



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Ácido araquidónico: estudio biofísico y funcional de su efecto sobre el canal de K^+ de alta conductancia dependiente de calcio y voltaje (BK) asociado a la subunidad $\beta 1$.

Tesista: Lic. Melisa Moncada

Director/a: Dra. Verónica Milesi

Codirector/a: Dr. Pedro Martín

Año: 2020

Este trabajo de Tesis doctoral fue posible gracias a la ayuda y acompañamiento de muchas personas e instituciones que, desde su lugar, me permitieron llegar. A continuación quiero expresar mi agradecimiento a cada una de ellas.

A mis directores

A Verónica, por darme la oportunidad de incorporarme en su laboratorio y hacerme sentir parte desde el primer día. Por su compromiso y pasión como formadora y científica. En el grupo de trabajo que ella supo consolidar, aprendí mucho más que electrofisiología, comprobé que es posible generar un ámbito de trabajo comprometido, horizontal, cooperativo, y a su vez realizarlo a gusto entre amigos y compañeros.

A Pedro, por adaptarse rápidamente a lo imprevisto y adoptarme como tesista. Por su dedicación y compromiso con mi formación desde el primer día, por la paciencia y el compañerismo. Por compartirme todos sus saberes.

A ambos, por darme libertad para preguntar, proponer, decir y contradecir, la mejor manera de aprender.

A mis compañeras y compañeros...

...del grupo de trabajo, con los que compartí en algún momento este trayecto. El camino es más fácil cuando la compañía es buena. Me llevo grandes recuerdos y amistades.

...de la cátedra de Fisiología, con quienes compartimos el gusto por enseñar y el interés por aprender a enseñar.

A mis amigas y amigos de la Facultad de Cs. Exactas, que tanto en la etapa de grado como en el doctorado, nos acompañamos y dimos aliento para seguir adelante. A los que están y a Andrés, quien forma parte de nuestra memoria.

A Nico por su amistad e incondicionalidad.

A mis afectos

A mi compañero Joaquín, por la vida que elegimos compartirnos. Por alentarme, apoyarme y sostenerme siempre. Por hacerme reír todos los días.

A mis padres, por fomentarme, de niña, la curiosidad y creatividad, aunque eso implicara llenarlos de preguntas que no supieran responder. Por animarme a hacer todo lo que yo quisiera. Por apoyar y acompañar todas mis elecciones. A mi familia, la que es de sangre y la que no, por todo el amor.

A mis amigas de toda la vida, aunque lejos siempre presentes. En especial a Paz y a Flor, con quienes compartimos casi 10 años de convivencia, y a las que siento como hermanas.

A Nina, por su amor incondicional, por estar siempre a mi lado (o encima de mí) durante las horas de escritura. Por los paseos que, “por ella”, me doy el gusto de dar.

A los colaboradores de este trabajo

A Jesica Raingo, del IMBICE, por brindarnos generosamente el clon de la eGFP y el vector pcDNA3, y permitirme aprender las técnicas de cultivo celular en su laboratorio, de la mano de Francina Agosti. A Leandro Vecchio y Pablo Stringa, del IIFP, por realizar los preparados de lecho mesentérico. A Carlos González, Karen Castillo y Luisa Soto, del CINV (Chile), por facilitarnos los clones de las subunidades α y $\beta 1$ del canal BK y por colaborar con los experimentos de corrientes de *gating*. Al grupo de Miguel Ángel Valverde, en especial a José Manuel Fernández-Fernández (Universidad Pompeu Fabra, España), por proveer los clones de $\beta 1$ mutantes y por la buena predisposición que mostraron durante mi estadía en Barcelona.

A las instituciones

Al IIFP por darme la posibilidad de realizar mi trabajo de Tesis. A las políticas en ciencia y tecnología que hicieron posible este trabajo. A la Universidad pública y gratuita, por la cual siento agradecimiento y profundo orgullo.

PUBLICACIONES

Parte del trabajo presente en esta Tesis forma parte de las siguientes publicaciones en revistas internacionales con referato:

- **“Arachidonic acid activation of BKCa (Slo1) channel associated to β 1-subunit in human vascular smooth muscle cells”.**

M. Moncada¹, P. Martín¹, N. Enrique, A. Asuaje, J.M. Valdez Capuccino, C. González, V. Milesi. *Pflugers Arch.* 466 (2014) 1779–92.

<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1422-x>.

¹Los autores contribuyeron en forma equitativa en la realización del trabajo.

- **“Arachidonic acid effect on the allosteric gating mechanism of BK (Slo1) channels associated with the β 1 subunit”.**

M. Moncada¹, P. Martín¹, K. Castillo, F. Orsi, G. Ducca, J.M. Fernández-Fernández, C. González, V. Milesi. *BBA-Biomembranes* (2021) 183550, ISSN 0005-2736.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183550>

¹Los autores contribuyeron en forma equitativa en la realización del trabajo.

También he sido coautora de los siguientes trabajos, relacionados con la temática de esta Tesis:

- **“Diversity of Potassium Channels in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells: A Review of Their Roles in Human Umbilical Artery Contraction”.**

P. Martín, A. Rebolledo, R. Roldán Palomo, M. Moncada, L. Piccinini, V. Milesi. *Reprod. Sci.* 21 (2014) 432–41. <https://doi.org/10.1177/1933719113504468>.

- **“Activation of human smooth muscle BK channels by hydrochlorothiazide requires cell integrity and the presence of BK β 1 subunit”.**

P. Martín, M. Moncada, G. Kuntamallappanavar, A.M. Dopico, V. Milesi. *Acta Pharmacol Sin* **39**, 371–381 (2018). <https://doi.org/10.1038/aps.2017.133>

- **“Fisiología celular: señales y respuestas”.** Capítulo 3: Potencial de membrana.

V. Milesi y M. Moncada. Colección Libros de Cátedra. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP) (2019). <https://doi.org/10.35537/10915/90432>

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Las palabras en inglés fueron incluidas en itálica.

% DRV: porcentaje de disminución de la resistencia vascular

4-AP: 4-aminopiridina

17-ODYA: ácido 17-octadecínico

AA: ácido araquidónico

AG: ácido graso

AUH: arteria umbilical humana

BK: canal de K^+ de alta conductancia sensible al Ca^{2+} y al voltaje

CA: del inglés, *Cell-Attached*

CCNS: canal catiónico no selectivo

CCR: curva de concentración-respuesta

CCVO: canal de Ca^{2+} voltaje operado

CDC: cinnamil-3,4-dihidroxi- α -cianocinamato

CDF: del inglés, *cumulative density function* (histograma acumulativo de latencias)

CML: célula de músculo liso

CMLV: célula de músculo liso vascular

COX: ciclooxigenasa

CSD: del inglés, *calcium sensor domain* (dominio sensor de calcio)

CYP: citocromo P450

DHA: ácido docosahexaenoico

EC₅₀: concentración efectiva 50

EET: ácidos epoxieicosatrieonicos

E_{rev}: potencial de reversión

HA: Modelo alostérico de Horrigan y Aldrich

HETE: ácidos hidroxieicosatetraenoicos

Indo: indometacina

IO: del inglés, *Inside-Out*

IP₃R: Receptor de IP₃

KRB: solución de Krebs Ringer Bicarbonato

LOX: lipooxigenasa

LTA: ácido litocólico

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

MLC17: del inglés, *myosine light chain 17 kDa* (cadena liviana de la miosina de 17 kDa)

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

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

NA: noradrenalina

NXC: intercambiador Na⁺/Ca²⁺

PGD: del inglés, *pore gate domain* (dominio del poro)

PGI₂: Prostaciclina

PUFA: ácido graso poliinsaturado

RCK: del inglés, *regulating conductance of K⁺ domains* (dominio regulador de la conductancia al K⁺)

RS: retículo sarcoplásmico

RyR: receptor de Rianodina

SB: solución del baño

SD: solución de disociación

SE: Solución extracelular del baño

SERCA: del inglés, *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (bomba Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplásmico/endoplásmico)

SI: solución intracelular de la micropipeta

SP: solución de la micropipeta

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

V_m: potencial de membrana

VSD: del inglés, *voltage sensor domain* (dominio sensor de voltaje)

WC: del inglés, *Whole-Cell*

Wt: del inglés, *wild-type*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MÚSCULO LISO VASCULAR	4
- Arteria umbilical humana	10
MÚSCULO LISO VASCULAR Y CANALES DE POTASIO	13
CANALES DE POTASIO	14
- La familia de los canales de K ⁺ Slo y el canal BK	17
- Modelo alostérico del canal BK	25
CANAL BK Y ÁCIDOS GRASOS	28
ÁCIDO ARAQUIDÓNICO, CANAL BK Y FACTORES ENDOTELIALES	30
OBJETIVOS	34
OBJETIVOS GENERALES	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PATCH-CLAMP:	
GENERALIDADES	38
ESTUDIOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA	43
- Obtención de la muestra y disociación celular	44
- Estudio del efecto del AA en corrientes macroscópicas medidas en configuración Whole-Cell	46
- Análisis del efecto del AA en las curvas de activación por voltaje del canal BK, a nivel de canal único en configuración Inside-Out	49
- Modificación de la cinética de activación por voltaje del canal BK por AA, medida a nivel de canal único en configuración de Inside-Out	54
ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DEL AA SOBRE EL CANAL BK, ESTUDIADO EN SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGO	56
- Células, clones y transfección	56

- Estudio de las propiedades de canal único del canal BK expresado con y sin la subunidad accesoria $\beta 1$ en células HEK y efecto del AA	58
- Cálculo de la conductancia iónica	58
- Análisis de estado estacionario: idealización de registros por el criterio del 50% de la amplitud como valor umbral	59
- Análisis de estado estacionario: cálculo de la probabilidad de apertura	61
- Análisis de estado estacionario: cálculo del tiempo de permanencia medio	62
- Análisis de corrientes macroscópicas del canal BK expresado con y sin la subunidad accesoria $\beta 1$ en células HEK y caracterización del efecto del AA	62
- Estudio del gating intrínseco del canal BK $\alpha + \beta 1$ y su modificación por AA	66
- Dependencia de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la activación del canal BK $\alpha + \beta 1$ inducida por AA	66
- Necesidad de acople funcional entre las subunidades α y $\beta 1$ del canal BK para la activación del canal por AA	67
- Efecto del AA en las corrientes de compuerta (gating) del canal BK $\alpha + \beta 1$	67
EFFECTO DEL AA EN UN LECHO VASCULAR DE RESISTENCIA	69
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
RESULTADOS	73
ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL CANAL BK EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR HUMANO.	76
RELEVANCIA FISIOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN UN LECHO VASCULAR DE RESISTENCIA	86
ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE EL CANAL BK ASOCIADO A LA SUBUNIDAD ACCESORIA $\beta 1$ ESPECÍFICA DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO.	88
- Rol de la subunidad accesoria $\beta 1$ en la activación del canal BK por el AA	88
- Caracterización del efecto de activación del AA: dependencia de la concentración	96
- Caracterización del efecto de activación del AA: dependencia del metabolismo del AA	98
EFFECTO DEL AA SOBRE LOS MÓDULOS FUNCIONALES DEL CANAL BK ASOCIADO A LA SUBUNIDAD ACCESORIA $\beta 1$.	101
- Efecto del AA sobre el dominio sensor de voltaje del canal BK $\alpha + \beta 1$.	102
- Efecto del AA sobre el dominio del poro del canal BK $\alpha + \beta 1$.	106
- Efecto del AA sobre el dominio sensor de calcio del canal BK $\alpha + \beta 1$.	108
- Activación del canal BK por AA: requerimiento del acople funcional entre la subunidad α y $\beta 1$.	110

DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	111

Introducción



La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y una de las principales causas de muerte en nuestro país. Actualmente se define como HTA a una presión arterial (PA) superior a 140/90 mmHg (sistólica/diastólica) sostenida en el tiempo. Constituye uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedad coronaria, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca y accidente cerebrovascular, de manera que el control de la PA reduce el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular compleja. Su prevalencia ha aumentado debido a la mayor expectativa de vida y a la mayor incidencia de obesidad en la población [1–3]. El último estudio epidemiológico nacional estima que esta patología afecta al 33.5% de la población adulta, y en la población de mayores de 65 años la incidencia crece al 68.5% [3].

Si bien la HTA constituye un síndrome multifactorial, la causa más común es un incremento de la resistencia vascular periférica y son múltiples los factores que pueden provocar este aumento. La funcionalidad de las células de músculo liso vascular (CMLV) tiene un rol central en este fenómeno dado que una mayor contractilidad de este tipo celular produce una disminución del radio de los vasos que conlleva a un aumento de la resistencia vascular periférica y de la PA [4].

El primer paso en el tratamiento de la HTA se basa en cambios en el estilo de vida como restricción de la ingesta de Na^+ , pérdida de peso, disminución del consumo de etanol y aumento del ejercicio. En los casos donde esto no es suficiente para lograr el control de la PA, se debe recurrir a una estrategia farmacológica. Los tratamientos apuntan a reducir el gasto cardíaco, la resistencia vascular periférica o ambos parámetros [2,5]. Actualmente, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), los antagonistas del receptor de angiotensina II AT1 (ARA-2) y los antagonistas del receptor β 1-adrenérgico (incluyendo a los bloqueantes mixtos α - β) constituyen los principales tipos de fármacos antihipertensivos [5]. Sin embargo, ante la falla de esta línea de tratamiento, se recurre a fármacos clásicos de segunda línea de eficacia probada pero con una tolerabilidad muy inferior a los anteriores (por ejemplo: inhibidores de canales de Ca^{2+} , diuréticos, activadores no selectivos de canales de K^+ , agonistas α 2-adrenérgicos) [5].

En este marco, el trabajo de Tesis doctoral se desarrolló con el objetivo de contribuir a la comprensión del funcionamiento de las proteínas involucradas en la regulación de la contractilidad vascular y su modulación por factores endógenos, lo cual constituye un punto de partida para la búsqueda de nuevos fármacos antihipertensivos con mecanismos de acción novedosos que permitan el tratamiento de pacientes que fracasan con la terapéutica actual de la HTA.

El canal de K^+ de alta conductancia sensible al Ca^{2+} y voltaje (canal BK) ha sido extensamente estudiado en las células de músculo liso vascular, donde contribuye en forma significativa al control de la contractilidad de los vasos sanguíneos, por lo que ha sido postulado como una interesante diana farmacológica para el tratamiento de la HTA y otras patologías de músculo liso (asma, incontinencia urinaria, disfunción eréctil, etc.) [6–9].

MÚSCULO LISO VASCULAR

Las células musculares lisas que forman la túnica media de los vasos sanguíneos son células fusiformes de entre 100 a 500 μm de largo y 2 a 6 μm de diámetro, con una gran proporción superficie/volumen. Esta relación se debe, en parte, a las invaginaciones que presenta la membrana denominadas caveolas [10], las cuales se relacionan por su cara interna con el retículo sarcoplásmico (Figura 1).

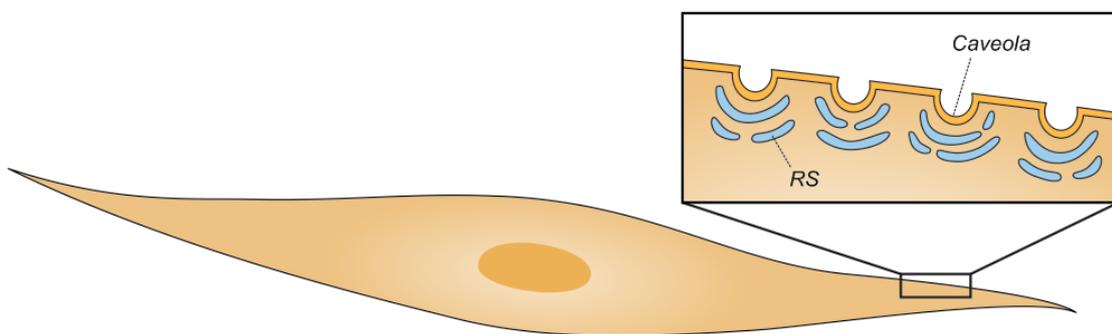


Figura 1. Esquema de una célula de músculo liso vascular. En el recuadro se muestra una ampliación en donde pueden apreciarse caveolas y retículo sarcoplásmico (RS).

Este tipo celular posee proteínas contráctiles específicas que se ordenan en filamentos finos y gruesos, y le confieren a la célula la propiedad de contraerse (Figura 2). Los filamentos finos están formados por actina globular polimerizada y tienen asociadas las proteínas tropomiosina, caldesmona y calponina. Los filamentos gruesos están constituidos por miosina, la cual posee dos subunidades proteicas pesadas y dos pares de subunidades livianas. Las cadenas pesadas de la miosina están enrolladas entre sí, constituyendo el núcleo del filamento grueso, y terminan en dos porciones de naturaleza globular (cabezas) capaces de hidrolizar ATP, que sobresalen del filamento a intervalos regulares. Sobre cada cabeza de miosina se disponen dos tipos de cadenas livianas, denominadas cadena liviana esencial (MLC17, del inglés, *myosine light chain 17 kDa*) y cadena liviana reguladora (MLC20, del inglés, *myosine light chain 20 kDa*). Esta última posee un sitio de fosforilación en el aminoácido serina 19, importante para la regulación de la contracción.

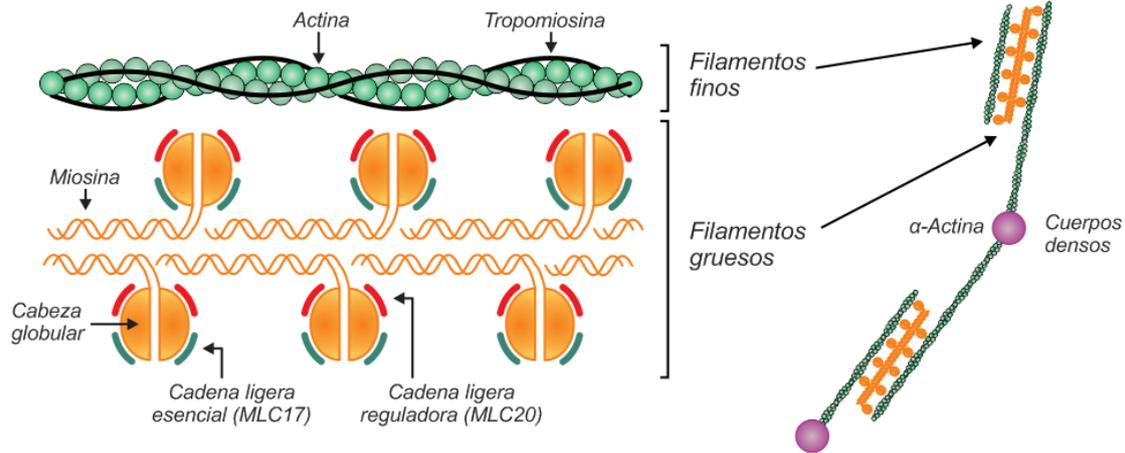


Figura 2. Esquema de los elementos que forman parte del aparato contráctil en las células de músculo liso. Figura modificada de la Tesis Doctoral de Nicolás Enrique [11].

Estos filamentos se organizan en unidades de tres a cinco filamentos gruesos rodeados de varios filamentos finos, los cuales se fijan a estructuras proteicas denominadas cuerpos densos, formados principalmente por α -actina, que están anclados a proteínas del citoesqueleto celular y a la membrana celular [10,12] (Figura 3). De esta manera, se forma la maquinaria contráctil, la cual modificará su longitud dependiendo de la concentración de calcio intracelular.

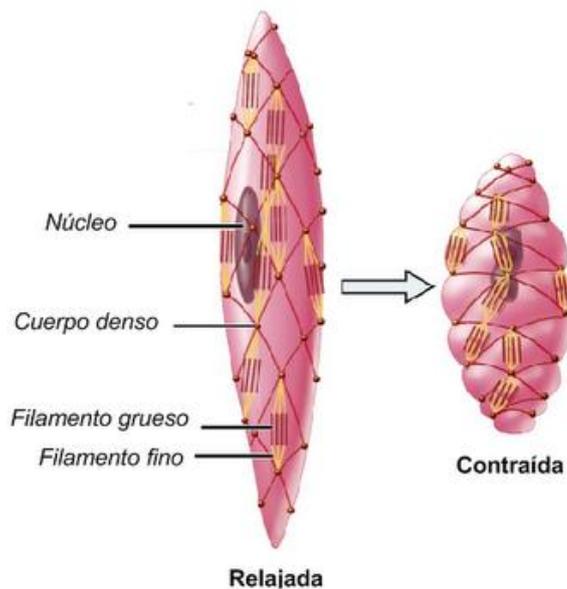


Figura 3. Disposición esquemática de los filamentos contráctiles y los cuerpos densos en la célula de músculo liso. La célula se muestra en estado relajado y contraído. Figura modificada de Tortora y Derrickson, "Principes of Anatomy and physiology" (2006) [13].

La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol de la célula de músculo liso (CML) es fundamental en la determinación de su grado de contracción. En la condición de reposo la misma está comprendida en el rango de valores de 120 a 170 nM [14,15]. Un aumento global en la concentración del Ca^{2+} intracelular a niveles de 500 a 700 nM activa el aparato contráctil celular, desencadenando la contracción de la célula. Dicho aumento se puede producir por el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular o a partir de la liberación del mismo desde organelas intracelulares como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria, que constituyen reservorios de Ca^{2+} intracelular. Las estructuras que median el aumento de calcio son numerosas y la importancia relativa de cada una de ellas varía entre los distintos tipos de células de músculo liso, incluso entre los distintos lechos vasculares. En general un aumento global o local de la concentración intracelular de Ca^{2+} puede estar mediado por (Figura 4):

- **Activación de canales de Ca^{2+} voltaje operados (CCVO):** de los cuales diferentes subtipos han sido identificados en el músculo liso vascular (L, T, P/Q, R). Su probabilidad de apertura es función del potencial de membrana celular y del estado de fosforilación, entre otros factores reguladores [16].
- **Activación de canales catiónicos no selectivos (CCNS) permeables al Ca^{2+} :** también en este caso existen varios subtipos, y pueden activarse mediante un número importante de estímulos como agonistas, estiramiento mecánico, depleción del retículo sarcoplásmico, estímulos despolarizantes de la membrana celular, entre otros [15,16].
- **Activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NXC) en su modo reverso de acción.** Este mecanismo es sensible a los cambios de concentración de Na^+ y Ca^{2+} , intracelular y extracelular, así como a las variaciones del potencial de membrana celular cuando se trata de isoformas electrogénicas [15,17].
- **Liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico,** inducido por el influjo de Ca^{2+} (RyR) o por el segundo mensajero IP_3 (IP_3R). Además, el RyR puede presentar aperturas espontáneas de corta duración que generan cambios locales en la concentración de Ca^{2+} denominados chispas (*sparks*) de calcio [15,18]

- **Liberación de Ca^{2+} desde la mitocondria**, regulado en gran medida por el pH intracelular y por la propia concentración de Ca^{2+} intracelular [15].

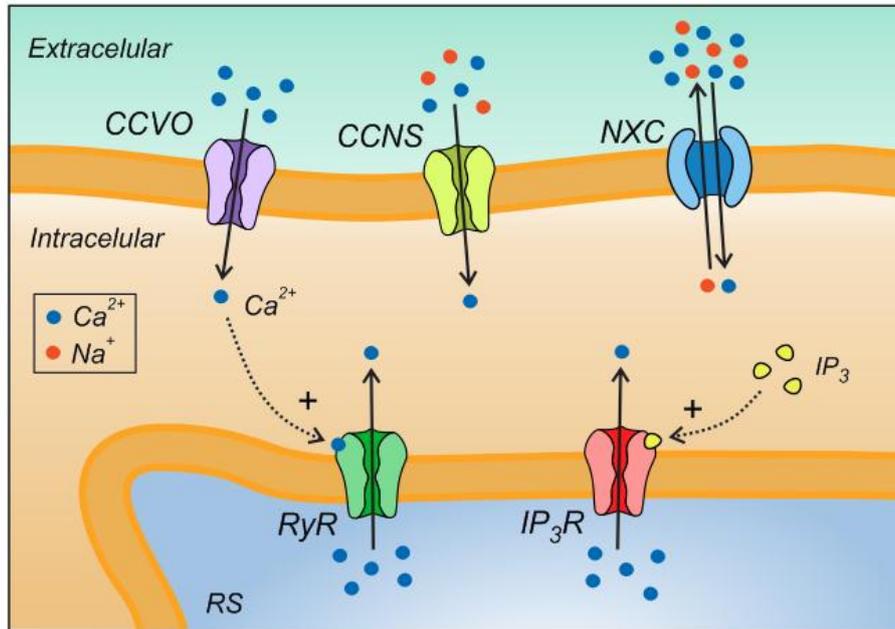


Figura 4. Estructuras que median el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en las CML. RS: retículo sarcoplásmico; CCVO: canal de Ca^{2+} voltaje operado; CCNS: canal catiónico no selectivo; NXC: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (en su modo reverso de acción); RyR: receptor de Rianodina; IP_3R : Receptor de IP_3 . Se simbolizan en azul los iones Ca^{2+} y en rojo los iones Na^+ .

El Ca^{2+} se une a una proteína citoplasmática denominada calmodulina que posee cuatro sitios de unión para este ion. Cuando aumenta su concentración, se favorece la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina que activa a la proteína quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK, del inglés *miosine light chain kinase*). Esta quinasa puede estar ligada a los filamentos finos a través de su extremo N terminal y cuando es activada fosforila a la MLC20 [10]. Esta reacción desencadena un ciclo, durante el cual ocurre el movimiento de las cabezas de miosina desplazando los filamentos de actina mediante el gasto de energía metabólica a través de la actividad ATPasa del complejo actomiosínico. Este mecanismo conduce al acortamiento de la estructura contráctil y el consiguiente desarrollo de fuerza. El ciclo de contracción se

lleva a cabo hasta que el Ca^{2+} vuelve a disminuir a la concentración de reposo, a la cual la MLCK se inactiva y se interrumpe la fosforilación de la miosina.

Al finalizar el estímulo contráctil, la concentración de Ca^{2+} disminuye debido a que el mismo es removido del citoplasma, y cuando se alcanza nuevamente la concentración de reposo se produce la consecuente relajación celular. La disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular implica la extrusión de Ca^{2+} a través de la membrana celular y su secuestro hacia las organelas intracelulares (Figura 5). La extrusión de Ca^{2+} puede realizarse a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NXC) actuando en su modo directo y/o por la bomba de Ca^{2+} -ATPasa ubicada en la membrana plasmática. Por su parte, la recaptación de Ca^{2+} hacia los reservorios intracelulares, es mediada por la bomba de Ca^{2+} ubicada en la membrana del RS (SERCA, del inglés *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) [15].

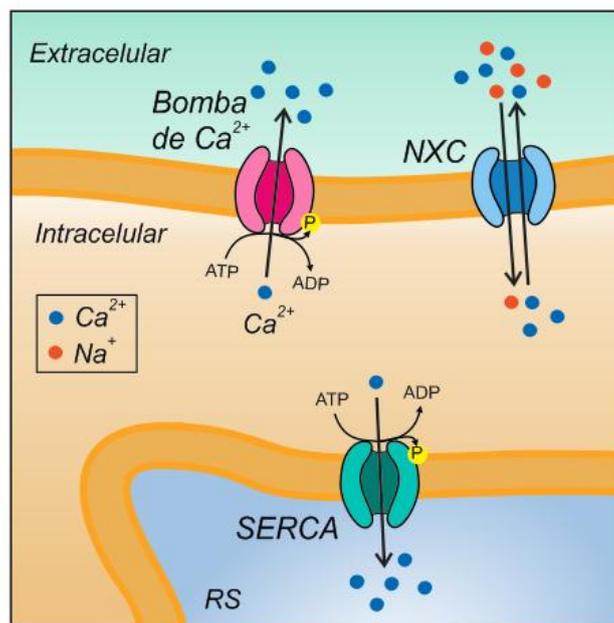


Figura 5. Estructuras que median la disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} en las CML. RS: retículo sarcoplásmico; NXC: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (en su modo directo de acción); SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Se simbolizan en azul los iones Ca^{2+} y en rojo los iones Na^+ .

A modo de resumen, en la Figura 6.a y b se esquematizan los mecanismos generales de contracción y relajación, respectivamente.

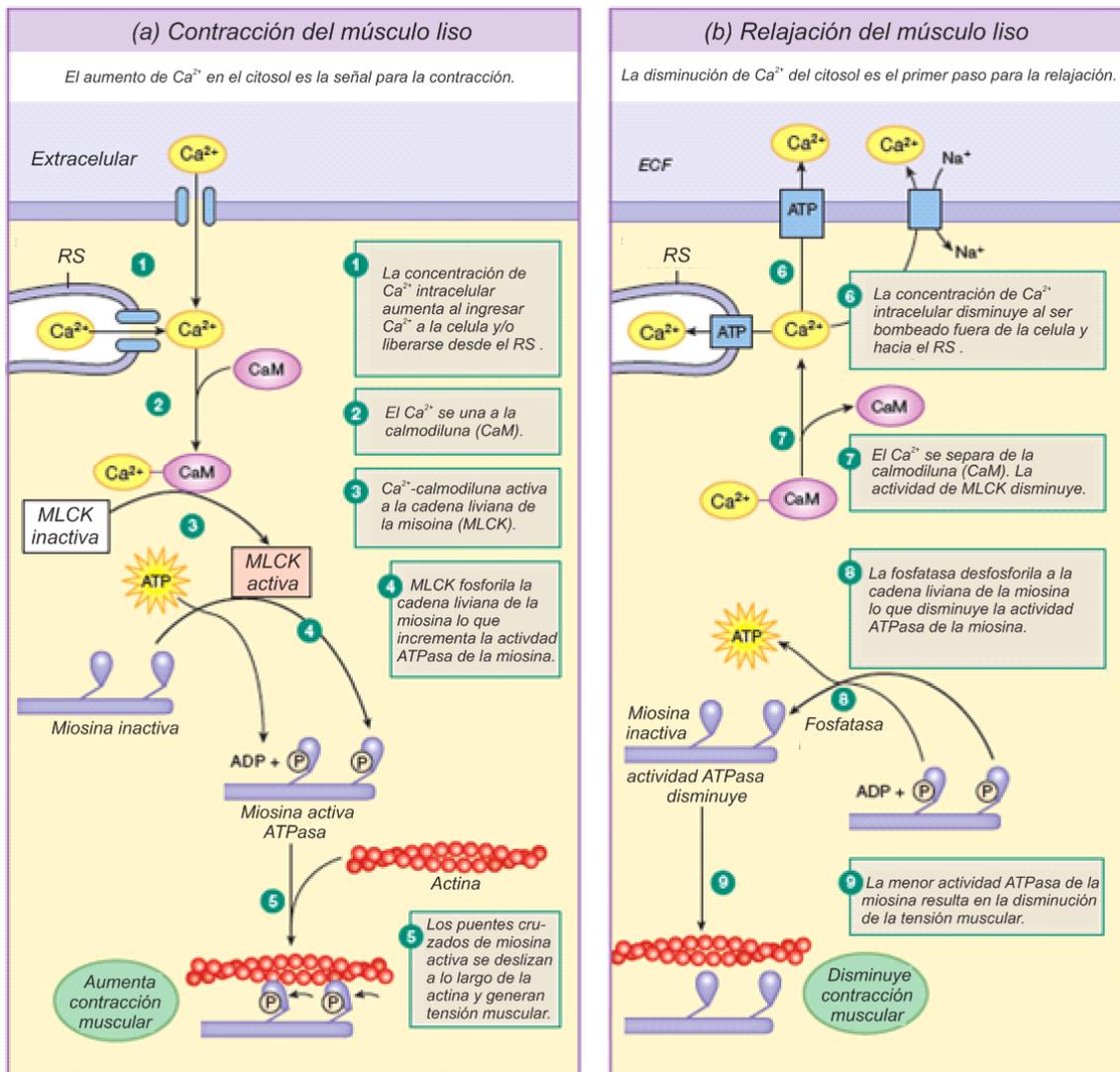


Figura 6. Esquema de los mecanismos de contracción y relajación de las CML. a: El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular deriva en la contracción de la CML por predominio de la MLC fosforilada. **b:** La remoción del Ca^{2+} intracelular deriva en la relajación de la CML por predominio de la MLC desfosforilada. Figura modificada de Silverthorn, "Human Physiology: An integrated Approach" (2017) [19].

Diversos estímulos endógenos (agonistas, iones, etc.) y exógenos (xenobióticos) pueden alterar el estado contráctil de las células de músculo liso vascular (CMLV) actuando sobre las estructuras celulares que intervienen directa o indirectamente en la regulación de la concentración del Ca^{2+} intracelular. Las sustancias vasoactivas

endógenas que reciben las CMLV pueden originarse en el endotelio vascular, plaquetas, eritrocitos, células del sistema inmune, terminales nerviosas, glándulas endócrinas, células del tejido conectivo, entre las más relevantes [10].

En particular, el endotelio vascular sintetiza y libera mediadores vasoactivos de acción paracrina sobre las CMLV en respuesta a distintos estímulos fisiológicos, como pueden ser sustancias circulantes (serotonina, angiotensina II, adrenalina, bradiquinina), sustancias liberadas por las plaquetas o por las células del sistema inmune, neurotransmisores liberados por las terminales nerviosas, cambios en la presión de O₂ sanguínea, alteraciones ácido base, así como cambios en el flujo sanguíneo que generan una fuerza de roce (del inglés, *shear stress*) sobre la superficie endotelial. Los factores liberados por el endotelio pueden difundir y actuar sobre las CMLV produciendo diversos efectos que alteran la regulación del estado contráctil de estas últimas, y por lo tanto del diámetro de la luz del vaso [20]. El conocimiento de la importancia del rol endotelial en el control de la contractilidad vascular ha aumentado mucho desde que Furchgott y Zawadzky (1980) demostraron que la acetilcolina relaja el tejido vascular precontraído sólo en presencia de endotelio intacto [21]. Actualmente, se sabe que la acción de muchos vasodilatadores y vasoconstrictores es dependiente de la integridad del endotelio con un importante impacto sobre la regulación de la presión arterial [22].

Arteria umbilical humana

En este trabajo de Tesis se utilizó la arteria umbilical humana (AUH) como modelo de estudio para evaluar el mecanismo de acción del ácido araquidónico, una sustancia endógena liberada por el endotelio vascular, que afecta el estado contráctil del músculo liso vascular (ver más adelante). La AUH es uno de los vasos sanguíneos del cordón umbilical que forma parte de la circulación feto-placentaria (Figura 7) contribuyendo a la regulación del flujo entre el feto y la placenta con un rol fundamental en el transporte de oxígeno y nutrientes vitales para el desarrollo del feto. Por lo tanto, el estudio de la AUH, además de representar un modelo de vaso humano muy útil en el campo de la fisiología vascular, es importante para entender el

rol de este vaso sanguíneo en los numerosos mecanismos que regulan el flujo feto-placentario.

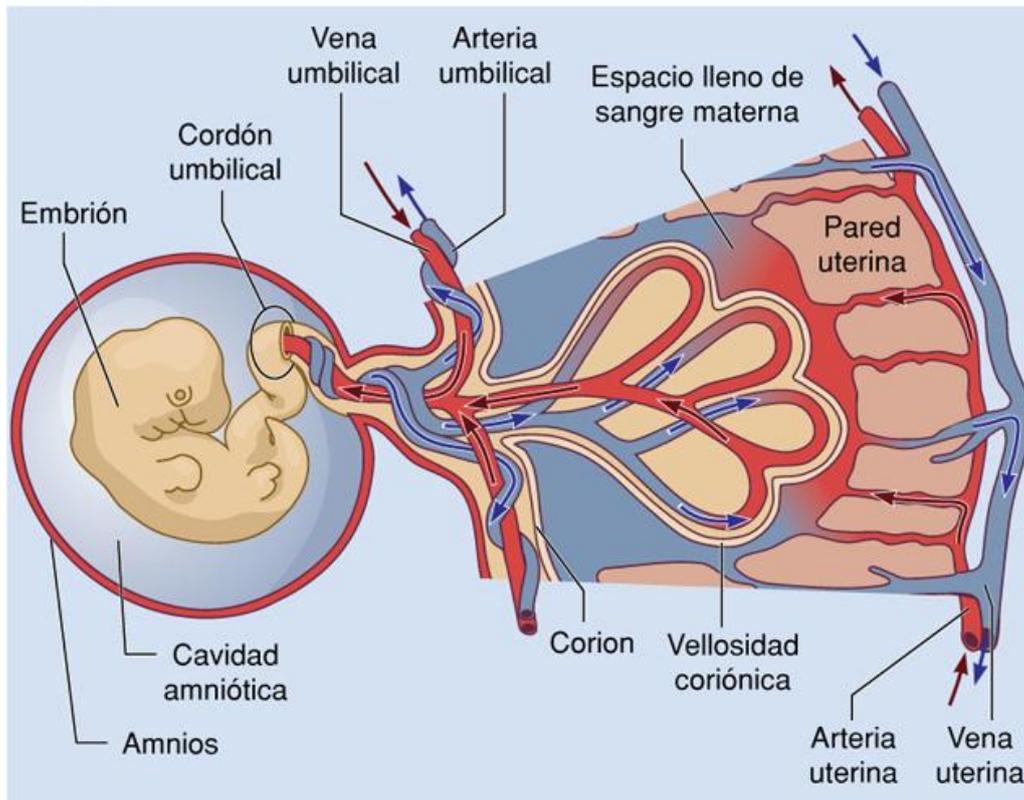


Figura 7. Esquema de la circulación feto-placentaria. El intercambio entre la madre y el feto se produce a través de la membrana placentaria. La sangre materna llega por la arteria uterina y baña las vellosidades coriónicas. La sangre fetal llega a la placenta por las arterias umbilicales, las cuales terminan en asas capilares largas y dilatadas dentro de las vellosidades coriónicas. La sangre retorna al feto por las venas umbilicales [23].
Figura de Curtis y col., "Biología" (2007) [24].

El cordón umbilical posee dos arterias y una vena, las cuales, a diferencia de otros vasos sanguíneos, carecen de *vasa vasorum*, vasos linfáticos e inervación autónoma [25]. Debido a esto último, la regulación del diámetro de las mismas está determinada fundamentalmente por factores liberados en forma local por células endoteliales, por el propio músculo liso o por sustancias que alcanzan las células de músculo liso a través del flujo sanguíneo.

La AUH presenta una organización histológica formada por dos tunicas, la íntima y la media, y carece de lámina elástica y adventicia típicas de otros lechos

arteriales. La túnica íntima, ubicada internamente (hacia la luz del vaso), presenta largas microvellosidades que se proyectan hacia el lumen, y está formada por una capa de células endoteliales ricas en retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y ribosomas [26,27]. El límite entre la túnica íntima y la media contiene un segundo tipo celular con características semejantes a las células de músculo liso aunque más ricas en retículo endoplasmático rugoso y organelas [26,27]. La túnica media está formada por células de músculo liso que se disponen internamente longitudinales al eje del vaso en forma espiralada, y externamente formando una capa circular compacta, como se observa en la Figura 8.



