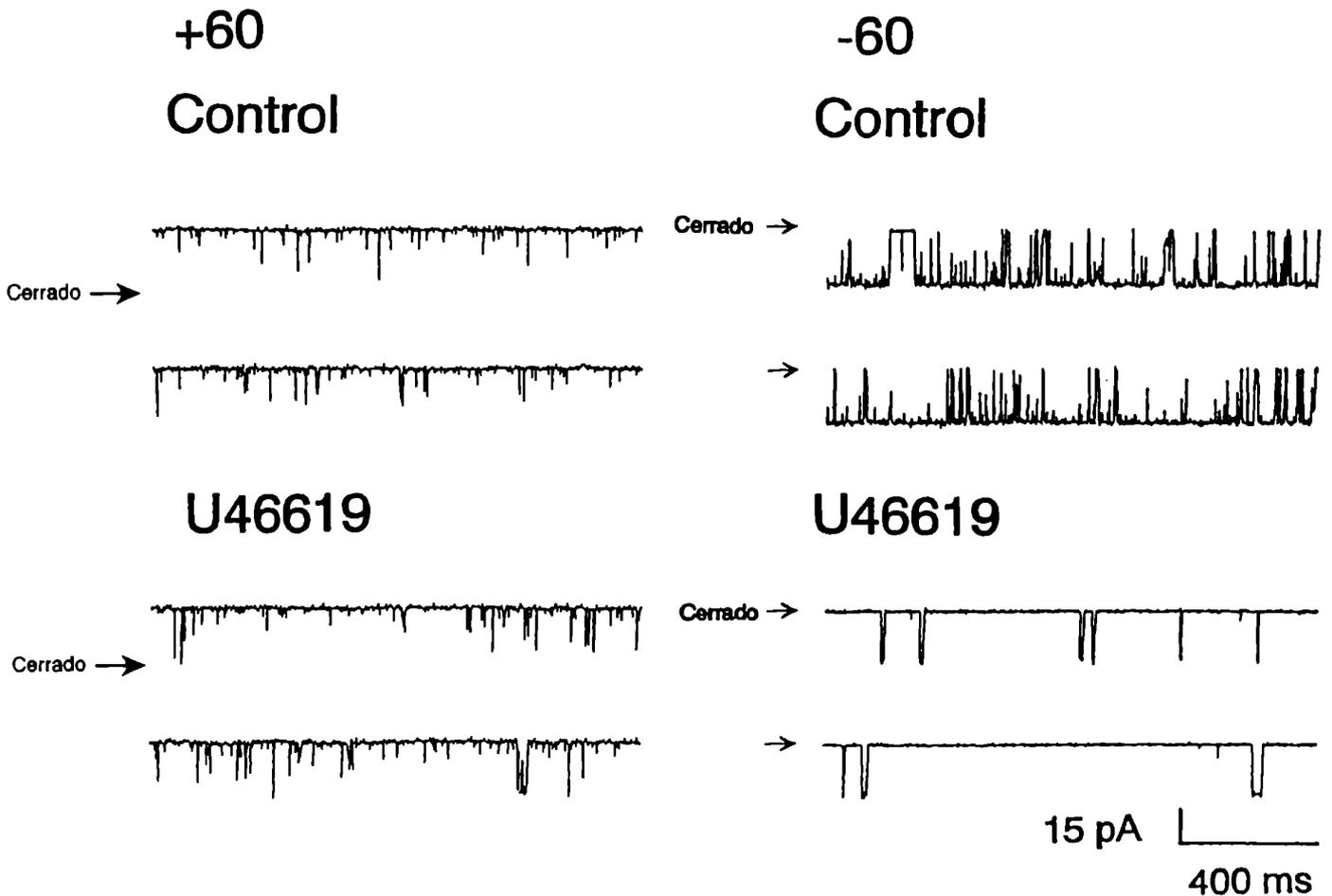
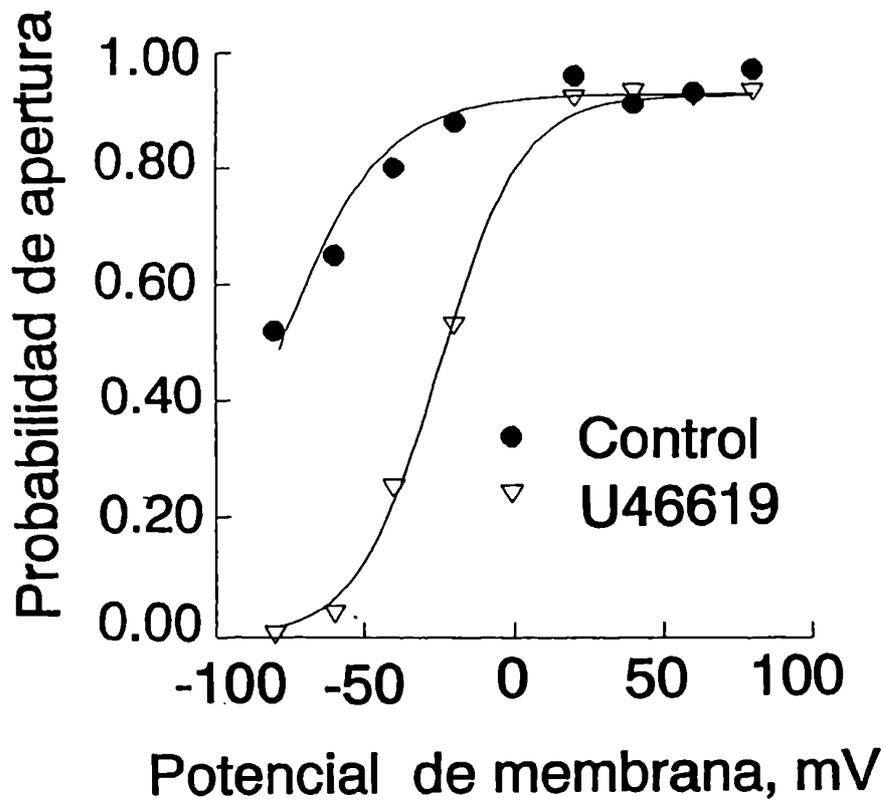


Fig. 19. Lateralidad de la acción del agonista del TxA₂ sobre los canales K_{Ca}. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control) (A) y luego del agregado de U46619 (100 nM) al lado interno (B) o externo del canal (C). Las P_o correspondientes fueron: 0.97 (control), 0.94 (U46619 interno) y 0.66 (U46619 externo). V_H = -40 mV.