Figura 8. Arteria umbilical humana. Se muestra las secciones transversales de cordón umbilical (izquierda) y de la arteria umbilical humana en la que se observa la estructura histológica (derecha, fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Respecto a la función contráctil de las CML de la AUH, nuestro grupo reportó la presencia de diferentes vías de influjo de Ca^{2+} , como canales de Ca^{2+} voltaje operados (L, P/Q y T) [28] y catiónicos no selectivos [29], el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo reverso [17] y entrada de Ca^{2+} operada por depleción del retículo [30].

MÚSCULO LISO VASCULAR Y CANALES DE POTASIO

Como mencionamos previamente, el aumento del calcio intracelular es fundamental para desencadenar la contracción de la CMLV. Existe una vinculación directa entre el valor del potencial de membrana celular (V_m) y el estado contráctil de la célula. La contracción muscular puede ser inducida por una despolarización del V_m ya que provoca un incremento en la probabilidad de apertura de los CCVO presentes en la membrana celular. Una mayor actividad de estos canales iónicos, que permiten el influjo de Ca^{2+} , genera un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que induce finalmente la contracción de la CMLV [31]. Los valores de V_m de reposo de este tipo celular están comprendidos en el rango de -40 a -60 mV, variando de acuerdo con el tejido y a los métodos de medida. Este valor es mantenido por flujos iónicos a través de canales iónicos de la membrana plasmática, en función del gradiente electroquímico y de la permeabilidad de la membrana para cada ion. Numerosos trabajos han demostrado la participación de distintos tipos de canales selectivos al K^+ en la regulación y mantenimiento del V_m de las CMLV [31,32], por lo cual estos canales iónicos pueden intervenir indirectamente en el mecanismo y regulación de la contracción vascular. La activación de los canales de K^+ produce hiperpolarización de la membrana celular (y relajación vascular) mientras que su inhibición despolariza la misma, desencadenando la contracción vascular. En la Figura 9 se esquematiza la participación de los canales de K^+ en la regulación del V_m y su influencia en la determinación de la concentración intracelular de Ca^{2+} que establece el grado de contracción de las CML.

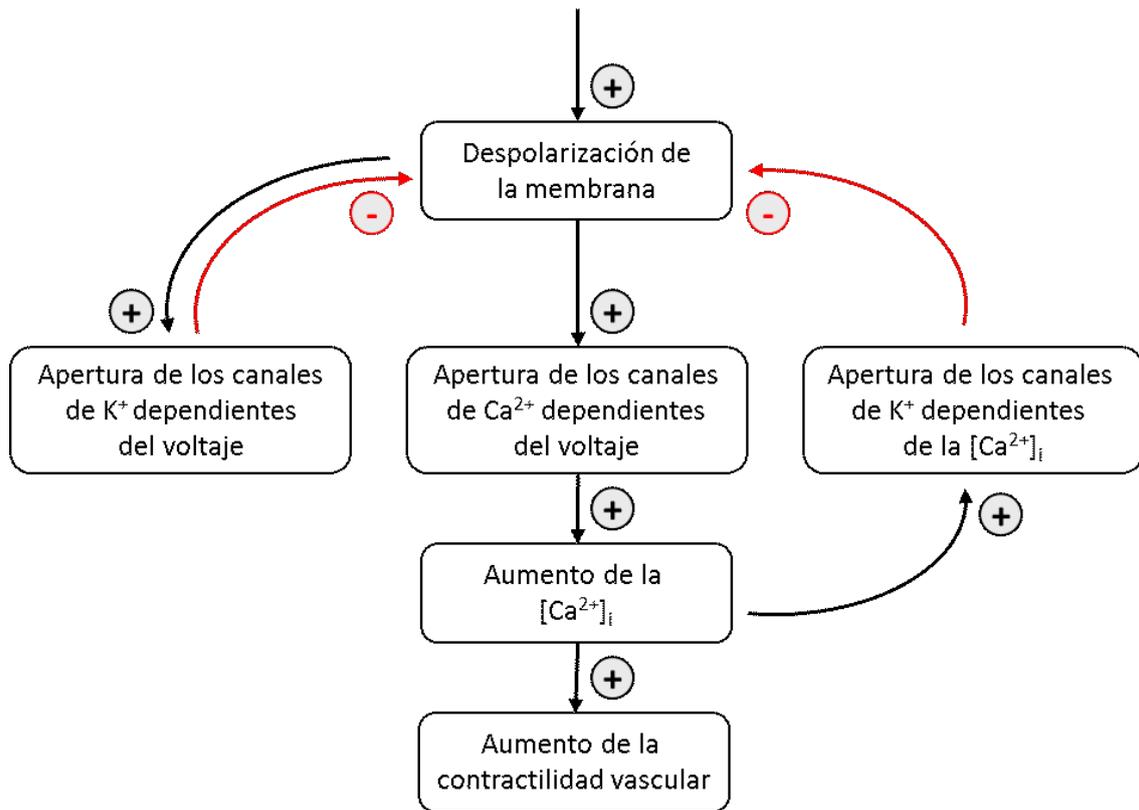


Figura 9. Esquema del rol del V_m sobre la concentración del Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en las CMLV y su relación con la contractilidad vascular. Figura modificada de Nelson M.T. y col. (1995) [31].

CANALES DE POTASIO

Los canales de K^+ son un conjunto de proteínas cuyo origen se postula en simultáneo con el origen de la vida en la tierra [33]. Los mismos se expresan tanto en células eucariotas como procariotas y constituyen el grupo más numeroso de canales específicos para un ion en particular (Figura 10).

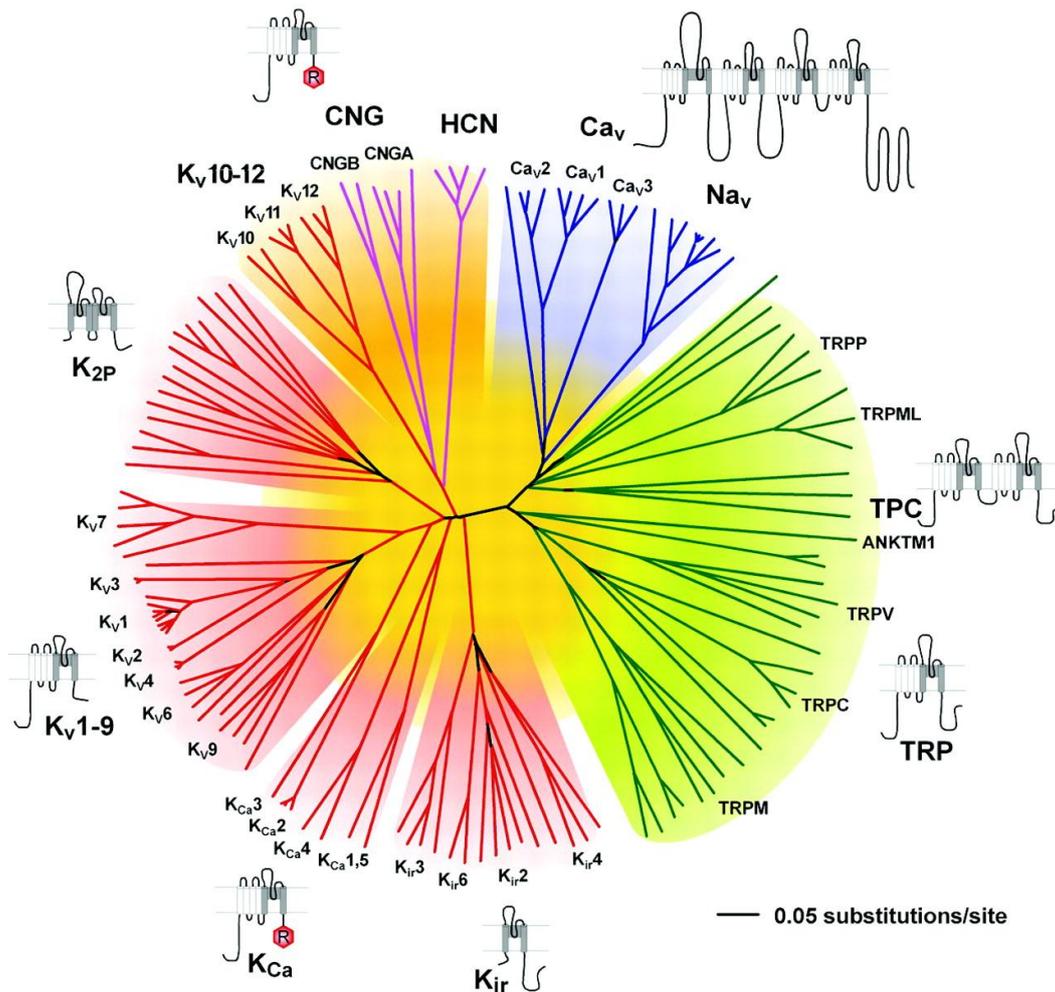


Figura 10. Diversidad de canales iónicos. Esquema que relaciona familias de canales iónicos en base a la similitud de secuencia de aminoácidos de las regiones formadoras de poros. Se incluyen 143 canales catiónicos, evolutivamente relacionados. Los colores de fondo agrupan los canales iónicos con relación más estrecha. Se muestran siete familias y sus topologías de membrana (los segmentos que conforman el dominio del poro se marcan en gris). Los canales de potasio se muestran como ramas rojas. Figura de Yu F.H. y col. (2005) [34].

El primer canal iónico en ser cristalizado fue justamente un canal de K⁺ de una célula procariota y a partir de la estructura de rayos X del mismo pudo localizarse la región formadora del poro iónico [35], la cual se observó que está ampliamente conservada en todas las familias de canales de K⁺, en todos los reinos. En contraste, en el resto de la secuencia de los canales de K⁺ se observan porciones de importante variabilidad, que permiten agruparlos, en base a su estructura, en 3 grandes grupos y en 5 familias [36–40] (Figura 11):

- **Canales 2 Segmentos de Transmembrana - 1 dominio formador de Poro (2TMS-1P):** el canal se forma como tetrámero y corresponde a la familia de canales K_{IR} (del inglés, *inward rectifying K^+ channels*).
- **Canales 4 Segmentos de Transmembrana - 2 dominios formadores de Poro (4TMS-2P):** el canal se forma como dímero y corresponde a la familia de canales K_{2P} (del inglés, *two pore domain K^+ channels*).
- **Canales 6 Segmentos de Transmembrana - 1 dominio formador de Poro (6TMS-1P):** incluye a tres familias y es el grupo más numeroso de canales de K^+ . Están formados por tetrámeros cuyas subunidades, como su nombre lo indica, poseen seis segmentos de transmembrana (S1-S6), siendo los últimos dos los que conforman un dominio formador del poro. Dentro de este grupo se encuentra la familia de canales de K^+ operados por voltaje (K_V), cuya característica estructural es la presencia de una región en el segmento de transmembrana S4 que presenta 4 aminoácidos cargados positivamente y que funciona como sensor de voltaje (altamente conservado en otras familias de canales iónicos de K^+ , de Na^+ y de Ca^{2+} que también presentan sensibilidad al voltaje). Este grupo se completa con 2 familias de canales de K^+ sensibles a la concentración de Ca^{2+} intracelular (K_{Ca}). La primera se denomina SK_{Ca} (del inglés, *small conductance calcium sensitive K^+ channel*), y está compuesta por una serie de canales de K^+ de conductancia intermedia y baja con actividad independiente del voltaje. Mientras que la segunda se denomina familia de los *Slo*, cuyo miembro más relevante es el canal de K^+ de alta conductancia sensible al Ca^{2+} y al voltaje, conocido como *Slo1*, BK o BK_{Ca} (del inglés, *big conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel*).

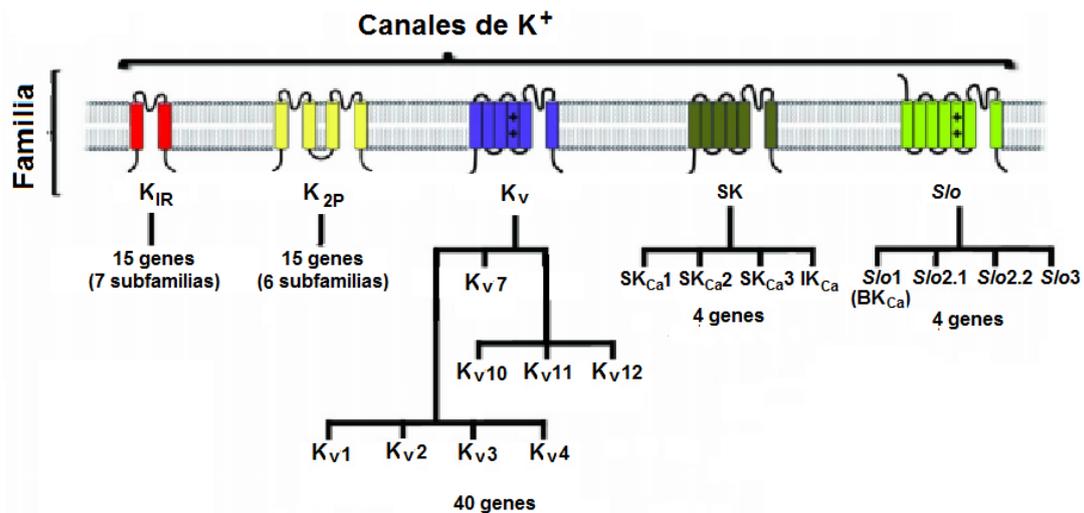


Figura 11. Familias de canales de K⁺ agrupados según la estructura primaria de sus subunidades. Los rectángulos indican los dominios de transmembrana, las interrupciones en la membrana indican los dominios formadores de poro y los signos + señalan la ubicación del sensor de voltaje. Figura modificada de González C. y col. (2012) [39].

Nuestro grupo ha realizado una extensa caracterización de los canales de K⁺ presentes en las CML de la AUH, encontrándose miembros de todas las familias principales. Particularmente, hemos identificado la presencia del canal BK, de canales K_v (al menos 4 isoformas) y al menos dos canales con un comportamiento compatible con canales K_{IR} o K_{2P} [41–43]. En este trabajo de Tesis nos focalizamos en el canal BK cuyas características principales describiremos a continuación.

La familia de los canales de K⁺ Slo y el canal BK

Esta familia de canales iónicos, constituida por proteínas codificadas por los genes *SLO* (*SLO1*, *SLO2.1*, *SLO2.2* y *SLO3*), tienen como características distintiva su valor elevado de conductancia iónica [44]. Además comparten la capacidad de sensar el voltaje de la membrana y cambios en la concentración intracelular de determinados iones (H⁺, Ca²⁺, Cl⁻ y Na⁺, según el subtipo), lo que les permite establecer un nexo entre los cambios en las concentraciones iónicas que se generan en la señalización intracelular y la conductancia de la membrana celular [36,39]. El canal BK, codificado por el gen *SLO1* (o *KCNMA1*), es el miembro más estudiado de esta familia, de

expresión ubicua y de alta relevancia a nivel del musculo liso vascular. Fue clonado por primera vez a partir del mutante de la *Drosophila* llamado "Slowpoke" [45], dando origen al nombre de la familia *Slo*.

El canal BK posee una conductancia de entre 200–300 pS, dependiendo de las condiciones de medida, entre 10–20 veces mayor que la mayoría de los canales de K^+ . Su probabilidad de apertura (P_o) aumenta con la despolarización de la membrana y con el incremento de la concentración de calcio intracelular (Figura 12) [9,46–48]. Estas propiedades hacen que su principal función, en los tejidos en los que se expresa, sea la de constituir un mecanismo de retroalimentación negativa, atenuante de las respuestas fisiológicas excitatorias mediadas por calcio y/o despolarización, tales como los procesos de exocitosis de neurotransmisores y hormonas, la excitabilidad neuronal, la contracción muscular, etc.

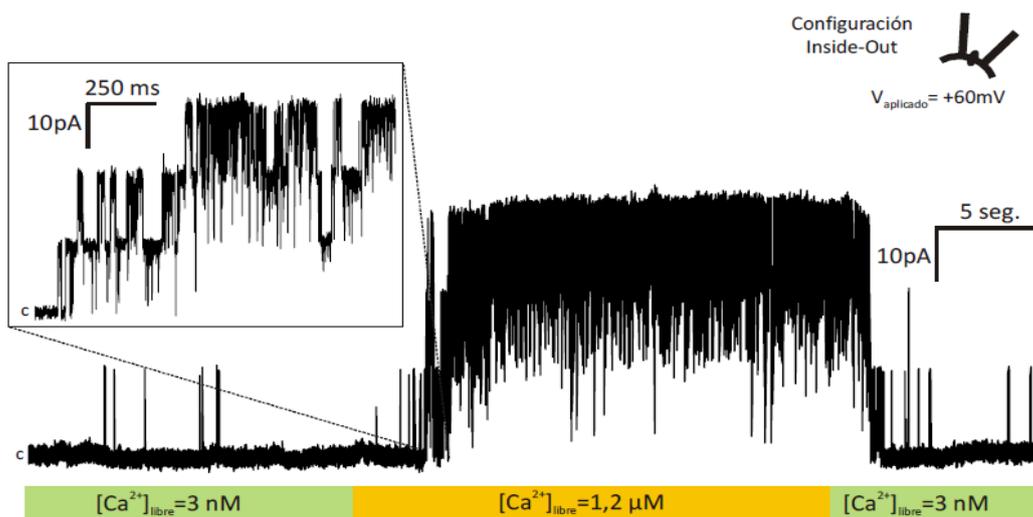


Figura 12. Activación del canal BK por el Ca^{2+} intracelular. Registro de canal único obtenido en nuestro laboratorio, en donde se observa la activación de la corriente BK de las CML de la AUH por incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de 3 nM a 1.2 μM . Figura perteneciente a la Tesis doctoral de Pedro Martín [49].

En el funcionamiento de las CMLV, en las cuales el canal BK se encuentra altamente expresado, tiene una función fisiológica relevante asociada a la vasorrelajación de diferentes lechos vasculares, y por lo tanto, una relación con la

determinación de la resistencia periférica y regulación de la presión arterial [9,31,50,51]. Tal como hemos esquematizado en la Figura 9, tanto la despolarización como el aumento global de la concentración de Ca^{2+} intracelular incrementan la actividad de los canales BK permitiendo un mayor eflujo de K^+ y por lo tanto la hiperpolarización de la membrana celular, condición que contribuye con la relajación de la CML. Un aspecto clave para este mecanismo, es la cercanía espacial con la que se expresan el canal BK y los canales CCVO en algunos tejidos [52–54]. El canal BK es también responsable de generar hiperpolarización en respuesta al incremento localizado de la concentración de Ca^{2+} intracelular en pequeñas áreas debido a liberaciones espontáneas de Ca^{2+} desde el canal RyR del retículo sarcoplásmico (chispas, en inglés, *sparks*), las cuales generan corrientes transitorias de K^+ (STOC, del inglés *spontaneous transient outward currents*) a través de canales BK [18,55,56]. En la Figura 13 se esquematizan los procesos mencionados. Además, existen evidencias que indican que en las CMLV, este canal participa del mecanismo de hiperpolarización que produce el endotelio vascular ante determinados estímulos [20,57].

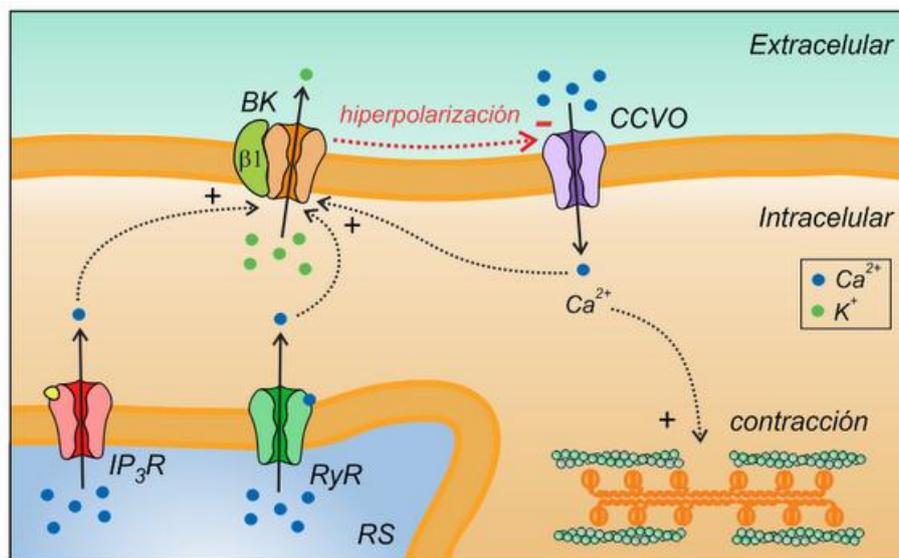


Figura 13. Regulación de la respuesta contráctil mediada por la activación del canal BK que induce hiperpolarización y relajación vascular en CMLV. RS: retículo sarcoplásmico; BK: canal BK; $\beta 1$: subunidad accesorias del canal BK (se mencionará más adelante en esta Introducción); CCVO: canal de Ca^{2+} voltaje operado; RyR: receptor de Rianodina; IP_3R : Receptor de IP_3 . Se simbolizan en azul los iones Ca^{2+} y en verde los iones K^+ .

El canal BK se compone de subunidades α formadoras del canal que se asocian formando tetrámeros. Como se mencionó anteriormente, la subunidad α tiene una topología muy similar a la de los canales de K^+ operados por voltaje de tipo Kv ya que posee los seis segmentos de transmembrana (S1-S6) con el segmento S4 cargado positivamente. Se conserva también, en el dominio de poro, la secuencia TVGYGD que le confiere selectividad al ión K^+ y es típica de canales selectivos a este ión. A diferencia de los otros canales, posee un dominio transmembrana adicional denominado S0, que orienta al extremo N-terminal hacia la cara extracelular, dando un total de siete segmentos transmembrana. S0 es requerido para la expresión funcional del canal y es necesario para la interacción del canal con sus subunidades accesorias β (ver más adelante) [9,58–60]. A diferencia de los canales Kv, en donde el sensor de voltaje está constituido solo por el segmento S4, el canal BK posee un sensor descentralizado, en donde aproximadamente el 50% de las cargas del mismo se ubican en el S4 y el resto se distribuyen entre el S2 y el S3 [61]. Actualmente, las evidencias biofísicas indican que los primeros cinco segmentos S0–S4 forman el sensor de voltaje (VSD, del inglés *voltage sensor domain*) del canal [61–63]. Los segmentos S5 y S6 de cada monómero α contribuyen a la formación del poro central de alta conductancia y selectivo al K^+ (PGD, del inglés, *pore-gate domain*) [9,64]. Su segmento C-terminal, expuesto hacia el medio intracelular, es muy voluminoso y posee dos dominios sensores de calcio, RCK1 y RCK2 (del inglés, *regulating conductance of K^+ domains*), que forman una superestructura hetero-octamérica denominada *gating ring* [65–67] la cual también es capaz de sensar otras moléculas intracelulares como Mg^{2+} , H^+ , grupo hemo, CO, ROS, PIP_2 , etc. [8]. Cada dominio RCK posee un sitio de unión al calcio, el sitio de RCK1 es de menor afinidad con una Kd de 3.5 μM y el sitio de RCK2, de mayor afinidad, presenta una Kd de 0.29 μM [68]. Las estructuras de la subunidad α y del canal BK se representan en las Figuras 14 y 15, respetivamente.

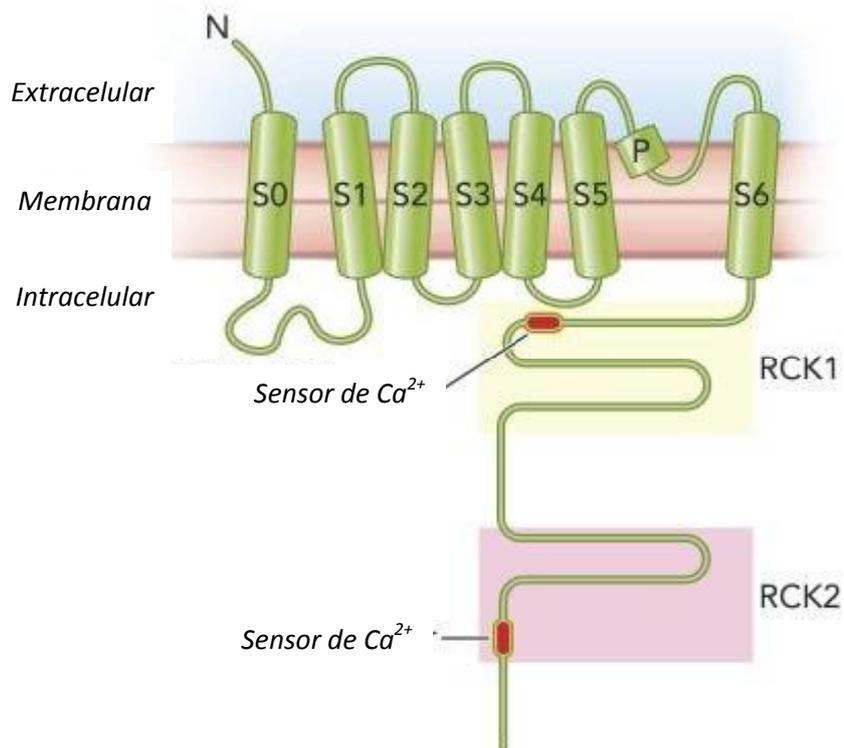


Figura 14. Esquema simplificado de la estructura de la subunidad α del canal BK. Los cilindros representan los dominios transmembrana (S0-S6). El dibujo no está en escala. Figura modificada de Hoshi T. y col. (2013) [69].

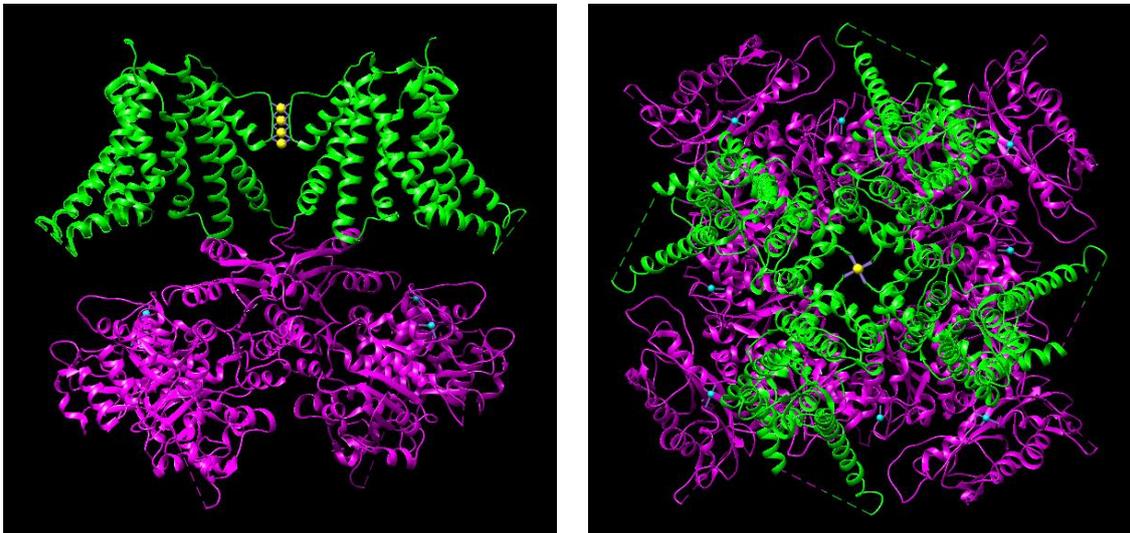


Figura 15. Estructura del canal BK. Representación 3D de la estructura del canal obtenida por criomicroscopía electrónica por Tao y MacKinnon (2019) (PDB: 6V22). La estructura del canal fue determinada en asociación con subunidades accesorias $\beta 4$ (no mostradas) y corresponde al estado abierto del canal, con unión de calcio. Vista lateral

(izquierda), de solo 2 subunidades α (con el fin de simplificar la visualización) y vista superior (derecha) del tetrámero. Los segmentos transmembrana de α se muestran en verde, mientras que el dominio C-terminal, que conforma el gating ring, se muestra en magenta. Las esferas amarillas corresponden a iones K^+ en el filtro de selectividad del poro del canal y las esferas turquesas a iones Ca^{2+} en sus sitios en RCK1 y 2 [64].

El canal BK además puede asociarse a subunidades accesorias beta (β) y gamma (γ). Se conocen cuatro tipos de subunidades β ($\beta 1$ a $\beta 4$, codificadas por los genes *KCNMB1-4*) [9,70-73], y su expresión difiere según el tejido. Estas subunidades accesorias poseen una estructura primaria similar, compuesta por 2 segmentos transmembrana con un *loop* extracelular extenso de 116-128 residuos y sus extremos N y C-terminal orientados hacia el medio intracelular [9]. Cuando se asocian a las subunidades α , se ubican entre las hélices que conforman el sensor de voltaje y en contacto con el segmento S6 y la α -hélice del *loop* S5-S6 [64,73], y modifican la cinética y la sensibilidad aparente a la concentración de Ca^{2+} intracelular, entre otras propiedades funcionales del canal. Además, las subunidades β pueden alterar el perfil farmacológico del canal, permitiendo la acción de fármacos de manera tejido-específica [74,75].

Respecto a las subunidades γ , su descubrimiento es más reciente y se conocen cuatro tipos ($\gamma 1$ a $\gamma 4$, codificadas por los genes *LRRRC26*, *LRRRC52*, *LRRRC55* y *LRRRC38*) que también tienen expresión diferencial según el tejido. Poseen una estructura primaria de un único segmento transmembrana, orientando su extremo N-terminal hacia el medio extracelular y C-terminal hacia el medio intracelular. El dominio N-terminal es extenso y se caracteriza por poseer motivos de residuos de leucina por lo que lleva el nombre de dominio LRR (del inglés, *leucine-rich repeat domain*) [76].

En la Figura 16 se esquematizan las subunidades β y γ , y en la Tabla 1 se resumen los efectos que tiene cada subunidad accesoria sobre el canal BK y su distribución diferencial en los distintos tejidos.

	Sensibilidad al Ca ²⁺	Sensibilidad al voltaje	Inactivación	Deactivación	Referencias	Expresión en tejidos
β1	Aumenta	Disminuye	No presenta	Enlentece	[70,77–79]	Músculo liso, riñón, vejiga, cerebro y miometrio [73,79,80].
β2	Aumenta	Sin efecto	Rápida y completa	Enlentece	[77,81–83]	Páncreas, riñón, bazo, ovario y cerebro [72,82].
β3	Sin efecto	Aumenta (β3a), disminuye (β3b)	Incompleta (β3a, b y c)	Enlentece (β3b)	[72,83–87]	Bazo, placenta, páncreas, riñón, corazón, pulmón, hígado, próstata, testículo, ovario y cerebro [72,83,84]
β4	Inhibe a bajo Ca ²⁺ , activa a alto Ca ⁺²	Disminuye	No presenta	Enlentece	[84,88–90]	Cerebro, riñón y músculo liso de la vejiga [84,91,92].
γ1	Sin efecto	Aumenta	No presenta	Enlentece	[76,93]	Próstata, glándula salival, tráquea, tiroides, timo, cerebelo, cerebro, aorta y mucosa [76].
γ2	Sin efecto	Aumenta	No presenta	Sin efecto	[76]	Testículo, músculo esquelético, placenta y espermatozoides [76].
γ3	Disminuye	Aumenta	No presenta	Enlentece	[76]	Cerebro, hígado y bazo. [76].
γ4	Sin efecto	Aumenta	No presenta	Sin efecto	[76]	Glándula suprarrenal, músculo esquelético, timo, cerebelo, cerebro, testículo y bazo [76].

Tabla 1. Efectos de las distintas subunidades accesorias sobre el canal BK y su distribución en los distintos tejidos. Datos recopilados por Torres y col. (2014) y Li & Yan (2016) [74,94]. Las modificaciones en la sensibilidad al calcio refieren a la sensibilidad aparente. La sensibilidad al voltaje refiere al parámetro z obtenido a partir de las curvas G-V o Po-V.

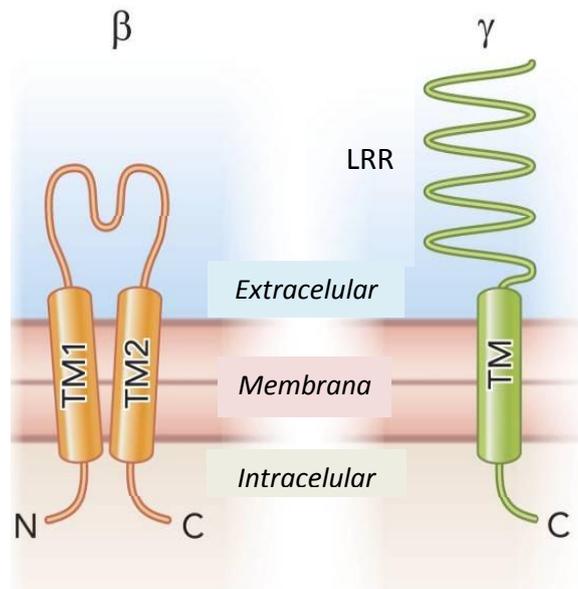


Figura 16. Esquema de la subunidades accesorias beta (β) y gamma (γ). Organización de una subunidad β (izquierda) y γ (derecha). Los cilindros representan dominios transmembrana (TM). El dibujo no está en escala. Figura modificada de Hoshi T. y col. (2013) [69].

A pesar de que el canal BK es el producto de un solo gen, las siguientes propiedades amplían enormemente su diversidad funcional entre los distintos tejidos en donde se expresa: posee once variantes de *splicing* alternativo [79], puede expresarse junto a las distintas subunidades accesorias β y γ (ocho en total), pudiendo asociarse a éstas con distinta estequiometría [95] y simultáneamente a ambos tipos de subunidades [96], y posee, en su estructura, sensores intracelulares que le confieren una estrecha relación con el estado metabólico celular.

En las células de músculo liso se encuentra expresada la subunidad $\beta 1$, la cual incrementa significativamente la sensibilidad aparente al Ca^{2+} , disminuye la dependencia del voltaje y enlentece la cinética de activación y de desactivación de la corriente de K^+ mediada por el canal [9,60,97]. Por otro lado, la asociación con $\beta 1$ le confiere a las CML un perfil farmacológico distinto, ya que se ha demostrado que la unión de determinados moduladores del canal, tanto endógenos como exógenos, requiere de la presencia de esta subunidad para ser efectivo. El 17- β estradiol, el tamoxifeno, el tungsteno y el ácido litocólico son sólo algunos ejemplos [75,98–100].

En las CMLV, la subunidad $\beta 1$ es esencial para la aparición de las corrientes transitorias de tipo STOC, descritas más arriba. Esto fue evidenciado empleando un ratón *knockout* para $\beta 1$, en donde se comprobó la desaparición de las corrientes STOC y se observó desarrollo de hipertensión, poniendo en evidencia el importante rol del canal BK asociado a la subunidad $\beta 1$ en el control de la contractilidad vascular y la regulación de la presión arterial [101,102].

Modelo alostérico del canal BK

Respecto al modo de activación del canal BK, se postula que la energía eléctrica (voltaje) y la energía química (de la unión del Ca^{2+}), sensadas a través de los dominios sensor de voltaje y sensor de calcio, respectivamente, son transducidas a energía mecánica, induciendo un cambio conformacional en el dominio del poro, el cual oscila entre los estados cerrado y abierto del canal [103,104].

Existen numerosos modelos cinéticos de variada complejidad para explicar la activación del canal BK, sin embargo, los estudios iniciales de la función del canal realizados por el grupo de Magleby [105–107] y los del grupo de Aldrich [103,104,108] generaron bases de conocimiento que permitieron llegar a una propuesta conocida como *Modelo alostérico de dos niveles* o *Modelo de Horrigan y Aldrich* (HA) [104] que, en forma sencilla y en concordancia con los datos experimentales, permite parametrizar la modulación de este canal por el calcio y por el voltaje.

Este modelo se basa en la existencia de tres módulos funcionales dentro del canal, el dominio del poro (PGD), cuatro dominios sensores de voltaje (VSDs) y cuatro dominios sensores de calcio (CSDs), cada uno de los cuales está en equilibrio entre dos estados: *cerrado/abierto* (PGD), *reposo/activo* (VSDs), *sin Ca^{2+} / Ca^{2+} unido* (CSDs). Se definen entonces tres constantes de equilibrio, L para la transición del PGD, J para cada VSD y K para cada CSD. Cada módulo VSD y CSD puede experimentar transiciones entre sus estados de equilibrio de manera independiente y regulados por el voltaje y la concentración de calcio intracelular. Adicionalmente, pueden comunicarse de manera alostérica, entre ellos y con el PGD [104,109], modificando el cambio de energía libre (ΔG) necesario para la transición entre los estados cerrado y abierto (y por lo tanto la

probabilidad de apertura), de manera similar a lo descrito para la modulación alostérica de las enzimas [110]. De este modo, los dominios involucrados en el modelo HA implican que el canal pueda transitar entre 70 posibles estados conformacionales diferentes. El comportamiento del canal puede resumirse, entonces, como tres procesos que constituyen equilibrios independientes pero que interactúan alostéricamente entre ellos. La comunicación entre los distintos módulos puede cuantificarse a través de factores alostéricos: C que caracteriza la transducción entre CSD y PDG, D que caracteriza el acoplamiento electromecánico entre VSD y PDG, y E que caracteriza la comunicación entre los sensores VSD y CSD. En la Figura 17 se esquematiza el mecanismo propuesto por el modelo de HA.

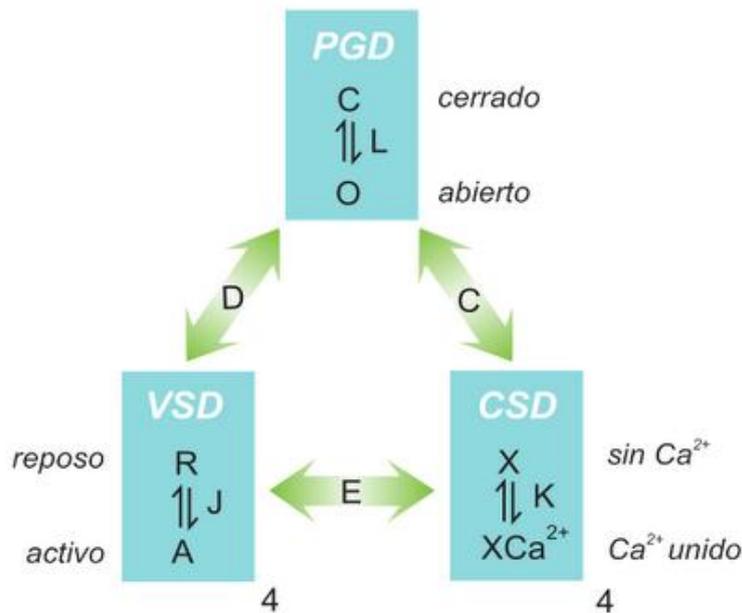


Figura 17. Esquema del Modelo de Horrigan y Aldrich de regulación alostérica del canal BK. L, J y K son constantes de equilibrio que describen los equilibrios para los dominios del poro (PDG), sensores de voltaje (VSD) y sensores de Ca^{2+} (CSD), respectivamente. D, C y E son los factores de interacción alostérica.

A continuación se presenta la ecuación propuesta por el modelo que describe la probabilidad de apertura del canal (P_o) en función de los parámetros antes presentados:

$$P_{(o)} = \frac{L(1+JD+KC+JKCDE)^4}{L(1+JD+KC+JKCDE)^4 + (1+J+K+JKE)^4}$$

en donde

$$J = J_0 \exp\left(\frac{z_j FV}{RT}\right), \quad K = \frac{[Ca^{2+}]}{K_d} \quad \text{y} \quad L = L_0 \exp\left(\frac{z_L FV}{RT}\right).$$

donde F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases y T la temperatura. Como es de esperar, el equilibrio de los VSD (J) entre los estados de reposo y activo, es una función del voltaje, definida por J_0 y z_j , que representan la constante de equilibrio para la activación de cada VSD a potencial 0 y en ausencia de calcio, y el número aparente de cargas por cada VSD, respectivamente. Por su parte, la unión del Ca^{2+} (K) depende exclusivamente de la concentración del Ca^{2+} intracelular y de la constante de disociación (K_d) de cada sensor de calcio. Por último, en L , parámetro que representa el equilibrio entre los estados cerrado y abierto, vemos una característica particular de este canal, que es que existe una dependencia del voltaje inclusive cuando todos los VSD están en posición de reposo. Esta dependencia de voltaje, definida por z_L (número aparente de cargas asociadas al proceso) es significativamente menor a la observada en los VSD (z_j). Además, L está determinado por L_0 que es la constante de equilibrio para la apertura del canal cuando los sensores están en reposo, en ausencia de calcio y a potencial 0.

Entonces, cuando ambos tipos de sensores están en reposo el canal tiene una probabilidad de apertura basal con leve dependencia del voltaje, del orden de 10^{-6} , denominada *gating* intrínseco. Según este modelo, cuando cada sensor de voltaje o de calcio se activa, la constante de equilibrio del PGD (L) se multiplica por el factor alostérico correspondiente (D o C , respectivamente), favoreciendo la transición hacia el estado abierto del canal. Por ejemplo, la activación de un sensor de voltaje

multiplica el valor de L por D, mientras que la activación de los cuatro sensores de voltaje multiplica L por D^4 . El modelo permite ver que la activación de los VSDs del canal puede llevar a la apertura del PGD aún en ausencia de Ca^{2+} y, a su vez, que el aumento del Ca^{2+} intracelular puede aumentar la probabilidad de apertura del canal en ausencia de un estímulo de voltaje.

Diferentes enfoques experimentales han puesto en evidencia las interacciones planteadas en dicho modelo funcional y han permitido responder numerosas preguntas relacionadas al mecanismo de funcionamiento de este canal [9]. El modelo alostérico ha sido extremadamente exitoso no solo para explicar las características biofísicas del canal BK originadas en cambios estructurales de la subunidad α , sino también para explicar el funcionamiento del canal asociado a subunidades accesorias β [77].

CANAL BK Y ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos (AGs) constituyen elementos integrales de las membranas celulares en las cuales se insertan, entre otras, las proteínas que forman canales iónicos. Muchos de estos AGs son liberados como mediadores químicos ante la presencia de un estímulo de señalización celular [111], por lo tanto, además de su rol fundamental como componentes estructurales de la membrana celular son importantes mensajeros en el proceso de señalización celular.

En relación al canal BK, se ha reportado que diversos AGs, como los ácidos palmitoleico, oleico, linoleico, linolénico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico (DHA) y araquidónico (AA), modulan este canal [112–115]. Estos estudios, en conjunto, han demostrado que los AGs son capaces de activar al canal BK cuando reúnen las siguientes características moleculares: una cadena de más de ocho átomos de carbono, una o más insaturaciones *cis* y una cabeza con carga negativa. Por el

contrario, los AGs saturados y los insaturados *trans*, neutros o de cadena corta, no tienen efecto sobre la actividad de este canal.

Otros estudios sobre los efectos de AGs sobre el canal BK han puesto en evidencia la importancia de la presencia de las distintas subunidades β en la definición del perfil farmacológico del canal. Por ejemplo, se ha demostrado que el DHA potencia la activación del canal en presencia de la subunidad $\beta 1$ o $\beta 4$ [116,117] y que la acil-CoA requiere de $\beta 2$ [118]. Por otro lado, en distintos tipos de CML (bronquial, mesentérico, coronario), pudo observarse la activación del canal BK por los AGs utilizando la técnica de *patch-clamp* en la configuración *Inside-Out* (IO), es decir en forma independiente de la integridad celular ya que se registra la actividad del canal en una pequeña porción de membrana escindida del resto de la célula [112,119,120].

El mecanismo de acción de estos AGs a nivel molecular es un aspecto interesante de estudio ya que existen varias hipótesis de trabajo que presentan controversias aún no dilucidadas. La naturaleza lipofílica de los AGs les confiere la propiedad de disolverse en la membrana celular y de este modo podrían ejercer una acción inespecífica sobre proteínas de transmembrana como los canales iónicos. Además, la posibilidad de que los AGs sufran modificaciones enzimáticas y/o modificación por especies reactivas del oxígeno también fue planteada como mecanismos de modulación indirecta por los productos de dichas reacciones. Por otro lado, las bajas concentraciones necesarias para ver activación del canal (del orden 1-10 μM) junto a las evidencias antes mencionadas sobre el requerimiento estructural de los AGs, la selectividad de distintos AGs por las subunidades $\beta 1-4$ del canal BK y la persistencia de su efecto en la configuración IO, llevaron a proponer mecanismos de acción específicos y directos. En este sentido, en los últimos años han sido reportadas evidencias teóricas y experimentales en distintos tipos de canales iónicos que sugieren la existencia de sitios de unión específicos para los ácidos grasos y otros lípidos [100,121–123]. La hipótesis de un mecanismo de acción directo que implica la unión de un lípido como ligando a un sitio específico del canal BK fue confirmada para el ácido litocólico (LTA), un lípido de estructura esteroidea, por Bukiya y col., quienes pudieron identificar que el LTA interactúa con el segmento transmembrana TM2 de la subunidad $\beta 1$ [75,122,124].

ÁCIDO ARAQUIDÓNICO, CANAL BK Y FACTORES ENDOTELIALES

El ácido araquidónico (AA), también denominado ácido eicosatetraenoico es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces *cis* en las posiciones 5, 8, 11 y 14, como se puede observar en la Figura 18. Es el ácido eicosanoico más abundante en el hombre y pertenece a la familia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés *polyunsaturated fatty acids*) esenciales en la estructura fosfolipídica de la membrana celular, así como en numerosos procesos de regulación génica, señalización mediada por receptores, sustrato de enzimas intracelulares, entre otros [111].

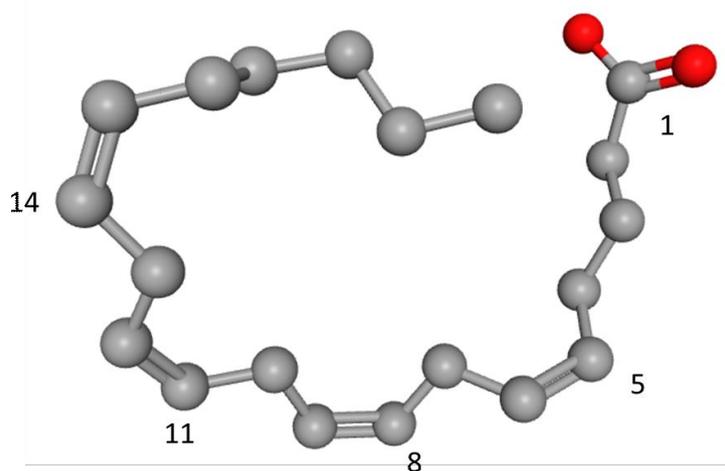


Figura 18. Molécula de ácido araquidónico. Estructura 3D obtenida por cristalografía de rayos X (PDB: 1ADL; el cristal se generó con una proteína unidora de lípidos complejada con AA; CITA). En gris se muestran los átomos de C y en rojo los de O (los átomos de H no se muestran). En las posiciones de C 5, 8, 11 y 14 se encuentran los dobles enlaces *cis* [125].

El mismo se obtiene a partir de la dieta y también puede sintetizarse a partir del ácido linoléico por elongación y desaminación en el hígado. La concentración de AA libre en plasma está en el rango de 5.8 a 49.3 μM en humanos [126,127], pero puede encontrarse aumentada en condiciones patológicas como la preeclampsia [127].

A nivel celular, el AA puede encontrarse formando parte del fosfatidilinositol y de otros fosfolípidos en las membranas celulares, esterificando al C₂ del glicerol, y puede ser liberado gracias a la acción de fosfolipasas como PLA1, 2, C y D [111]. El AA libre puede reincorporarse a los fosfolípidos, difundir al exterior celular o ser metabolizado por distintas enzimas. Dicho metabolismo puede producirse por tres vías, cuyas enzimas son las ciclooxigenasas (COX), las lipooxigenasas (LOX) y las epoxigenasas (pertenecientes al citocromo P450, CYP), generándose una gran variedad de metabolitos de actividad relevante (prostaciclina, leucotrienos y ácidos epoxieicosatrienoicos, respectivamente) [111,128] (Figura 19). Los metabolitos del AA han sido ampliamente estudiados dada su participación en diversos procesos fisiológicos, como la vasorrelajación dependiente de endotelio [20,128,129], la agregación plaquetaria, la contracción bronquial, el flujo sanguíneo renal y la secreción estomacal de mucus [111]. Además, muchos de ellos juegan un rol importante en los procesos inflamatorios [130].

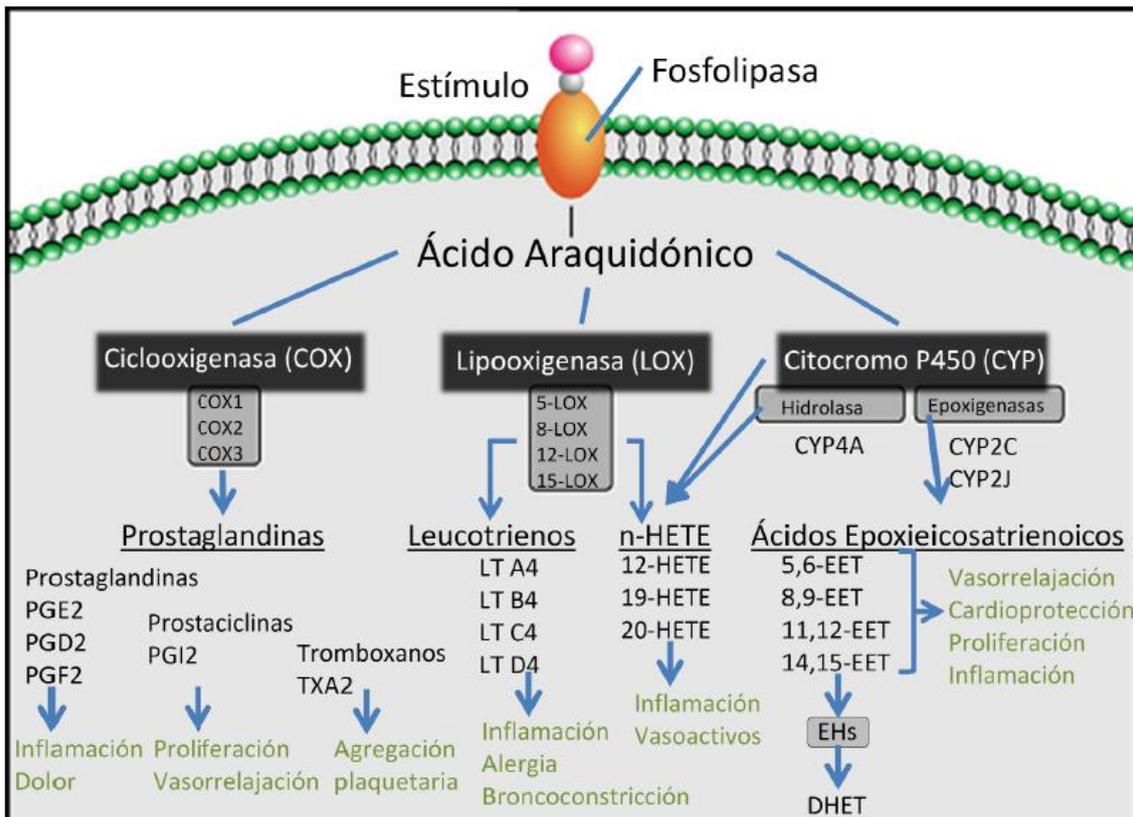


Figura 19. Principales vías de metabolización del AA. Se muestran las tres vías de metabolización, las enzimas involucradas y los productos obtenidos. En verde se

mencionan los procesos fisiológicos y fisiopatológicos en los que estos últimos están involucrados. Figura modifica de Panigrahy D. y col. (2010) [134].

A nivel vascular, se ha descrito que diversos agonistas como acetilcolina, histamina y bradiquinina (según el vaso sanguíneo) inducen la generación de AA a nivel endotelial mediante la activación de las fosfolipasas A2, C y D. Luego, al igual que en otros tejidos, el mismo puede utilizarse como sustrato para generar sus metabolitos activos. Entre ellos, el primero en ser descrito fue la prostaciclina (PGI₂), con importante acción vasodilatadora y antiagregante plaquetaria, actuando de manera paracrina en las CMLV [131]. Posteriormente, se publicaron numerosos reportes que muestran efectos vasodilatadores mediados por distintos metabolitos del AA [128,132,133].

Además, la acción directa de este ácido graso fue tempranamente propuesta por Lonigro y col. en 1994 [135], quienes demostraron acciones vasodilatadoras del AA que permanecen cuando se inhiben las tres vías metabólicas. Adicionalmente, el grupo de Gutterman [136] demostró en un tejido vascular humano (arterias coronarias) que el AA es capaz de inducir relajación vascular e hiperpolarización de la membrana celular, en presencia de inhibidores de las enzimas COX, LOX y CYP. Si bien encontraron evidencias de que más de un canal de K⁺ podría estar implicado, no se indagó profundamente el mecanismo por el cual se produce la hiperpolarización, pudiendo ser el canal BK un candidato posible a estar involucrado en este efecto.

Respecto a la acción del AA sobre canales iónicos, actualmente se conoce que el mismo modula en forma directa diferentes tipos de canales iónicos de K⁺ (Kv, K2P, BK), Na⁺(Nav) y Ca²⁺ (Cav) [113,137–141]. Su efecto sobre el canal BK fue estudiado mediante la técnica de *patch-clamp* en diversos trabajos, los cuales muestran evidencias de que el AA puede activar este canal en forma directa. Los trabajos de Kirber y col. y Ahn y col. observaron la activación del canal BK por AA como un aumento en la probabilidad de apertura en corrientes de canal único, en CML de arterias pulmonar y coronaria de conejo, respectivamente, y propusieron que su acción es directa basándose en que la misma ocurre en la configuración *Inside-Out*, libre del entorno celular e independiente de la maquinaria intracelular [112,120].

Denson y cols. descartaron que el AA actúe a través de cambios en la curvatura y fluidez de la membrana en el entorno del canal BK, ya que las mismas ocurren a concentraciones superiores a la necesarias para activar el canal [113]. Además, descartaron la participación de especies reactivas del oxígeno, dado que la activación persiste en presencia de *scavengers* de dichas moléculas [113]. Por otro lado, la posibilidad de que el AA genere un cambio en el campo eléctrico de la membrana, causado por su incorporación en la misma, y de que active indirectamente al canal BK por movilización de calcio (en *Inside-Out*) o por modulación de kinasas o fosfatasa que pudieran estar ancladas en el parche de membrana, fue descartada en el trabajo de Clarke y col. [119].

Respecto al efecto del AA en función de la composición del canal BK, Sun y col. han demostrado que la activación depende de la subunidad β que está siendo expresada en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estos autores examinaron la acción del AA sobre los canales BK expresados con o sin las subunidades $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$, observando una activación significativa del canal solo en presencia de las subunidades $\beta 2$ o $\beta 3$ [142]. Sin embargo, no analizaron qué ocurría con el canal BK co-expresado con $\beta 1$.

Por lo tanto, si bien se conoce que el AA activa al canal BK, el mecanismo biofísico por el cual produce un aumento en la probabilidad de apertura y su correlación con cambios en los dominios funcionales del canal, como son el sensor de voltaje, los sitios de unión a calcio y la región del poro, y el rol de la subunidad $\beta 1$, entre otras posibilidades, no han sido explorados.

En este trabajo de Tesis doctoral investigamos en profundidad el mecanismo de acción del mencionado efecto. Demostramos que el AA es capaz de activar al canal BK solo cuando el mismo se encuentra asociado a la subunidad $\beta 1$ y que su mecanismo de acción involucra una estabilización del sensor de voltaje en el estado activado y un aumento en el *gating* intrínseco del canal, sin modificar su dependencia de la concentración de Ca^{2+} . Esta activación fue también observada en CMLV de origen humano, donde promovió a la hiperpolarización de la membrana. Finalmente, observamos que el AA tiene un rol vasorrelajante sobre la arteria mesentérica de rata *ex vivo*, que disminuye cuando los canales BK no son funcionales.

Objetivos



OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo de Tesis doctoral es contribuir al conocimiento y desarrollo de un área de base, de importante impacto sobre la salud humana como lo es la fisiología vascular. En particular nos interesa aportar al conocimiento de los mecanismos vasodilatadores mediados por la activación de canales de K^+ . En este caso planteamos abordar el estudio molecular del mecanismo de acción de activación de canales de tipo BK inducido por el ácido araquidónico (AA), una sustancia endógena capaz de ser liberada por el endotelio vascular. El AA participa directa o indirectamente, a través de sus metabolitos, en la regulación de numerosas y diversas funciones celulares. A nivel del músculo liso de los vasos sanguíneos, los metabolitos del AA poseen un rol modulador del estado contráctil del músculo liso que puede involucrar la activación de canales de tipo BK [20,128,143]. Mediante la activación de esta vía es posible generar vasodilatación de determinados lechos vasculares entre otros efectos posibles de relevancia fisiológica y fisiopatológica que involucren la función del músculo liso [128]. Teniendo en cuenta la relevante función que tiene el canal BK en el músculo liso, especialmente en la regulación del potencial de membrana celular en función de la concentración intracelular de calcio [9], el objetivo general de este plan es estudiar, a nivel molecular y funcional, el mecanismo de acción del AA sobre el canal de K^+ de tipo BK, focalizado en su posible acción directa AA y el rol de la subunidad accesoria $\beta 1$, altamente expresada en el músculo liso. Por lo tanto, el estudio del mecanismo de acción molecular del AA sobre este canal, contribuye a la generación de conocimiento en el campo de la fisiología y fisiopatología del músculo liso y asienta las bases para el desarrollo de moléculas con actividad sobre este canal iónico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos están dirigidos al estudio del impacto fisiológico de los efectos del AA en sistemas nativos (células de músculo liso disociadas de la arteria umbilical humana y lecho vascular mesentérico de rata aislado) y al estudio del mecanismo de acción molecular directo del AA sobre el canal BK, en un sistema de expresión heterólogo (células HEK293T, HEK293 y ovocitos de *Xenopus laevis*). En particular nos proponemos:

1. Estudiar la relevancia de los efectos del AA sobre las propiedades funcionales del canal BK en un sistema nativo, tomando la célula de músculo liso vascular de la arteria umbilical humana como objeto de estudio.
2. Analizar si el AA tiene efectos moduladores de la presión arterial en el lecho mesentérico completo de rata, utilizado como modelo de resistencia periférica.
3. Caracterizar el mecanismo molecular de acción del AA sobre el canal BK expresado en un sistema de expresión heterólogo. En este sentido proponemos:
 - a) Analizar del rol de la subunidad $\beta 1$ en el mecanismo de acción del AA.
 - b) Estudiar de la dependencia del metabolismo del AA para la activación del canal BK.
 - c) En el marco del modelo de regulación alostérica del canal BK [104], analizar si el efecto activador del AA sobre el canal BK se logra a través de modificaciones en la actividad de alguno de sus dominios funcionales. Para ello estudiaremos el efecto del AA sobre los sensores de voltaje, los sensores de Ca^{2+} intracelular y el dominio del poro del canal.

Materiales y Métodos



REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PATCH-CLAMP: GENERALIDADES

La técnica de *patch-clamp* fue la principal técnica utilizada para el desarrollo de esta Tesis doctoral. La misma permite medir corrientes iónicas de membrana manteniendo el potencial de la misma en valores controlados (en inglés, *voltage-clamp*) o medir la variación del potencial de membrana ante un estímulo de corriente (en inglés, *current-clamp*). Es por lo tanto, la técnica ideal para estudiar el funcionamiento en tiempo real de los canales iónicos, pudiendo identificar los iones que transportan la corriente, la magnitud de las mismas, su sensibilidad al voltaje, a drogas y a estímulos de diferente tipo [144]. En la Figura 1 se presenta un esquema básico de esta técnica.

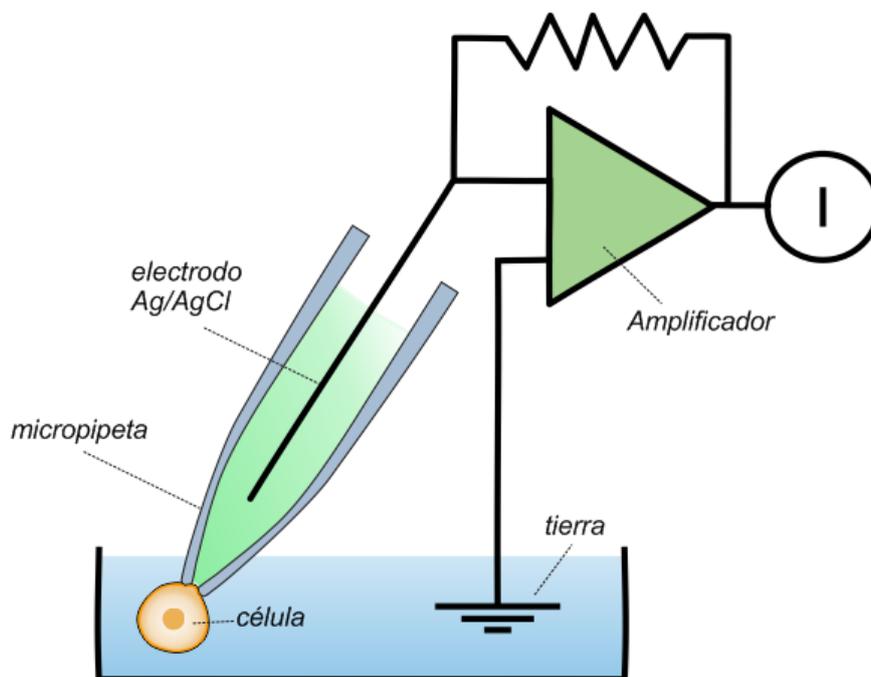


Figura 1. Esquema básico la técnica de *patch-clamp*. Mediante el circuito eléctrico empleado, en el modo *voltage-clamp*, el amplificador operacional permite controlar el voltaje aplicado y registrar la corriente que circula entre los electrodos de la pipeta y del baño (electrodo de tierra).

La técnica se inicia con la aproximación de una micropipeta de vidrio, por medio de un micromanipulador, a la superficie de la membrana de la célula elegida bajo el microscopio invertido. Para ello, la micropipeta se coloca en un dispositivo (conocido como *holder*) montado sobre el micromanipulador y que sostiene un electrodo de Ag/AgCl, el cual queda sumergido en la solución que contiene la micropipeta, como se muestra en la Figura 1.

Una vez establecido el primer contacto entre la micropipeta y la membrana celular, se aplica una suave succión desde la micropipeta que permite establecer un sello de alta resistencia (en inglés, *Giga-seal*), de aproximadamente 10 G Ω , entre el vidrio de la misma y la membrana celular. A esta condición, esquematizada en la Figura 2, se la denomina configuración *Cell-Attached* (CA).

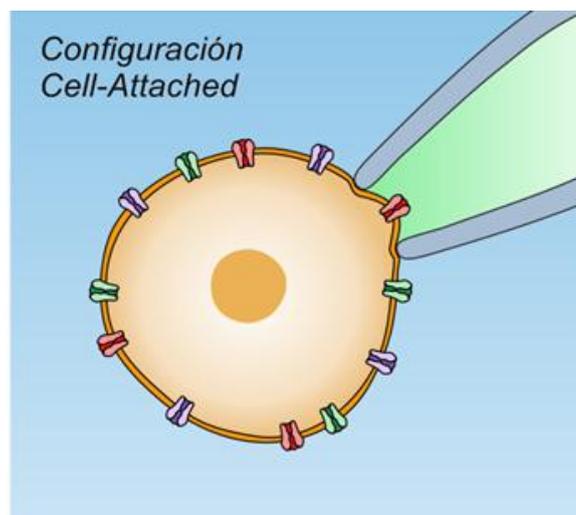


Figura 2. Esquema de la configuración *Cell-Attached*.

En CA tanto la solución de la micropipeta (SP) como la del baño (SB) están en contacto con la cara externa de la membrana celular, de manera que se mantiene la integridad de la célula y se conservan todas las interacciones y regulaciones intracelulares de la célula sellada. Esta configuración permite registrar las corrientes de los canales iónicos presentes en la porción de membrana, que se invagina en la punta de la micropipeta, llamada parche (en inglés, *patch*). De esta manera, se pueden registrar corrientes de canal único o corrientes macroscópicas, dependiendo de la

densidad de canales iónicos presentes en el parche. Cuando el nivel de expresión de canales iónicos es bajo o moderado, como ocurre en sistemas nativos, esta configuración permite registrar la corriente iónica durante las aperturas de los canales iónicos en forma individual (corrientes unitarias o de canal único), las cuales se observan como saltos discretos en el nivel de corriente registrada. Sin embargo, si en el parche de membrana coexisten un gran número de canales iónicos, como puede ocurrir en sistemas de expresión heteróloga, se generan corrientes macroscópicas aún en esta configuración. Registros típicos de estos dos tipos de corrientes se pueden observar más adelante en la Figura 4.

A partir de la configuración de CA, se puede lograr el pasaje a las dos configuraciones utilizadas en este trabajo de Tesis: *Inside-Out* (IO) y *Whole-Cell* (WC). En la configuración IO se escinde la porción de membrana sellada del resto celular, mediante el desplazamiento de la micropipeta con el micromanipulador (Figura 3).

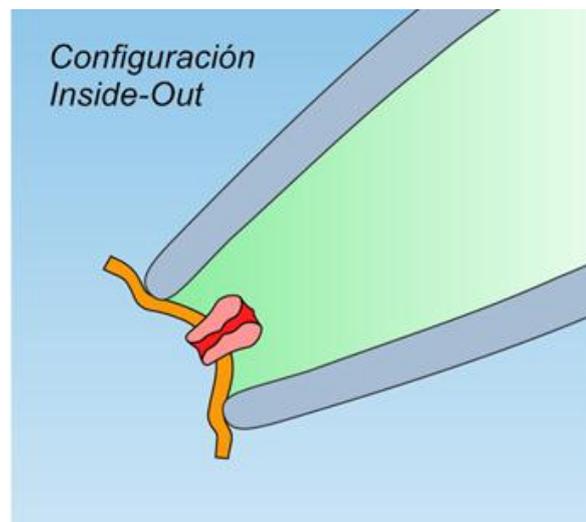


Figura 3. Esquema de la configuración *Inside-Out*.

De esta manera, la punta de la misma mantiene adherida la porción de membrana celular sellada, y su cara intracelular está ahora en contacto con la solución del baño donde se encontraba la célula. Esta configuración, al igual que la anterior y como se esquematiza en la Figura 4, permite el registro tanto de corrientes de canales iónicos individuales (cuando el número de canales es bajo) como de corrientes

macroscópicas (cuando el número de canales es elevado). La configuración IO tiene la ventaja de que nos permite controlar en forma precisa la composición de las soluciones que se ponen en contacto con ambos lados de la membrana celular, así como independizarnos de los efectos de las regulaciones intracelulares sobre el canal de interés.

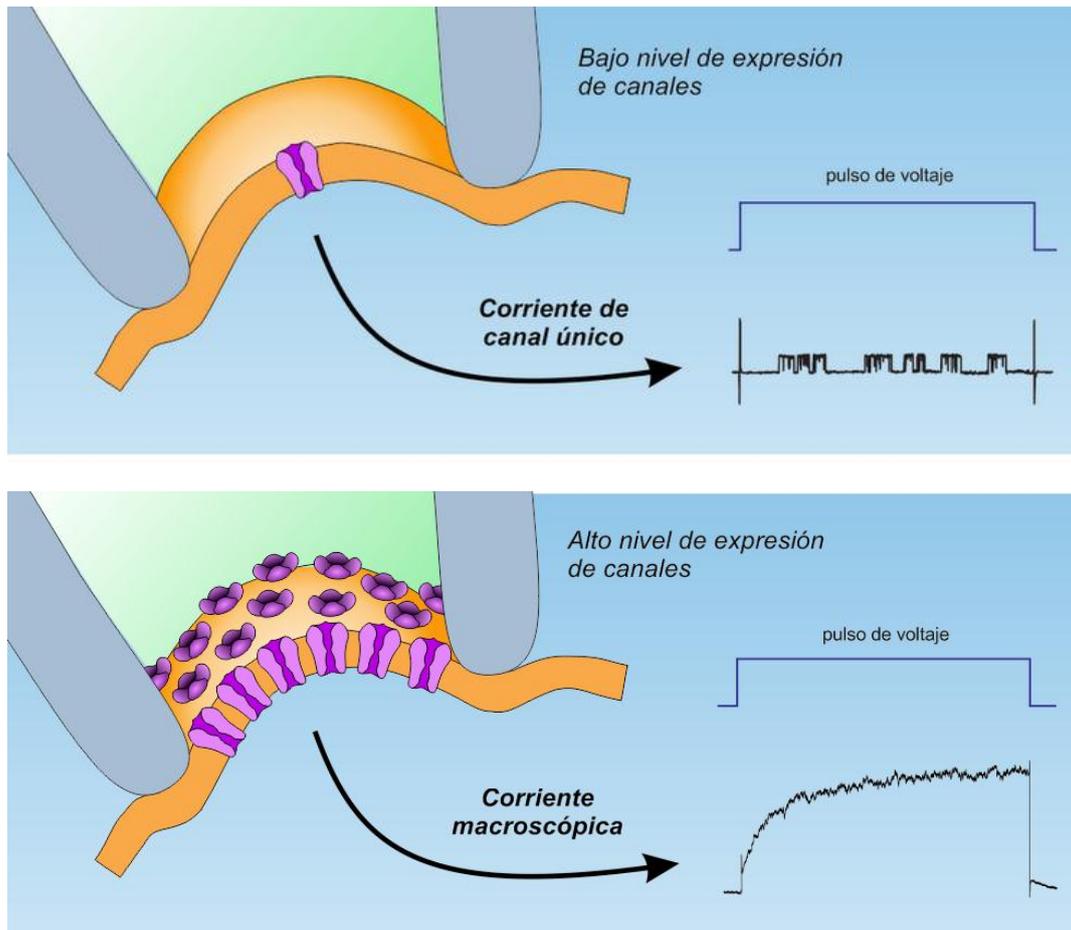


Figura 4. Esquema de los distintos tipos de registros de corrientes que se obtienen al aplicar un pulso de voltaje en dos niveles diferentes de expresión de canales iónicos. Panel superior: muestra una corriente de canal único obtenida cuando el nivel de expresión de canales es bajo. Panel inferior: muestra una corriente macroscópica obtenida cuando el nivel de expresión de canales es alto. En ambos casos se esquematiza un parche en configuración IO, pero las corrientes podrían obtenerse también en la configuración CA.

Para obtener la configuración WC también es necesario partir de la configuración CA, solo que en este caso se realiza una segunda presión negativa desde

la micropipeta, que logra retirar la porción de membrana bajo el área de la misma manteniendo el sello de alta resistencia (Figura 5). De esta manera, la SP dializa la célula y se establece una conexión eléctrica entre el electrodo (en contacto con la SP) y el interior intracelular. En WC es posible registrar corrientes macroscópicas mediadas por la totalidad de los canales iónicos presentes en la membrana celular. Esta configuración representa un buen modelo para el estudio de canales iónicos en condiciones cercanas a las fisiológicas, dado que permite mantener intactas gran parte de las estructuras intracelulares y, respetando los gradientes de los distintos iones a ambos lados de la membrana, permite registrar las corrientes que mantienen el potencial de membrana en reposo.

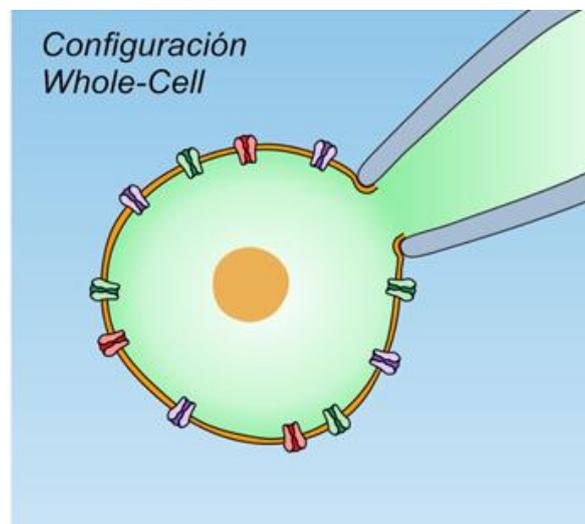


Figura 5. Esquema de la configuración Whole-Cell.

En todas las configuraciones, las células se observaron con un microscopio invertido de epifluorescencia (*Arcano*; China) estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria (*Newport*) recubierto con una caja de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente. La señal de corriente iónica fue registrada en función del tiempo, con un amplificador *Axopatch 200A* (*Axon Instruments*, Foster City, CA), se filtró adecuadamente con un filtro de tipo Bessel de 8 polos a una frecuencia de 2 kHz y se digitalizó (*Digidata 1440 Molecular Devices*, San José, CA, USA) con una frecuencia de muestreo de 16 kHz. Todos los registros fueron analizados con el software *Clampfit 10.3* (*Molecular Devices*, San José, CA, USA).

Las micropipetas fueron fabricadas en el momento de su uso empleando vidrio WPI PG52165-4 (*World Precision Instruments*) y un equipo de calentamiento y estiramiento controlado (*Micropipette puller PP-83, Narishige Scientific Instrument*). La punta de cada micropipeta fue pulida para mejorar la calidad de los sellos utilizando una forja MF-83 (*Microforja Narishige Scientific Instrument*). En nuestro caso utilizamos micropipetas de una resistencia de entre 2 y 4 M Ω , cuya punta tiene un área de aproximadamente 1.5 μm^2 .

Las diferentes SB utilizadas fueron perfundidas con una pipeta multivías colocada en la proximidad de la célula investigada. Luego de ensayar un protocolo en una célula, se reemplazó la cámara experimental por otra conteniendo una nueva muestra de células. Las distintas drogas ensayadas fueron agregadas sobre las soluciones estándares utilizadas y, en el caso que correspondiera, los controles fueron realizados en presencia del solvente en el cual se disolvió la droga. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente 20-22 °C.

El ácido araquidónico (AA; *Sigma Aldrich*) fue disuelto en DMSO (*Sigma Aldrich*) y almacenado a -20 °C protegido de la luz, en atmósfera de nitrógeno y fraccionado en alícuotas listas para su uso, con el fin de evitar su degradación por oxidación. En el momento del experimento se agregó una alícuota a la SB y se utilizó la solución preparada con AA solo durante ese día, desechando lo que pudiera quedar sobrante luego de concluido el día experimental.

ESTUDIOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA

Para abordar el estudio fisiológico de la modulación del canal BK por AA en células de músculo liso vascular (CMLV), utilizamos la arteria umbilical humana (AUH), uno de los vasos sanguíneos del cordón umbilical fundamental en la circulación feto-placentaria durante la vida intrauterina. El mismo tiene origen en la aorta fetal y su

función es transportar la sangre fetal desoxigenada hacia la placenta donde se produce su oxigenación. Tomando un segmento del cordón umbilical en el momento del parto es posible aislar esta arteria, obteniendo así una muestra de tejido vascular humano a partir de la cual podemos obtener células musculares lisas (CML) aisladas para el estudio del canal iónico de interés. Cabe destacar que esta arteria constituye un modelo experimental muy interesante para el estudio de la fisiología vascular, dado que permite abordar, en un tejido humano sano, el estudio de estructuras celulares que participan en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular y por ende en el grado de contracción de la arteria y resistencia al flujo sanguíneo.

Obtención de la muestra y disociación celular

Utilizamos segmentos vasculares de la AUH obtenidos a partir de muestras de cordones umbilicales provistos por el servicio de obstetricia del Instituto Central de Medicina y del Hospital Gutiérrez, de La Plata. Luego del parto se obtiene un segmento de 10-15 centímetros de la parte medial del cordón umbilical (Figura 6.a y b), el cual se introduce en una solución de Krebs Ringer Bicarbonato (KRB, con la siguiente composición en mM: NaCl 130, KCl 4.7, Na_2HPO_4 1.17, MgSO_4 1.16, NaHCO_3 24, CaCl_2 2.5, pH ajustado a 7.4 con carbógeno) sin glucosa y se conserva a 4 °C hasta su utilización (dentro de las siguientes 24 horas). A partir del mismo, en el laboratorio se procede a la disección de la arteria umbilical, aislándola completamente del tejido circundante (gelatina de Wharton), como se muestra en las Figuras 6.c y d. Los segmentos arteriales aislados se utilizan inmediatamente para la disociación de las CML mediante un proceso enzimático. La obtención de las CML aisladas de la AUH se realizó a partir del protocolo de disociación celular descrito por Klockner (1993) y posteriormente modificado en nuestro laboratorio [43,145]. El método consiste en colocar un segmento arterial de entre 20 y 40 mg cortado en piezas de aproximadamente 2 x 2 mm en un medio con la siguiente composición (en mM): ClNa 140, KH_2PO_4 4.7, Cl_2Mg 1.2, HEPES 5, glucosa 6, pH ajustado a 7.4 con NaOH (solución de disociación, SD). Luego de 30 minutos se transfiere el tejido a un tubo conteniendo 1 ml de la SD a la cual se le adiciona 2-3 mg de colagenasa tipo I (*Sigma Aldrich*). El

tubo con el tejido se coloca en un baño termostático a 35 °C con agitación suave. Cada 15-20 minutos, se realiza una dispersión mecánica utilizando una pipeta Pasteur y se hacen extracciones sucesivas de las células musculares aisladas resultantes, las cuales se separan de la solución por centrifugación y se resuspenden en la SD libre de enzimas. Las células musculares aisladas y resuspendidas en cada instancia se colocan en una cámara de Petri de 3 ml con fondo de vidrio, apta para microscopio invertido. Las células disociadas se usan durante las 5 a 6 horas posteriores a la disociación y en cada cámara se seleccionan por su aspecto ahusado y relajado (Figura 7) para intentar obtener sellos con las micropipetas de vidrio de *patch-clamp*.