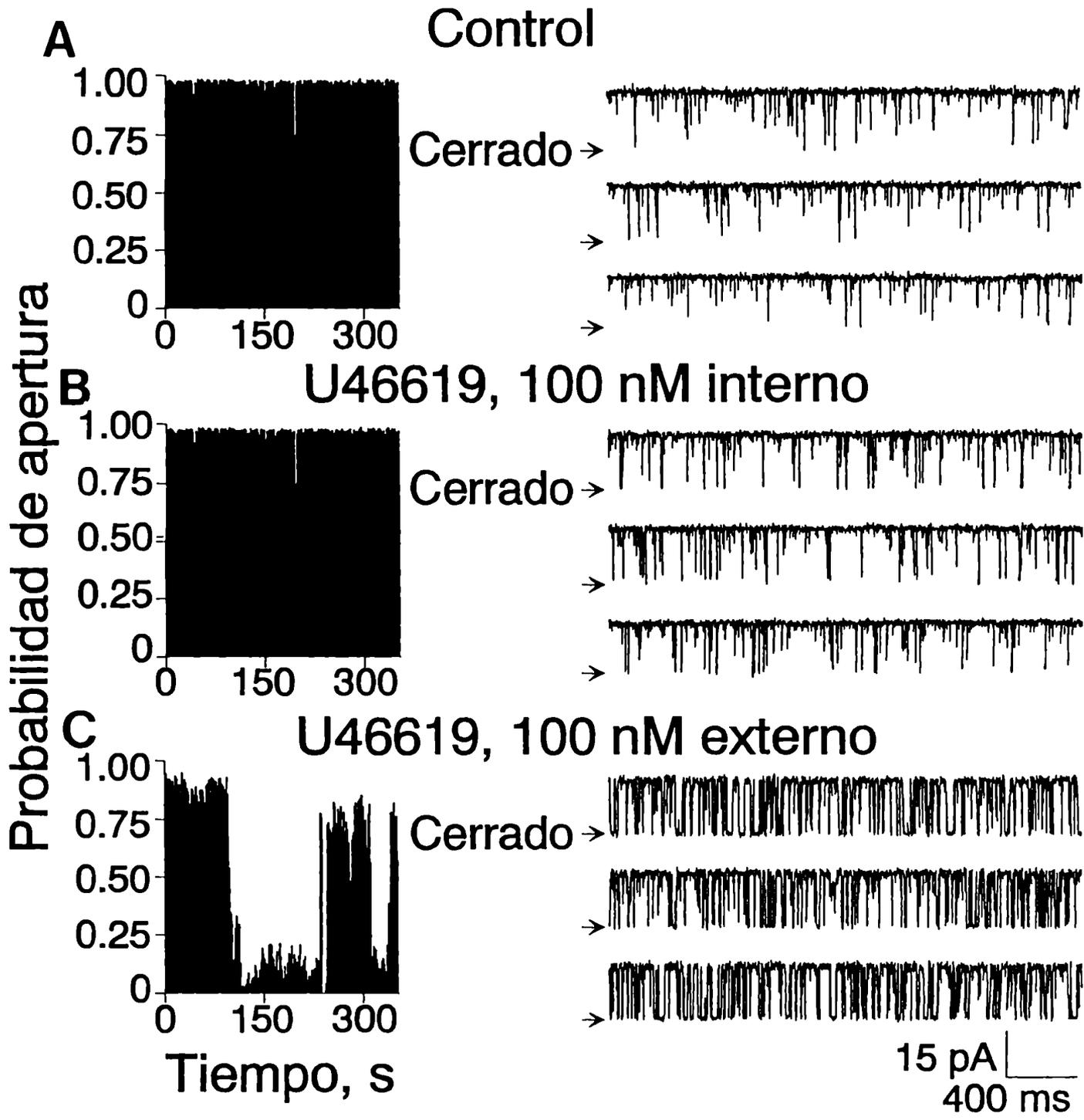


Fig. 20. Especificidad del efecto del agonista del TxA₂, U46619, sobre el canal K_{Ca}.
La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en condiciones control (A) y luego del agregado de del metabolito inactivo del TxA₂, TxB₂ (B), o del U46619 (C) al lado externo del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.95 (control), 0.95 (TxB₂, 1 μM) y 0.26 (U46619 100 nM). V_H = -40 mV.

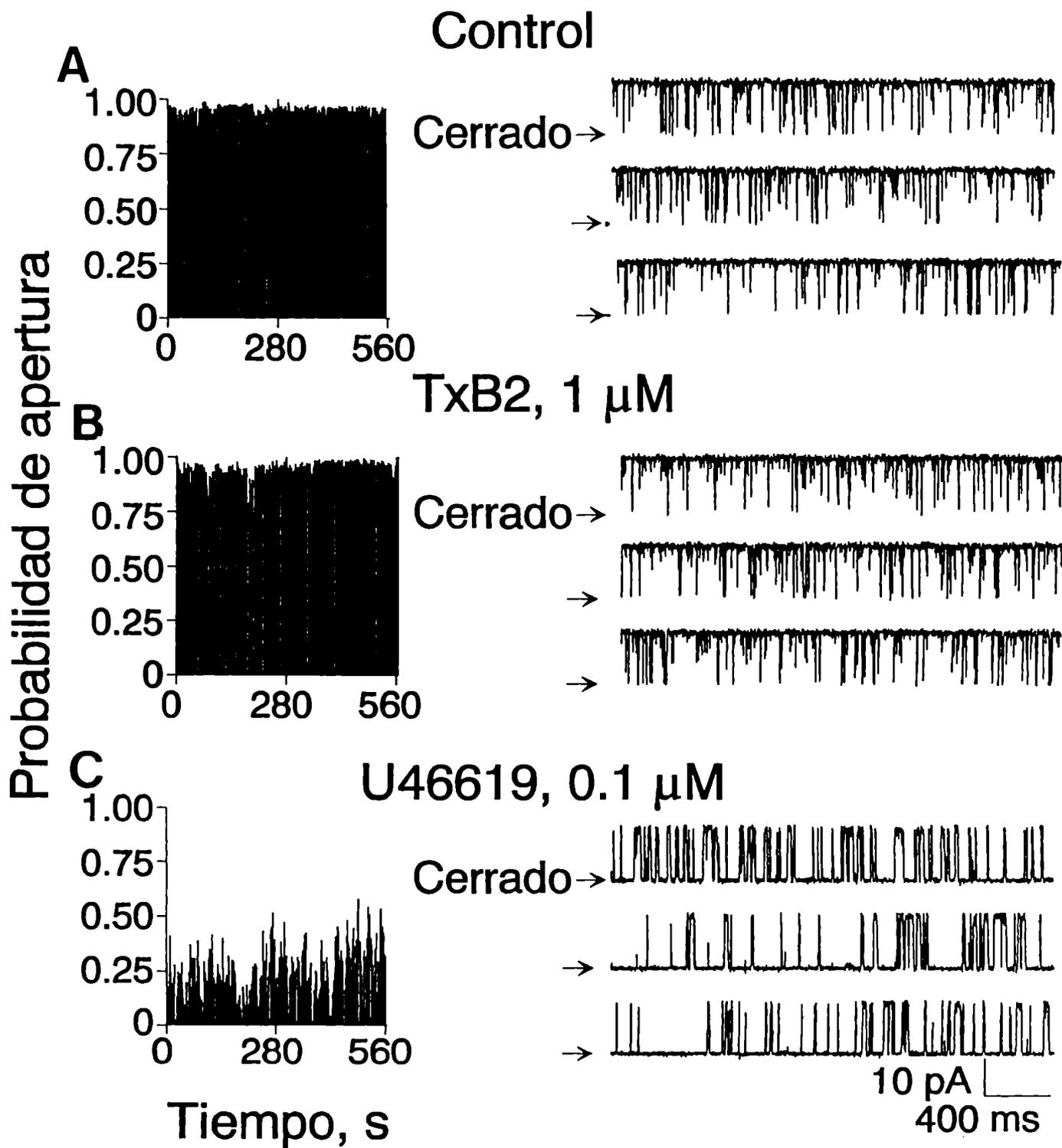


Fig. 21. El antagonista del TxA₂, SQ29,549, previene la inhibición causada por el agonista U46619. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (A) y en presencia del SQ29,548 (0.4 μM) (B) y luego del subsiguiente agregado del agonista U46619 (0.75 μM) (C) al lado externo del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.93 (control), 0.93 (SQ29,548) y 0.94 (U46619). El potencial de membrana (V_H) fue -40 mV.