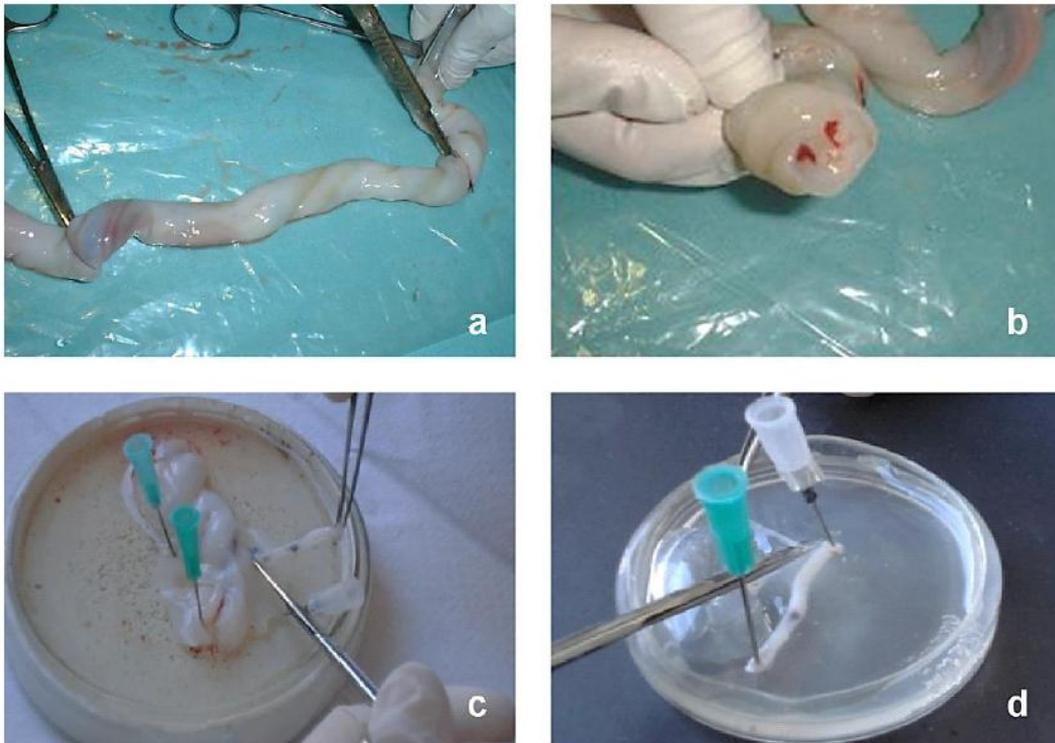


Figura 6. Fotografías del cordón umbilical tomadas en el quirófano y de la arteria aislada en nuestro laboratorio. **a:** selección de un segmento de 10-15 cm de la porción medio del cordón umbilical. **b:** corte transversal donde pueden distinguirse las dos arterias umbilicales. **c, d:** procedimiento de disección de una arteria umbilical.



Figura 7. Imagen de las células de músculo liso de la arteria umbilical humana aisladas en nuestro laboratorio (microscopio óptico objetivo de 40X).

Estudio del efecto del AA en corrientes macroscópicas medidas en configuración Whole-Cell

Como mencionamos anteriormente, la configuración WC permite registrar las corrientes iónicas mediadas por todos los canales presentes en la membrana, en respuesta a un pulso de voltaje (modo *voltage-clamp*). Durante el desarrollo de esta serie experimental se registró la corriente macroscópica evocada mediante la aplicación de protocolos de voltaje en forma de un pulso rectangular. Estos pulsos consisten en un cambio instantáneo del valor de potencial de *clamp* desde un valor determinado (potencial de mantenimiento) a otro valor de potencial que se mantiene constante durante el tiempo deseado y luego retorna en forma instantánea al valor inicial de mantenimiento.

Las corrientes macroscópicas se registraron en condiciones control y luego del agregado de AA, y el efecto del AA fue analizado a partir de las relaciones corriente (I) vs. voltaje (V) (curvas I-V). Para construir estas curvas, la corriente macroscópica fue evocada por un protocolo de sucesivos pulsos de voltaje de 500 ms de duración en el rango de -70 a +60 mV, con incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -50 mV (Figura 8.a). El valor medio de la corriente evocada a cada

potencial fue medido entre los 400 y 450 ms desde el inicio del pulso (momento en el cual la corriente alcanzó el estado estacionario, Figura 8.b) y fue normalizado por la capacitancia de la célula (parámetro proporcional a la superficie de la membrana), con el fin de reducir la variabilidad debida al tamaño de las CML. Para ello, el valor de la corriente a cada potencial (medido en amperes, A) fue dividido por el valor de la capacitancia de la membrana celular (medido en faradios F, calculado a partir de la corriente capacitiva obtenida desde un registro de un solo pulso hiperpolarizante de 10 mV). Finalmente, los valores de corriente, expresados en pA/pF, fueron graficados en función del voltaje aplicado (curva I-V) y se estimó el valor del potencial de membrana en el reposo como el valor en que la corriente macroscópica se hace nula (potencial de reversión, E_{rev}) (Figura 8.c).

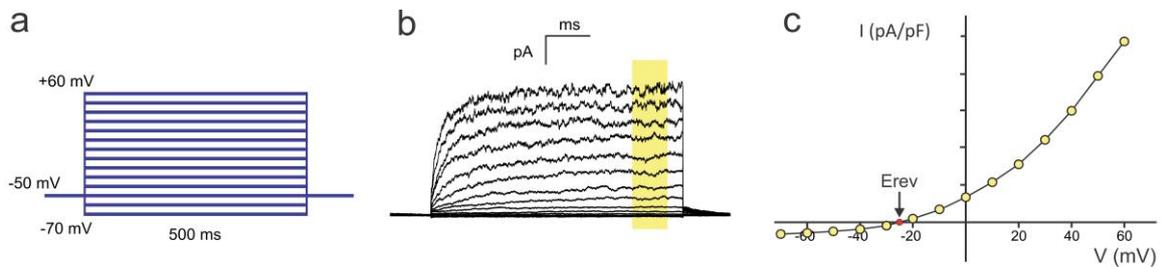


Figura 8. Construcción de curvas I-V. **a:** Esquema del protocolo de voltaje aplicado. **b:** Registro típico de las corrientes obtenidas tras la aplicación del protocolo de voltaje mostrado en **a**. La medida de corriente se realiza en el último tramo del pulso en donde se alcanza el estado estacionario (zona sombreada en amarillo). **c:** Curva I-V obtenida de un registro de corriente como el mostrado en **b**, normalizada por la capacitancia. El valor en el cual la corriente es cero coincide con el E_{rev} (punto rojo).

Para garantizar que las medidas de corriente se obtuvieran en condiciones estables, la misma fue monitoreada a través de un único pulso de voltaje desde un potencial de mantenimiento de -50 mV hasta un potencial de +40 mV durante todo el experimento, con el fin de registrar los cambios temporales de la misma en cada condición ensayada (Figura 9). Una vez alcanzado el efecto estable en cada condición (varios pulsos sin cambios en el valor de corriente de estado estacionario) se realizó el protocolo de curvas I-V antes descrito.

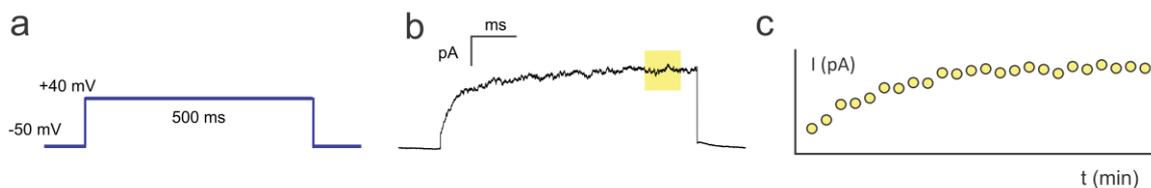


Figura 9. Control de la estabilidad de la corriente. **a:** Esquema del protocolo de voltaje aplicado. **b:** Registro típico de la corriente obtenida tras la aplicación del protocolo de voltaje mostrado en **a**. La medida de corriente se realiza en el estado estacionario (zona sombreada en amarillo). **c:** Gráfico de Corriente vs. tiempo obtenido de registros de corriente como el mostrado en **b**.

Por otro lado, a partir de los registros de corriente con los que se construyeron las curvas I-V, fue posible analizar los efectos del AA sobre la cinética de activación de la misma a cada uno de los voltajes aplicados. La constante temporal de activación (τ_{act}), en cada condición, fue obtenida a partir del ajuste con una función exponencial de primer orden de los trazos de corriente correspondientes a cada valor de potencial, según la siguiente ecuación:

$$I_x = Ae^{t/\tau_x}$$

donde τ_x es la constante temporal de activación de la corriente evocada (I_x) por un pulso de voltaje a x mV y t es el tiempo que transcurre desde el inicio del pulso de voltaje.

Se utilizaron tres soluciones estándares para los registros en WC:

- Solución intracelular de la micropipeta (SI), con la siguiente composición en mM: KCl 130, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 0.1, CaCl₂ 0.1, Na₂ATP 5, llevada a pH 7.3 con KOH.
- Solución extracelular del baño (SE) **4-AP 5 mM**, con la siguiente composición en mM: NaCl 130, KCl 5.4, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, HEPES 5, Glucosa 6, 4-AP 5, llevada a pH 7.4 con HCl.

- Solución extracelular del baño (SE) **paxilina 500 nM**, con la siguiente composición en mM: NaCl 130, KCl 5.4, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, HEPES 5, Glucosa 6, Paxilina 500 nM, llevada a pH 7.4 con NaOH.

La 4-AP (4-aminopiridina, *Sigma Aldrich*) y la paxilina (*Sigma Aldrich*) fueron utilizadas como inhibidores selectivos de los canales de tipo K_v y BK, respectivamente. La 4-AP se agregó directamente en el momento de la preparación de la solución SE, mientras que la paxilina fue agregada a la SE desde una solución madre en DMSO en el momento de su uso.

Análisis del efecto del AA en las curvas de activación por voltaje del canal BK, a nivel de canal único en configuración Inside-Out

Para evaluar si el AA afecta la relación que tiene la probabilidad de apertura (P_o) del canal BK con el voltaje, es necesario construir curvas Po-V. En este trabajo de Tesis, para obtener las mismas utilizamos un protocolo de rampa de voltaje basado en el descrito por Carl y Sanders [146], ya que permite medir rápidamente la activación del canal y provee una lectura continua de la NPo (donde N es el número de canales) a través de un amplio rango de voltaje. Los datos de P_o obtenidos con este protocolo son consistentes con los obtenidos a partir de la relación entre el tiempo que el canal pasa en el estado abierto dividido por el tiempo total de registro de la actividad del canal a potenciales constantes. Esta definición es válida únicamente para el cálculo de P_o en el estado estacionario y requiere de registros temporalmente extensos a cada voltaje evaluado. En cambio, cuando se utilizan rampas de voltaje, al no tratarse de una medida en estado estacionario, es necesario pensar el cálculo de la P_o de otra manera.

Para poder explicar esta metodología debemos introducir antes algunos conceptos básicos. Como ya adelantamos, en la configuración IO es posible obtener registros de corrientes de canal único (a través de canales individuales) en función del tiempo, donde las aperturas del canal se observan como saltos discretos de corriente. La amplitud de la corriente de un canal único (i_x) es siempre idéntica para una dada

condición experimental y está determinada por la diferencia entre el valor de potencial de membrana (V) y el gradiente de concentración del ión permeante (E_x), y por la conductancia unitaria del canal (γ_x), que es una propiedad intrínseca de cada tipo de canal iónico. Por lo tanto, a partir de registros de corriente de canal único se pueden medir los valores de amplitud de corriente (i_x) para cada valor de potencial aplicado (V) y construir un gráfico i_x vs. V (i - V), que relaciona estos parámetros según la siguiente expresión:

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

La conductancia unitaria del canal y la fuerza impulsora ($V-E_x$) determinan la magnitud de la corriente que fluye a través del canal cada vez que este se abre, mientras que la chance de encontrar al canal en el estado abierto está determinada por la probabilidad de apertura (P_o).

Podemos decir que si uno repite n veces un protocolo de estimulación por voltaje del canal, la P_o del mismo puede obtenerse como el número de veces en las que, a un determinado tiempo y voltaje, se observa al canal abierto, dividido n . Si tenemos que cuenta que cuando un canal se halla en estado cerrado la corriente es nula y que cuando está abierto a un mismo voltaje la magnitud de corriente es siempre i , la P_o es equivalente a hacer la relación entre la corriente obtenida al promediar todos los registros (\bar{i}) y la corriente unitaria (i). Además, teniendo en cuenta que en la porción de membrana bajo el área de la pipeta puede haber más de un canal, la probabilidad de encontrar un canal (el que sea) abierto es la sumatoria de las P_o individuales de cada canal, y dado que la apertura de un canal es independiente del estado de los otros canales, este valor obtenido es NP_o , donde N es el número de copias de canal presentes en la membrana. Por lo tanto, la corriente promedio en dicha condición será:

$$\bar{i} = NP_o \times i.$$

El protocolo de rampa de voltaje consiste en aplicar reiteradas veces una rampa de voltaje a un parche de membrana en configuración IO, en el cual se ha observado al

menos una copia del canal BK (identificado por su conductancia unitaria característica). Luego, al promediar las corrientes evocadas por todas las rampas en una misma condición, es posible obtener una relación de corriente promedio de canal único (\bar{i}) en función del voltaje aplicado (curva \bar{i} -V). Teniendo en cuenta lo explicado más arriba, la relación Po vs. voltaje se puede obtener dividiendo la curva \bar{i} -V por los valores de $N \times i$ en cada potencial (Figura 10). N se estima para cada parche como el mayor número de aperturas simultáneas visualizadas en la condición de mayor activación (+80 mV en presencia de AA).

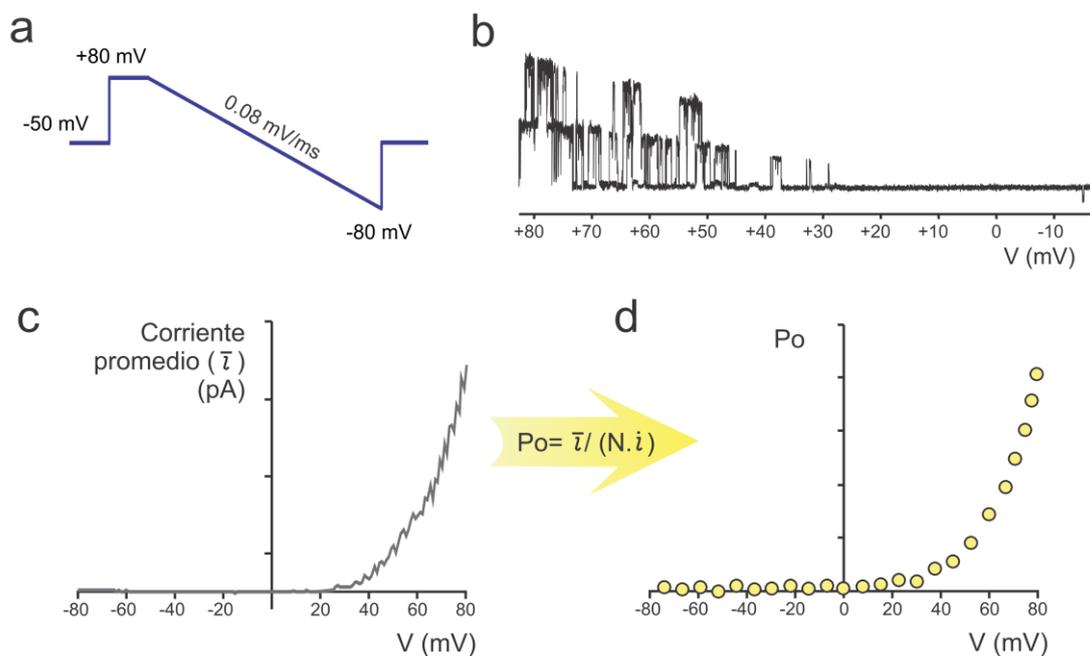


Figura 10. Construcción de curvas Po-V mediante protocolo de rampa. **a:** Esquema del protocolo de rampa de voltaje elegido tras su puesta a punto. **b:** Registro típico de la corriente obtenida tras la aplicación del protocolo de voltaje mostrado en **a**. **c:** Curva \bar{i} -V obtenida al promediar numerosos registros de corriente como el mostrado en **b**. **d:** Curva Po-V obtenida al dividir la corriente promedio por ($N \cdot i$), a cada potencial.

Antes de probar los efectos del AA, pusimos a punto este protocolo para obtener la rampa adecuada para poder construir las curvas Po-V de los canales BK de las CML de la AUH. Primero, realizamos las rampas de voltaje utilizando diferentes concentraciones de Ca^{2+} (100 nM, 50 nM y libre de Calcio) en la solución de baño (en contacto con la cara intracelular) para poder elegir una condición control donde la

actividad basal del canal sea significativa y poder ver aperturas en un rango de voltaje considerable poniendo en evidencia el número de copias del canal en el parche y que a su vez permita estudiar un efecto activador del AA (datos no mostrados). Luego, probamos los protocolos de rampa de voltaje en sentido despolarizante e hiperpolarizante a diferentes velocidades de cambio del potencial aplicado (0.02, 0.04, 0.08 o 0.16 mV/ms), para seleccionar un protocolo lo suficientemente lento que evite la distorsión de las curvas Po-V que puede ocurrir cuando la velocidad del cambio de voltaje de las rampas despolarizantes e hiperpolarizantes es más rápida que la cinética de activación y deactivación del canal, respectivamente. Esta distorsión se observa como una histéresis entre las curvas Po-V obtenidas con rampas despolarizantes e hiperpolarizantes, y se profundiza al aumentar la velocidad de cambio del potencial aplicado (Figura 11). El criterio para la elección de la velocidad de cambio del voltaje fue la máxima velocidad a partir de la cual la curva Po-V se superpone con la curva obtenida para una velocidad menor. Como era de esperar, la rampa hiperpolarizante admitió una mayor velocidad de cambio del voltaje, en concordancia con la mayor velocidad con la que ocurre el proceso de deactivación respecto al de activación en el canal BK (Figura 12).

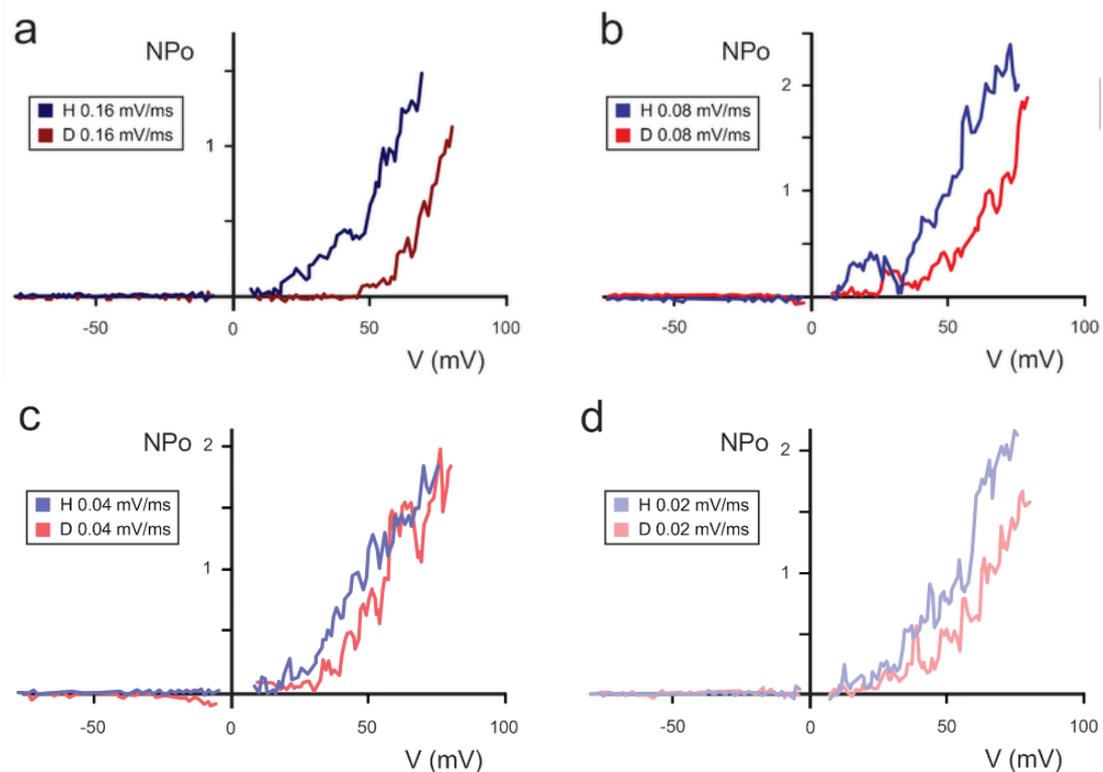


Figura 11. Histéresis entre las curvas NPo-V. Se muestran superpuestas las curvas NPo vs. V típicas obtenidas empleando rampas hiperpolarizantes (H, azul) y despolarizantes (D, roja) a distintas velocidades de cambio de voltaje: 0.16 mV/ms (a), 0.08 mV/ms (b), 0.04 mV/ms (c) y 0.02 mV/ms (d). La histéresis se profundiza cuanto mayor es la velocidad de cambio del potencial aplicado (a). La probabilidad de apertura se expresa como NPo dado que en condiciones control la actividad del canal no es suficiente como para hacer una estimación adecuada de N.

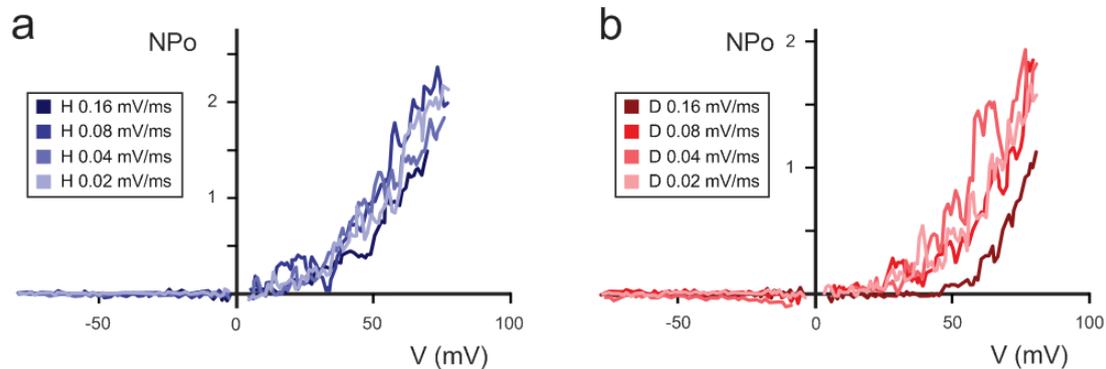


Figura 12. Elección del protocolo de rampa. Se muestran superpuestas las curvas NPo vs. V típicas obtenidas empleando (a) rampas hiperpolarizantes (H) y (b) despolarizantes (D) a todas las velocidades de cambio de voltaje ensayadas. Se seleccionó aquella rampa con la máxima velocidad a partir de la cual la curva NPo-V se superpone con la curva obtenida para una velocidad menor (H 0.08 mV/ms).

Con la información proporcionada por estos experimentos, elegimos aplicar el protocolo de rampa en el sentido hiperpolarizante (desde +80 hasta -80 mV) a una velocidad de cambio de 0.08 mV/ms (Figura 10.a) utilizando una SB con una concentración de Ca^{2+} libre de 50 nM en ausencia (control) y presencia de AA 10 μM . La rampa fue precedida por un pulso de 500 ms a +80 para inducir la activación del canal hasta el estado estacionario. La misma se aplicó entre 15 y 75 veces en cada condición y luego se construyeron las curvas \bar{i} -V y Po-V para ambas condiciones. Finalmente, las curvas Po-V se ajustaron con una relación de Boltzmann, utilizando el programa *GraphPad Prism* (versión 5.01), suponiendo una probabilidad de apertura máxima (Po_{max}) de 1, ya que los parches de membrana no soportaban potenciales más

despolarizados, donde se podría registrar la $P_{o_{max}}$ empírica. La ecuación utilizada para ajustar estas curvas fue:

$$P_o = \frac{1}{1 + e^{\frac{zF(V_{1/2} - V)}{RT}}}$$

donde $V_{1/2}$ es el potencial en el que la P_o es 0.5, z es un valor constante que describe la sensibilidad al voltaje (pendiente de la curva), F es la constante de Faraday (96500 C/mol), R es la constante de los gases (8.314 J/(mol.K)), y T es la temperatura ambiente (aproximadamente 295 K).

Se utilizaron las siguientes soluciones para los registros en la configuración IO:

- Solución extracelular de la micropipeta (SP), con la siguiente composición en mM: KCl 140, MgCl₂ 0.5, HEPES 10, Glucosa 6, CaCl₂ 1, llevada a pH 7.4 con KOH.
- Solución intracelular del baño (SB), con la siguiente composición en mM: KCl 140, MgCl₂ 0.5, HEPES 10, Glucosa 6, EGTA 1, llevada a pH 7.4 con KOH.

Las SB con diferentes concentraciones de CaCl₂ se obtuvieron mediante agregados de volúmenes adecuados de una solución madre acuosa 1M de Ca²⁺ (*Lab. Olivieri*). El cálculo para obtener las concentraciones de Ca²⁺ libre ensayadas se realizó usando el programa: *Maxchelator* de *Stanford University*: <http://maxchelator.stanford.edu>.

Modificación de la cinética de activación por voltaje del canal BK por AA, medida a nivel de canal único en configuración de Inside-Out

Para estudiar el efecto del AA en la cinética de activación de las corrientes mediadas por el canal BK en la configuración IO, evaluamos el cambio en la constante temporal de activación (τ_{act}) obtenida a partir de un protocolo de medida de la latencia a la primer apertura del canal después de un pulso de voltaje despolarizante. Para ello, adaptamos el protocolo establecido por Aldrich y cols. [147], aplicando de

manera repetida un pulso de voltaje de 500 ms desde un potencial de mantenimiento de -80 mV hasta un valor despolarizado de +80 mV (Figura 13.a), utilizando las mismas soluciones descritas en el inciso anterior. Sólo se utilizaron parches con menos de 4 copias del canal BK, y el protocolo de voltaje se repitió al menos 50 veces para cada parche, con y sin AA 10 μ M. Luego, las latencias se midieron en cada pulso como el tiempo necesario para observar la primera apertura de canal desde el inicio del pulso de voltaje (Figura 13.b). Con estos datos construimos un histograma acumulativo con las latencias medidas en ambas condiciones, obteniendo una función de densidad acumulada (cdf, del inglés *cummulative density function*) (Figura 13.c). El recuento de eventos en el histograma se expresó en probabilidades y, para los parches que presentaban más de un solo canal, se obtuvo la distribución de latencia verdadera aplicando la raíz N ésima de la cdf aparente, donde N es el número de canales presentes en el parche [147]. Finalmente, las distribuciones de densidad se ajustaron con el software *GraphPad Prism* con la siguiente función de decaimiento exponencial de primer orden:

$$cdf = Ae^{-t/\tau_{act}}$$

donde τ_{act} es la constante temporal de activación por voltaje.

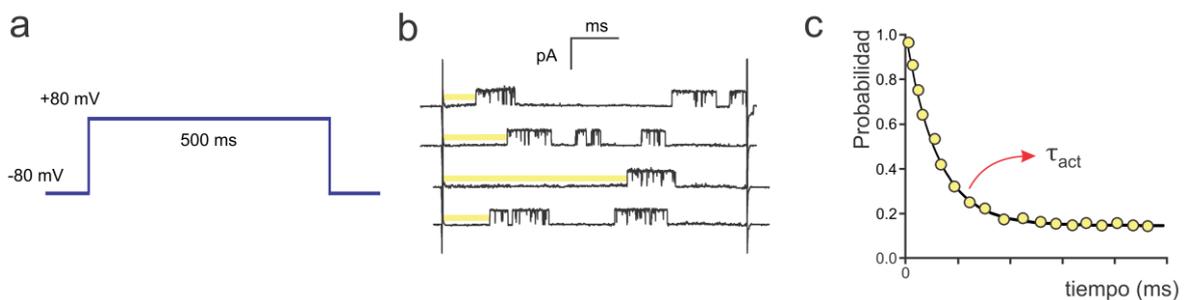


Figura 13. Medida de latencia y constante temporal de activación. **a:** Esquema del protocolo de voltaje aplicado. **b:** Registros típico de la corriente obtenida tras la aplicación reiterada del protocolo de voltaje mostrado en **a**. La medida de la latencia a la primera apertura se marca en amarillo a modo de ejemplo. **c:** cdf construida a partir de las medidas de latencia. Del ajuste de esta curva se obtiene la constante temporal de activación.

ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DEL AA SOBRE EL CANAL BK, ESTUDIADO EN SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGO

La expresión de canales iónicos recombinantes en sistemas de expresión heterólogo es una herramienta invaluable para el análisis detallado de sus propiedades biofísicas. Esta estrategia ofrece un enfoque complementario al análisis de canales endógenos en su contexto fisiológico en las células nativas, brindando la oportunidad de estudiarlos y manipularlos en un entorno celular definido en ausencia de otros canales iónicos. Esto es ventajoso para muchos estudios, en particular para la definición detallada de las propiedades biofísicas y farmacológicas, para analizar las relaciones estructura-función y para caracterizar el papel de los subtipos individuales de canales y/o subunidades que los componen. Además, los sistemas de expresión heterólogos son particularmente útiles en la correlación de la estructura molecular con la función electrofisiológica de un canal específico, dado que permiten expresar la proteína con mutaciones puntuales así como moléculas quiméricas entre dos canales o subunidades estrechamente relacionadas. La mayoría de los sistemas tienen las ventajas de ser fáciles de manipular, proporcionan una expresión de la proteína de interés robusta y los registros electrofisiológicos son estables para la mayoría de los canales iónicos [148].

Células, clones y transfección

En base al nivel de expresión requerida se utilizaron células HEK293T, HEK293 y ovocitos de *Xenopus laevis*.

Las células HEK293 y 293T se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (*EMEVE medios, Lab. Microvet*) y suero bovino fetal (*Internegocios*) al 10% y se dividieron cuando alcanzaron una confluencia del 70-80%. La subunidad α humana del canal BK (*Slo1, KCNMA1, U11058*), la subunidad auxiliar $\beta 1$ *wild-type* (*wt*) (*KCNMB1, AF035046*) o las subunidades $\beta 1$ mutantes (Y74A, S104A) y el ADNc de la proteína fluorescente verde (eGFP), se transfectaron transitoriamente en células HEK usando *FuGene 6* (*Promega*). Las subunidades α y $\beta 1$ se utilizaron en relaciones molares de 1:3

o 1:6, para asegurar un exceso de subunidad $\beta 1$ sobre la subunidad α , y se usó eGFP como indicador de la transfección. En los experimentos donde la transfección se realizó sin subunidades accesorias, se reemplazó la masa de ADN de las mismas por el vector plasmídico vacío (pcDNA3). Después de la transfección, las células se mantuvieron en cultivo durante 18 horas (Figura 14), luego de las cuales se realizaron las medidas electrofisiológicas. Los clones *wt* de las subunidades α y $\beta 1$ fueron provistos por el Dr. Carlos González (CINV, Chile), los mutantes de la subunidad $\beta 1$ por el Dr. José Manuel Fernández-Fernández (Universidad Pompeu Fabra, España), mientras que el vector vacío y el clon de eGFP fueron proporcionados por la Dra. Jessica Raingo (IMBICE, Argentina).

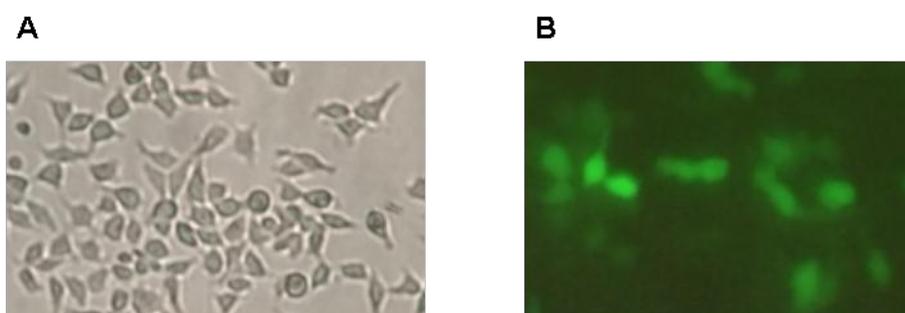


Figura 14. Células HEK293T. Fotos tomadas en nuestro laboratorio al microscopio óptico con luz blanca (a) y con luz azul (b), 18 horas post-transfección, empleando eGFP como gen reportero.

Las medidas de corrientes de compuerta (*gating currents*) se realizaron en el Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso (CINV, Chile) utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión. Se realizó transcripción in vitro (*mMESSAGE mMACHINE*, Ambion) para obtener el ARNm de ambas subunidades. Los ovocitos fueron inyectados en una proporción molar de 1:3 de α : $\beta 1$ con 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del ARNm respectivo. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se incubaron en una solución ND96 (con la siguiente composición en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 HEPES, pH 7.4) a 18 ° C durante 4-8 días antes de realizar los registros electrofisiológicos.

Estudio de las propiedades de canal único del canal BK expresado con y sin la subunidad accesoria $\beta 1$ en células HEK y efecto del AA

Para validar la expresión funcional de la subunidad α del canal BK con o sin la subunidad accesoria $\beta 1$ en células HEK293T transfectadas, realizamos una caracterización del canal en este sistema a nivel de canal único, donde posteriormente evaluamos el efecto del AA. Para ello medimos: la conductancia unitaria, la probabilidad de apertura en estado estacionario, la sensibilidad al voltaje y a la concentración de Ca^{2+} intracelular y los tiempos medios de permanencia en el estado abierto, tanto para el canal homotetrámero de subunidades α (canal BK α), como para el complejo formado por $\alpha+\beta 1$ (canal BK $\alpha+\beta 1$).

Para obtener estos parámetros, se realizaron registros de corriente de al menos un minuto de duración a los potenciales de -20, +20, +40 y +60 mV (donde la corriente presentaba definición de canal único) en condiciones control (a las 2 concentraciones de Ca^{2+} testeadas) y luego de la perfusión de AA 10 μM . Se utilizaron las mismas soluciones especificadas para los experimentos de sistema nativo en configuración IO, con concentraciones de Ca^{2+} libre intracelular de 0.3 y 3 μM .

Cálculo de la conductancia iónica

La conductancia iónica de los canales BK expresados en células HEK fue calculada a partir de los registros de corriente de canal único en función del potencial aplicado (curva $i-V$). Teniendo en cuenta que $i_x = \gamma_x(V-E_x)$, y que en nuestras condiciones de registro (K^+ simétrico, $E_K \sim 0$) la fuerza impulsora es igual al potencial aplicado a la membrana, la ecuación anterior se simplifica a $i_x = \gamma_x \cdot V$. Una vez medida y construida la curva $i-V$, calculamos el valor de la conductancia de canal único γ_x como el valor de la pendiente de la recta ajustada por el método de cuadrados mínimos.

Análisis de estado estacionario: idealización de registros por el criterio del 50% de la amplitud como valor umbral

Para la obtención del resto de los parámetros evaluados, realizamos la idealización de los registros con el programa *Clampfit 10.3* (*Molecular Devices*, San José, CA, USA). La creación de registros idealizados a partir de los registros de canal único constituye un herramienta poderosa de análisis, dado que permite obtener los valores de amplitud y de tiempo de permanencia (en inglés, *dwel time*) de cada evento de apertura o cierre de los canales presentes en el registro de corriente, a partir de los cuales se pueden desarrollar numerosos estudios de las propiedades de la actividad de un canal único.

Básicamente, la construcción de un registro idealizado consiste en transformar un registro de canal único en una serie de líneas rectas que representan los estados cerrado y abierto del canal. Dicho proceso se sintetiza en la Figura 15, en donde podemos observar un registro crudo de canal único que presenta aperturas de un canal iónico en el panel de la izquierda, mientras que a la derecha se esquematiza superpuesto el registro idealizado.

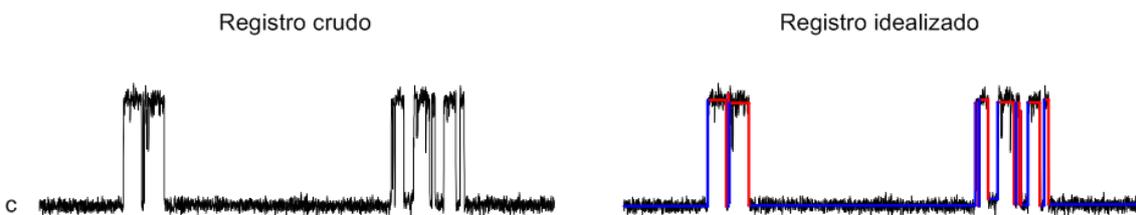


Figura 15. Esquema de la idealización de registros de canal único. Corriente típica de canal único (panel de la izquierda) y el esquema de su registro idealizado (a la derecha). Las líneas azules y rojas representan la idealización del estado cerrado y abierto, respectivamente.

Para realizar el registro idealizado se debe indicar, por medio de cursores, los niveles de corriente correspondientes al estado cerrado y al estado abierto del canal, estableciéndose de esta manera dos estados posibles: nivel 0 (cerrado) y nivel 1 (abierto). Se considera que un “evento” comienza cuando el valor de la corriente pasa

del nivel 0 al 1 para una apertura del canal (o del 1 al 0 para un cierre), y finaliza cuando la corriente vuelve a pasar del 1 al 0 en el caso de la apertura (o del 0 al 1 para el caso del cierre). Teniendo en cuenta que no todas las aperturas y cierres coinciden exactamente con los valores de corriente definidos para los niveles 0 y 1, el criterio que se emplea para determinar cuándo ha ocurrido un cambio de estado (del abierto al cerrado o viceversa) es utilizar como valor umbral al valor del 50% de la amplitud entre los niveles 0 y 1. Esto último se denomina “criterio del 50% de la amplitud de corriente como valor umbral” (en inglés *half-amplitude threshold criterion*). Una vez establecidos los parámetros de inicio, el programa comienza a clasificar (automática o manualmente) los eventos dentro de cada uno de los niveles. Para ello realiza un barrido del registro de corriente vs. tiempo detectando los distintos eventos y almacenando en una planilla de hoja de cálculo los siguientes datos para cada evento detectado:

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

De esta manera se obtiene un listado de datos que describe completamente al registro de canal único, cuya utilización detallaremos a en las siguientes secciones. Cabe aclarar que dicha idealización puede realizarse con hasta ocho niveles de corriente (además del correspondiente al estado cerrado), de manera que permite trabajar con registros con más de un tipo canal o con más de una copia del mismo. Como última generalización de este punto, debemos mencionar que en el análisis de nuestros registros fueron desestimados aquellos eventos con una duración menor a 0.25 ms para evitar la detección de falsos eventos generados por ruido eléctrico del registro o de cierres veloces e incompletos dentro de las aperturas de los canales.

La elevada conductancia característica del canal BK permite diferenciar fácilmente entre los niveles de corriente correspondientes a los estados cerrado y abierto, lo cual permitió la utilización de la idealización automática en la mayoría de los casos. Sin embargo, en los casos en que la idealización automática fue utilizada, posteriormente se verificó que la misma coincidiera con el registro crudo de corriente [149].

Análisis de estado estacionario: cálculo de la probabilidad de apertura

Como adelantamos previamente, en los registros de corriente donde el canal llega a una Po de estado estacionario, su valor se puede calcular mediante la relación del tiempo en la cual el canal pasa en el estado abierto dividido por el tiempo total de registro (tiempo en el estado abierto más tiempo en el estado cerrado). En nuestros experimentos la probabilidad de apertura se estima con el parámetro NPo, donde N es el número total de canales (de igual valor de amplitud) presentes en el parche, y Po es la probabilidad de apertura individual del canal. Para calcular este parámetro se idealizaron registros de corriente de canal único de una duración de al menos 30 segundos y a partir de ellos se obtuvo el valor de NPo, según la siguiente fórmula:

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

donde T es la duración del registro, t_j es el tiempo de permanencia con $j=1, 2, 3...n$ canales abiertos.

Este valor debe ser calculado una vez que la Po del canal alcanzó el estado estacionario. Para confirmar este requisito se generaron gráficos de estabilidad de NPo en los cuales se representan los valores de NPo calculados en intervalos de 5 segundos en función del tiempo del registro de canal único. A partir de los mismos podemos confirmar que la actividad del canal no está variando en el tiempo de registro (en condiciones control), como también detectar a partir de qué punto se llega a un nuevo estado estacionario al someter al canal a un estímulo o una inhibición.

Análisis de estado estacionario: cálculo del tiempo de permanencia medio

El tiempo de permanencia del canal en el estado abierto (o cerrado) cuantifica al fenómeno temporal de apertura (o cierre) estocástico característico de cada canal. Permite estudiar por ejemplo, si la actividad de un canal se manifiesta como pocas aperturas pero de larga duración, o muchas de duración menor. Justamente, la expresión efectiva de la subunidad $\beta 1$ puede confirmarse con este parámetro, dado que la misma prolonga el tiempo de permanencia del canal BK en el estado abierto [9]. Para ello calculamos el tiempo de permanencia medio del estado abierto como el promedio de los valores de tiempo de permanencia de todas las aperturas del canal detectadas en el registro idealizado en condiciones de estado estacionario, a un determinado voltaje en cada condición de transfección (α y $\alpha+\beta 1$).

Análisis de corrientes macroscópicas del canal BK expresado con y sin la subunidad accesoria $\beta 1$ en células HEK y caracterización del efecto del AA

Como explicitamos en las generalidades de esta sección, cuando se aplican potenciales despolarizados en configuración IO en el sistema de expresión heterólogo, es posible obtener corrientes macroscópicas, generadas por el alto número de canales presentes en la porción de membrana de la micropipeta (Figura 4). Para caracterizar el efecto del AA sobre el canal BK en corrientes macroscópicas trabajamos con células HEK293T transfectadas con las subunidades de interés. Se utilizaron las mismas soluciones de registro que en los experimentos de sistema nativo en configuración IO, sin agregado de Ca^{2+} a la solución intracelular. En las series experimentales que se describen a continuación, trabajamos en ausencia de calcio intracelular (excepto en experimentos en donde lo que estudiamos es rol del dominio sensor de calcio) ya que esta condición, nos otorga varias ventajas experimentales. En primer lugar, permite analizar por separado el rol de los distintos dominios del canal en el mecanismo de acción del AA. Adicionalmente, permite disminuir la variabilidad de la corriente BK debida a su gran sensibilidad al calcio (introducida por las posibles variaciones en la concentración de calcio de las soluciones, parte del error experimental). En este sentido, trabajar en condiciones en la que todos los sitios de unión al calcio del canal

están libres, disminuye la dispersión de la corriente. Por otro lado, para poder caracterizar el efecto del AA, buscamos construir las curvas G-V completas, para lo cual fue necesario trabajar en condiciones de menor activación basal, de modo de poder obtener la curva G-V en un rango de potenciales compatibles con la estabilidad del sello y el límite de detección de corriente de nuestro amplificador.

En estas condiciones, la estabilidad de la corriente se monitoreó aplicando periódicamente pulsos de voltaje de 180 ms desde un potencial de mantenimiento de 0 mV a un potencial de testeo de +110 mV, descartando las células donde la amplitud de la corriente no permaneció constante en el tiempo. Este protocolo también fue utilizado para seguir el curso temporal del efecto del AA sobre la corriente del canal BK. Después de la estabilización de la corriente en cada condición (control y AA), se aplicó el protocolo de voltaje consistente en una familia de pulsos de voltaje de 180 ms desde un potencial de mantenimiento de 0 mV hasta potenciales entre -50 y +190 mV, con incrementos de 20 mV, seguido de un pulso de voltaje de 50 ms a -50 mV (Figura 16.a). Este último pulso tuvo por objetivo registrar las corrientes de cola (I_{cola}), es decir las corrientes que fluyen en el instante previo a la desactivación del canal. De esta manera, las I_{cola} están determinadas por la P_o del canal en el pulso de voltaje que le antecede, manteniendo la conductancia unitaria y fuerza impulsora correspondiente a -50mV. Con estos registros obtuvimos la relación entre la corriente de cola correspondiente a un dado potencial ($I_{cola,x}$) y la corriente de cola máxima (I_{max}), observada como la saturación de la magnitud de la corriente en al menos dos pulsos sucesivos en ese parche, ambas corrientes medidas al pico. En los casos en los que la I_{max} no se alcanzó experimentalmente en condiciones de control, utilizamos la I_{max} correspondiente al valor observado para el AA en el mismo parche. Teniendo en cuenta que para las I_{cola} la fuerza impulsora es constante y que:

$$I_{cola\ x} = NP_o\gamma_x(V - E_x)$$

de lo anterior deduce que $I/I_{max} = G/G_{max}$, por lo tanto utilizando los valores de corrientes de cola construimos las curvas de conductancia normalizada G/G_{max} versus voltaje (Figuras 16.b y c).

Estas curvas se ajustaron con la siguiente relación de Boltzmann utilizando *GraphPad Prism* (versión 5.03):

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{zF(V_{1/2} - V)}{RT}}}$$

donde $V_{1/2}$ es el potencial en el que G/G_{max} es la mitad de la G_{max} , z describe la sensibilidad del voltaje (pendiente de la curva en la zona variable), F es la constante de Faraday (96500 C/mol), R es la constante de los gases (8.314 J/(mol.K)), y T es la temperatura ambiente en Kelvin (aproximadamente 295 K).

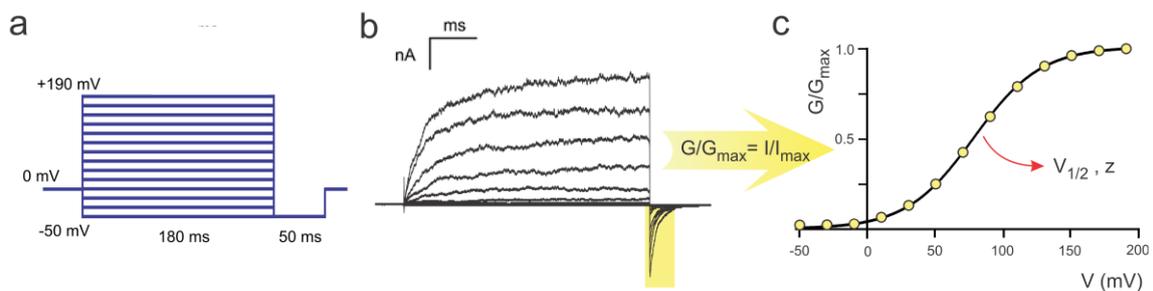


Figura 16. Construcción de curvas G/G_{max} - V . *a*: Esquema del protocolo de voltaje aplicado. *b*: Registro típico de las corrientes obtenidas tras la aplicación del protocolo de voltaje mostrado en *a*. La medida se realiza en las corrientes de cola (zona sombreada en amarillo). *c*: Curva G/G_{max} - V obtenida de un registro de corriente como el mostrado en *b*, al dividir la corriente de cola al pico por la corriente de cola máxima (I/I_{max}) para cada voltaje. Del ajuste de esta curva se obtienen los parámetros $V_{1/2}$ y z .

En las células transfectadas únicamente con la subunidad α del canal BK no fue posible observar la I_{max} de cola tanto en las corrientes control como en las tratadas con AA 10 μ M. Dado que en esta condición no se alcanzó G_{max} , no es adecuado ajustar las curvas G - V con la relación de Boltzmann, y en su lugar, los efectos del AA fueron evaluados comparando la conductancia obtenida para cada voltaje en cada condición. El valor de la conductancia macroscópica (G) se calculó dividiendo la corriente de cola al pico por la fuerza impulsora del pulso en la cola (-50 mV).

Para estudiar la dependencia de la concentración de AA en la activación del canal BK $\alpha+\beta 1$, se utilizó el mismo protocolo de voltaje descrito al principio de esta

sección (Figura 16.a) ensayando distintas concentraciones del ácido graso (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 μM). Construimos las curvas de concentración-respuesta (CCR) del efecto activador del AA sobre las corrientes BK para cada potencial donde la activación fue significativa (a partir de +70 mV). Luego, las curvas obtenidas para cada voltaje se ajustaron con una relación de Hill, a fin de obtener la concentración efectiva 50 (EC_{50}) y el *Hill Slope* (γ). El ajuste se realizó utilizando GraphPad Prism con la siguiente fórmula:

$$\frac{I_{AA}}{I_{control}} = 1 + \frac{(E_{max} - 1) \times [AA]^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + [AA]^{\gamma}}$$

donde E_{max} representa la máxima activación generada por el AA.

Para confirmar que la activación del AA sobre el canal es directa e independiente de los metabolitos del AA, evaluamos el efecto del AA sobre el canal BK $\alpha+\beta 1$ en presencia de inhibidores de las enzimas capaces de metabolizar este PUFA: las enzimas ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y citocromo P450 (CYP) [111]. Las enzimas COX y LOX se inhibieron con 10 μM de indometacina (*Sigma Aldrich*) y 5 μM de cinnamil-3,4-dihidroxi- α -cianocinamato (CDC, *Santa Cruz Biotechnology*), respectivamente, que se aplicaron a las soluciones de baño durante todo el experimento. Las enzimas CYP se inhibieron irreversiblemente mediante una incubación de 30 minutos en presencia de ácido 17-octadecinoico 5 μM (17-ODYA, *Santa Cruz Biotechnology*) antes del registro de las corrientes. Las concentraciones empleadas para cada bloqueante se basaron en datos presentes en la bibliografía [150–154]. Dado que el CDC es un modulador del canal BK, el tiempo requerido para obtener la estabilidad de la corriente en condiciones de control fue de al menos 30 minutos y las curvas G-V se desplazaron a la derecha con respecto a la condición de control sin el bloqueante. Debido a esto último, en la mayoría de los parches probados la corriente no alcanzó G_{max} para esta condición experimental. Además, la condición control presentó registros con replicados muy dispersos en sus valores de corriente y dado que no pudimos normalizar por G_{max} , los valores corrientes se normalizaron con los valores de control obtenidos a +170 mV para reducir el error en las curvas G-V.

Estudio del gating intrínseco del canal BK $\alpha+\beta 1$ y su modificación por AA

El *gating intrínseco* se evaluó midiendo la actividad del canal BK en la configuración IO a -120 mV en una solución libre de Ca^{2+} intracelular [104]. Se trabajó en células HEK293 transfectadas con las subunidades α y $\beta 1$, con las mismas soluciones utilizadas en apartado anterior. En estas condiciones la P_o del canal es tan baja, que la actividad se define con aperturas de canal único, por lo tanto se requirieron registros de entre 30 y 60 segundos en ausencia y presencia de AA para poder obtener la probabilidad de apertura intrínseca del canal (NPoi). La identificación del canal BK en el parche se realizó en base al valor de conductancia unitaria. La probabilidad de apertura intrínseca, en cada condición, se calculó tal como fue descrito anteriormente para la NPo el estado estacionario. La estabilidad del control y la activación por AA fue monitoreada aplicando en forma alternada pulsos de voltaje despolarizantes, como fue descrito anteriormente.

Dependencia de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la activación del canal BK $\alpha+\beta 1$ inducida por AA

Para estudiar la relación entre la concentración de Ca^{2+} intracelular y la activación del canal BK por AA, se obtuvieron las curvas G-V del canal expresado en células HEK293, en una solución libre de Ca^{2+} intracelular y en una solución con una concentración de 1.2 μM de Ca^{2+} libre. La solución libre de Ca^{2+} intracelular fue la descrita para la configuración IO en el sistema nativo, sin agregado de CaCl_2 a la solución intracelular, mientras que la solución de 1.2 μM de Ca^{2+} libre se obtuvo con el agregado de volúmenes adecuados de una solución madre acuosa 1M de CaCl_2 . El cálculo para obtener la concentración de Ca^{2+} libre ensayada se realizó usando el programa: *Maxchelator* de *Stanford University*: <http://maxchelator.stanford.edu>. Elegimos utilizar la concentración de 1.2 μM de Ca^{2+} libre teniendo en cuenta que la activación del canal BK $\alpha+\beta 1$ por este ión se observa claramente a concentraciones superiores a 1 μM [77]. Para la condición libre de Ca^{2+} se empleó el protocolo de voltaje descrito en la Figura 16.a, mientras que para 1.2 μM de Ca^{2+} libre se adaptó dicho protocolo a voltajes más negativos en función al desplazamiento de la curva G-V

en esta condición. Finalmente, las curvas G-V obtenidas se ajustaron con una relación de Boltzmann, y se compararon los desplazamientos de los $V_{1/2}$ ($\Delta V_{1/2} = V_{1/2}^{AA} - V_{1/2}^{control}$) y los cambios en z producidos por el AA 10 μM en cada concentración de Ca^{2+} intracelular.

Necesidad de acople funcional entre las subunidades α y $\beta 1$ del canal BK para la activación del canal por AA

En el año 2012, Gruslova y cols. demostraron la presencia de dos dominios funcionales en la subunidad $\beta 1$ (segmento A y B), ambos localizados en el *loop* extracelular, que estarían involucrados en la modulación de la función del canal BK por esta subunidad accesoria [155]. Para evaluar si este acoplamiento funcional entre la subunidad α y $\beta 1$ podría ser necesario en la activación del canal BK inducida por AA, medimos su efecto sobre las corrientes del canal expresado en células HEK293T con la subunidad $\beta 1\text{wt}$ y sus mutantes Y74A y S104A (correspondientes a los segmentos A y B, respectivamente). Se trabajó con los protocolos experimentales mostrados en la Figura 16, y el peso de cada segmento en la activación del canal por AA se ponderó a partir de los cambios en los desplazamientos de los $V_{1/2}$ ($\Delta V_{1/2} = V_{1/2}^{AA} - V_{1/2}^{control}$) y en z de las curvas G-V producidos por el AA 10 μM en cada condición de transfección.

Efecto del AA en las corrientes de compuerta (*gating*) del canal BK $\alpha+\beta 1$

Esta serie experimental buscó evaluar el efecto del AA sobre la dinámica del dominio sensor de voltaje del canal BK. Como se mencionó anteriormente, la misma se realizó en el CINV (Chile) y se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión. Los registros de las corrientes de *gating* (I_G) se adquirieron en configuración de IO con un amplificador *Axopatch 200B* (Molecular Devices, San José, CA, USA) y se digitalizaron con una *Digidata 1550B* (Molecular Devices, San José, CA, USA) utilizando una frecuencia de muestreo de 500 kHz. Se registraron las corriente en macroparches utilizando micropipetas con resistencias de entre 0.5 y 1 M Ω .

Las I_G se evocaron por pulsos de voltaje de 1 ms de duración entre -100 y 350 mV con incrementos de 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV (Figura 17.a). Tanto el comando de voltaje como la salida de corriente se filtraron a 20 kHz utilizando un filtro de paso bajo Bessel de 8 polos. La corrección de la capacitancia lineal de membrana y las corrientes de fuga (*leak*) fueron corregidas con el protocolo de sustracción P/4 [156].

Se utilizaron las siguientes soluciones de registro:

- Solución extracelular de pipeta (en mM): tetraetilamonio (TEA)-MeSO₃ 110, HEPES 10, MgCl₂ 2, ajustada a un pH de 7.0.
- Solución intracelular de baño (en mM): N-metil-D-glucamina (NMDG) -MeSO₃ 110, HEPES 10, EGTA 5, ajustada a un pH de 7.0.

Un puente de agar que contenía NaMES 1 M conectó la solución del baño a un reservorio de la solución de pipeta conectada a tierra con un electrodo Ag/AgCl. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($20-22$ ° C).

Las corrientes de compuerta obtenidas en ausencia y en presencia de AA 10 μ M se integraron entre 0 y 400 μ s después del pulso de voltaje para obtener el movimiento de carga neta (Q) del componente "ON" de los registros (Figuras 17.b y c). La Q observada a cada valor de potencial se normalizó con la carga neta máxima (Q_{max}) observada en cada parche y con ellas se graficaron las relaciones Q - V , que luego se ajustaron con una función de Boltzmann:

$$\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{zF(V_{1/2} - V)}{RT}}}$$

donde z es la dependencia del voltaje de activación, $V_{1/2}$ es el voltaje correspondiente a una Q/Q_{\max} de 0.5; T es la temperatura absoluta (típicamente 295 K), F es la constante de Faraday y R es la constante de los gases. Las curvas $Q-V$ se alinearon desplazándolas a lo largo del eje x de voltaje en base al $V_{1/2}$ medio de los replicados (desplazamiento: $\Delta V_{1/2} = \langle V_{1/2} \rangle - V_{1/2}$), luego se graficó un punto cada 25 mV para generar la curva $Q-V$ media para cada condición sin modificar la dependencia del voltaje [97,103].

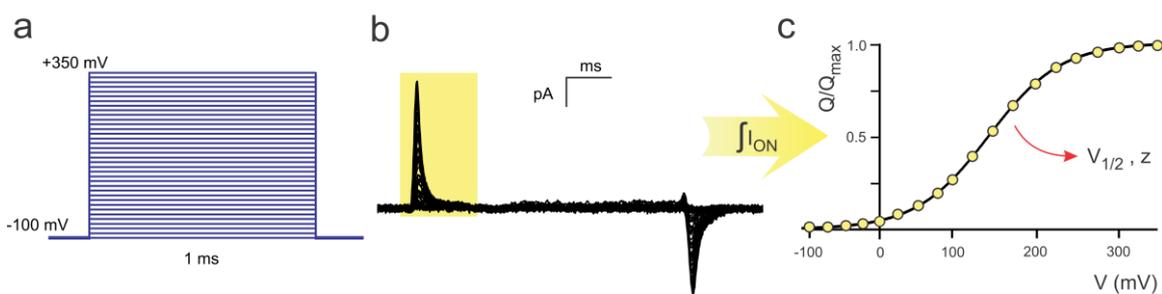


Figura 17. Construcción de curvas Q/Q_{\max} -V. **a:** Esquema del protocolo de voltaje aplicado. **b:** Registro típico de las corrientes de compuerta obtenidas tras la aplicación del protocolo de voltaje mostrado en **a**. La medida se realiza integrando el componente ON (zona sombreada en amarillo). **c:** Curva Q/Q_{\max} -V obtenida de un registro de corriente como el mostrado en **b**. Del ajuste de esta curva se obtienen los parámetros $V_{1/2}$ y z .

EFFECTO DEL AA EN UN LECHO VASCULAR DE RESISTENCIA

Realizamos medidas de presión en el lecho vascular mesentérico de ratas *Sprague-Dawley* hembras. Las mismas fueron criadas en un bioterio climatizado, bajo ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, alimentadas con alimento balanceado estándar para ratas y agua *ad libitum*. Las ratas fueron provistas por la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Todos los animales recibieron atención

humana y los protocolos del estudio cumplieron con las pautas locales para el bienestar de los animales vertebrados.

Las ratas fueron anestesiadas con isofluorano y se aisló el intestino delgado (yeyuno e íleon) junto con su lecho vascular mesentérico intacto, el cual se colocó inmediatamente en una solución de Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) refrigerada y se procedió a canular la arteria mesentérica superior y la vena porta. Esta cirugía requiere de mucho entrenamiento y destreza, por lo cual fue realizada por los médicos veterinarios Dr. Pablo Stringa y Med. Vet. Leandro Vecchio, ya entrenados en este tipo de práctica. Una vez en nuestro laboratorio, el preparado fue colocado en una cápsula de Petri, conteniendo solución KRB (Figura 18). La misma fue adaptada para permitir la perfusión del preparado con influjo por la arteria mesentérica y eflujo por la vena porta, a través una bomba peristáltica (*Model E50, Elmeco Laboratory Instruments*). El preparado fue perfundido con KRB (termostatizada a 37 °C y burbujeada con carbógeno) a velocidad de 1 ml/min y las drogas empleadas (noradrenalina, paxilina, AA) fueron agregadas a la solución KRB previo a su uso. La presión río arriba del lecho mesentérico fue medida en forma continua por un transductor de presión conectado a la línea de influjo arterial. En la Figura 19 se muestra un esquema simplificado del equipo empleado.



Figura 18. Preparado de lecho mesentérico intacto. Fotografía tomada en nuestro laboratorio.

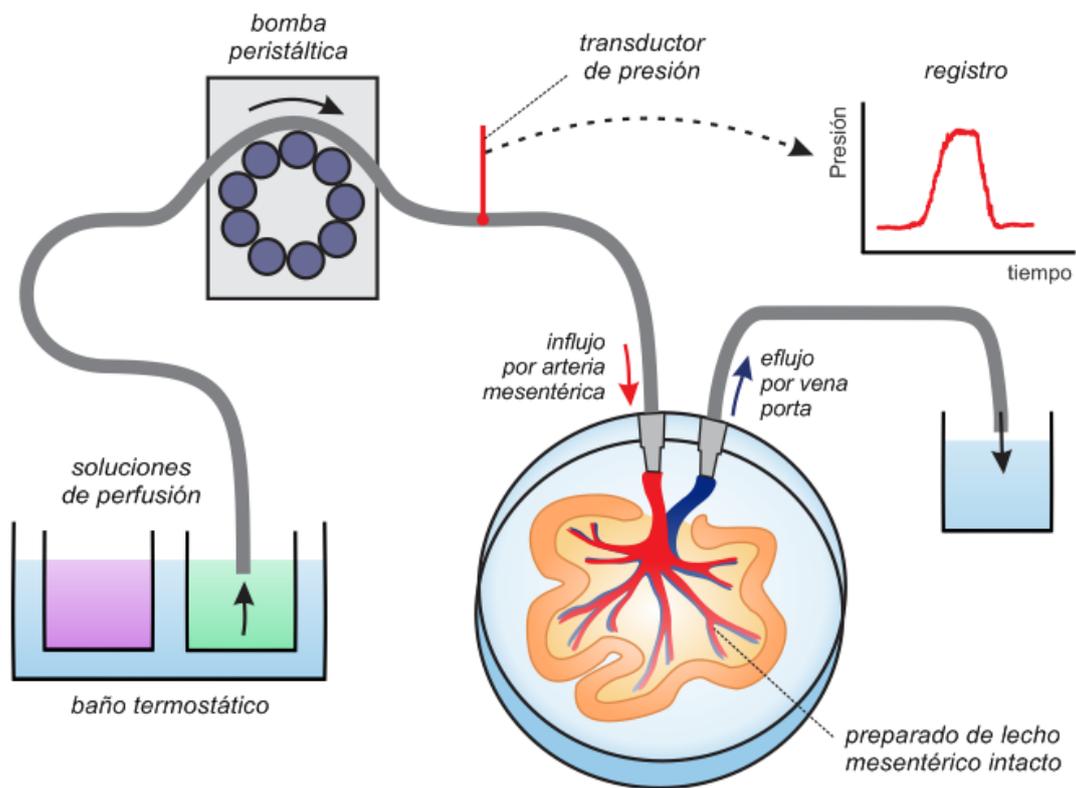


Figura 19. Esquema básico del equipo empleado para la determinación de presión del lecho mesentérico. La solución de perfusión fue termostaticada y perfundida en el preparado ingresando por la arteria mesentérica y egresando por la vena porta. La presión de perfusión arterial fue determinada empleando un transductor de presión conectado a la vía de ingreso. Se obtuvieron registros de presión vs. tiempo.

Para estudiar el potencial efecto vasorrelajante del AA sobre la presión de perfusión arterial del lecho mesentérico, luego de la estabilización del preparado mediante perfusión de solución KRB, se estimuló con noradrenalina (NA) 1 μ M (*Sigma Aldrich*) para inducir la contracción vascular medida como un aumento en la presión de perfusión. A los 20 min, se agregó AA 10 μ M manteniendo la NA en la solución de perfusión. Luego de 20 min se lavó el preparado y se repitió el ensayo en presencia de paxilina 500 nM.

Dado que trabajamos a flujo constante, los cambios en la presión de perfusión de este sistema reflejan los cambios en la resistencia vascular del lecho mesentérico. Por lo tanto, los datos fueron expresados como porcentaje de disminución de la resistencia vascular (%DRV). El %DRV fue calculado como el porcentaje de disminución de la presión de perfusión en presencia de AA, respecto a la presión correspondiente a la precontracción con NA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la misma. Se realizaron test t de Student apareados para comparar entre 2 grupos (control *versus* tratamiento en la misma célula), mientras que la comparación entre varios grupos se realizó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA seguido de un test de Holm-Sidack). En la comparación de tiempos de latencia en CML de AUH, en los experimentos de corrientes de *gating* y en la serie de dependencia de Ca^{2+} intracelular, se utilizó el test t de Student no apareado. En todos los casos se utilizó el *SigmaStat v3* para realizar el análisis estadístico. Por último, el análisis estadístico comparativo de las EC_{50} y los *Hill Slope* de las curvas dosis respuesta se llevó a cabo mediante el *extra sum of squares F test* (*GraphPad Prism v5*). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en los casos en que el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados



Con anterioridad al inicio de este trabajo de Tesis, nuestro grupo ya había comenzado con el estudio del efecto del ácido araquidónico (AA) sobre la corriente mediada por canales de K^+ de tipo BK [49]. En particular, habíamos estudiado mediante la técnica de *patch-clamp*, el efecto del AA 10 μ M en los canales BK presentes en células de músculo liso (CML) disociadas frescas de la arteria umbilical humana (AUH). Midiendo las corrientes de canal único mediadas por el canal BK, en estado estacionario y en configuración *Inside-Out* (IO), observamos que el AA activa dicho canal produciendo un aumento de su probabilidad de apertura (NPo), sin modificar su conductancia unitaria (Figura 1.a y b). La activación del canal inicia luego de aproximadamente 3 minutos de perfusión de AA, alcanzando un estado estacionario luego de aproximadamente 5 minutos. El análisis de los tiempos medios de permanencia en el estado cerrado y en el estado abierto mostró que el cambio en la NPo involucra la sumatoria de dos efectos: una marcada disminución en el tiempo medio de permanencia en el estado cerrado y un aumento en el tiempo medio de permanencia en el estado abierto (Figura 1.c y d) [157].

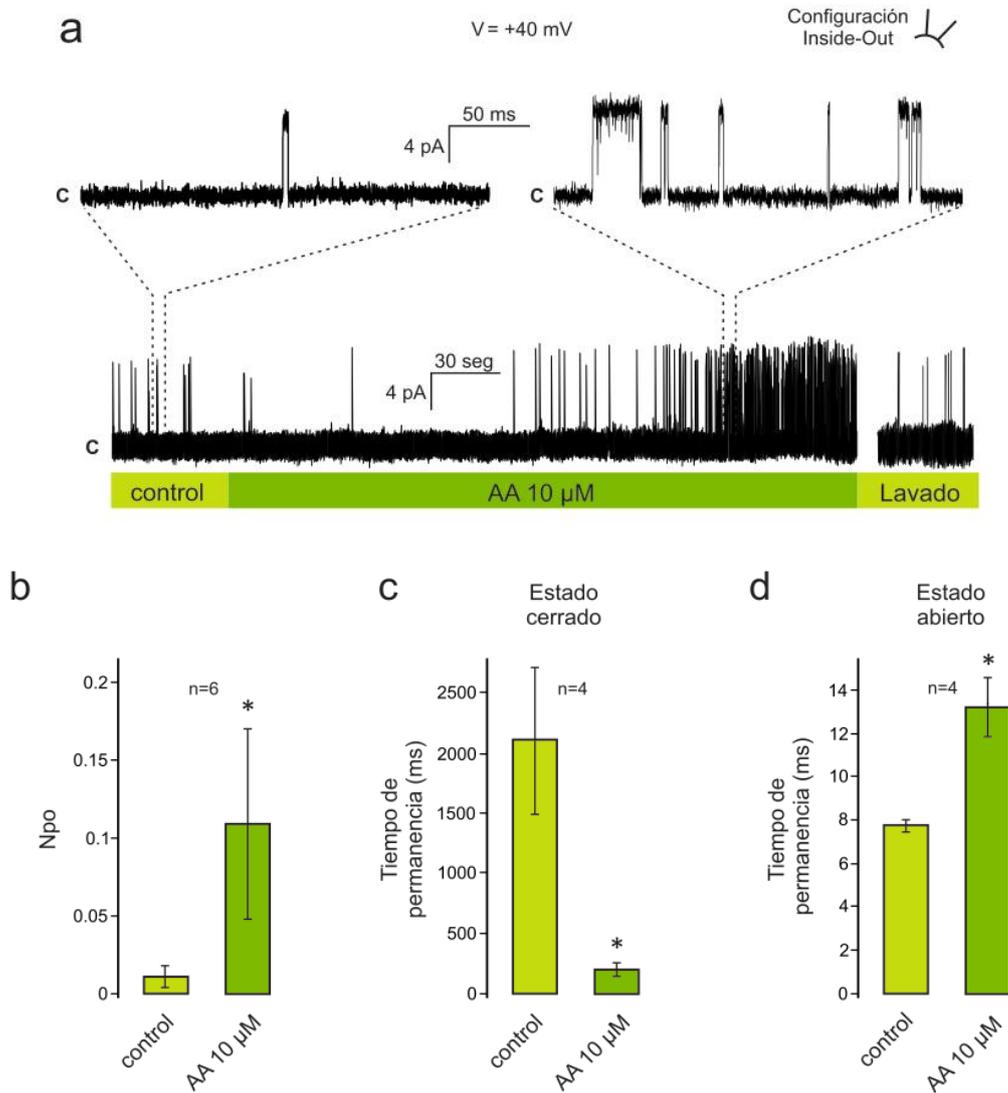


Figura 1. Activación del canal BK inducida por AA 10 μM en CML aisladas de la AUH en configuración IO. **a:** Registro típico de la actividad de un único canal BK registrado a un potencial de membrana de +40 mV, en condiciones control, durante la perfusión con AA 10 μM y luego de 4 minutos de lavado. El nivel de corriente indicado con una "c" corresponde al estado cerrado del canal. **b, c, d:** Probabilidad de apertura media (N_{po}) (n=6), tiempo de permanencia medio en el estado cerrado (n=4) y tiempo de permanencia medio en el estado abierto (n=4), respectivamente. Parches provenientes de tres muestras de cordón umbilical. El asterisco indica diferencia significativa respecto del control ($p < 0.05$; test t de Student apareado). Figura modificada de la Tesis Doctoral del Dr. Pedro Martín [49].

Estos primeros resultados constituyeron el punto de partida de este trabajo de Tesis Doctoral, permitiéndonos generar nuevas hipótesis de trabajo, enfocadas al estudio detallado del mecanismo de acción molecular del AA sobre el canal BK con el objetivo de contribuir al conocimiento general de los efectos que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) inducen sobre diferentes tipos de canales iónicos. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL CANAL BK EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR HUMANO.

Cuando las CML de la AUH son estimuladas con pulsos de voltaje despolarizantes, evocan predominantemente dos tipos de corrientes de K^+ dependientes de voltaje: una mediada por canales de K^+ de tipo Kv y otra, mediada por canales de tipo BK. Las propiedades electrofisiológicas de estas dos corrientes fueron descritas en profundidad por nuestro grupo de investigación en trabajos previos [43]. En particular, sabemos que la corriente macroscópica de K^+ dependiente de voltaje es completamente inhibida al utilizar una combinación de los bloqueantes paxilina 500 nM (un inhibidor específico del canal BK) y 4-aminopiridina (4-AP) 5 mM (un inhibidor ampliamente usado para suprimir la actividad de canales de K^+ de tipo Kv) [41].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, para estudiar el efecto del AA sobre la corriente macroscópica de K^+ mediada por los canales de tipo BK, utilizamos la técnica de *patch-clamp* en la configuración *Whole-Cell* (WC) y ensayamos el efecto del AA 10 μ M sobre las corrientes evocadas por pulsos de voltaje en presencia de 4-AP 5 mM. El AA fue agregado mediante perfusión constante de solución extracelular y, en concordancia con lo observado a nivel de canal único, induce un aumento significativo y reversible de la magnitud de la corriente (Figura 2.a). La activación corresponde a una corriente saliente rectificante, sensible al voltaje, que en nuestras condiciones de

registro solo puede ocurrir a través de canales BK. Los gráficos de corriente (I), medida en el estado estacionario y expresada como densidad de corriente macroscópica media, en función del voltaje (V) (curvas I-V) muestran que el aumento en la corriente es estadísticamente significativo a los potenciales de membrana entre -30 y +50 mV ($p < 0.05$, *test t de Student apareado*; Figura 2.b).

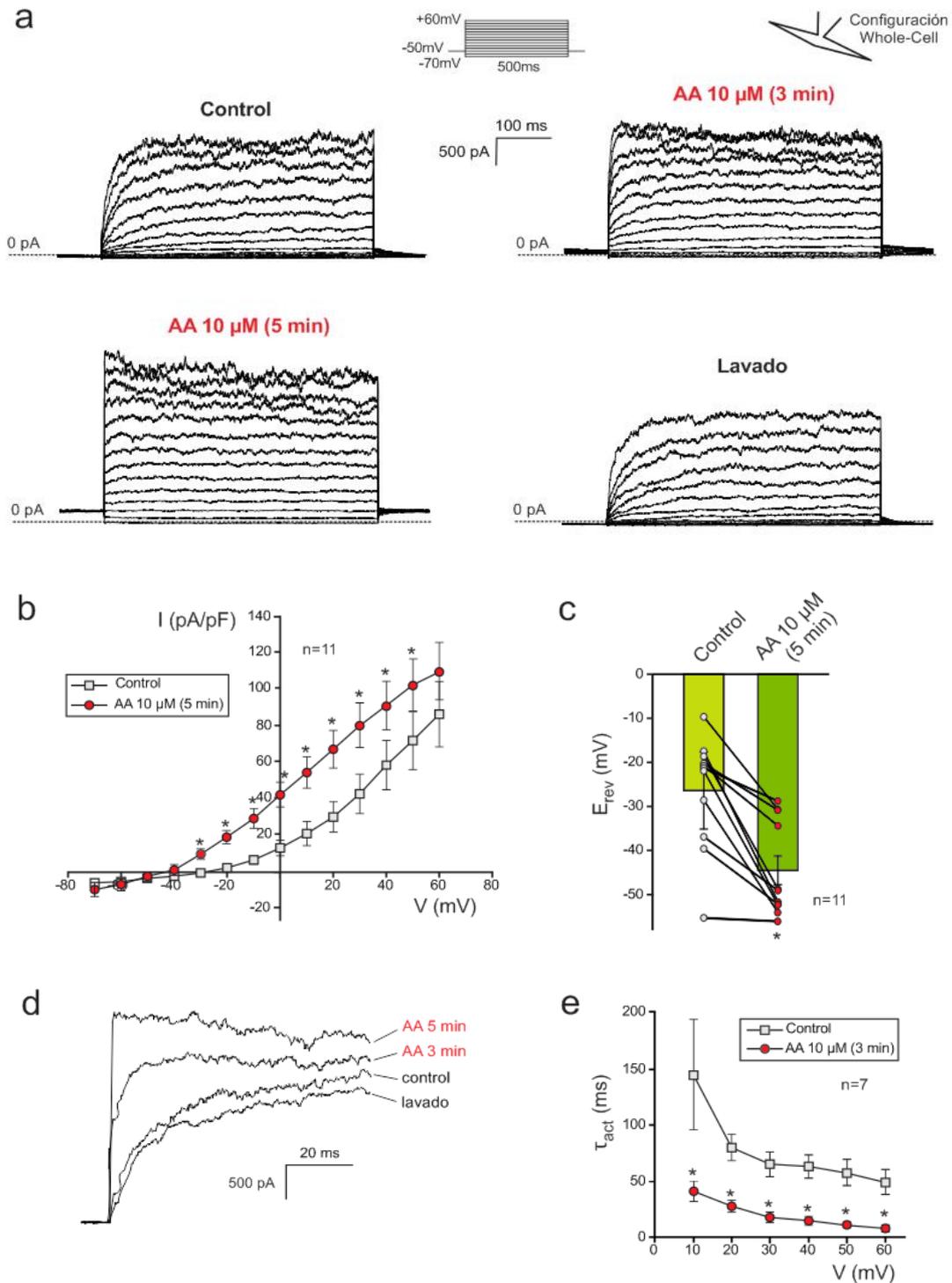


Figura 2. Efecto del AA 10 μ M sobre la corriente macroscópica mediada por canales BK en CML de la AUH (en presencia de 4-AP 5 mM). **a:** Registros típicos superpuestos obtenidos en la configuración WC tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 10 mV entre -70 y +60 mV, con una duración de 500 ms partiendo de un potencial de mantenimiento de -50 mV, en condiciones control, a los 3 y 5 minutos luego del agregado de AA 10 μ M y luego del lavado. **b:** Curvas I-V medias obtenidas a partir de las corrientes como las mostradas en **a**, en estado estacionario. La corriente fue normalizada por el valor de la capacitancia de la membrana para cada célula ($n=11$ células provenientes de dos muestras de cordón umbilical). **c:** Valores medios de E_{rev} obtenidos a partir de las curvas I-V. **d:** Registros típicos de la corriente evocada por un pulso desde -50 hasta +60 mV en cada condición (superpuestos). **e:** Valores medios de las constantes temporales de activación (τ_{act}) calculadas a partir de las corrientes evocadas por pulsos de voltaje desde -50 mV hasta potenciales entre +10 y +60 mV. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de 4-AP 5 mM con el fin de inhibir los canales Kv. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$, test t de Student apareado).

La activación de la corriente generada por el AA provoca un desplazamiento de la curva I-V hacia la izquierda, acompañado de un cambio significativo en el valor del potencial de reversión de la corriente (E_{rev}) de -18.1 mV respecto de la condición control (E_{rev} control: -26.4 ± 8.8 mV; E_{rev} AA: -44.5 ± 3.3 mV; $p<0.05$; Figura 2.c). Este resultado indica que el AA induce una hiperpolarización del V_m celular, dado que el E_{rev} es equivalente al V_m de la célula en estas condiciones experimentales.