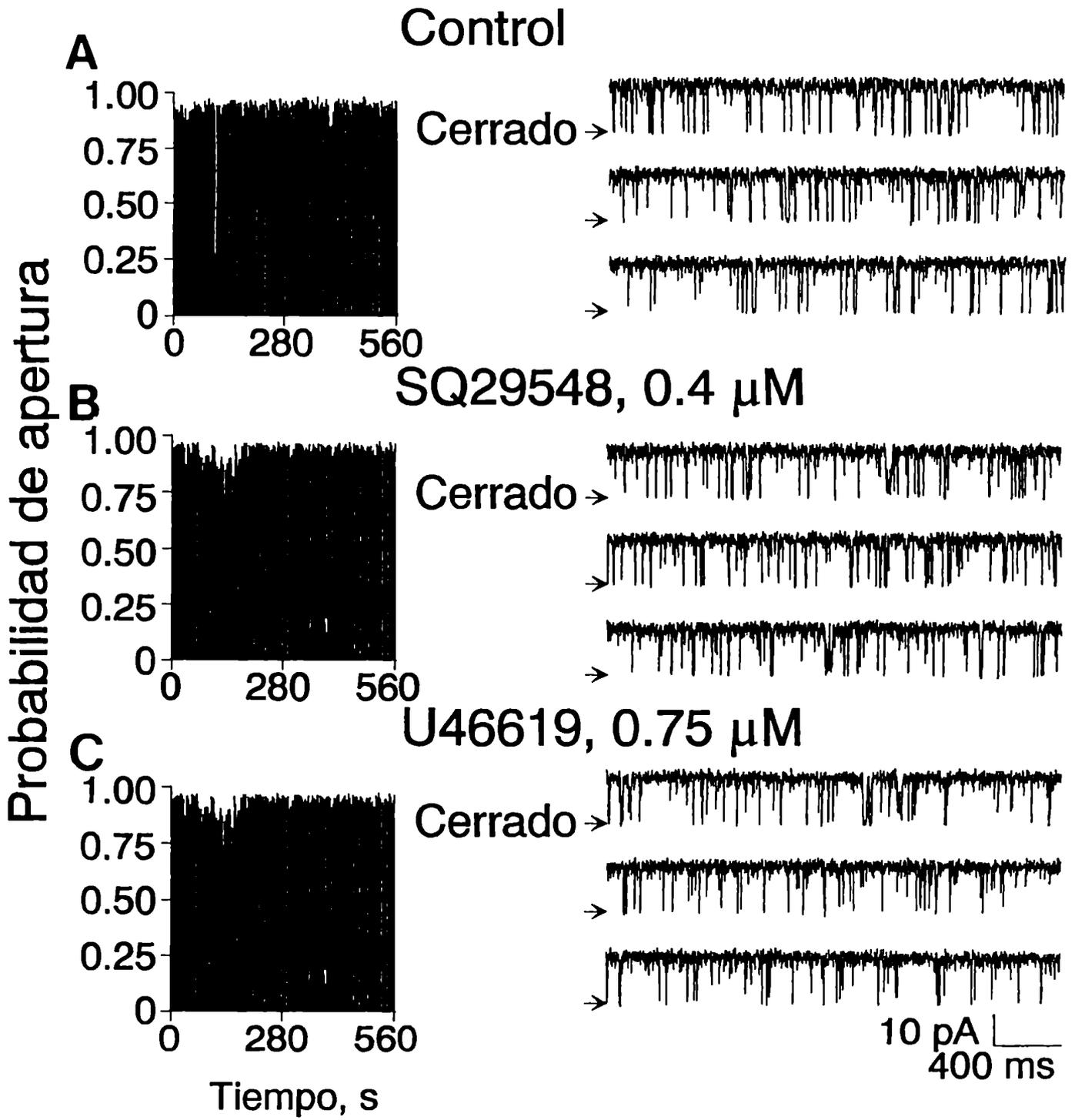
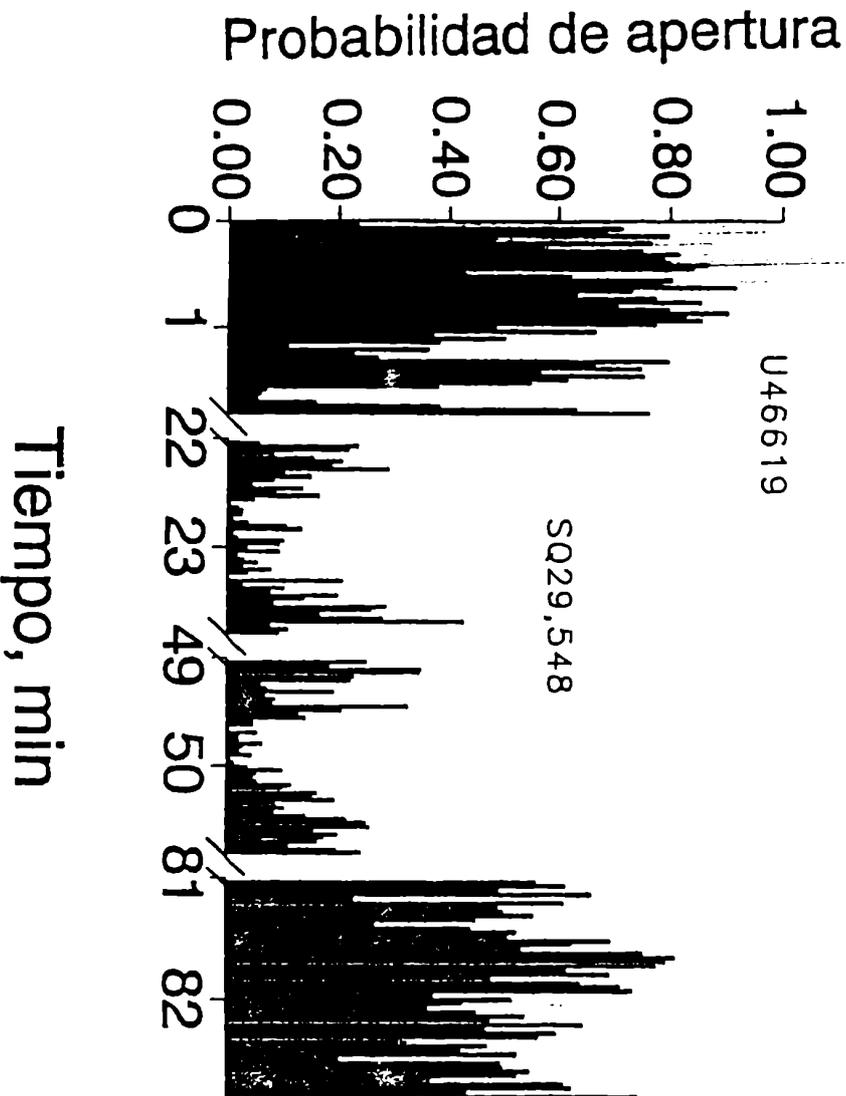


Fig 22. Recuperación de la actividad del canal K_{Ca} inhibido por el agonista U46619, por la acción del antagonista SQ29,548. El gráfico a la izquierda representa el curso temporal de la probabilidad de apertura del canal K_{Ca} en condiciones control, y luego del subsiguiente agregado del agonista U46619 (primera flecha, a $t= 2$ min) y del antagonista SQ29,548 (segunda flecha, $t= 24$ min). La reversión del efecto inhibitorio del U46619 por el antagonista se comenzó a observar recién después de una hora de incubación con el mismo. Las P_o correspondientes fueron: 0.6 (control), 0.1 (U46619) y 0.54 (SQ29,548). A la derecha se muestran registros correspondientes al mismo canal. $V_H = -20$ mV.



Control



U46619, 100 nM



SQ29,548, 1 μ M



10 pA

600 ms

Fig. 23. Recuperación del canal K_{Ca} inhibido por el agonista U46619, por el agregado de calcio interno. La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control, pCa 5.6) (A); luego del agregado de U46619 al lado externo del canal (pCa 5.6) (B), y luego del agregado de calcio (pCa 4.5) al lado interno del canal (C). Las P_o correspondientes fueron: 0.84 (control), 0.29 (U46619) y 0.83 (pCa 4.5). $V_H = -20$ mV.

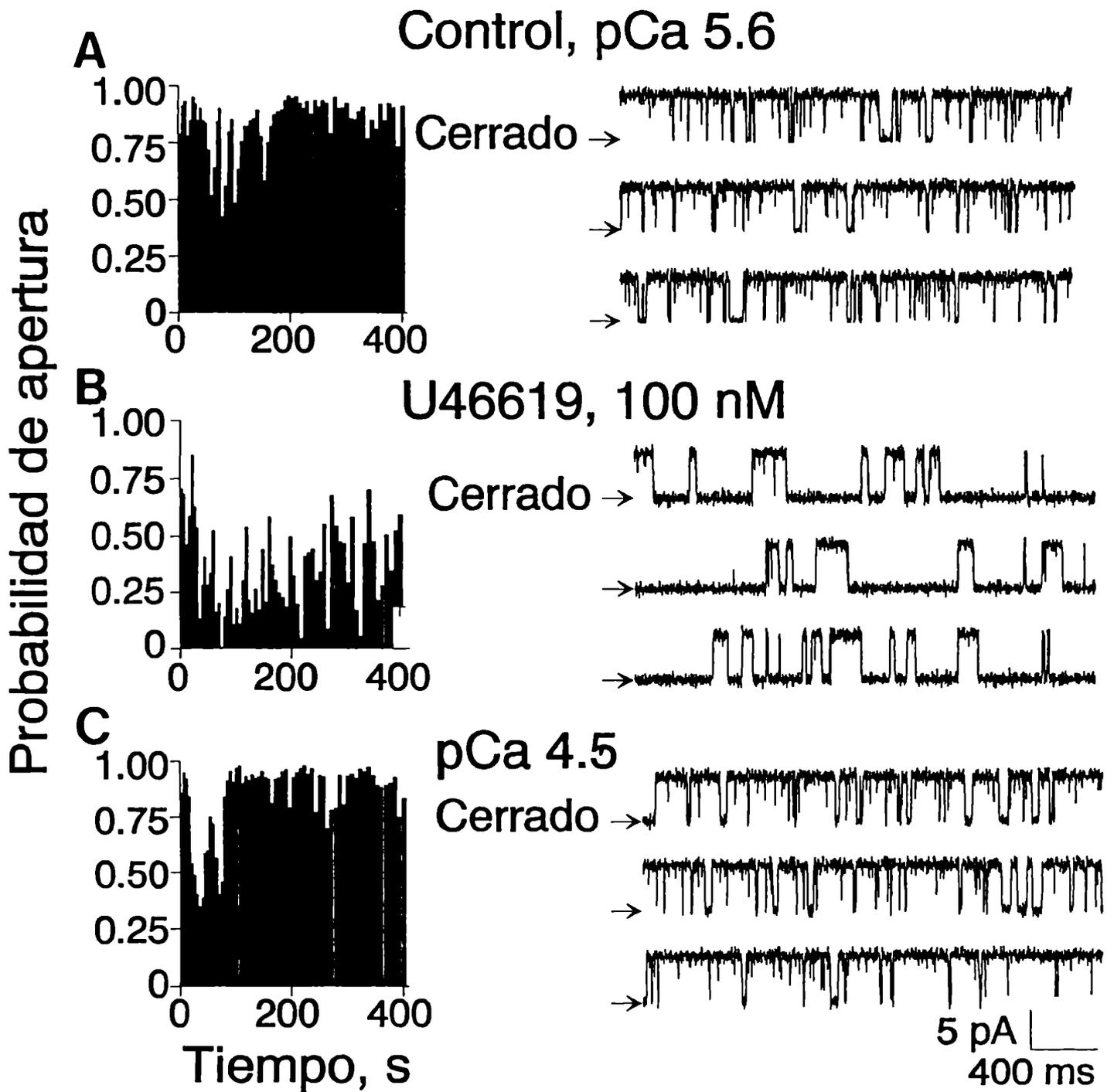
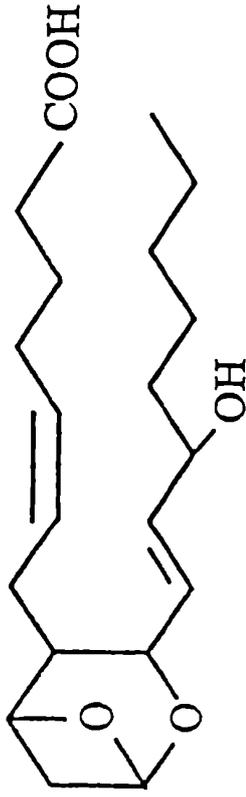
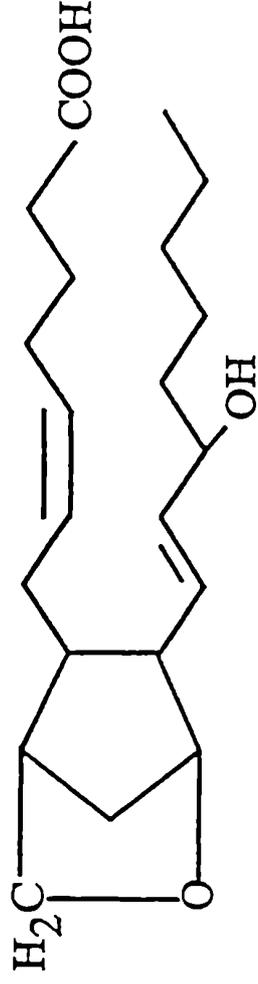