Además del efecto activador observado en el estado estacionario de las corrientes macroscópicas mediadas por el canal BK, resultó llamativo el cambio que produce el AA sobre la cinética de activación de la corriente evocada por el pulso de voltaje. En los registros de corriente puede observarse que, luego de 3 minutos de perfusión con AA 10 μ M, la corriente presenta una cinética de activación más acelerada que en la condición control y, que a los 5 minutos, la corriente adquiere una cinética instantánea en los pulsos correspondientes a los potenciales más despolarizados (Figura 2.a y 2.d). Para realizar un estudio cuantitativo de este efecto, analizamos las constantes temporales de activación (τ_{act}) antes y después del agregado del AA. La τ_{act} se obtuvo ajustando las corrientes evocadas por cada pulso de voltaje con una función exponencial de primer orden. Dado que a los 5 minutos de perfusión de AA la cinética se hizo instantánea en la mayoría de las células, y que esto

imposibilita el ajuste con la función exponencial, utilizamos únicamente los datos obtenidos a los 3 minutos de actividad de AA en 7 de las 11 células, en las que a ese tiempo la cinética aún muestra un efecto temporal. Observamos que el AA produce una disminución significativa en la τ_{act} respecto a la condición control (Figura 2.e), lo que muestra cuantitativamente que este ácido graso acelera la cinética de activación de la corriente mediada por canales BK. Además, luego de 5 minutos de perfusión de AA, 9 de las 11 células ensayadas modificaron significativamente su cinética dependiente del tiempo hacia una cinética instantánea (test de Chi cuadrado, $p < 0.05$).

Con el fin de evaluar si en las CML de la AUH el AA afecta solo los canales BK, ensayamos el efecto del AA sobre las corrientes macroscópicas remanentes cuando se inhibe farmacológicamente este canal con su bloqueante selectivo paxilina a una concentración de 500 nM. En primer lugar y como era de esperar, observamos que la paxilina inhibe gran parte de la corriente macroscópica evocada por voltaje debido al bloqueo selectivo de la componente BK, dejando aislado el resto de los canales presentes en este tipo celular. El agregado de AA 10 μM en estas condiciones, no produce ningún efecto significativo sobre la cinética ni la magnitud de la corriente remanente (Figura 3), indicando que el AA produce un efecto selectivo sobre los canales de tipo BK en este tipo celular.

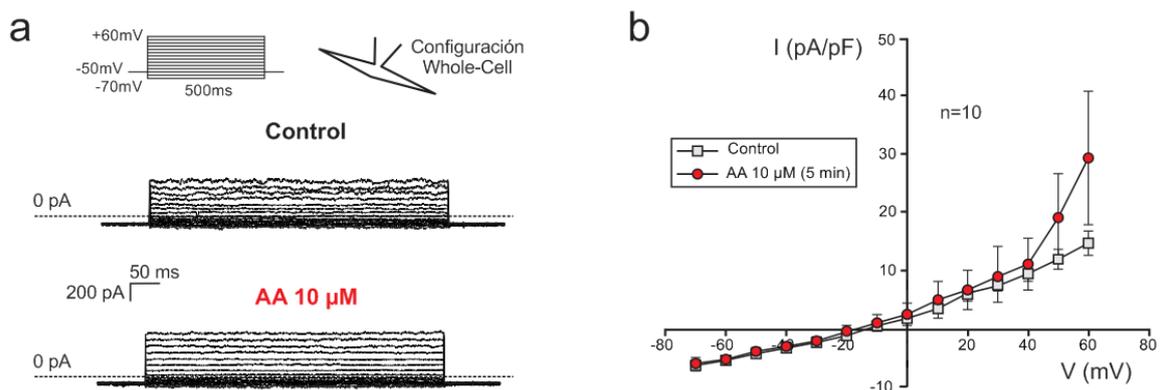


Figura 3. Efecto del AA 10 μM sobre la corriente macroscópica en CML de la AUH en presencia de paxilina 500 nM. a: Registros típicos superpuestos obtenidos en la configuración WC tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 10 mV entre -70 y +60 mV, de 500 ms de duración, partiendo de un potencial de mantenimiento de -50 mV, en condiciones control y luego de 5 minutos del agregado de AA 10 μM . **b:** Curvas I-V

medias obtenidas a partir de corrientes como las mostradas en a, en estado estacionario. La corriente fue normalizada por el valor de la capacitancia de la membrana para cada célula (n=10 células provenientes de seis muestras de cordón umbilical). Todos los experimentos fueron realizados en presencia de paxilina 500 nM con el fin de inhibir los canales BK. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$, test t de Student apareado).

Estos datos en su conjunto, permiten concluir que en las CML de la AUH el AA aumenta la magnitud y la cinética de la corriente macroscópica mediada por canales BK sin afectar al resto de los canales de K^+ . Además, se pone en evidencia que la activación de los canales BK genera un claro efecto hiperpolarizante sobre el potencial de membrana celular. Este efecto podría generar una vasodilatación en la AUH debido a una reducción en el influjo de Ca^{2+} mediado por canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (CaV) presentes en esta arteria [28].

La configuración WC de la técnica de *patch-clamp* presenta la ventaja de permitir la evaluación de un efecto farmacológico y su impacto en la fisiología celular en condiciones más cercanas a las fisiológicas. Sin embargo, a la hora de estudiar en detalle los mecanismos de acción a nivel molecular, tiene la desventaja de que todos los efectos se evalúan sobre la corriente macroscópica, compuesta por la sumatoria de las corrientes de todos los canales iónicos presentes en la membrana celular y, por lo tanto, obliga a disociar farmacológicamente la corriente de interés. En particular la 4-AP es un excelente inhibidor para eliminar las corrientes K_v (con 40 miembros posibles en su familia), sin embargo se ha descrito que puede modificar el pH y la concentración de Ca^{2+} intracelular [158–160]. Por otro lado, en las CML de origen vascular se ha descrito la presencia de enzimas citoplasmáticas capaces de metabolizar el AA generando una amplia variedad de metabolitos (prostaglandinas, leucotrienos y ácidos epoxieicosatrienoicos). Estos metabolitos pueden modular al canal BK y, por lo tanto, el efecto directo del AA podría verse contaminado por la acción conjunta de los mismos [55,143,161]. Por lo tanto, para confirmar los efectos observados en la configuración más fisiológica, realizamos la siguiente serie experimental en la configuración *Inside-Out* (IO), que permite registrar al canal BK en ausencia de inhibidores, sin contaminación por corrientes iónicas mediadas por otros

tipos de canales y en ausencia de las enzimas citoplasmáticas que puedan metabolizar el AA. En estas condiciones experimentales (configuración IO en las CML aisladas de la AUH) se obtienen corrientes de canal único debido a la baja densidad de canales iónicos.

En primer lugar, analizamos si el AA modifica la dependencia del voltaje que presenta la activación del canal BK. Para ello estudiamos el efecto del AA sobre la P_o del canal registrada a diferentes voltajes aplicando un protocolo de rampa de voltaje similar al descrito por Carl y Sanders [146] que permite obtener la curva de activación (curva P_o -V) en forma rápida y precisa. Los registros de corriente fueron llevados a cabo en condiciones de concentración simétrica de K^+ y con 50 nM de Ca^{2+} libre en la solución del baño (en contacto con la cara intracelular de la membrana celular). El protocolo de voltaje utilizado consistió en una rampa hiperpolarizante desde +80 a -80 mV con una velocidad de cambio de voltaje de 0.08 mV/ms, precedida de un pulso de voltaje instantáneo de 500 ms de duración a +80 mV. La elección de la concentración de Ca^{2+} intracelular, el sentido hiperpolarizante de la rampa y la velocidad de la misma, fue realizada a partir de la puesta a punto del protocolo (ver *Metodología*). El AA fue agregado desde la solución del baño entrando así en contacto con la cara intracelular de la membrana.

En la Figura 4.a se muestran los registros típicos superpuestos de las corrientes de canal único del canal BK evocadas por rampas de voltaje sucesivas, para la condición control y en presencia de 10 μ M de AA. La identificación del canal BK se realizó en base al valor de conductancia unitaria característico de este canal (del orden de los 250 pS). En la Figura 4.b se muestran las curvas de corriente promedio en función del voltaje, obtenidas al promediar las corrientes evocadas en las repeticiones de la rampa en cada condición, y en la Figura 4.c se representan las curvas medias de activación. Los resultados obtenidos mostraron, coherentemente con lo observado a nivel de la corriente macroscópica, que el AA induce un aumento en la probabilidad de apertura del canal BK estadísticamente significativo a potenciales mayores a +23 mV ($p < 0.05$, test t de Student apareado). Además, produce un desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales de membrana más hiperpolarizados, cuantificado mediante el parámetro $V_{1/2}$ que surge del ajuste de las curvas P_o -V con la función de

Boltzmann. Observamos un desplazamiento del $V_{1/2}$ de aproximadamente -20 mV, desde 104.7 ± 1.5 mV en la condición control a 83.9 ± 0.5 mV en presencia de AA, ($p < 0.05$, test t de Student apareado), sin una modificación significativa del valor de z (1.40 ± 0.06 y 1.29 ± 0.03 en condición control y en presencia de AA, respectivamente; $p > 0.05$, test t de Student apareado).

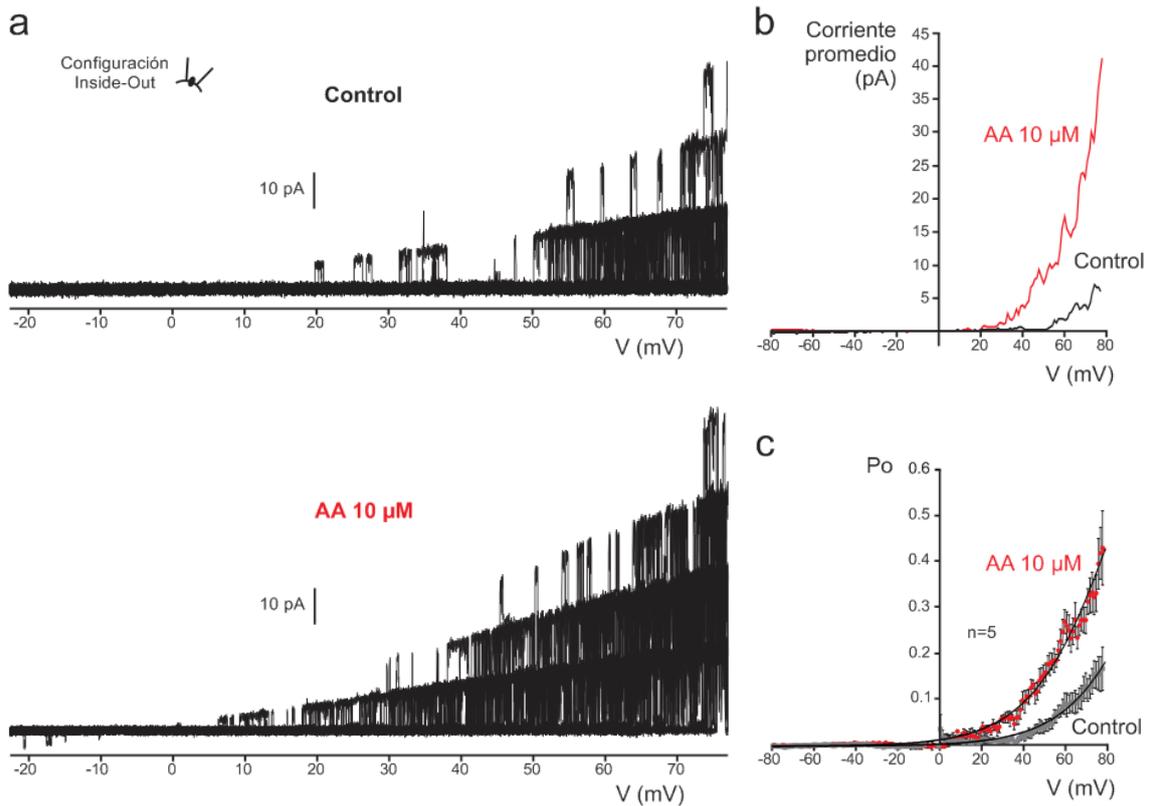


Figura 4. Efecto del AA 10 μM sobre la activación por voltaje del canal BK, a nivel de canal único en CML de AUH. a: 30 registros representativos superpuestos, correspondientes a corrientes de canal único del canal BK en configuración IO, obtenidos al aplicar sucesivas rampas de voltaje hiperpolarizantes, desde +80 a -80 mV, en las condiciones control y luego de perfundir AA 10 μM. En este caso el parche contiene cuatro copias del canal BK. **b:** Curvas de corriente promedio vs. voltaje obtenidas a partir de los registros mostrados en a. **c:** Curvas medias de activación (P_o vs. V) para cada condición ($n=5$ parches provenientes de dos muestras de cordón umbilical). La P_o media en presencia de AA muestra diferencias significativas respecto a la situación control a voltajes mayores a +23 mV ($p < 0.05$, test t de Student apareado). Las curvas fueron ajustadas con la función de Boltzmann (líneas continuas) tomando $P_o=1$ como valor de máxima activación.

A partir del análisis de estos resultados podemos decir que el efecto directo del AA sobre el canal BK no sólo potencia su actividad a los potenciales en donde el canal ya tenía una actividad basal significativa (aperturas registradas en la condición control), sino que además se observa una actividad significativa del canal a potenciales hiperpolarizados, en donde inicialmente la probabilidad de apertura era tan baja que no se registraban aperturas en la condición control. Esto último sugiere que el efecto del AA como activador del canal BK en las células de músculo liso podría ser relevante a nivel fisiológico, posibilitando la apertura de este canal de K^+ a potenciales de membrana más cercanos al potencial de reposo de estas células. Por último, el hecho de que el AA active al canal sin modificar la pendiente de la curva de activación (estimada a partir del valor z del ajuste) indica que el AA no modifica la sensibilidad al voltaje del canal. En otras palabras, si bien el AA induce la activación del canal a potenciales de membrana más negativos (desplazamiento hacia la izquierda de la curva Po-V), no modifica la razón de cambio de la Po frente al cambio de potencial de membrana (misma pendiente de la curva Po vs. V).

Vista la aceleración de la cinética de activación generada por el AA en las corrientes mediadas por el canal BK en la configuración WC en las CML de la AUH, nos planteamos estudiar este proceso cinético a nivel de canal único. Para ello, analizamos el efecto del AA sobre la latencia a la primera apertura evocada por un pulso despolarizante desde el potencial de mantenimiento de -80 mV hasta +80 mV, aplicado al menos 50 veces, en la configuración IO. Este análisis, además de permitir la evaluación del efecto en la cinética únicamente en el canal de interés, identificado inequívocamente a través de su conductancia unitaria, otorga la posibilidad de estudiar el fenómeno de activación independientemente del proceso de inactivación, que pueden presentar algunos tipos de canales iónicos. La latencia se calcula como el tiempo transcurrido desde que se aplica un estímulo activador hasta que se produce la primera apertura del canal. Debido al comportamiento estocástico de los canales iónicos, la latencia medida para un mismo canal estimulado con el mismo pulso de voltaje, aplicado varias veces, será diferente en cada determinación. Con estos valores construimos para cada condición (control y en presencia de AA) la función *cdf* (del inglés, *cumulative density function*) que consiste en realizar un histograma acumulativo

de los tiempos medidos y representa la probabilidad que el canal aún no se haya abierto por primera vez a los tiempos indicados. Para los parches con más de una copia del canal, la verdadera función *cdf* fue obtenida como la raíz enésima de la función *cdf* aparente, donde N es el número de canales presentes en el parche. Luego, a partir del ajuste de cada función *cdf* con una ecuación de decaimiento exponencial se obtiene la constante temporal de activación por voltaje (τ_{act}).

En la Figura 5.a se muestran 10 registros típicos del protocolo de latencia para cada condición, control y luego de 5 minutos de perfusión con 10 μ M de AA. Como puede observarse a simple vista, el AA produce una clara disminución en los tiempos de latencia. Considerando el total de los pulsos, en la situación control la actividad del canal BK es baja y en el 25% de los pulsos no se registra ninguna apertura, mientras que, posterior al tratamiento con AA, se produce un claro aumento de la probabilidad de apertura y solo en el 5% de los pulsos no se observa ninguna apertura del canal. En la Figura 5.b se muestran las funciones *cdf* obtenidas para el mismo parche en ambas condiciones y sus respectivos ajustes con una función de decaimiento exponencial. De la observación de estas curvas se desprende que el AA induce un desplazamiento de las curvas *cdf* hacia valores menores de latencia, es decir que en presencia de AA la activación por voltaje del canal BK se produce a tiempos más cortos. En ambas condiciones, el ajuste de las *cdf* fue logrado con funciones exponenciales de primer orden y, teniendo en cuenta que el número de componentes exponenciales necesarios para obtener un buen ajuste refleja el número de estados conformacionales cerrados con diferente cinética de transición hacia el estado abierto, podemos decir que, en estas condiciones, existe una única transición desde el estado cerrado al abierto. De esta forma descartamos la posibilidad de que en el proceso de activación del canal existan transiciones a través de distintos estados cerrados o, en el caso de existir, los mismos no constituyen pasos limitantes en la cinética. El análisis cuantitativo de la aceleración de la cinética de activación (Figura 5.c) nos muestra que la τ_{act} media disminuyó significativamente, desde un valor de 428.99 ± 28.08 ms para la condición control a un valor de 78.58 ± 3.29 ms con AA ($p < 0.05$, test t de Student). Este resultado indica que el cambio en la P_o del canal en función del tiempo ante un estímulo despolarizante se acelera en presencia de AA.

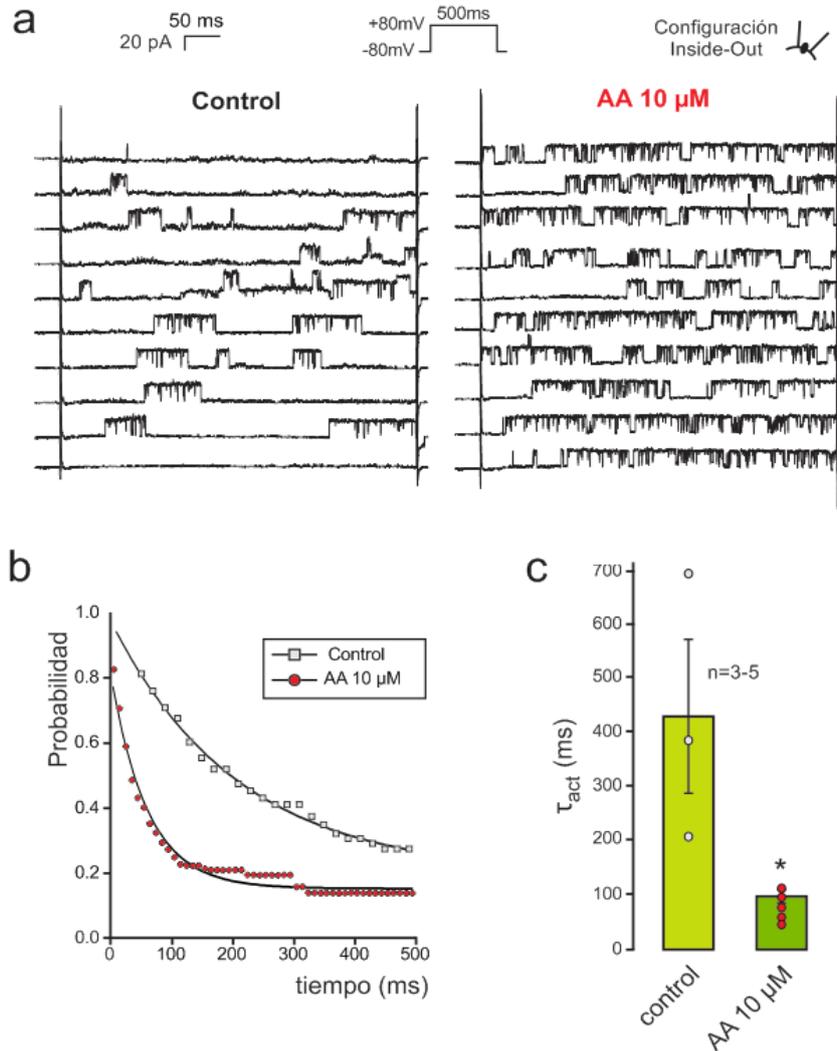


Figura 5. Efecto del AA 10 μ M sobre la latencia a la primera apertura evocada por voltaje del canal BK, a nivel de canal único en CML de AUH. a: 10 registros representativos correspondientes a corrientes del canal BK en configuración IO, obtenidos al aplicar sucesivos pulsos de 500 ms desde -80 a +80 mV, en las condiciones control y luego de 5 minutos de perfusión de AA 10 μ M. En este caso el parche contiene una única copia del canal BK. **b:** Funciones cdf (histogramas acumulativos de latencias) obtenidas a partir de los registros mostrados en **a**. La función cdf indica la probabilidad de que el canal permanezca cerrado a un tiempo dado. Las líneas continuas corresponden a ajustes con una función de decaimiento exponencial de primer orden, a partir de los cuales obtuvimos las constantes temporales de activación (τ_{act}). **c:** τ_{act} medias obtenidas para cada condición (n= 3-5 parches provenientes de cinco muestras de cordón umbilical). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, test t de Student).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante el registro de corrientes macroscópicas y muestran, a nivel de canal único, un aumento en la Po del canal y un incremento en su cinética de activación que podrían explicarse por una desestabilización del estado cerrado del canal inducida por el AA. Sin embargo, quedan aún varias preguntas de interés acerca de en qué condiciones y de qué manera el AA es capaz de producir dicho efecto, que serán abordadas específicamente mediante el estudio del canal en sistemas de expresión heterólogos, como se describirá más adelante.

RELEVANCIA FISIOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN UN LECHO VASCULAR DE RESISTENCIA

Para estudiar el impacto fisiológico de la activación del canal BK inducida por el AA en el músculo liso vascular y su efecto sobre la contractilidad, utilizamos experimentos *ex-vivo* con tejido intacto. Si bien la propuesta para esta Tesis fue realizar medidas de fuerza isométrica en anillos vasculares de AUH, esta serie experimental no pudo ser concluida, ya que las muestras de cordón umbilical humano fueron discontinuadas. Como alternativa, realizamos medidas de presión en el lecho vascular mesentérico de ratas Sprague-Dawley, que presenta la ventaja de ser un lecho vascular de resistencia con un impacto relevante en la determinación de la presión arterial.

Estudiamos el efecto del AA sobre la presión de perfusión arterial del lecho mesentérico precontraído con noradrenalina (NA) 1 μ M, en ausencia y en presencia de paxilina 500 nM (inhibidor específico del canal BK), y medimos el porcentaje de disminución de la resistencia vascular (%DRV). Los resultados, presentados en la Figura 6, muestran que el AA 10 μ M produce un descenso de la presión de perfusión por disminución de la resistencia vascular y que este efecto es significativamente menor cuando el canal BK se encuentra inhibido por paxilina (AA: %DRV= 54.57 \pm 10.76;

AA+paxilina: %DRV= 26.47 ± 5.99 ; $p < 0.05$, test t de Student apareado). Estos resultados muestran en un entorno más fisiológico y complejo, que la activación del canal BK inducida por el AA es capaz de producir vasorrelajación, lo que sugiere que este ácido graso podría tener un rol relevante en la regulación de la resistencia periférica y por lo tanto en la determinación de la presión arterial.

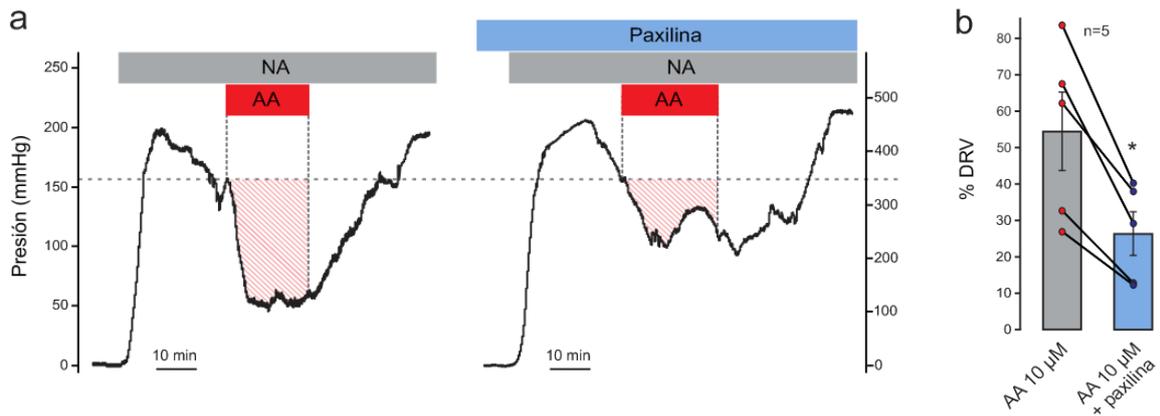


Figura 6. Efecto del AA 10 μM sobre la presión de perfusión arterial en el lecho vascular mesentérico de rata. a: Registros representativos de la presión de perfusión arterial del lecho mesentérico de rata sometido a un estímulo vasoconstrictor de NA 1 μM , y posteriormente al agregado de AA 10 μM , en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de paxilina 500 nM. **b:** Porcentaje de disminución de la resistencia vascular (%DRV) medio para la situación sin paxilina (barra gris) y con paxilina (barra azul). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($n=5$, $p < 0.05$, test t de Student apareado).

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE EL CANAL BK ASOCIADO A LA SUBUNIDAD ACCESORIA β 1 ESPECÍFICA DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO.

Rol de la subunidad accesoria β 1 en la activación del canal BK por el AA

Tal como se presentó en la *Introducción* de esta Tesis, la presencia de alguna de las distintas subunidades accesorias β 1-4 modifica las propiedades biofísicas como la cinética de activación, la sensibilidad al calcio y la inactivación del canal BK [9,51]. También se ha descrito que la presencia de estas subunidades puede modificar el efecto de sustancias endógenas y exógenas sobre el canal. Inclusive, en algunos casos la presencia de determinada subunidad β es necesaria para que dicha sustancia ejerza su efecto sobre el canal [74,121]. Previo al desarrollo de esta Tesis, se reportó que el efecto activador del AA es dependiente de la presencia de las subunidades accesorias β 2 y β 3 [142]. Sin embargo, el rol de la subunidad β 1, expresada en el músculo liso, no había sido explorado, por lo tanto nos propusimos evaluar si la activación del canal BK observada en las CML de la AUH podía ser el reflejo de una activación dependiente de β 1.

Para esta serie experimental expresamos el canal BK en las células HEK293T realizando transfecciones transientes de los genes que codifican para la subunidad α formadora del canal (*KCNMA1*, *U11058*) y la subunidad accesoria β 1 (*KCNMB1*, *AF035046*), del canal BK humano. Se realizaron transfecciones con solo la subunidad α y con α junto a β 1 ($\alpha+\beta$ 1). Luego de 16-24 horas de expresión pudimos evaluar el efecto del AA sobre la corriente del canal BK utilizando la técnica de *patch-clamp* en la configuración IO.

En primer lugar, validamos que la expresión del canal BK con y sin la subunidad accesoria β 1 fuese efectiva. Con el objetivo de obtener la conductancia unitaria, la relación Po-V y el tiempo medio de permanencia en el estado abierto en las dos condiciones de transfección, registramos la actividad del canal a nivel de canal único con una concentración fisiológica de 0.3 μ M de Ca^{2+} intracelular, en estado estacionario a distintos valores de potencial de membrana. En la Figura 7.a y b se

muestran los registros típicos de la actividad del canal BK como homotetrámero de subunidades α y complejos $\alpha+\beta 1$, respectivamente. Tanto la elevada conductancia unitaria, obtenida a partir de las curvas de corriente unitaria vs. voltaje (Figuras 7.c y d), como la dependencia del voltaje de la probabilidad de apertura del canal (Figuras 7.e y f) son completamente compatibles con las características del canal BK en las dos condiciones de transfección [117]. Además, la identidad de canal fue confirmada al observar su activación ante el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular a 3 μM , tal como se muestra en las Figuras 7.i y j. El agregado de Ca^{2+} se realizó a distintos voltajes en cada condición de transfección dado que la presencia de la subunidad $\beta 1$ modifica la P_o en las condiciones control (Figuras 7.e y f). No se calculó el cambio en la P_o al aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular ya que la corriente se hace macroscópica debido a la alta expresión y activación del canal. Por su parte, la medida del tiempo medio de permanencia en el estado abierto fue utilizada para confirmar la expresión funcional de la subunidad accesoria $\beta 1$, dado que la presencia de la misma prolonga los tiempos de apertura del canal BK [162]. En las Figuras 7.g y h se muestran los tiempos medios de permanencia en el estado abierto obtenidos en ambas condiciones de transfección a los potenciales de -20 y +20 mV, respectivamente. Observamos que las células transfectadas con el clon de la subunidad $\beta 1$ presentan tiempos de apertura significativamente mayores que aquellas en las que solo se transfectó la subunidad α ($p < 0.05$, test t de Student), confirmando de manera funcional la expresión de la subunidad accesoria del canal BK. Por último, realizamos el protocolo en células no fluorescentes, sin expresión del gen reportero, para descartar la expresión endógena del canal BK, cuya ausencia fue confirmada en todas las células evaluadas ($n=15$).

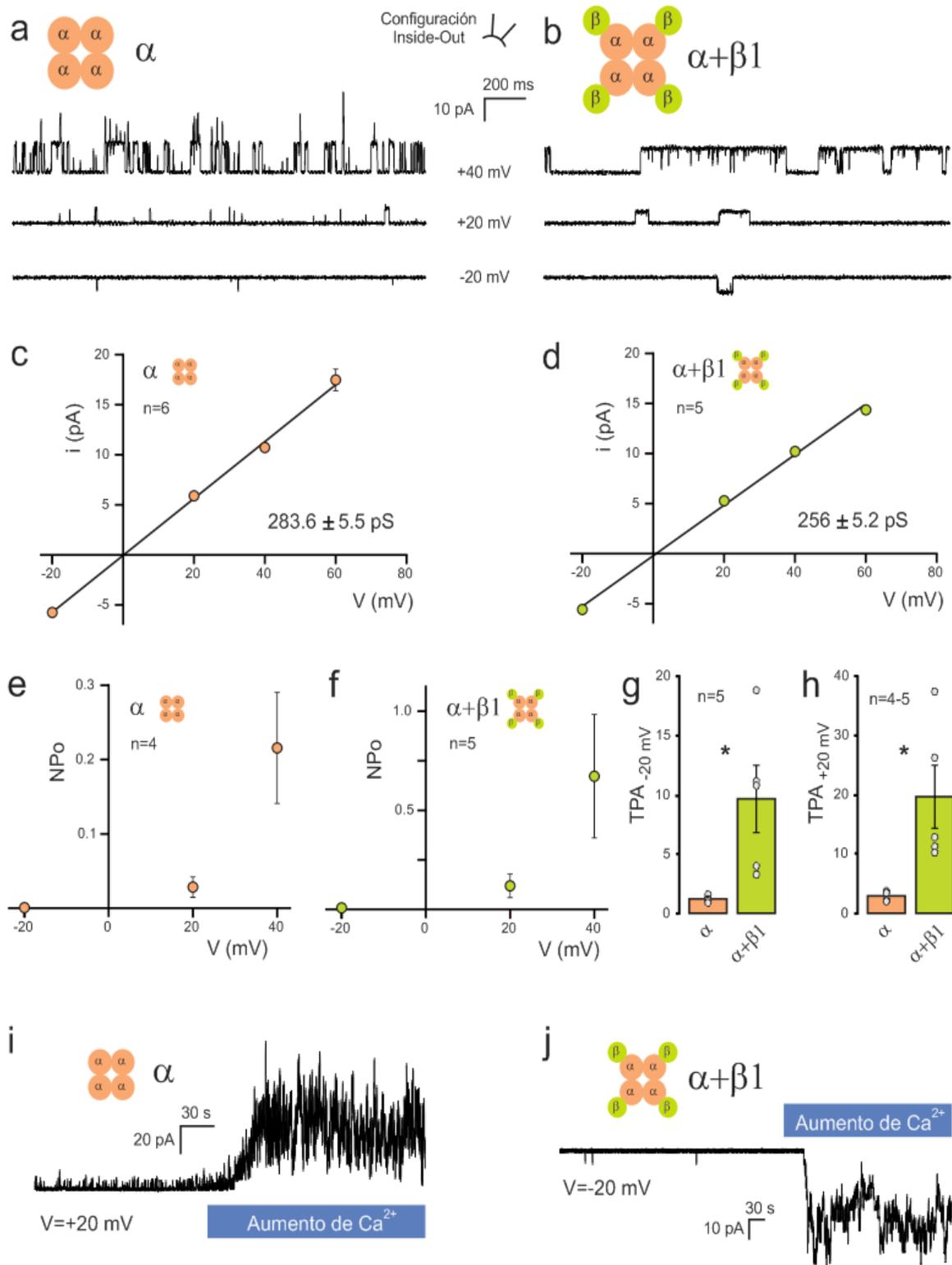


Figura 7. Validación funcional de la expresión en células HEK293T del canal BK en ausencia y en presencia de la subunidad $\beta1$. **a, b:** Registros típicos de corriente de canal único del canal BK obtenidos en configuración IO a distintos voltajes y con una concentración de Ca^{2+} intracelular de $0.3 \mu M$ en células HEK293T transfectadas con la subunidad α (**a**) y con las subunidades $\alpha+\beta1$ (**b**). **c-f:** Curvas de valores medios de amplitud de corriente unitaria (**c, d**) vs. voltaje (i - V) y de probabilidad de apertura (**e, f**)

*vs. voltaje (NPo-V) obtenidas a partir de las condiciones evaluadas en **a** y **b**. Las curvas *i*-*V* se ajustaron con una función lineal cuya pendiente indica la conductancia unitaria del canal, informada en la figura. **g, h**: Valores medios de los tiempos de permanencia en el estado abierto (TPA) del canal BK en cada condición de transfección, registrados a -20 mV (**g**) y +20 mV (**h**). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($n=4-5$, $p<0.05$, test *t* de Student). **i, j**: Trazos representativos de la activación del canal BK α (**i**) y $\alpha+\beta1$ (**j**) por incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de 0.3 a 3 μM .*

Una vez validada la estrategia de transfección, probamos el efecto del AA sobre la actividad en estado estacionario del canal BK α y $\alpha+\beta1$, a +20 mV y a -20 mV, respectivamente, con una concentración de 0.3 μM de Ca^{2+} intracelular. Utilizamos estas condiciones experimentales ya que garantizan observar todos los efectos posibles, dado que el canal presenta una P_o basal que permite ver tanto inhibición como activación, sin que las corrientes se hagan macroscópicas debido a la sobreexpresión del canal en el sistema de expresión heterólogo. Esto último es esencial para poder evaluar posibles efectos sobre la conductancia unitaria del canal que se observan como cambios en la amplitud de la corriente de las aperturas de canal único. Por último, tanto el voltaje aplicado como la concentración de Ca^{2+} intracelular utilizados son compatibles con los que presentan normalmente las CML en reposo.

En la Figura 8 se muestran los registros típicos de la actividad de estado estacionario del canal BK, formado por homotetrámeros de subunidades α (Figura 8.a) y por complejos $\alpha+\beta1$ (Figura 8.b), antes y después de 4 minutos de perfusión con AA 10 μM . Podemos observar que el ácido graso genera un incremento significativo en la probabilidad de apertura únicamente cuando el canal BK está expresado junto a la subunidad $\beta1$ (Figuras 8.c y f), sin modificar la conductancia unitaria en ninguno de los dos casos (Figuras 8.b y e). De esta manera, confirmamos que la activación del canal BK por AA requiere de la presencia de $\beta1$, y que por lo tanto el efecto observado anteriormente en las CML es posible gracias a la expresión constitutiva de esta subunidad accesoria en este tipo celular.

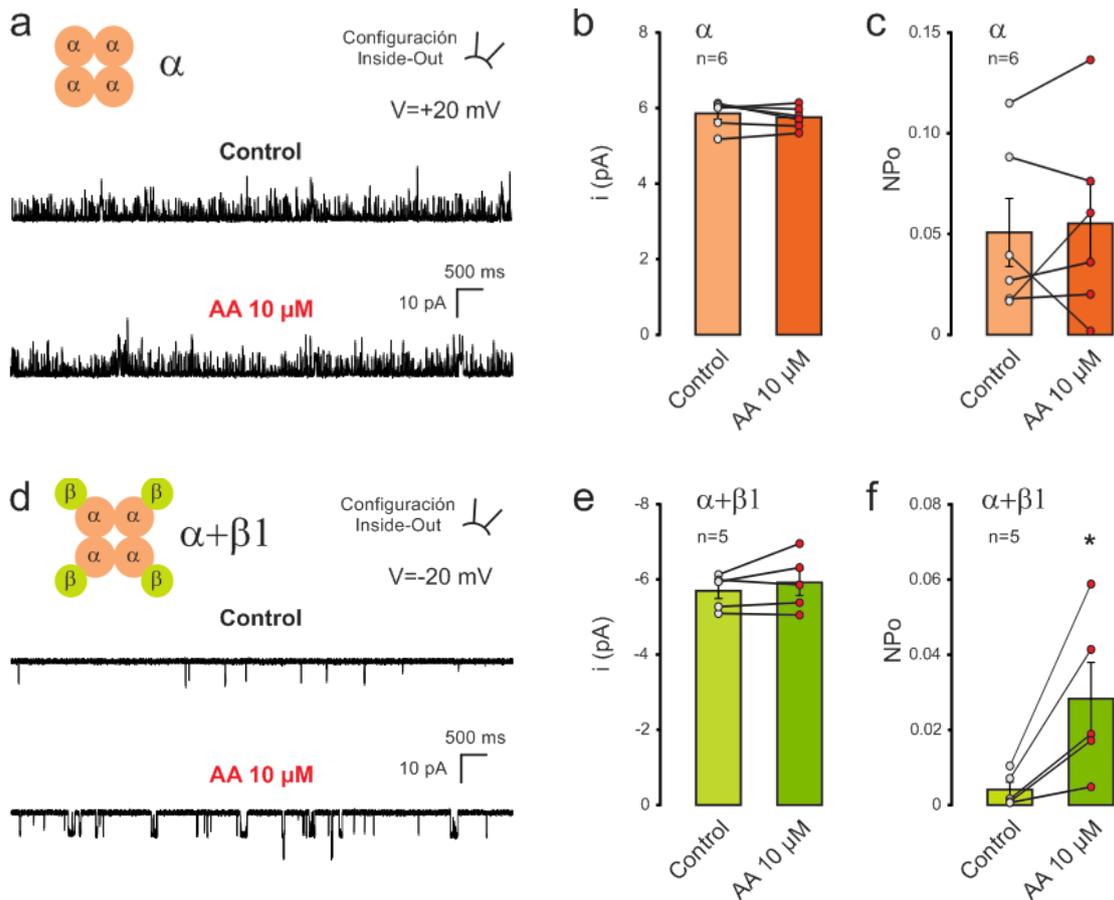


Figura 8. Efecto del AA $10 \mu\text{M}$ sobre la conductancia unitaria y la probabilidad de apertura de canales BK expresados en ausencia y en presencia de la subunidad β 1 en sistema de expresión heterólogo. *a, d:* Registros típicos de corriente de canal único obtenidos en configuración IO a $+20$ mV (α) y -20 mV ($\alpha+\beta$ 1) y con una concentración de Ca^{2+} intracelular de $0.3 \mu\text{M}$, en células HEK293T transfectadas con la subunidad α sin (*a*) y con (*d*) la subunidad accesoria β 1, antes y después del agregado de AA $10 \mu\text{M}$. *b, c, e, f:* Valores medios de amplitud de corriente unitaria (*b* y *e*) y de probabilidad de apertura (*c* y *f*) obtenidos a partir de registros como los presentados en *a* y *d*. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tratado con AA ($n=5-6$, $p<0.05$, test *t* de Student apareado).