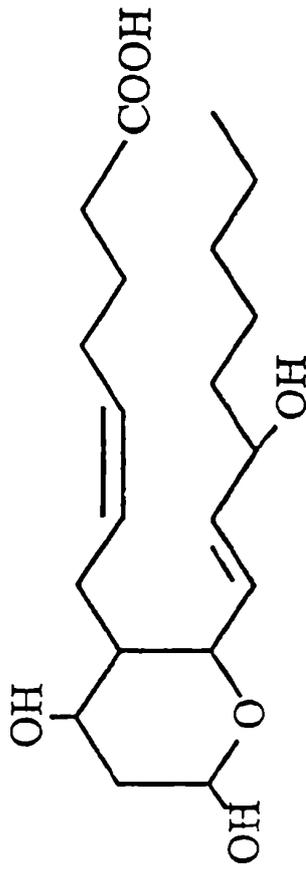
Fig. 24. Estructura química del TxA₂ y de compuestos asociados. Estructura química del TxA₂, TxB₂, el análogo del TxA₂, U46619, y del antagonista del TxA₂ SQ29,548.



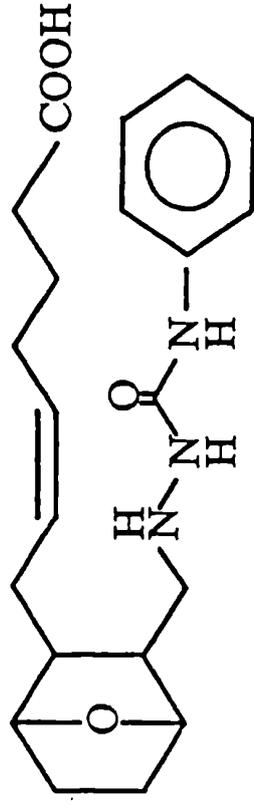
Tromboxano A2
TxA2



U46619



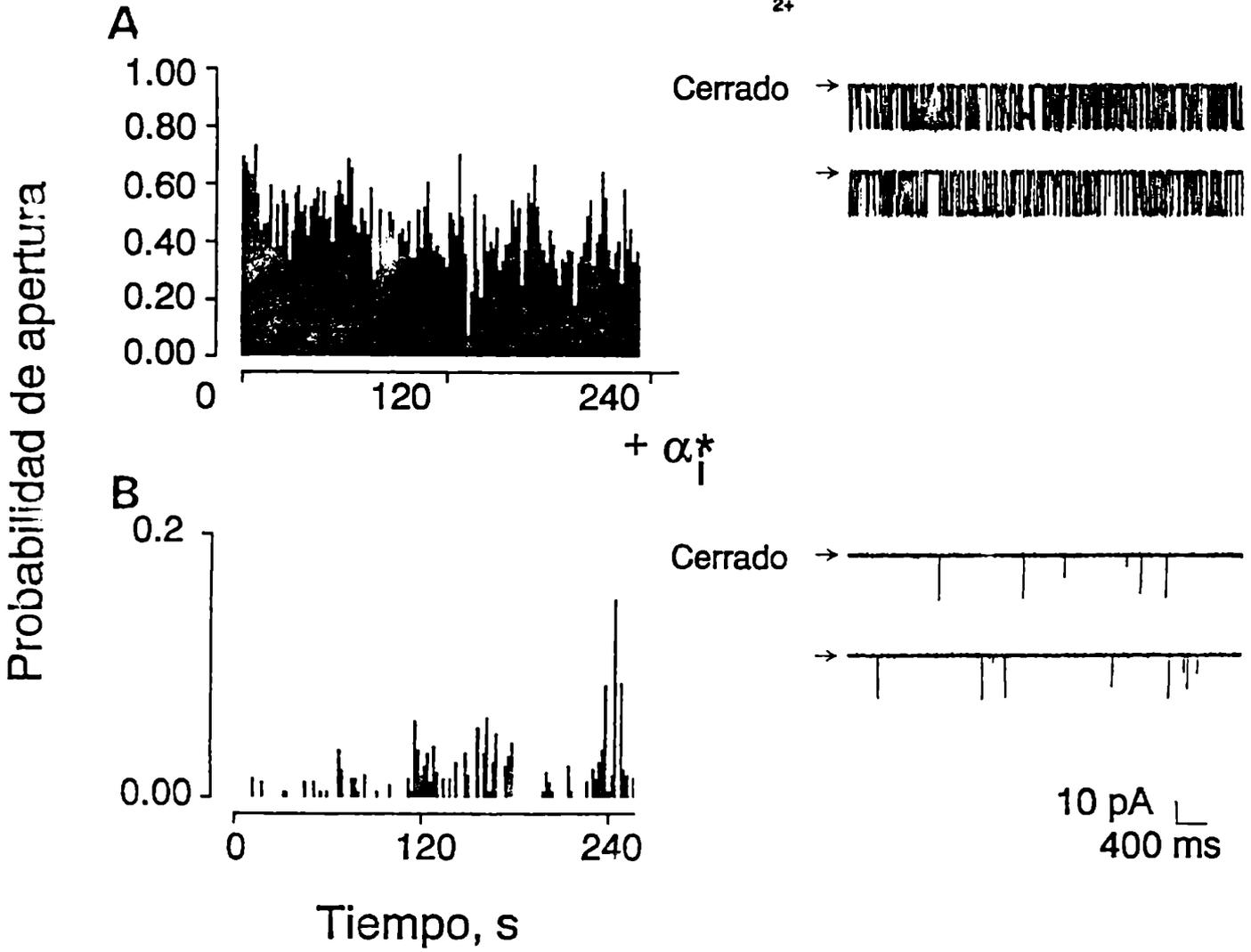
Tromboxano B2
TxB2



SQ29,548

Fig. 25. La subunidad α de la proteína G_{i3} inhibe a los canales K_{Ca} . La figura muestra el curso temporal de la probabilidad de apertura (P_o) del canal K_{Ca} (izquierda) y los registros correspondientes (derecha) en ausencia (control, Mg^{2+}) (A) y en presencia de α_{i3}^* (300 pM) (B) agregada al lado interno del canal. Las P_o correspondientes fueron: 0.35 (control) y 0.02 (α_{i3}^*). $V_H = -40$ mV.

Control + Mg₂₊



Agradecimientos: Quiero agradecer a:

mi director de Tesis, el Dr. Enrico Stefani por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y por brindarme todo su apoyo en la realización del mismo,

mi consejero de estudios, Dr. Leonardo Nicola Siri, por su apoyo constante, aún a larga distancia,

la Dra. Ligia Toro y el Dr. Lutz Birnbaumer, con quienes tuve la suerte de poder trabajar, por las interminables horas de discusión y por enseñarme a leer mis propios trabajos,

el Dr. Juan Codina, que tan gentilmente me facilitó material imprescindible para los experimentos con proteínas G,

la Dra. Maria Garcia, por facilitarme la preparación del canal purificado de tráquea,

mis compañeros de laboratorio, por haber estado siempre que los necesité,

el Dr. Rafael Mejía-Alvarez, por su ayuda en la elaboración de la sección de "Materiales y Métodos",

el Lic. Guillermo J. Perez, por su lectura crítica y minuciosa del manuscrito,

Claudia Scornik, por su ayuda en la compaginación gráfica,

y la Lic. Sonia Scornik, por su ayuda en el tipeado del manuscrito.

Quiero agradecer nuevamente a la Dra. Ligia Toro, por todas las horas de trabajo compartidas.

Bibliografia

- Alvarez, O. How to set up a bilayer system. In : *Ion Channel reconstitution*, Miller, C. ed. pp 115-130. Plenum Press, NY, 1986.
- Anwer, K., Oberti, C., Pérez, G. J., Pérez-Reyes, E., McDougall, J. K., Monga, M., Sanborn, B. M., Stefani, E. and Toro, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am. J. Physiol.* En prensa.
- Apperly, E., Feniuk, W., Humphrey, P. P., Levy, G. P., Evidence for two types of excitatory receptor for 5 hydroxytryptamine in dog isolated vasculature. *Br J Pharmacol.* 1980; 68:215-224
- Atkinson, N. S., Robertson, G. A. & Ganetzki, B. A component of calcium activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* 1991; 253: 551-555,
- Baron, G. D., Speden, R. N., Bohr, D. F. :Beta adrenergic receptors in coronary and skeletal muscle arteries. *Am J Physiol* 1972; 223: 878-881
- Berne R: The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Cardiovas. Res.* 1980; 47:807-813
- Bian, K. and Toda, N. Vasodilator actions of flunarizine in Isolated dog cerebral and extracerebral arteries. *Japan J. Pharmacol.* 1989,49:83-94.
- Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Yatani, A., Scherer, N., Toro, M. & Brown, A. M. Signal transduction by G proteins. *Kidney Int.* 1987, 32:514-537.
- Birnbaumer, L. G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 675-705, 1990.
- Bkaily, G., Peyrow, M., Sculptoreano, A., Jacques, D., Chahine, M., Regoli, D. & Sprrelakis, N. Angiotensin II increases I_{Si} and blocks I_k in single aortic cells of rabbit. *Plügers Arch.* 1988, 412:448-450.
- Bouvier M., Guilbault N., Bonin H., :Phorbol-ester-induced phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor decreases its coupling to Gs. *Febs Letters.* 1991; 279:243-248
- Bourne, H., Sanders, D., & MacCormick, F.: The GTPase superfamily :a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* ;1990; 348:125-132
- Brayden, J. E. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium dependent cerebral vasodilation. *Am. J. Physiol.* 1990, 259: H668-673.

Brayden, J. E. and Nelson, M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992, 257: 532-535.

Brazenor, R. M. & Angus J. A.: Ergometrine contracts isolated canine coronary arteries by a serotonergic mechanism: no role for alpha adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218:530-576

Brazenor, E. M. & Angus, J. A. Actions of serotonin antagonist on dogs coronary artery. *Eur J Pharmacol* 1982; 81:569-576

Brown, A. M. & Birnbaumer, L: Direct G protein gating of ion channels. *Am J Physiol* 1988, 254:H401-H410

Brown, A. M. & Birnbaumer, L Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu. Rev. Physiol.* 1990, 52: 197-213

Brown, A. M. A cellular logic for G protein coupled ion channel pathways. *Faseb J.* 1991, 5:2175-2179

Brown, A. M. Membrane delimited cell signaling complexes: direct ion channel regulation by G proteins. *J Membrane Biology* 1993;131:93-104

Brum, J. M., Sufan, Q., Lane, G. & Bove, A.: Increased vasoconstrictor activity of proximal coronary arteries with endothelial damage in intact dogs. *Circulation* 1984, 70:1066-1073

Candia, S., Garcia, M. L. & Latorre, R. Mode of action of iberiotoxin a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Biophys J.* 1992

Carl, A., McHale N. G., Publicover N. G. & Sanders K. M.: Participation of Ca^{2+} activated K^{+} channels in electrical activity of canine gastric smooth muscle. *J. Physiol Lond.* 1990, 429: 205-221

Carl, A., Kenyon, J. L., Uemura, D., Fusetani, N. & Sanders, K. M. Regulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels by protein kinase A and phosphatase inhibitors. *Am. J. Physiol.* 1991, 261:C387-392.

Cassel, D. & Selinger, Z.: Catecholamine stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 1976, 452: 538-551

Cassel, D., & Selinger, Z.: Mechanism of adenylate activation through beta-adrenergic receptors; Catecholamine induced displacement of bound GDP. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 1978, 75:2669-2663

- Cassel, D. & Selinger, Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1977, 74: 3307-3311
- Castle, N. A., Haylett, D. G. & Jenkinson, D. H. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends in Neurosc.* 1989, 12: 59-65
- Chand, N. & Altura, B. M. Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cell: role in lung vascular diseases. *Science* 1981, 213: 1376-1379
- Chen, G., Suzuki, H. & Weston, A. H. Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 1988, 95:1165-1174.
- Chung, S., Reinhart, P. H., Martin, B. L., Brautigan, D., & Levitan, I. B. Protein kinase activity closely associated with a reconstituted calcium-activated potassium channel. *Science*, 1991, 253: 560-562
- Christensen, O., & Zeuthen, T. Maxi K⁺ channels in leaky epithelia are regulated by intracellular Ca²⁺, pH and membrane potential. *Plügers Archiv.* 408: 249-259, 1987
- Codina, J., Rosenthal, W., Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D. and Birnbaumer, L.. Updated protocols and comments on the purification without use of activating ligands of the coupling proteins Ns and Ni of the hormone sensitive adenylyl cyclase. *J. Receptor Res.* 4: 411-442, 1984.
- Codina, J., Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D., Birnbaumer, M., Bryan, J., Manclark, Ch., Iyengar, R. & Birnbaumer, L. Ns and Ni, the stimulatory and inhibitory regulatory component of adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 1984, 259:5871-5886
- Cocks, T. M. & Angus, J. A: Endothelium dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 1983, 305:627-630
- Cook, D. I. & Young, J. A. Epithelial secretion of water and electrolytes. In: Young Wong (eds). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp 15-38; 1990
- Cook, D. L., Ikeuchi, M., & Fujimoto, W. Y. Lowering of pH inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channels in pancreatic β cells. *Plügers Archiv.* 1984, 391:85-100.
- Cohen, M. V. & Kirk, E. S. Differential response of large and small coronary arteries to nitroglycerin and angiotensin *Circ Res* 1973, 33:445-453
- Cohen, R. A., Shepherd, J. T. & Vanhoutte, P. M.: Inhibitory role of endothelium in the

reponse of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983, 221:273-274

Cohen, R. A., Shepherd, J. T. & Vanhoutte, P. M. 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependant relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* 1983, 245:H1077-H1080

Cole W. C. and Sanders K M :Characterization of macroscopic outward currents of canine colonic myocytes. *Am J Physiol* 1989, 257:C461-C469

Cole, W. C. & Sanders, K. M., G proteins mediate suppression of Ca^{2+} -activated K^+ current by acetylcholine in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1989,257:C596-C600

Colquhoun, D. & Sigworth, F. J., Fitting and statistical analysis of single channel records. in *Single Channel Recording* . Sakmann, B. & Neher, E Ed., pp. 191-263. New York, Plenum Press.1983,

Cote, T. E., Grewe, C. W. & Kebakian, J. W. Guanyl nucleotides participate in the beta-adrenergic stimulation of adenylate cyclase activity in the intermediate lobe of the rat pituitary gland. *Endocrinology*. 1982, 110:805-811

Curry, R. C., Pepine, C.J., Saboom, M. B. & Conti, C. R. Similarities of ergonovine induced and spontaneous attacks of variant angina. *Circulation* 1979, 59:307-312

Cushing, D. J. & Cohen, M. L. Serotonin induced contraction in porcine coronary artery: use of ergolines to support vascular 5-hydroxytryptamine₂-receptor heterogeneity. *J Pharmacol Exp Ther*.1993, 264:193-200

De Mey, J. G. & Vanhoutte, P. M. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol (Lond)* 1981, 316:347-355

De Mey, J. G., Claeys, M. & Vanhoutte, P. M. Endothelium dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1982, 222: 166-173

Denn, M. J. & Stone, H. L.: Autonomic innervation of dog coronary arteries. *J Appl Physiol* 1976, 41:30-35

De Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans J. P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D. & Vane, J. R. Pressor effects of circulating endothelium are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85:9797-9800