Continuamos el estudio de la dependencia de la subunidad accesoria β 1 del efecto activador del AA sobre el canal BK en un rango más amplio de voltajes, analizando las corrientes macroscópicas que se generan a potenciales más despolarizados en el sistema de expresión heterólogo. Debido a que el nivel de expresión de los canales es elevado, el aumento de la P_o producido por una mayor despolarización evoca corrientes macroscópicas en lugar de corrientes de canal único, en la configuración IO. Por lo tanto, trabajando en condiciones similares a las

detalladas en la serie experimental anterior (en este caso se utilizó una solución intracelular libre de Ca^{2+}), la aplicación de un protocolo de pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento de 0 mV hasta potenciales entre -50 y +190 mV, en incrementos de 20 mV, seguido de un pulso de 50 ms a -50 mV, induce corrientes macroscópicas como las que se observan en la Figura 9.a. Estos registros típicos muestran las corrientes mediadas por el canal BK, conformado como heteromultímero $\alpha+\beta 1$, obtenidas antes y después de la perfusión con AA 10 μM , y su posterior lavado. Como era de esperar, en concordancia con lo observado a nivel de canal único, el AA produce un claro efecto activador reversible similar al observado y descrito en las CML de la AUH. A partir de las corrientes macroscópicas de cola construimos las curvas $G/G_{\text{max}}-V$ de la condición control y en presencia de AA. Mediante el ajuste de las curvas con la ecuación de Boltzmann obtuvimos los parámetros característicos, $V_{1/2}$ y z , de la activación por voltaje del canal (Figura 9.b). Observamos que la activación por AA consiste en un desplazamiento significativo de la curva $G/G_{\text{max}}-V$ hacia potenciales más negativos, cuantificado como un cambio en el valor de $V_{1/2}$ desde 129.8 ± 3.9 mV en condiciones control, a 79.3 ± 5.3 mV en presencia de AA ($p < 0.05$, test t de Student apareado, Figura 9.c). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el parámetro z (z : 1.10 ± 0.08 y 1.13 ± 0.07 para las condiciones control y con AA, respectivamente; $p > 0.05$, test t de Student apareado), indicando que el AA no produce cambios en la sensibilidad aparente del canal BK al voltaje.

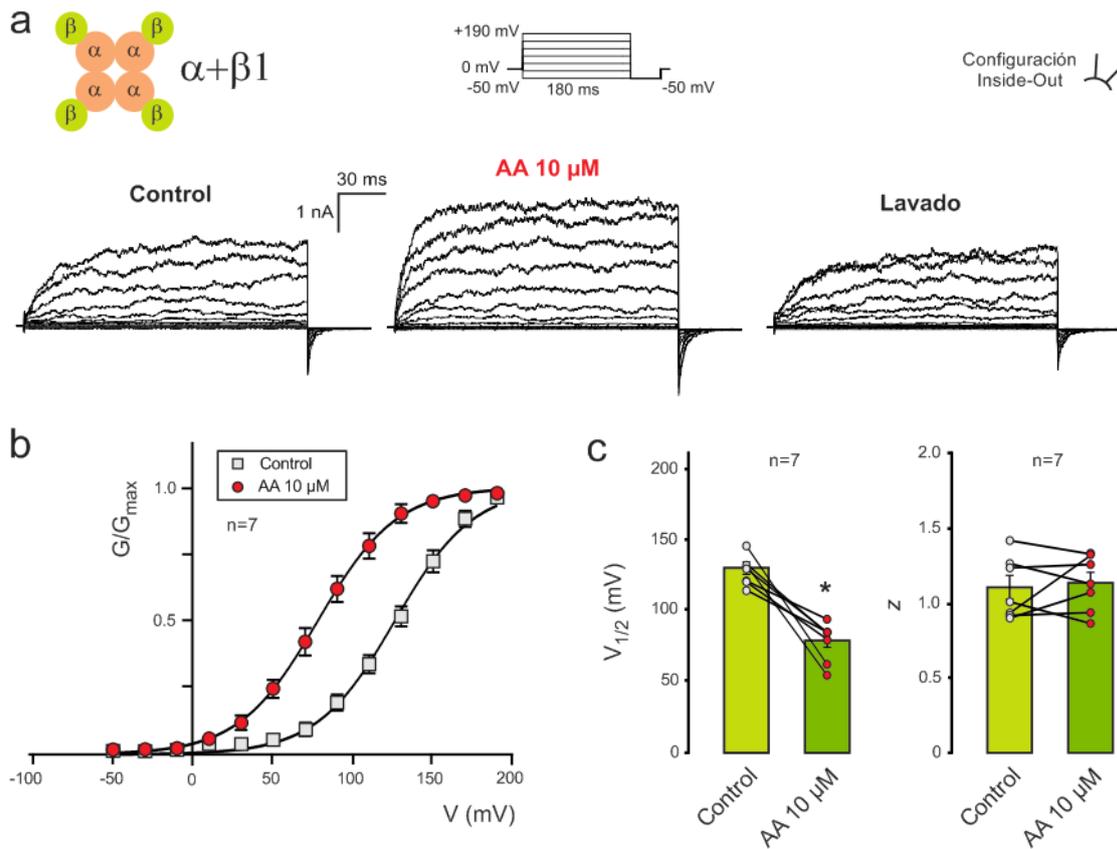


Figura 9. Efecto del AA 10 μ M sobre canales BK expresados junto a $\beta 1$ medido en la corriente macroscópica en sistema de expresión heterólogo. a: Registros típicos superpuestos de las corrientes macroscópicas del canal BK ($\alpha + \beta 1$) expresado en células HEK293T, obtenidos en configuración IO tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de 20 mV entre -50 y +190 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV, seguido de un pulso de 50 ms a -50 mV, en un mismo parche en situación control, luego del agregado de AA 10 μ M y posterior al lavado. **b:** Curvas de valores medios de conductancia normalizada por la conductancia máxima, en función del voltaje aplicado (G/G_{max} -V) construidas a partir de registros de corriente como los mostrados en **a**. Las líneas continuas representan sus respectivos ajustes con la ecuación de Boltzmann. **c:** Parámetros $V_{1/2}$ y z obtenidos de los ajustes mostrados en **b**. El asterisco indica diferencias significativas (n=7, $p < 0.05$, test t de Student apareado).

Por otro lado, cuando se aplicó este protocolo de voltaje en células transfectadas únicamente con la subunidad α del canal, la perfusión de AA 10 μ M no modificó la conductancia macroscópica del canal BK a ninguno de los potenciales evaluados (Figura 10), también en concordancia con los resultados de canal único. Dado que en estas condiciones no pudimos obtener la G_{max} , las curvas G-V no pudieron

ser normalizadas por este valor, ni realizamos el ajuste de las mismas con la ecuación de Boltzmann (Figura 10.b).

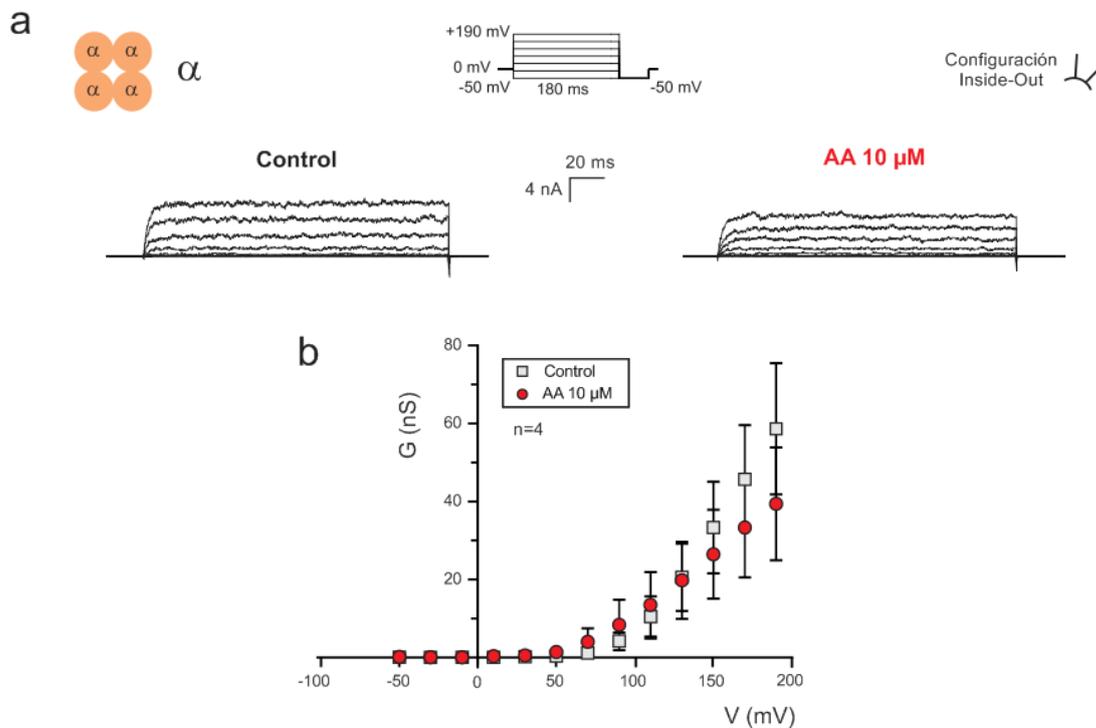


Figura 10. Efecto del AA 10 μ M sobre canales BK expresados en ausencia de β 1, medido en la corriente macroscópica en sistema de expresión heterólogo. a: Registros típicos superpuestos de las corrientes macroscópicas del canal BK (α) expresado en células HEK293T, obtenidos en configuración IO tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 20 mV entre -50 y +190 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV, seguido de un pulso de 50 ms a -50 mV, en un mismo parche en situación control y luego del agregado de AA 10 μ M. **b:** Curvas de valores medios de conductancia en función del voltaje aplicado (G-V) construidas a partir de registros de corriente como los mostrados en a. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (n=4, p>0.05, test t Student apareado).

Adicionalmente, para descartar la posibilidad de que el AA active corrientes endógenas de las células HEK293T, repetimos este ensayo sobre células no transfectadas, en donde corroboramos que el AA no genera efectos sobre estas corrientes (datos no mostrados). Este control negativo fue realizado además en células HEK293, utilizadas también como sistema de expresión heterólogo en esta Tesis. De

esta forma nos aseguramos de que todos los efectos observados en este sistema de estudio se deben a la modulación del canal BK expresado.

Caracterización del efecto de activación del AA: dependencia de la concentración

En esta serie experimental evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de AA (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 μM) sobre las corrientes macroscópicas evocadas por voltaje, mediadas por canales BK co-expresados con $\beta 1$, en las mismas condiciones experimentales que la serie anterior. En las Figuras 11.a-c se muestran registros típicos obtenidos para una misma célula, en situación control y luego del agregado de 1 y 10 μM de AA, y sus respectivas curvas I-V, observándose una clara dependencia de la concentración que se mantiene a voltajes superiores a +70 mV. En la Figura 11.d se muestra el curso temporal del efecto activador que el AA produce sobre la corriente medida a +110 mV, expresado como la corriente normalizada (I/I_0) en función del tiempo, siendo I_0 el valor de la corriente en la situación control a +110 mV.

A partir de las curvas I-V obtenidas para las distintas concentraciones de AA, construimos la curva concentración-respuesta (CCR) para cada voltaje aplicado. En la Figura 11.e se muestra, a modo ilustrativo, la CCR obtenida a +110 mV. A partir del ajuste de estas curvas con la ecuación de Hill, obtuvimos los parámetros pD_2 ($-\log\text{EC}_{50}$) y Hill Slope (pendiente) para los voltajes donde la activación fue significativa. Observamos que el AA presenta una EC_{50} de 4.15 μM (pD_2 : 5.38 ± 0.52) y un Hill Slope de 0.73 ± 0.35 , para la corriente medida a +110 mV. Estos parámetros no se modificaron significativamente con el voltaje (Figura 11.f; $p > 0.05$, *extra sum of squares F test*). Esto último indicaría que el potencial de la membrana en sí mismo, no cumple un rol importante en el mecanismo de acción del AA sobre canal BK.

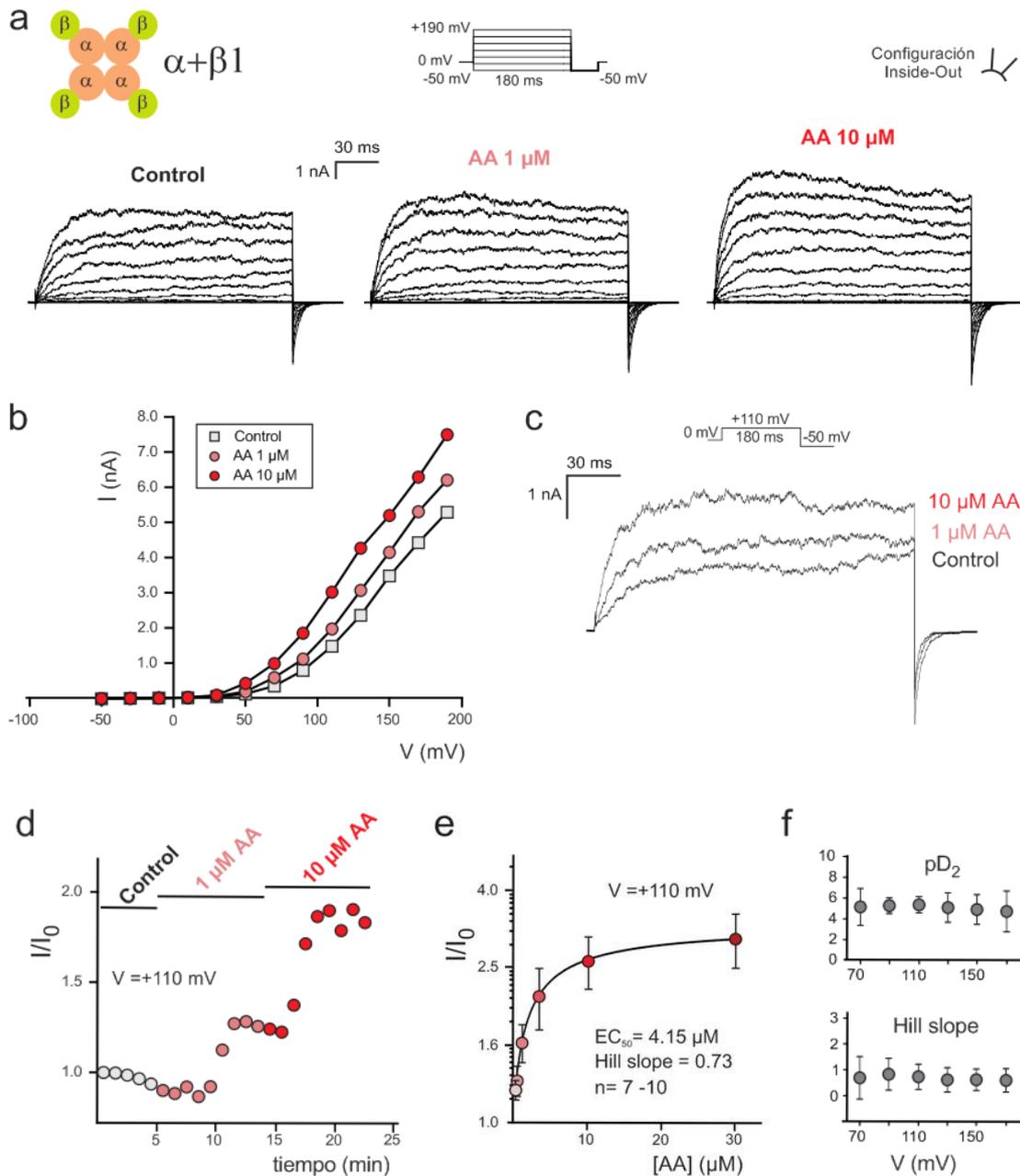


Figura 11. Dependencia de la concentración del efecto del AA sobre canal BK. Curva Concentración-Respuesta realizada en corrientes macroscópicas en sistema de expresión heterólogo. a: Registros típicos superpuestos de las corrientes macroscópicas del canal BK ($\alpha + \beta 1$) expresado en células HEK293T, obtenidos en configuración IO tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 20 mV entre -50 y +190 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV, seguido de un pulso de 50 ms a -50 mV, en un mismo parche en situación control y luego del agregado de 1 μM y 10 μM de AA. **b:** Curvas de corriente vs. voltaje (I-V) construidas a partir de los registros mostrados en a. **c:** Trazos representativos superpuestos de las corrientes correspondientes al pulso de +110 mV, obtenido en un parche que se expuso

secuencialmente a condiciones control y a 1 y 10 μM de AA. **d**: Curso temporal representativo del efecto activador del AA sobre el canal BK, obtenido de los registros de corriente a +110 mV que se muestran en **c**. **e**: Curva concentración-respuesta media, correspondiente a +110 mV. Los datos fueron ajustados con una función de Hill (línea continua). **f**: Dependencia de voltaje de la EC_{50} , expresada como pD_2 , y del Hill Slope de la activación del canal BK por el AA. No se observan diferencias significativas en los valores obtenidos a los distintos potenciales ($n=7-10$, $p>0.05$, ANOVA de una vía, seguido del post hoc test de Holm-Sidak).

Caracterización del efecto de activación del AA: dependencia del metabolismo del AA

La activación del canal BK en configuración IO, tanto en CML de la AUH como en las células HEK293T, refuerza nuestra hipótesis que el AA ejerce su efecto de manera directa sobre la proteína del canal. De lo contrario, el posible mediador de un efecto indirecto del AA debería estar presente en los parches de membrana a partir de los cuales obtenemos los registros de corriente en configuración IO. Si bien en esta condición es poco probable que el efecto observado sea indirecto, existen en la bibliografía algunos reportes que sugieren que algunas isoformas de las enzimas que metabolizan el AA podrían estar presentes aún en la configuración IO, ancladas en la membrana del parche [163,164]. Por lo tanto, realizamos una serie experimental donde evaluamos el efecto del AA en presencia de inhibidores de cada una de las enzimas que pueden metabolizarlo, y así poner a prueba la posibilidad de que la activación del canal BK esté causada por la génesis local de alguno de los metabolitos del AA.

En la Figura 12 se muestra un esquema simplificado de las vías metabólicas del AA, las enzimas y los inhibidores que fueron utilizados en este trabajo, elegidos mediante una minuciosa búsqueda bibliográfica, según el siguiente detalle:

- i) Indometacina 10 μM (Indo), como inhibidor de las enzimas ciclooxigenasas (COX).

- ii) Cinamil-3 4-dihidroxi- α -ciano cinamato 5 μ M (CDC), como inhibidor de las enzimas lipooxigenasas (LOX).
- iii) Ácido 17-octadecínico 5 μ M (17-ODYA), como inhibidor genérico de las enzimas del Citocromo P450 (CYP).

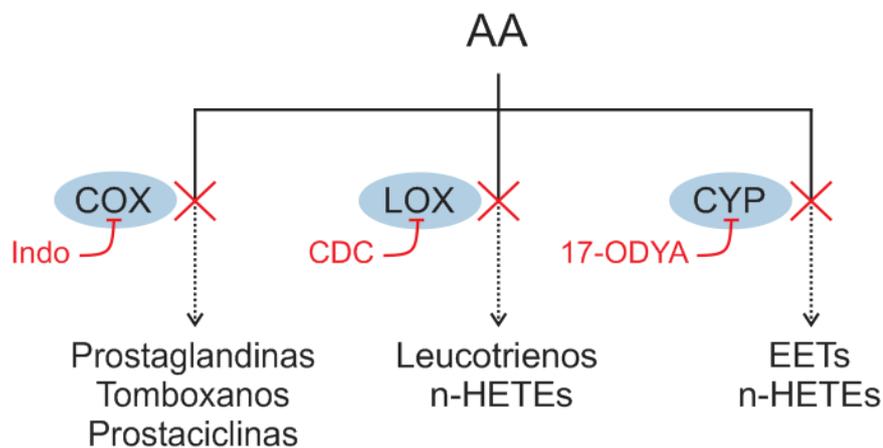


Figura 12. Esquema simplificado de las vías enzimáticas involucradas en la generación de los metabolitos del AA. En rojo se muestran los inhibidores utilizados para inhibir cada una de las vías. Las enzimas de cada vía se representan a través de sus abreviaturas (COX: ciclooxigenasas; LOX: lipooxigenasas; CYP: citocromo P450). En la parte inferior se mencionan resumidamente los metabolitos producidos en cada vía.

Previo al registro de la corriente, las células se incubaron durante 30 minutos con los tres inhibidores a fin de garantizar un bloqueo completo de las enzimas. Además, Indometacina y CDC fueron adicionados a las soluciones control y de AA, y perfundidos durante todo el experimento, debido a que su acción inhibitoria es reversible. En la Figura 13.a se muestran los registros típicos obtenidos en condiciones control y con AA 10 μ M, donde se puede observar que el efecto activador del AA persiste aún en presencia de los inhibidores de las tres enzimas capaces de metabolizarlo. Dado que el CDC es además un modulador de canal BK [152,165], el tiempo requerido para obtener la estabilidad de la corriente en presencia de los inhibidores fue de al menos 30 minutos y las curvas G-V se desplazaron a la derecha con respecto a la condición de control (sin los inhibidores). Este efecto hizo que, en la mayoría de las células probadas, la corriente no alcanzara la G_{max} y por lo tanto, en

este caso normalizamos los valores de conductancia para cada potencial utilizando el valor de la conductancia control a +170 mV. A pesar de esta dificultad experimental, los resultados mostraron que el efecto activador del AA persiste, dado que el ácido graso produce un aumento significativo de la magnitud de la conductancia evocada por voltaje, como puede verse en la Figura 13.b ($p < 0.05$, test t de Student apareado). Estos resultados son consistentes con los observados previamente y, si bien no permiten descartar que los metabolitos del AA puedan ejercer algún efecto, podemos afirmar que el AA tiene un efecto activador directo sobre el canal BK.

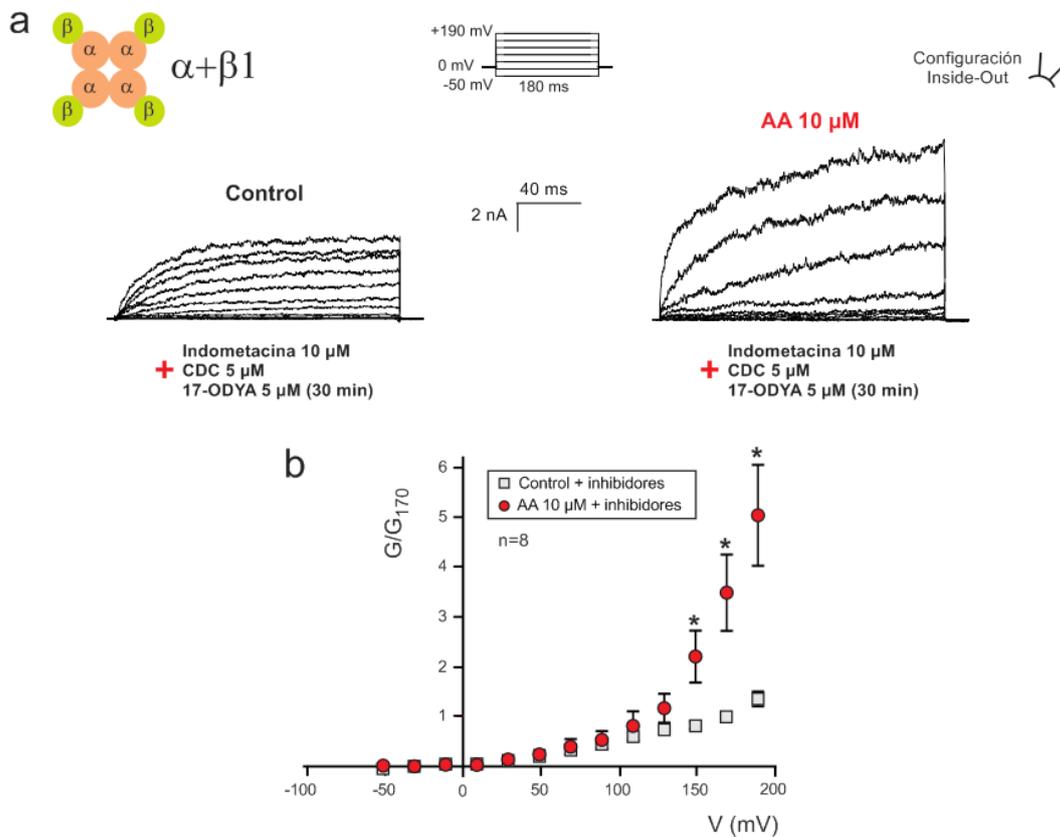


Figura 13. Efecto del AA 10 μ M en presencia de inhibidores de las enzimas COX, LOX y CYP, sobre la corriente macroscópica mediada por canales BK en sistema de expresión heterólogo. a: Registros típicos superpuestos de las corrientes macroscópicas del canal BK ($\alpha + \beta 1$) expresado en células HEK293T, obtenidos en configuración IO tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 20 mV entre -50 y +190 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV, en un mismo parche en situación control y luego del agregado de AA 10 μ M. **b:** Curvas de conductancia media, normalizada por la conductancia del control a +170 mV, en función del voltaje (G/G_{170} -V) construidas a partir de registros como los mostrados en a. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($n = 8$, $p < 0.05$, test t de Student apareado).

EFFECTO DEL AA SOBRE LOS MÓDULOS FUNCIONALES DEL CANAL BK ASOCIADO A LA SUBUNIDAD ACCESORIA β 1.

A continuación, se presentan los resultados de las series experimentales dirigidas a indagar el mecanismo de acción molecular por el cual el AA activa el canal BK en forma directa y dependiente de la subunidad accesoria β 1. Para ello tomamos como marco de análisis el modelo alostérico propuesto por Aldrich y Horrigan (HA), detallado en la *Introducción* de esta Tesis, que pondera el rol de cada uno de los factores involucrados en el mecanismo de activación del canal.

Como ya hemos mencionado, la probabilidad de apertura del canal BK depende del funcionamiento modular de diferentes dominios fundamentales en la inducción de las transiciones entre sus estados conformacionales. El modelo HA especifica que la actividad del canal es determinada tanto por el movimiento del sensor de voltaje (VSD) desde su conformación de reposo (*resting*) a su forma activa, como por la unión del Ca^{2+} a los dominios intracelulares de unión a este ión (CSD). Ambos módulos se comunican de manera alostérica entre sí y con el dominio formador de poro del canal (PGD) donde los cambios conformacionales en ambos sensores se transducen en cambios en la probabilidad de apertura del canal [103,104]. Además, se ha descrito que en el canal BK se producen aperturas aún en ausencia de estímulos en los sensores principales (VSD y CSD), fenómeno que se denomina *gating* intrínseco y constituye el tercer módulo de regulación de su actividad [103].

La subunidad accesoria β 1 modifica la actividad de los tres módulos funcionales del canal BK, ejerciendo una modulación positiva sobre los VSD y CSD, y negativa sobre el *gating* intrínseco del canal [77]. El hecho de que el AA requiera de la presencia de esta subunidad para ejercer su efecto, nos permite pensar en las posibilidades de que el mismo pueda estar actuando sobre β 1, interviniendo en la modulación que la misma ejerce sobre los diferentes dominios del canal BK, o de que el AA pueda estar actuando directamente sobre uno o más dominios de α y que el rol de β 1 sea otorgar un requerimiento estructural para la acción del ácido graso. En este contexto, mediante las diferentes estrategias experimentales que se describen a continuación, evaluamos

por separado el efecto del AA sobre el funcionamiento de cada uno de los tres dominios proteicos involucrados en la activación del canal.

Efecto del AA sobre el dominio sensor de voltaje del canal BK $\alpha+\beta 1$.

En los canales voltaje operados, los sensores de voltaje propiamente dichos consisten en residuos aminoacídicos con cargas positivas que permiten sensor cambios en el campo eléctrico a los lados de la membrana. En esta dinámica, además existen contracargas en la propia estructura del canal que estabilizan al sensor de voltaje en sus estados de reposo y activo. Al cambiar el potencial de la membrana, los segmentos transmembrana correspondientes al VSD se mueven traccionados por los residuos cargados, y ese pequeño movimiento de cargas genera una corriente transitoria, denominada corriente de *gating* (o de compuerta) que puede ser medida utilizando la técnica de *patch-clamp*. Estas corrientes son de magnitud mucho menor que las corrientes resistivas que transcurren a través del poro del canal y es necesario determinarlas en un sistema de expresión heterólogo que logre sobreexpresar fuertemente el canal iónico. De esta manera, realizando las medidas de corriente en ausencia del ión (en este caso en ausencia de K^+), es posible registrar las corrientes resultantes del movimiento del VSD aisladas del resto de las corrientes iónicas. Por lo tanto, el estudio de las corrientes de *gating* nos permite poner en evidencia si el efecto activador del AA sobre el canal BK involucra una modificación en el funcionamiento del VSD.

Para evaluar esto, realizamos una serie de experimentos en el Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV, Chile), utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión transiente del canal. Los mismos fueron sometidos a microinyección de mRNA codificante de las subunidades α y $\beta 1$. Las mediciones electrofisiológicas fueron realizadas 5 días después de realizada la microinyección, utilizando macroparches en la configuración IO. Las corrientes de *gating* fueron evocadas por pulsos de voltaje de 1 ms de duración en incrementos de a 10 mV desde -100 mV hasta +350 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de -100 mV. La carga efectiva asociada al movimiento del sensor de voltaje (Q) a cada

potencial se calculó como el área bajo la curva de corriente al inicio del pulso (estado ON de la corriente de *gating*). Con estos datos se construyeron las curvas Q/Q_{\max} vs. voltaje (Q/Q_{\max} -V) para cada condición evaluada y se ajustaron con una ecuación de Boltzmann.

En las Figuras 14.a y b se presentan los registros típicos de las corrientes de *gating* correspondientes al canal BK asociado a $\beta 1$, obtenidas en presencia y ausencia de AA 10 μM , y sus respectivas curvas Q/Q_{\max} -V. Observamos que en presencia de AA hay un desplazamiento significativo de la curva hacia la izquierda respecto a la curva control (Figura 14.c, Control: $V_{1/2} = 112 \text{ mV} \pm 5$; AA: $V_{1/2} = 89 \pm 4$, $p < 0.05$, test t de Student), sin cambios apreciables en la carga aparente del VSD cuantificado con el parámetro z del ajuste (Figura 14.d, Control: $z = 0.62 \pm 0.02$; AA: $z = 0.64 \pm 0.03$; $p > 0.05$, test t de Student). Estos resultados muestran que el AA facilita la activación del VSD, lo cual puede interpretarse como una estabilización del estado activo del mismo, sin alterar su carga aparente. Justamente, este es uno de los efectos característicos de la subunidad $\beta 1$ sobre el canal BK, y este resultado sugiere que el AA lo potencia.

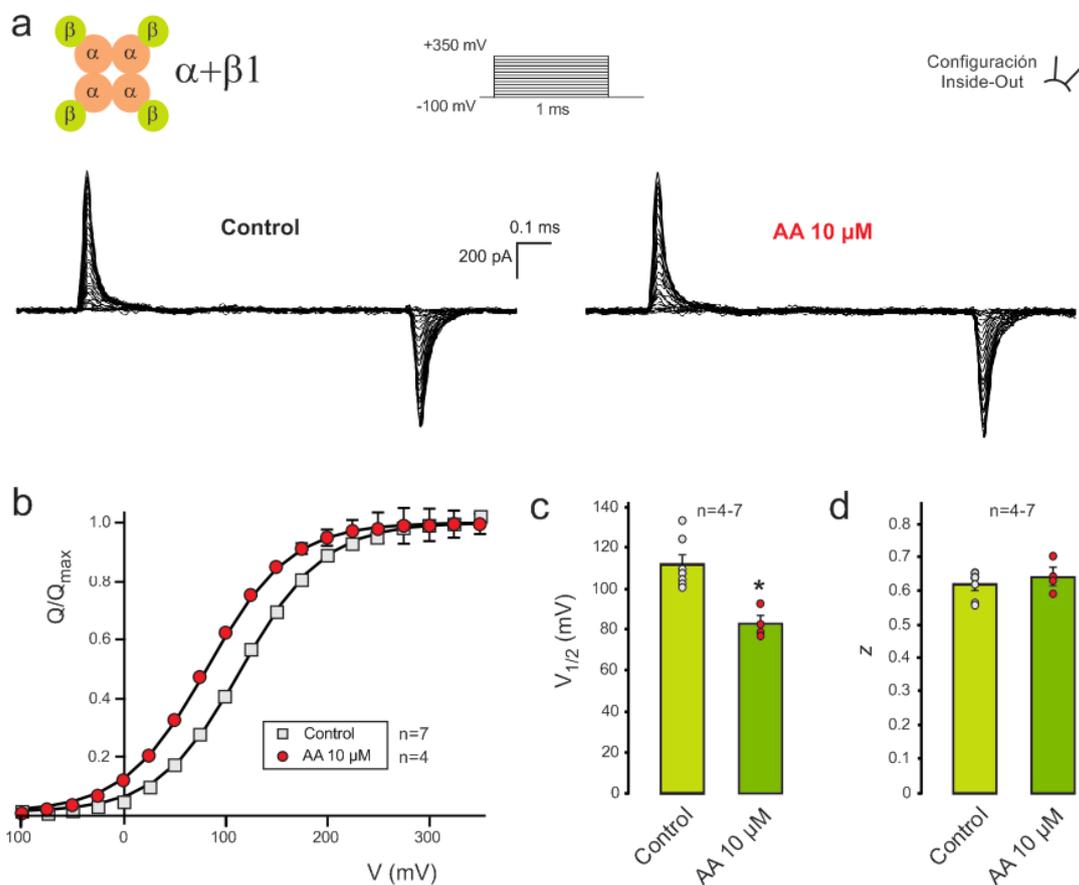


Figura 14. Efecto del AA 10 μM sobre las corrientes de gating del canal BK expresado en sistema de expresión heterólogo. **a:** Registros típicos superpuestos de corrientes de gating del canal BK ($\alpha+\beta 1$) expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*, obtenidos en configuración IO tras aplicar una serie de pulsos de voltaje crecientes de a 10 mV entre -100 y +350 mV, con duración de 1 ms, partiendo de un potencial de mantenimiento de -100 mV, en un mismo parche en situación control y luego del agregado de AA 10 μM . **b:** Curvas medias de carga en función del voltaje ($Q/Q_{\text{max}}-V$) construidas a partir de registros como los mostrados en **a**. Las líneas continuas representan sus respectivos ajustes con la ecuación de Boltzmann. **c, d:** Valores medios de $V_{\frac{1}{2}}$ y z obtenidos de los ajustes mostrados en **b**, para cada condición. El asterisco indica diferencias significativas ($n=4-7$; $p<0.05$, test t de Student).

A continuación nos preguntamos si este efecto del AA sobre el VSD podría explicar por sí solo el aumento de P_o observado en los canales BK $\alpha+\beta 1$. Para responder a esta pregunta, evaluamos si los cambios inducidos por el AA en las curvas $Q/Q_{\text{max}}-V$ explican completamente el cambio observado en las curvas $G/G_{\text{max}}-V$ utilizando el modelo HA [100,103]. En este modelo, el equilibrio del VSD entre los estados de reposo (R) y activo (A) viene dado por J , un parámetro dependiente del voltaje definido por la siguiente ecuación:

$$J = \frac{A}{R} = J_0 e^{\frac{z_j F V}{RT}} = e^{\frac{z_j F (V - V_{\frac{1}{2}})}{RT}}$$

donde J_0 es la constante de equilibrio a 0 mV, V el voltaje de membrana, z_j es el número aparente de cargas de activación por sensor de voltaje y $V_{\frac{1}{2}}$ el voltaje de activación media de la curva $Q/Q_{\text{max}}-V$. En nuestros resultados observamos que el AA genera un desplazamiento de la curva $Q-V$ hacia la izquierda sin modificar z_j (z_j es equivalente a z del ajuste de las curvas $Q/Q_{\text{max}}-V$). Por lo tanto, inferimos que este ácido graso altera el equilibrio del VSD modificando el parámetro J_0 . A partir de los datos experimentales de $V_{\frac{1}{2}}$ y z_j de nuestras curvas Q/Q_{max} , antes y después de la adición de AA, obtuvimos los valores de J_0 para cada condición (Tabla 1).

Teniendo en cuenta que nuestros registros de activación del canal fueron obtenidos en ausencia de Ca^{2+} intracelular, la ecuación del modelo HA que pondera la participación de cada módulo del canal en función del voltaje y la concentración de

calcio intracelular, presentada en la *Introducción*, puede simplificarse ya que, al estar los CSD desocupados, K tomará el valor de 0, quedando reducida a:

$$P_o = \frac{L(1 + JD + \cancel{KG} + \cancel{JKCDE})^4}{L(1 + JD + \cancel{KG} + \cancel{JKCDE})^4 + (1 + J + \cancel{K} + \cancel{JKE})^4}$$

$$P_o = \frac{L(1 + JD)^4}{L(1 + JD)^4 + (1 + J)^4}$$

donde L es la constante de equilibrio cerrado-abierto indicativa del estado del poro de permeación del canal y D es un factor alostérico que relaciona la activación del sensor de voltaje con la apertura del poro. Usando los valores de los parámetros D y L informados por Orio y Latorre [77] para el canal BK co-expresado con $\beta 1$ y los valores de J obtenidos a partir de nuestros datos experimentales, calculamos el valor teórico de la P_o para cada potencial y ajustando dicha curva obtuvimos un valor de $V_{\frac{1}{2}}$ a partir de la curva P_o -V teórica en condiciones control y AA (Tabla1). Teniendo en cuenta que $G = N \cdot P_o \cdot \gamma$, donde N representa el número de canales en el parche y γ la conductancia unitaria, y sabiendo que N y γ son constantes, podemos afirmar que las curvas P_o -V y G/G_{\max} -V son equivalentes y, por lo tanto, los valores de $V_{\frac{1}{2}}$ de dichas curvas y los cambios en este parámetro también lo serán. A partir del análisis teórico se predice que el AA por su acción en el VSD induciría un $\Delta V_{\frac{1}{2}}$ de -11 mV en la curva P-V. Este valor es claramente más bajo que el observado experimentalmente (-50.5 mV, Figura 9.b) y sugiere que el AA debe modificar otros módulos funcionales del canal BK para alcanzar su efecto máximo.

Parámetro	Control	AA 10 μ M
z_j (obtenido de la Q-V)	0.63	0.63
J_0 (obtenido de la Q-V)	0.064	0.130
z_L (de Orio y cols. [77])	0.33	0.33
L_0 (de Orio y cols. [77])	3.1×10^{-7}	3.1×10^{-7}
D (de Orio y cols. [77])	24.4	24.4
$V_{1/2}$ (de curva Po-V, obtenido del modelo)	203 mV	192 mV

Tabla 1. Parámetros utilizados en las predicciones del modelo de HA y valores del $V_{1/2}$ obtenidos.