- Desilets, M., Driska, S. P. & Baumgarten, C. M. Current fluctuations and oscillations in smooth muscle cells from hog carotid artery. *Circ. Res.* 1989, 65:708-722.
- Dolezel, S., Gerova, M., Gero, J., Sladek, T. & Vasku, J. Adrenergic innervation of the coronary arteries and the myocardium. *Acta Anat.* 1978, 100:306-316.
- Dolezel, S., Gerova, M., Hatmannova, B., Dostal, M., Janeckova, H. & Vasku, J.: Cardiac adrenergic innervation after instrumentation of the coronary artery in dog. *Am J. Physiol* 1984, 246:H459-H465
- Detar, R.: Mechanism of physiological hypoxia induced depression of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1980, 238:H761-H769
- Dusting, G. J. & Angus, J. A: Interaction of epoprostenol (PGI₂) with vasoconstrictors on diameter of large coronary arteries of the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984, 6:20-27
- Endo, M., Hirose, K., Kaneko, N., Hase, K., Inoue, Y. & Konno, S. Prinzmetal's variant angina-Coronary arteriogram and left ventriculogram during angina attack induced by methacholine. *N Engl J Med* 1976, 294:252-255
- Fabiato, A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Meth. Enzymol.* 1988, 157:378-417.
- Fam, W. M. & McGregor, M Effect of coronary vasodilator drugs on retrograde flow in areas of chronic myocardial ischemia. *Circ Res* 1964, 15:355-365
- Fan, S., Wang, S. & Kao, C. Y. The Transduction system in the isoproterenol activation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in Guinea Pig taenia coli myocytes. *J.Gen. Physiol.* 1993, 102:257-275
- Farley, J. & Rudy, B. Multiple types of voltage dependent Ca²⁺-activated K⁺ channels of large conductance in rat brain synaptosomal membranes. *Biophys. J.* 1988, 53: 919-934.
- Feigl, E. O. Coronary physiology. *Physiol Rev* 1983, 63:1-205
- Foley, D. H.; Amsterdam, E. A. & Mason, D. T: Intertactions of vasoactive effects of adenosine and potassium ion on isolated feline coronary artery smooth muscle. *Circ Res* 1979, 44: 207-21
- Folta, A., Joshua, I. G. & Webb, R. C. Dilator actions of endothelin in coronary resistance vessels and the abdominal aorta of the guinea pig. *Life Sci.* 1989, 45:2627-2635.

- Fujino, K., Nakaya, S., Wakatsuki, T., Miyoshi, Y. & Nacaya, Y: Effects of nitroglycerin on ATP induced Ca^{++} -mobilization, Ca^{++} -activated K channels and contraction of cultured smooth. muscle cells of porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 256:371-377
- Fung, B. K., Hurley, J. B., & Styer, L. Flow of information in the light triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78:152-156
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288:373-376.
- Furchgott, R. F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983;53: 557-573
- Garcia Calvo, M., Knaus, H. G., McManus, O. Giangiacomo, K. M., Kaczorowski, G & Garcia, M. L. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1993, en prensa.
- Garland, C. J. & McPherson, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1992, 429-435.
- Gill, D. M. & Meren, R. ADP ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 1978, 75:3050-3054
- Godchaux, W., & Zimmerman, W. Membrane dependent guanine nucleotide binding and GTPase activating of soluble protein from bovine rod cell outer segments. *J. Biol Chem.* 1979, 254:7874-7884
- Goto, K., Kasuya, Y., Matsuki, N., Takuwa, Y., Kurihara, H., Ishikawa, T., Kimura, S., Yanagisawa, M., & Masaki, T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:3915-3918.
- Gray, M. A., Grenwell, J. R., Garton, A. J., & Argent, B. E. Regulation of maxi- K^+ channels on pancreatic duct cells by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J. Membr. Bio.*, 1990, 115:203-215.
- Griendling, K. K., Tsuda, T., Berk, B. C. and Alexander, R. W. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989, 14 suppl. 6:S27-33.
- Hadcock J. R., Ros, M., Watkins & Malbon, C. C. Cross regulation between G protein mediated pathways: stimulation of adenyl cyclase increases expression of the inhibitory G protein G_i . *J Biol. Chem.* 1990, 265:14784-14790

Hamilton, S., Mejia Alvarez, R. Fill, M. Hawkes, M.J. Brush, K.L. Schilling W.P. and Stefani, E. [³H]PN200-110 and [³H]Ryanodine binding and reconstitution of ion channel activity with skeletal muscle membranes. *Analyt. Biochem.* 1989, 183:31-41.

Hanke, W. Incorporation of ion channel by fusion. In : *Ion Channel reconstitution*, Miller, C. ed. pp 141-153. Plenum Press, NY, 1986.

Henry, P. D. Comparative pharmacology of calcium antagonist: nifedipine, verapamil and diltiazem. *Am J Cardiol* 1980, 46:1047-1058

Herlihy, J. T., Bockman, E. L., Berne, R. M. & Rubio, R. Adenosine relaxation of isolated vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1976, 230:1239-1243

Hescheler, J., Tang, M., Jastorff, B. & Trautwein, W. On the mechanism of histamine induced enhancement of the cardiac Ca²⁺ current. *Pflügers Arch.* 1987, 410:23-29

Hintze, T. H., Vatner, S. F. Purinergic control of large coronary arteries in the conscious dog. *Bibliotheca Cardiol* 1984, 38:189-199

Hintze, T. H. & Vatner, S. F. Reactive dilation of large coronary arteries in conscious dog. *Circ Res.* 1984, 54:50-57

Holtz, J., Fosterman, U., Phol, U., Giesler, M. & Bassenge, E. Flow dependent, endothelium mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984, 6:1161-1169

Holtz, J., Busse, R. & Giesler, M. Flow dependant dilation of canine epicardial coronary arteries in vivo and in vitro: Mediated by the endothelium. (abstract) *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1983, 322:R44

Honda, K., Satake, T., Takagi, K and Tomita, T. Effects of relaxants on electrical and mechanical activities in the guinea-pig tracheal muscle. *Br. J. Pharmac.* 87: 665-671, 1986.

Houston, D. S., Shepherd, J.T. & Vanhoutte, P. M. Adenine nucleotides, serotonin and endothelium dependent relaxations to platelets. *Am J Physiol* 1985, 248:H389-H395

Hu, S., Kim, H. S. & Jeng, A. Y. Dual action of endothelin-1 on the Ca²⁺-activated K⁺ channel in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Europ. J. Pharmac.* 1991, 194:31-36

Huang, A. H., Busse, R. & Bassenge, E. Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide).

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1988, 338:438-442.

Ignarro, L. J., Lippon, H., Edwards, J. C., Baricos, W. H., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J., & Gruetter C. A.: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1981, 218:739-749

Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. * Wood, K. S. Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possess pharmacologic and chemical propeties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 1987, 61:866-879

Ito, Y., Kitamura, K. and Kuriyama, H. Effects of acetylcholine and catecholamines on the smooth muscle cell of the porcine coronary artery. *J. Physiol.* 294: 595-611, 1979.

Ito, H., Tung, R. T., Sugimoto, T., Kobayashi, I., Takahashi, K., Katada, T., Ui, M. & Kurachi, Y. On the mechanisme of G protein BG subunit activation of the muscarine K⁺ channel in Guinea pig atrial cell membrane. *J Gen. Physiol.* 1992,99:961-983

Iyengar, R. & Birnbaumer, L. Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylyl cyclase by reducing its requirement for Mg²⁺ and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982, 79:5179-5183

Janoff, A. S. & Miller, K. W. in *Biological membranes*, Chapman, D., ed. 4:417-476, Academic, New York. 1982.

Jelsema, C. L. & Axelrod, J. Stimulation of phospholipase A₂ activity in bovine rod outer segments by the α subunit of transducin and inhibition by the $\beta\gamma$ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84:3623-3627

Kalsner, S. Endogenous prostaglandin release contributes directly to coronary artery tone. *Can J Phisiol Pharmacol* 1975, 53:560-565

Katz, G., Roy-Contancin, L., Bale, T. & Reuben, J. P. arachidonic, linolec, and other unsaturated fatty acids enhance K⁺ and depress Na⁺ and Ca²⁺ channel activity. *Biophys. J.* 1990, 57:506a.

Kelly, K. O. & Feigl, E. O. Segmental a receptor mediated vasoconstriction in the canine coronary circulation. *Circ Res* 1978,43:908-917.

Kim, D., Lewis, D. L. Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D. and Clapham D.E. G protein $\beta\gamma$ -subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A₂. *Nature.* 1989, 337:557-560.

Kimori, K., Lorenz, R. R. & Vanhoutte, P. M. Nitric oxide, ACh, and lectrical and



mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1988, 255:H207-212

Kirber, M. T., Ordway, R. W., Clapp, L. H., Walsh Jr., J. B. and Singer, J. J. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 1992, 297: 24-28.

Kitamura, K. & Kuriyama, H. Effects of acetylcholine on the smooth muscle cell of isolated main coronary artery of the guinea pig. *J. Physiol (Lond)* 1979,293:119-133

Kobilka, B.: Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu.Rev. Neuroci.* 1992,15:87-114

Kodama, M., Kanaide, H., Abe, S., Hirano, K., Kai, H., & Nakamura, M. Endothelin-induced Ca^{2+} independent contraction of the porcine coronary artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 160:1302-1308.

Ku, D. D: Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science* 1982, 218:576-578

Kume, H., Takai, A., Tokuno, H. and Tomita, T. Regulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* 341: 152-154, 1989.

Kume, H. & Kotlikoff, M. I. Muscarinic inhibition of single K_{Ca} channels in smooth muscle cells by a pertussis sensitive G protein. *Am J Physiol* 1991, 261:C1204-C1209

Kume, H., Graziano, M. P. and Kotlikoff, M. I. Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89:11051-11055.

Kume, H., Takagi, K., Satake, T., Tokuno, H. & Tomita, T. Effects of intracellular pH on calcium-activated potassium channels in rabbit tracheal smooth muscle. *Journal of Physiology*. 1990; 424: 445-457

Lamping, K. C., Marcus, M. L. & Dole, W. P: Flow dependent inhibition of 5-hydroxytryptamine (5HT) constriction of large coronary arteries in vivo. (abstract) *Fed Proc* 1985, 44:1561

Lamping, K. G., Marcus, M. L. & Dole, W. P: Removal of the endothelium potentials canine large coronary arterie constrictor responses to 5-hydroxytryptamine in vivo. *Circ Res* 1985, 57:46-54

Latorre, R., Oberhauser, A. Labarca, P. and Alvarez, O. Varieties of calcium-activated

- potassium channels. *Annual Review of Physiology*. 1989 51: 385-399.
- Latorre, R., Vergara, C. & Hidalgo, C. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+} -dependent K^+ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*. 1982, 79:805-809.
- Laurido, C., Candia, S., Wolff, D. & Latorre, R. Proton modulation of a Ca^{2+} -activated K^+ channel from rat skeletal muscle incorporated into planar bilayers. *J.Gen. Physiol.* 1991; 98: 1025-1043
- Lincoln, T. M. & Cornwell, T. L. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 1991, 28:129-137.
- Logothetis D., Kurachi, E., Galper, J., Neer, E. & Clapham, D. E. The $\beta\gamma$ subunits of GTP binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature*. 1987, 325:321-326
- Lowry, O. H., Rosenbrought, N. J., Farr, D. L. & Randall, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193:265-275.
- Macho, P., Hintze, T. H. & Vatner, S. F. Effects of alpha adrenergic receptor blockade on coronary circulation in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 1982, 243: H94-98
- Manning, D., & Gilman, A.;The regulatory components of adenylate cyclase and transducin. A family of structurally homologous guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 1983, 258:7059-7063
- Matsumoto, T., Kinoshita, M & Toda, N. Mechanisms of endothelium responses to vasoactive agents in isolated porcine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993, 21:228-234.
- Mehta J. & Metha, P: Role of blood platelets and prostaglandins in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1981, 48:366-373
- Miller, C & Racker, E. Calcium induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. *Journal of Membrane Biology*. 1976, 30:283-300.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. & Phillips, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*, 1985, 313:316-318.
- Miller, V. M. Selective production of endothelium-derived nitric oxide in canine femoral veins. *Am J. Physiol*, 1991, 261: H677-682

Minami, K., Fukuzawa, K. & Nakaya, Y. Protein kinase C inhibits the Ca^{2+} -activated K^+ channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1993, 190:263-266

Moczyłowski, E. Single channel enzymology. In : *Ion Channel reconstitution*, Miller, C. ed. pp 75-113. Plenum Press, NY, 1986.

Molleman, A., Hoiting, B., Duin, M., van den Akker, J., Nelemans, A., and Den Hertog, A. *J Biol Chem* 1991, 266, 5658-5663.

Moncada, S. & Vane, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides thromboxane A_2 , and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1978, 30:293-331

Moss, J. & Vaughan, M. Cholera toxin and E. coli enterotoxin and their mechanism of actions. In *Handbook of Natural Toxins. Vol 4. Bacterial Toxins*. Hardegree, M. C. and Tu, A. T., eds. Marcel Dekker, Inc New York 39-87, 1988

Muller Schweinertzer, E., Sturmer, E.,: Investigations on the mode of action of ergotamine in the isolated femoral vein of the dog. *Br J Pharmacol* 1974, 51:441-446

Murad, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. Invest.* 1986, 78: 1-5.

Muraki, K., Imaizumi, Y & Watanabe, M. Ca-dependent K channels in smooth muscle cells permeabilized by β -escin recorded using the cell-attached patch clamp technique. *Pflügers Arch.* 1992, 420: 461-469.

Myers, P. R., Guerra Jr., R. & Harrison, D. G. Release of NO and EDRF from cultured bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1989, 256: H1030-H1037

Myers, P. R., Bannitt, P., Guerra, R. & Harrison D. G. Role of the endothelium in modulation of the acetylcholine vasoconstrictor response in porcine coronary microvessels. *Cardiovasc. Res.* 1991, 25: 129-137

Nacayama, K., Fleckenstein, A., Byon, Y. K. & Fleckenstein-Grun, G. Fundamental Physiology of coronary smooth musculature from extramural stem arteries of pigs and rabbits. *Eur J. Cardiol* 1978, 8:319-335

Northup, J., Sternweis, P., Smigel, L., Ross, E., & Gilman, A.: Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1980, 77:6516-6520

Northup, J. K., Smigel, M. D., Sternweis, P. C. and Gilman, A. G. The subunits of the stimulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45,000 dalton (α) subunit. *J. Biol. Chem.* 258: 11369-11376, 1983.

- Ohya, Y., & Sperelakis, N. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1991, 68:763-761
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature (Lond)*. 1987, 327:524-526
- Parrat, J. R. Effects of adrenergic activators and inhibitors on the coronary circulation, in : *Handbook of Experimental Pharmacology, Adrenergic Activators and Inhibitors*, 54: 735-822 Szekeres L, ed. Berlin, Springer-Verlag. 1980
- Pawlosky, J. R. & Chapnik, B. M. LTD4 and bradykinin evoke endothelium-dependent relaxation of the renal vein: dissimilar mechanisms. *Am J. Physiol.* 1991, 261:H88-95
- Pérez, G., Toro, L., & Stefani E. Protein kinase A (PKA) modulates calcium activated potassium channel (KCa) from human myometrium. *Biophys. J.* 1992, 61:a255
- Pérez, G., Stefani E. and Toro, L.. Dual hormonal regulation of PKA-dependent phosphorylation in K(Ca) channels from uterine smooth muscle. *Biophys. J.* 1993, 64: A386.
- Rapoport, R. M. Cyclic guanosine moniphosphate inhibition of contraction may be mediated trough inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ. Res.* 1986, 58:407-410.
- Reinhart, P. H., Chung, S., Martin, B. L., Brautigan, D. L. and Levitan, I. B. Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatase 2A. *J. Neurosci.* 1991, 11:1627-1635.
- Reid, J. V. O., Ito, B. R., Huang, A. H., Buffington, C. W. & Feigl, E. O. Parasympathetic control of transmural coronary blood flow in dogs. *Am J Physiol* 1985, 249:H337-H343
- Richard, V., Tanner, F. C., Tschudi, M., Luscher, T. F. Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin and clonidine in coronary arteries. *Am J, Physiol*, 1990, 259:H1433-H1439
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Phol, S. & Krans, H. The glucagon sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J.Biol. Chem.* 1971, 246:1877-1882
- Roberts, A. M., Messina, E. J. & Kaley, G. Prostacylin (PGI₂) Mediates hypoxic relaxation of bovine coronary arterials strips. *Prostaglandins* 1981, 21:555-569

- Ross, G.: Adrenergic responses of the coronary vessels. *Circ Res* 1976, 39:461-465
- Roth, S. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1979, 19:159-178
- Rubanyi, G., & Vanhoutte, P. M. Endothelium removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by β -adrenergic agonists and adenosine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985, 7:139
- Sadoshima, J-I., Akaike, N., Kanaide, H. and Nakamura, M. Cyclic AMP modulates Ca-activated K channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. *Am. J. Physiol.* 1988, 255: H754-H759.
- Sakai, K. Coronary vasoconstriction by locally administered acetylcholine, carbachol and bethanechol in isolated, donorperfused, rat heart. *Br J Pharmacol* 1980, 68:625-632
- Sakanashi, M. Araki, H. Yonemura, K. I. Indomethacin induced contractions of dog coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980, 2:657-665
- Schroeder, J. S., Bolen, J. L., Quint, R. A., Clark, D. A., Hayden, W. G., Higgins, C. B. & Wexler, L. Provocation of coronary spasm with ergovine maleate. New test results in 57 patients undergoing coronary arteriography. *Am J Cardiol* 1977, 40:487-491
- Seeman, P. *Pharmacol. Rev* 1982, 24: 583-655.
- Selke, F. W., Shafique, T. Schoen, F. J. & Weintraub R. M.. Impaired endothelium dependent coronary microvascular relaxation after cold potassium cardioplegia and reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surj.* 1993, 105:52-58.
- Shen, K. F. & Crain, S. M. Cholera toxin β subunit blocks effects of opioids on sensory neuron action potentials indicating that GMI ganglioside may regulate G linked opioid receptor functions. *Brain Research.* 1990, 531:1-7
- Shogakiuchi, Y., Kanaide, H. and Nakamura, M. Cytosolic calcium transients differ between porcine coronary arterial and aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ. Res.* 1991, 68: 818-826.
- Sibley, D. R. & Lefkowitz, J.: Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β adrenergic receptor coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature Lond:* 1985, 317:124-129
- Sikdar, S. K., Mc. Intosh, R. P. & Mason, W. T. Differential modulation of Ca^{2+} -activated K^+ channels in ovine pituitary gonadotrophs by GnRH, Ca^{2+} and cyclic AMP. *Brain Research*, 1989, 496:113-123.

Silberberg, S. D. & Van Breemen, C. An ATP, calcium and voltage sensitive potassium channel in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 172:517-522.

Simonds, W. F., Goldsmith P. K., Codina, J., Unson C. G., & Spiegel A., M. :G₁₂ mediates α_2 -adrenergic inhibition of adenylyl cyclase in platelet membranes: *in situ* identification with G α C-terminal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:7809-7813

Smith III, E. F., Lefer, A. M. and Nicolau, K. C. Mechanism of coronary vasoconstriction induced by carbocyclic Thromboxane A₂. *Am. J. Physiol.* 1981, 240:H493-497.

Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O. & Sternweis, P. C. :Regulation polyphosphoinositide specific phospholipase C activity by purified G_q. *Science* 1991, 251:804-807

Stadel, J. M. & Lefkowitz, R. J. Differential effects of cholera toxin on guanine nucleotide regulation of beta adrenergic agonist high affinity binding and adenylyl cyclase activation in frog erythrocyte membrane. *Journal of Cyclic Nucleotide Research.* 1981, 7: 363-374

Taniguchi, J., Furukawa, K. & Shigekawa, M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.*, 1993, 423:167-172.

Tare, M., Parkington, H. C., Coleman, H. A., Neild, T. O., & Dusting, G. J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature.* 1990, 346:69-71

Tas, P. W. L., Kress, H. G., & Koschel, K. Lipid solubility is not the sole criterion for the inhibition of Ca²⁺-activated K⁺ channel by alcohols. 1990

Taylor, S. G. & Weston, A. H. Endothelium derived hyperpolarizing factor: an endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988, 9:272-274.

Taylor, S. J., Chae, H., Rhee, S. G. & Exton, J. H. Activation of the β_1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G proteins. *Nature*, 1991, 350: 516-518

Toro, L., Silberberg, S. D., Brown, A. M. & Stefani, E. K⁺ and Ca²⁺ currents from coronary single smooth muscle cells. *Biophys. J.* 1989, 55:543a.

Toro, L., Amador, M., & Stefani, E. Ang II inhibits calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle in lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 1990, 258:H912-915.

Toro, L., Ramos-Franco, J. and Stefani, E.. GTP-dependent regulation of myometrial K_{Ca}

channels incorporated into lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 1990, 96: 373-394.

Toro, L., Vaca, L. and Stefani, E. Calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle reconstituted in lipid bilayers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1991, 260: H1779-H1789.

Toro, L. & Scornik, F. Modulation of Ca-activated K channels from coronary smooth muscle. *Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells*. pp. 111-124. Sperelakis & Kuriyama ed., 1991, Elsevier Science Publishing Company.

Toro, L. & Stefani, E. Calcium activated K⁺ channels: metabolic regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1991, 23: 561-576.

Trieschmann, U. and Isenberg, G. Ca²⁺-activated K⁺ channels contribute to the resting potential of vascular myocytes. Ca²⁺-sensitivity is increased by intracellular Mg²⁺ ions. *Pflügers Arch.* 1989, 414: S183-S184

Van Neuten, J. M., Van Beek, J. & Vanhoutte, P. M. Inhibitory effect of lidoflazine on contractions of isolated canine coronary arteries caused by norepinephrine. 5 hydroxytryptamine, high potassium, anoxia and ergonovine maleate. *J Pharmacol Exp Ther* 1980, 213:179-187

Van Neuten, J. M. & Van Houtte, P. M. Cardiovascular pharmacology of ketanserin. *Biblioteca Cardiol* :1984, 38:222-233

Van Rentergham, C., Vigne, P., Barhaini, J., Schmid-Alliana, A., Frelin, C., & Lazdunski, M. Molecular mechanisms of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 157: 977-985.

Vatner, S. F. Pagani, M., Manders, W. T. & Pasipoularides, A. D: Alpha adrenergic vasoconstriction and nitroglycerin vasodilation of large coronary arteries in the conscious dog. *J Clin Invest* 1980, 65:5-14

Vatner, D. E., Knight, D. R., Homcy, C. J. Vatner, S. F. & Young, M. A Subtypes of β adrenergic receptors in bovine coronary arteries. *Circ Res* 1986, 59:463-473

Vergara, C. & Latorre, R. Kinetics of Ca²⁺ -activated K⁺ channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca²⁺ and Ba²⁺ blockade. *J Gen Physiol*, 1983, 82: 543-568

Vergara, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. Conduction, Blockade and gating in a Ca²⁺-activated K⁺ channel incorporated into planar bilayers. *Biophys J.* 1984, 45:73-76

Volk, K. A., Matsuda, J. J. & Shibata, E. F. A voltage-dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)* 1991, 439:751-768

Walsh, J. V. & Singer, J. J. Ca^{2+} -activated K^+ channels in vertebrates smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 1983, 4:321-330.

Walsh, J. V. & Singer, J. J. Identification and characterization of major ionic currents in isolated smooth muscle cells using voltage-clamp technique. *Plügers Arch.* 1987, 408: 83-97

Weigel, R. J., Connor, J. A. and Prosser, C.L. Two roles of calcium during the spike in circular muscle of small intestine in cat. *Am. J. Phys.* 1979, 237:C247-256.

White, R. E., Schonbrunn, A., & Armstrong D. L. Somatostatin stimulates Ca^{2+} -activated K^+ channels through protein desphosphorylation. *Nature* 1991, 351:570-573.

White, S. H. The physical nature of planar bilayer membranes. In *Ion Channel reconstitution*, Miller, C. ed. pp 3-35. Plenum Press, NY, 1986.

Wilde, D. W. and Lee, K.S. Outward potassium currents in freshly isolated smooth muscle cell of dog coronary arteries. *Circulation Research* 1989, 65:1718-1734.

Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X. N., Amatruda, T. T., Koremberg, J. R., Trask, B. J., De Jong, P., Reed, R. R., Simon, M. I., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. Evolution of the mammalian G protein α subunits multigene family. *Nature Genet.*, 1992, 1:85-91

Winn, M. J., Asante, N. K. & Ku, D. Vasomotor responses of canine coronary arterial rings to N_G -monomethyl-l-arginine and N_W nitro l-arginine methyl ester. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993, 264: 265-270.

Woodman, O. L., Dusting, G. J. & Nolan, R. D. Pericardial release of prostacyclin induced by bradykinin and angiotensinII: Effects on coronary blood flow in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983, 5:954-960

Wong, S. K., Parker, E. M. & Ross, E. M. Chimeric muscarine cholinergic β -adrenergic receptors that activate G_s in response to muscarine agonist. *J Biol. Chem.* 1990, 265:6219-6224

Yamada, K., Kubo, K., Shuto, K. and Nakamizo, N. Inhibition of Thromboxane A_2 -induced vasoconstriction by KF4939, a new anti-platelet agent, in rabbit mesenteric and dog coronary arteries. *Japan J. Pharmacol.* 1984, 36:283-290

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitzui, Y.,

Yazaki, Y., Gotto, K. & Masaki, T. *Nature* 1988, 332:411-415.

Yasue, H., Touyama, M., Shimamoto, M., Kato, H., Tanaka, S. & Akiyama, F. Role of autonomic nervous system in the pathogenesis of Prinzmetal's variants form of angina. *Circulation* 1974, 50:534-539

Yatani, A., J. Codina, Y. Imoto, J.P. Reeves, L. Birnbaumer, and A.M. Brown. A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science* 238: 1288-1292, 1987.

Yatani, A., Imoto, Y., Codina, J., Hamilton, S. L., Brown, A. M. and Birnbaumer, L.. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, Gs, also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 1988, 263: 9887-9895.

Yellen, G. Ionic permeation and blockade in Ca activated K-channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1984, 84:157-186

Yokoyama, M., Akita, H., Mizutani, T., Fukuzaki, H. & Watanabe, Y. Hyperreactivity of coronary arterial smooth muscle in response to ergonovine from rabbits with hereditary hyperlipidemia. *Circ Res* 1983, 53:63-71

Young, M. A., Knight, D. R., Vatner, D. E., Homcy, C. J. & Vatner, S. F: β 1 and β 2 adrenergic vasodilation in large coronary arteries of conscious calves (abstract) *Clin Res* 1986, 34:357A

Young, M. A. & Vatner, S .F. Brief Review: Regulation of large coronary arteries. *Circ. Res.* 1986, 59:579-595

Zuberbuhler, R. C. & Bohr, D. F: Responses of coronary smooth muscle to catecholamines. *Circ Res* 1965, 16:431-440