Efecto del AA sobre el dominio del poro del canal BK $\alpha+\beta 1$.

A continuación, evaluamos el efecto del AA sobre el *gating* intrínseco del canal BK asociado a la subunidad $\beta 1$ expresado en células HEK293. Este fenómeno refleja la capacidad del canal para abrirse cuando los otros dos estímulos fisiológicos principales (Ca^{2+} y despolarización) están ausentes. Para ello realizamos una serie experimental donde medimos la corriente a nivel de canal único con un potencial de membrana mantenido a -120 mV (sensores de voltaje en estado de reposo) y en una solución libre de Ca^{2+} . La Figura 15.a muestra registros representativos de la actividad de canal único registrada en IO en condiciones control y después de la perfusión de AA 10 μ M. A partir de los mismos calculamos la probabilidad de apertura intrínseca (NPoi) para cada situación y, como es posible observar en la Figura 15.b, el AA produce un aumento de 20 veces en la NPoi del canal BK (control: NPoi = 0.0013 ± 0.0008 ; AA: NPoi = 0.0245 ± 0.0051 ; $p < 0.05$, test t de Student apareado). Esta serie experimental muestra que el AA induce un potente efecto activador del dominio del poro del canal reflejado en la modulación del *gating* intrínseco, que se suma al efecto, también

potenciador, observado sobre el VSD, dando sustento al efecto global observado inicialmente sobre las curvas Po-V y G-V, en el sistema nativo y heterólogo, respectivamente.

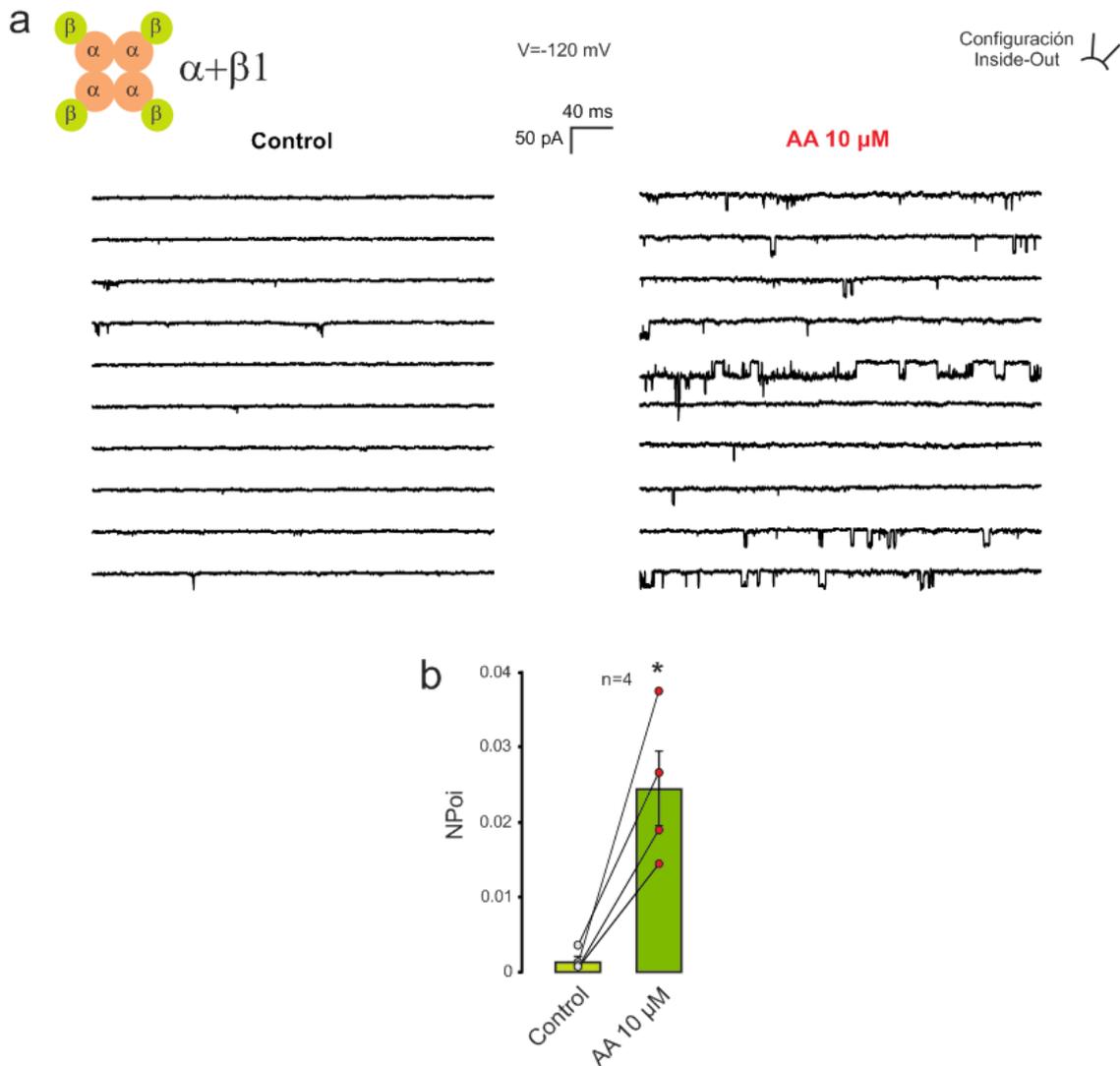


Figura 15. Efecto del AA 10 μM sobre el gating intrínseco del canal BK expresado en sistema de expresión heterólogo. a: Registros típicos de la corriente de canal único del canal BK ($\alpha+\beta 1$) expresado en células HEK293, obtenidos en configuración IO a -120 mV en ausencia de Ca^{2+} intracelular, en el mismo parche antes y después del efecto del AA 10 μM . Las aperturas se observan como deflexiones de la corriente hacia abajo. **b:** Valores medios de probabilidad de apertura intrínseca (NPoi) calculada a partir de registros de corriente como los mostrados en **a**, en cada condición. El asterisco indica diferencias significativas ($n = 4$, $p < 0.05$, test t de Student apareado).

Efecto del AA sobre el dominio sensor de calcio del canal BK $\alpha+\beta 1$.

En tercer lugar, evaluamos si el AA también modifica el efecto activador que tiene el Ca^{2+} sobre el canal BK acoplado a $\beta 1$. El canal contiene dos sitios de unión de Ca^{2+} en su región intracelular, los cuales promueven la activación del canal cuando la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) aumenta [78]. La subunidad $\beta 1$ aumenta la sensibilidad aparente del canal BK al Ca^{2+} , generando una mayor activación del canal por el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a concentraciones superiores a $1 \mu\text{M}$ [77]. Por lo tanto, para conocer si existe alguna relación entre el efecto del AA y la activación del canal BK por $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se midió la actividad de los canales BK $\alpha+\beta 1$ expresados en las células HEK293 en la configuración IO, exponiendo la cara intracelular del canal a una solución libre de Ca^{2+} y a una concentración de Ca^{2+} libre de $1.2 \mu\text{M}$, en ausencia y en presencia de AA. Las Figuras 16.a, b y c muestran registros típicos de las corrientes del canal BK inducidas por AA $10 \mu\text{M}$ en ambas condiciones y las curvas $G/G_{\text{max}}-V$ correspondientes. El análisis de estos datos nos permite observar, en primer lugar y como es de esperar para este canal, que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desplaza la curva $G/G_{\text{max}}-V$ control hacia la izquierda (comparación de las curvas en las condiciones control para ambas concentraciones de Ca^{2+}). En segundo lugar, y como hemos descrito en las otras series experimentales, el AA induce un desplazamiento de la curva hacia la izquierda en la solución libre de calcio, y también lo induce en presencia de Ca^{2+} $1.2 \mu\text{M}$ (Tabla 2). Sin embargo, la magnitud de este desplazamiento no presenta diferencias significativas entre las dos condiciones ($\Delta V_{1/2} = -56.6 \text{ mV} \pm 7.7$ para la condición libre de Ca^{2+} y $-67.6 \text{ mV} \pm 8.8$ para la condición de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre = $1.2 \mu\text{M}$) (Figura 16.d). Estos resultados indican que el efecto de activación de AA es independiente de la concentración intracelular de Ca^{2+} y compatible con un efecto aditivo de ambos activadores.

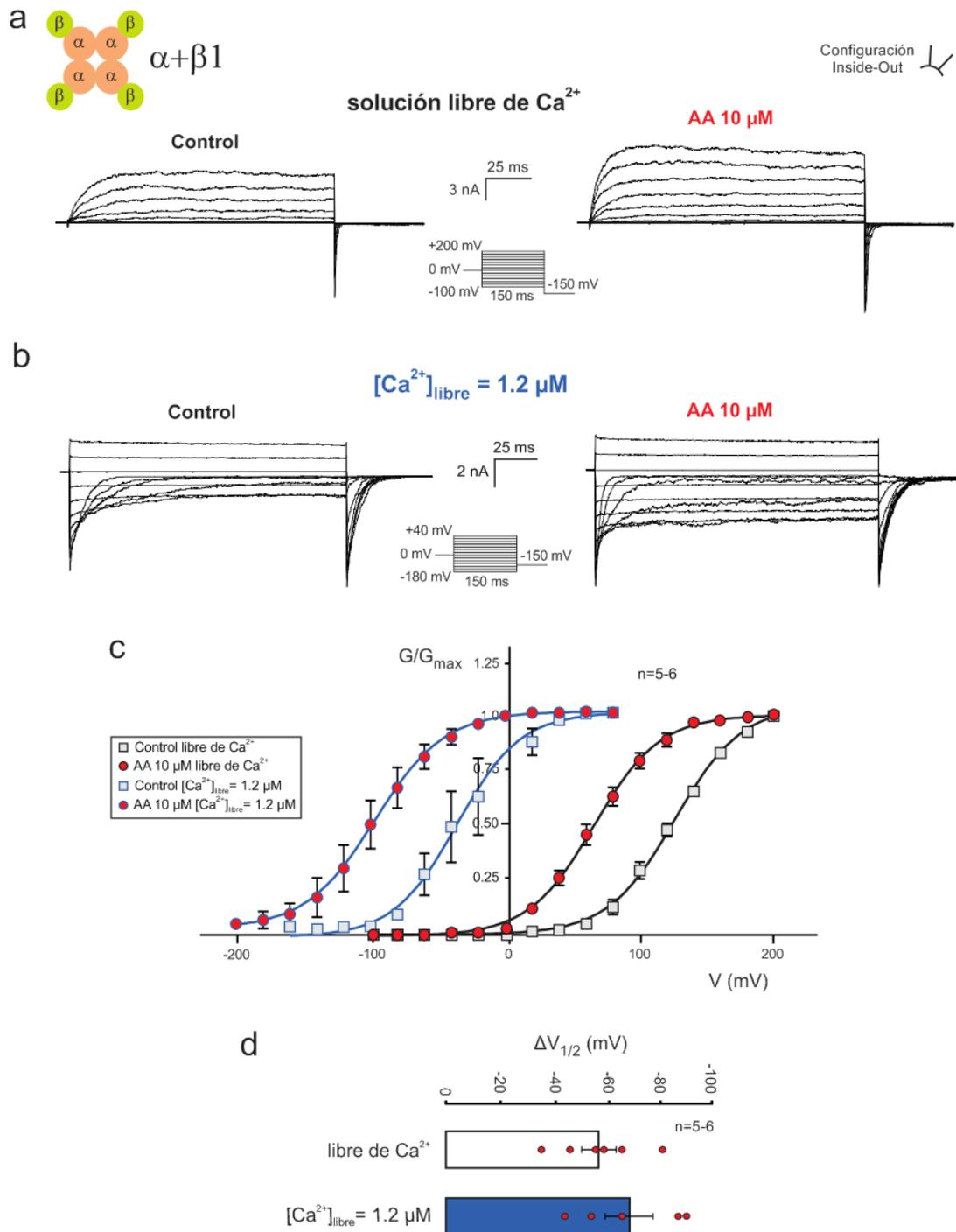


Figura 16. Activación por AA del canal BK, expresado en sistema de expresión heterólogo, en ausencia y presencia de Ca^{2+} intracelular. a, b: Registros típicos de corrientes macroscópicas del canal BK ($\alpha + \beta 1$) expresado en células HEK293, obtenidos en configuración IO antes y después del efecto del AA 10 μM , en una solución intracelular libre de Ca^{2+} (a) y en una concentración intracelular de Ca^{2+} libre de 1.2 μM (b). **c:** Curvas medias de conductancia normalizada vs. voltaje ($G/G_{\text{max}}-V$) construidas a partir de registros como los mostrados en a y b. Las líneas continuas representan los

ajustes con la ecuación del Boltzmann. **d**: Valores medios del cambio en el $V_{1/2}$ entre las condiciones de control y después de 10 μM de AA, obtenidos de los ajustes de cada una de las curvas $G/G_{\text{max}}-V$ que se muestran en **c**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($n=5-6$, $p > 0.05$; test t de Student).

	$V_{1/2}$ (mV)		z	
	Control	AA 10 μM	Control	AA 10 μM
Solución libre de Ca^{2+} (n=6)	125.1 \pm 2.3	68.1 \pm 4.4	1.08 \pm 0.07	1.06 \pm 0.06
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}=1.2 \mu\text{M}$ (n=5)	-30.9 \pm 13.0	-98.4 \pm 11.5	1.30 \pm 0.14	1.17 \pm 0.09

Tabla 2. Valores medios \pm error estándar de los $V_{1/2}$ y z obtenidos del ajuste de las curvas $G/G_{\text{max}}-V$ en condiciones control y luego del agregado de AA 10 μM registradas en una solución intracelular libre de Ca^{2+} y en una concentración intracelular de Ca^{2+} de 1.2 μM .

Activación del canal BK por AA: requerimiento del acople funcional entre la subunidad α y $\beta 1$.

Hasta aquí, nuestros resultados muestran que el efecto activador del AA requiere la presencia de la subunidad accesoria $\beta 1$ y que su efecto puede explicarse por una estabilización del VSD en el estado activo y un aumento en el *gating* intrínseco del canal BK. En el año 2012, Gruslova y col. reportaron que existen dos dominios funcionales en $\beta 1$ (segmentos A y B), localizados en su *loop* extracelular, responsables de la modulación que esta subunidad accesoria ejerce sobre la subunidad α que forma el canal BK [155]. Estos autores demostraron que en particular, los residuos Y74 y S104, localizados respectivamente en los segmentos A y B, participan en la estabilización del VSD y en la reducción del *gating* intrínseco que ejerce $\beta 1$ en el canal. Por lo tanto, los mutantes puntuales Y74A y S104A de $\beta 1$ constituyen una herramienta valiosa para evaluar si ese acople funcional entre subunidades es necesario en el mecanismo de acción del AA.

Para probar esta hipótesis, durante una estadía en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Canalopatías de la Universidad Pompeu Fabra (Barcelona), realizamos una serie experimental donde medimos el efecto del AA 10 μ M sobre las corrientes macroscópicas mediadas por el canal BK co-expresado con la subunidad β 1 de tipo salvaje (*wt*) y con cada uno de sus mutantes Y74A y S104A (Figura 17). Como se puede observar, el AA mantiene la capacidad de activar la corriente en todos los casos, produciendo el característico desplazamiento de la curva G/G_{\max} -V hacia la izquierda. Sin embargo, el cambio en el $V_{1/2}$ que produce el AA disminuye significativamente cuando el canal BK se encuentra coexpresado con el mutante β 1Y74A respecto a cuando se expresa con β 1*wt*, mientras que en la condición de co-expresión con el mutante β 1S104A el efecto del AA se mantiene intacto (β 1*wt*: $\Delta V_{1/2} = -43.37 \pm 5.75$ mV; β 1Y74A*: $\Delta V_{1/2} = -22.56 \text{ mV} \pm 2.7$; β 1S104A: $\Delta V_{1/2} = -43.77 \text{ mV} \pm 5.81$; * $p < 0.05$, prueba de Holm-Sidak post hoc ANOVA). Estos resultados indican que los cambios en la función del canal BK inducidos por el segmento A de la subunidad auxiliar β 1 están involucrados en el mecanismo de activación del AA.

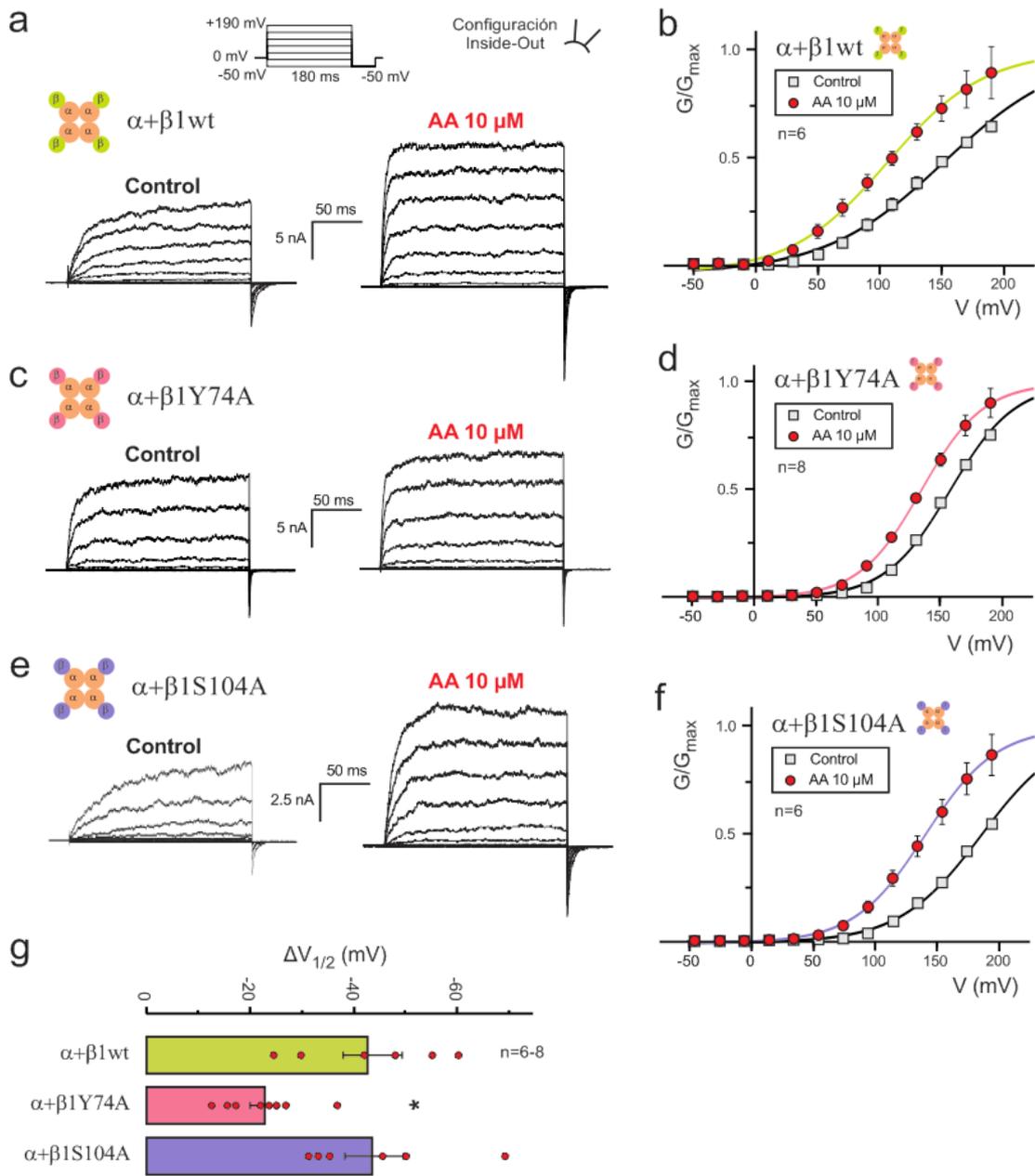


Figura 17. Efecto del AA 10 μM sobre canales BK expresados junto a $\beta1wt$, $\beta1S104A$ y $\beta1Y74A$. **a, c, e:** Registros típicos de corriente macroscópica del canal BK ($\alpha+\beta1$), con $\beta1wt$, $\beta1S104A$ y $\beta1Y74A$, obtenidos en configuración IO en células HEK293T. Se aplicó una serie de pulsos de voltaje crecientes entre -50 y +190 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV, seguido de un pulso de 50 ms a -50 mV, en un mismo parche en situación control y luego del agregado de AA 10 μM . **b, d, f:** Curvas de valores medios de conductancia normalizada en función del voltaje ($G/G_{max}-V$) construidas a partir de registros como los mostrados en **a**. Las líneas continuas representan el ajuste mediante una ecuación del Boltzmann. **g:** Parámetro $\Delta V_{1/2}$ obtenido de los ajustes, para la condición control respecto a con AA, correspondientes a cada condición de expresión. El asterisco indica diferencias significativas respecto a $\beta1wt$ ($n=6-8$; $p<0.05$, ANOVA de una vía, seguido del post hoc test de Holm-Sidak).

Discusión



En este trabajo de Tesis hemos demostrado que el AA, un lípido endógeno poliinsaturado de tipo omega 6, activa en forma directa a los canales BK dependiendo de la presencia de la subunidad accesoria $\beta 1$, característica de las células de músculo liso (CML). El AA está involucrado en una vía compleja de señalización celular presente en múltiples procesos fisiológicos como la vasodilatación mediada por endotelio, la agregación plaquetaria, la citoprotección gástrica y la regulación del flujo renal, o en procesos fisiopatológicos como inflamación, algesia y fiebre, entre otros [111,130]. Inicialmente, los efectos biológicos del AA fueron atribuidos principalmente a sus metabolitos (prostaglandinas, leucotrienos y ácidos epoxieicosatrienoicos), pero estudios posteriores demostraron que el propio AA también es capaz de modular varias proteínas, incluidos los canales iónicos [139]. En particular para el canal BK, los trabajos de Ahn y col., Kirber y col., Clarke y col. y Denson y col. reportaron un efecto directo del AA en canales BK presentes en arterias coronaria y pulmonar de conejo y en células GH3, respectivamente [112,113,119,120]. Consistente con esto, en nuestro trabajo observamos que este ácido graso fue capaz de incrementar las corrientes mediadas por el canal BK en las CML de la arteria umbilical humana (AUH), siendo el primer reporte de este efecto en un tejido de origen humano. Esta activación fue registrada inicialmente en la configuración *Whole-Cell* (WC) y permitió observar que el efecto activador del AA genera una hiperpolarización de la membrana celular, la cual puede inducir relajación del músculo liso vascular debido a un menor influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje operados. Justamente la hiperpolarización de la membrana de las CML constituye el efecto común que poseen los Factores hiperpolarizantes dependientes de endotelio, entre los cuales se encuentran descritos el propio AA y varios de sus metabolitos [128]. Este efecto fue confirmado en nuestro trabajo, utilizando un lecho vascular de resistencia como lo es el árbol mesentérico de rata, donde observamos que el AA induce una vasorrelajación dependiente de la función de los canales BK [127].

Mostramos que el AA es capaz de activar estos canales en forma directa, sin ninguna modificación metabólica. Si bien en la configuración WC las tres vías metabólicas del AA permanecen intactas y podrían estar involucradas en la activación del canal BK, el efecto persiste en los registros electrofisiológicos realizados en la

configuración IO (independizados de mediadores y enzimas intracelulares) así como en presencia de los inhibidores de las vías metabólicas que podrían convertir al AA en diferentes tipos de metabolitos activos. Este efecto directo del AA, podría entonces sumarse a los efectos de sus metabolitos, ya conocidos y reportados en otros tipos de células de músculo liso vascular [20,112,119,120,166,167].

Se ha reportado que los niveles normales de AA libre en plasma humano se encuentran en un rango de 5.8 a 49.3 μM [126,127], mientras que en determinados estados patológicos, como la preeclampsia y la isquemia cerebral, pueden estar aumentados [127,168]. En este sentido, un hallazgo interesante fue que el efecto activador del AA tiene una EC_{50} de 4.15 μM para el canal BK $\alpha+\beta_1$, lo que sugiere que este ácido graso endógeno podría cumplir un rol vasodilatador en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, sea por su liberación a nivel local por el endotelio, o mediante su llegada a través del torrente circulatorio.

Este trabajo estuvo centrado en el estudio del rol esencial que cumple la subunidad accesoria β_1 en el mecanismo de activación que el AA produce sobre el canal BK. Sun y col. en un trabajo previo [142], demostraron que el AA no afecta al canal BK expresado como homotetrámero de subunidades α pero sí modifica su actividad cuando el mismo se encuentra expresado conjuntamente con las subunidades accesorias β_2 o β_3 . Sin embargo, en dicho trabajo no se indagó el rol de la subunidad β_1 . Teniendo en cuenta que esta subunidad accesoria se expresa principalmente en el músculo liso, y que resultados previos de nuestro grupo y de otros grupos mostraban activación del canal BK en este tipo celular, postulamos que la subunidad β_1 es esencial para la activación del canal por el AA [49,112,119,120]. Nuestros experimentos realizados en el sistema de expresión heterólogo nos permitieron completar los hallazgos de Sun y col. demostrando, en primer lugar, que el AA activa de manera directa al canal BK expresado junto a la subunidad β_1 , y que la misma es necesaria para que ocurra dicha activación.

La modulación farmacológica dependiente de subunidades accesorias constituye un campo de estudio de gran relevancia, dado que permite explicar efectos tisulares selectivos, como también postular sitios y mecanismos de acción como punto de partida para plantear nuevos blancos farmacológicos selectivos. Esto es crítico para

estructuras celulares de expresión ubicua como el canal BK, el cual presenta varios ejemplos de modulaciones dependientes de sus subunidades accesorias [74]. Los lípidos son un ejemplo de esto último, destacándose los trabajos realizados por los laboratorios de Dopico y Hoshi con derivados del ácido litocólico (LTA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), respectivamente [121]. En particular, el LTA activa únicamente al canal BK acoplado con la subunidad $\beta 1$, interactuando con su segmento de transmembrana TM2 [75,122,124]. Dicha interacción ha podido ser imitada por un análogo sintético no esteroideo, constituyendo un claro ejemplo donde la actividad de un mediador endógeno puede ser utilizada como punto de partida para obtener un nuevo farmacóforo con una actividad específica [169,170].

Por otro lado, en los trabajos de Hoshi y col. se demuestra que el DHA, un ácido graso omega-3 poliinsaturado de 22 carbonos, es un activador del canal BK como homotetrámero de subunidades α y que el rol de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$ es el de potenciar significativamente este efecto [117,171]. Dado que tanto el DHA como el AA son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), se podría pensar que comparten sitio y mecanismo de acción. Sin embargo, en base a la evidencia experimental, parece improbable ya que estos ácidos grasos no comparten el patrón de activación: el DHA es un activador del canal en ausencia de subunidades accesorias y potenciado por $\beta 1$ y $\beta 4$, mientras que, nuestros resultados junto con los de Sun y cols., muestran que el AA activa al canal únicamente cuando está co-expresado con las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ [117,142,171]. Por otro lado, Hoshi y col. mostraron que el mutante Y318S de la subunidad α del canal BK es insensible al DHA, pero mantiene invariable la activación por AA, consistente con la presencia de sitios de acción diferentes para los dos ácidos grasos [172,173].

El estudio de Sun y cols., mencionado anteriormente, demostró que la activación del canal BK inducida por AA se debe a una disminución en el proceso de inactivación que el canal BK adquiere cuando se encuentra expresado con las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ [142]. Teniendo en cuenta que la subunidad $\beta 1$ no genera inactivación de la corriente BK, es de esperar que el mecanismo activador del AA sobre los complejos $\alpha+\beta 1$ difiera del observado para $\alpha+\beta 2$ y $\alpha+\beta 3$. Por este motivo,

decidimos estudiar en detalle el mecanismo de activación de este PUFA sobre el canal BK expresado con la subunidad $\beta 1$.

La primera aproximación fue realizada trabajando a nivel de canal único en CML de la AUH. En un trabajo de Tesis previo de nuestro grupo, habíamos observado que el aumento en la probabilidad de apertura que induce el AA, se debe principalmente a una disminución en el tiempo de permanencia del canal en el estado cerrado y, en menor medida, a un aumento en los tiempos de permanencia del estado abierto [49]. Este resultado es compatible con una desestabilización del estado cerrado y una estabilización del estado abierto, que se traduce en una reducción en diferencia de energía libre (ΔG) entre los estados cerrado y abierto del canal. Esto último fue confirmado en esta Tesis por el desplazamiento de la curva Po-V hacia valores más negativos, sin alterarse la pendiente de la misma. La ΔG del proceso de apertura de un canal voltaje operado en una determinada condición puede estimarse como $\Delta G = z.F.V_{1/2}$, empleando los valores z y $V_{1/2}$ del ajuste de las curvas Po-V [174]. Realizando el cálculo con nuestros datos experimentales en CML, encontramos que el AA reduce en 0.88 Kcal/mol la energía necesaria para promover el pasaje del estado cerrado al abierto del canal BK $\alpha+\beta 1$ ($\Delta G_{\text{control}} = 3.38$ Kcal/mol vs $\Delta G_{\text{AA}} = 2.38$ Kcal/mol). Otra propiedad interesante que observamos en este trabajo es la aceleración que el AA genera en la cinética de activación de las corrientes, efecto que podría interpretarse como una reducción en la barrera energética para la transición entre el estado cerrado y abierto del canal. Este efecto fue muy significativo y se evidenció tanto en las corrientes macroscópicas, donde el curso temporal de activación de tipo exponencial se convirtió en un proceso de activación instantáneo, como en el análisis de los tiempos de latencia a la primera apertura del canal. La aceleración en la cinética de activación que genera el AA también ha sido previamente observada en otros tipos de canales de K^+ como los KV1.5, y hEAG1 y hEAG2 reportados por Gavrilova-Ruch y col. [175] y los canales TREK-2 presentados por Ferroni y col. [176].

En concordancia con los resultados obtenidos en CML, el AA también reduce la energía libre del proceso de pasaje del estado cerrado al abierto del canal BK $\alpha+\beta 1$ expresado en HEK293T, pero en este caso en un valor de 1.21 kcal/mol (calculado empleando los valores z y $V_{1/2}$ del ajuste de las curvas G-V). Este valor es mayor al

observado en las CML y podría deberse a una distinta estequiometría de los heteromultímeros $\alpha+\beta 1$ [95]. Conociendo que la estequiometría altera las propiedades del canal y que $\beta 1$ disminuye la sensibilidad al voltaje (z) [77], el hecho de que el valor de z para las CML fue mayor que en las células HEK (1.40 ± 0.06 en CML vs 1.10 ± 0.08 en HEK) es compatible con una menor proporción de subunidades $\beta 1$ en las CML. Por lo tanto, y basándonos en la necesidad de $\beta 1$ para la acción del AA, una menor proporción de $\beta 1$ también podría explicar el menor cambio en el ΔG observado en las CML respecto del sistema de expresión heterólogo.

Como describimos en la *Introducción* de esta Tesis, el canal BK pertenece a la familia de canales dependientes de voltaje que cuentan con la presencia un dominio sensor de voltaje (VSD) cargado, el cual le confiere la propiedad de modificar su estado conformacional y por lo tanto su actividad, dependiendo de la magnitud del campo eléctrico a través de la membrana celular. A su vez, el canal presenta, en su extremo C-terminal, un dominio sensor de Ca^{2+} intracelular (CSD) que, mediante dos sitios de unión de Ca^{2+} de diferente afinidad, induce un aumento en la probabilidad de apertura del canal en función de los incrementos en la concentración intracelular de este ión. Si bien es posible que el canal se abra aun cuando dichos sensores se encuentran en reposo, mediante una actividad intrínseca del poro del canal, un estímulo despolarizante o un aumento en la concentración de calcio son capaces de activar de manera independiente la compuerta del dominio del poro del canal (PGD) disminuyendo la energía libre necesaria para la transición del estado cerrado al abierto [9,104]. Además, existe una extensa evidencia que demuestra el carácter alostérico de la comunicación entre los sensores (CSD y VSD) y el dominio del poro del canal, así como entre los propios sensores [9,104]. Teniendo en cuenta esta naturaleza modular que determina la probabilidad de apertura del canal BK, es esperable que sus activadores e inhibidores puedan ejercer sus efectos actuando tanto a nivel del poro, como en los dominios VSD y CSD. Por lo tanto, trabajando con sistemas de expresión heterólogos, evaluamos el efecto del AA sobre cada uno de los dominios funcionales del canal BK acoplado a la subunidad $\beta 1$.

En primer lugar, mediante el registro y análisis de las corrientes de *gating* demostramos que el AA afecta al VSD. Específicamente, nuestros datos indican que el

AA induce una estabilización del VSD en la configuración activa sin modificar la carga aparente que se mueve durante la activación de cada sensor. La modulación del VSD por los PUFAs fue descrita anteriormente por el grupo de Elinder y col. demostrando que el DHA interactúa electrostáticamente con el VSD, afectando el equilibrio del sensor de voltaje del canal de K^+ de tipo *Shaker* [123]. Este mecanismo fue denominado "efecto lipoeléctrico" y postula que los ácidos grasos actúan en la interfaz entre la región extracelular del canal iónico y la cara externa de la bicapa lipídica, estabilizando al sensor de voltaje en su conformación activa y por ende facilitando la apertura del canal. Diferentes canales iónicos activados por voltaje y modulados por ácidos grasos, como los canales Cav, Hv1 y varios tipos de canales Kv, podrían compartir este mecanismo [177]. Nuestros resultados, son los primeros que demuestran en forma directa, mediante el registro de las corrientes de *gating* del canal, que un PUFA produce un cambio en el dominio sensor de voltaje del canal BK.

La interpretación de nuestros resultados en el marco del modelo alostérico de Horrigan & Aldrich (HA) [104], evidenció que los cambios observados a nivel del VSD no son suficientes para explicar completamente el desplazamiento de las curvas G-V obtenidas a partir de las corrientes macroscópicas y que, por lo tanto, es esperable que el AA genere una modificación en al menos otro de los módulos funcionales del canal. Continuamos nuestro estudio analizando el efecto del AA sobre la probabilidad de apertura intrínseca o *gating* intrínseco del canal BK $\alpha+\beta 1$. El incremento en la probabilidad de apertura que produce el AA en ausencia de despolarización y calcio, indica que el AA afecta al dominio del poro del canal, lo que significa que este ácido graso modifica las transiciones del canal entre los estados abierto y cerrado aun cuando el VSD está en estado de reposo y los CSD poseen sus sitios de unión a Ca^{2+} desocupados. Si bien mencionamos que el AA y el DHA no parecen compartir un sitio común de interacción con el canal BK, es importante destacar que ambos PUFAs sí comparten este efecto sobre el *gating* intrínseco del canal [171]. Respecto a la acción del AA sobre el módulo CSD, demostramos que la activación del canal BK $\alpha+\beta 1$ inducida por el AA no está influenciada por la concentración intracelular de Ca^{2+} . La activación por AA fue similar cuando los sitios de unión de Ca^{2+} del canal estaban desocupados (solución libre de Ca^{2+}) y cuando los mismos estaban parcialmente

ocupados ($[Ca^{2+}]$ libre = 1.2 μ M) [77]. La falta de un efecto sinérgico o antagonista entre la activación del canal BK inducida por AA y por la concentración intracelular de Ca^{2+} implica que los mecanismos involucrados en ambas activaciones son independientes. Este resultado está de acuerdo con reportes anteriores que muestran que los efectos activadores del AA sobre el canal BK fueron independientes de Ca^{2+} , tanto en células de músculo liso vascular, donde el canal está expresado con la subunidad $\beta 1$, como en las células gliales de Müller de la retina [112,113]. Esta característica también es compartida por el DHA en su mecanismo activador del canal BK $\alpha+\beta 1$ expresado en células HEK293 [171].

En conjunto, estos resultados muestran que el efecto activador del AA, en el contexto del modelo HA, puede explicarse como un aumento en los parámetros L y J que reflejan el equilibrio entre los estados cerrado y abierto de la compuerta del poro de conducción del canal, y el equilibrio entre los estados de reposo y activo del sensor de voltaje, respectivamente [104]. Estos cambios son consistentes con la disminución que produce el AA en la energía libre necesaria para abrir la compuerta del canal que se observa como un desplazamiento a la izquierda en la curva $G/G_{max}-V$, con un mecanismo independiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Teniendo en cuenta que la subunidad $\beta 1$ es necesaria para la activación del canal BK por el AA, y que está descrito que la misma produce una reducción de L_0 y un aumento de J_0 [77,78,155], el aumento de L y J generado por el AA podría involucrar un cambio en la comunicación entre las subunidades α y $\beta 1$, que favorezca el efecto de $\beta 1$ sobre el equilibrio del VSD (J) y disminuya su efecto sobre el equilibrio del PGD (L). Se han propuesto varios residuos de la subunidad $\beta 1$ como responsables de la modulación del canal BK por esta subunidad accesoria [97,99,155,178]. Gruslova y col. mostraron que las mutaciones puntuales localizadas en el *loop* extracelular de la subunidad $\beta 1$, en particular Y74 en el segmento A y S104A, Y105A e I106E en el segmento B, reducen parcialmente los cambios inducidos por $\beta 1$ en las curvas $G/G_{max}-V$ del canal BK expresado en células HEK293 [155]. En esta Tesis, observamos que la mutación puntual Y74A en la subunidad $\beta 1$ reduce significativamente la activación del canal por el AA, mientras que para el mutante S104A no se observaron diferencias respecto al *wt*. Si bien Gruslova y col. propusieron que estos residuos están

involucrados en los cambios inducidos por la subunidad $\beta 1$, tanto en la función del VSD como en el PGD [155], la información estructural publicada recientemente por Tao y MacKinnon [64] para el complejo BK $\alpha + \beta 4$, obtenida por crio-EM, no muestra evidencia de interacciones directas entre el *loop* extracelular de la subunidad $\beta 4$ y las subunidades α . Por lo tanto, el residuo Y74, conservado en las β e involucrado en la regulación de $\beta 1$ sobre el canal BK, no participaría en forma directa en su interacción con α pero sería parte necesaria en el mecanismo de transducción de los efectos de $\beta 1$ sobre la misma. En este contexto, nuestro resultado con el mutante Y74A refuerza la importancia del acoplamiento funcional entre ambas subunidades en el mecanismo de acción del AA, donde el residuo Y74 participaría en la transducción molecular del efecto de este ácido graso sobre el VSD, el poro del canal o el acoplamiento alostérico entre estos dominios.

Dada la necesidad de la presencia de $\beta 1$ en el efecto del AA, podemos proponer que el mismo interactúa con algún sitio de $\beta 1$ o de las interfases entre α y $\beta 1$. La falta de sensibilidad al voltaje en los valores de EC_{50} obtenidos en esta Tesis sugiere que la afinidad por el AA no se ve modificada por el campo eléctrico, lo que hace poco probable que el sitio de unión del AA se encuentre en dominios del canal que cambian significativamente su conformación en función del voltaje. En este sentido, la falta de un efecto del voltaje en las curvas concentración respuesta es compatible con la hipótesis de una interacción directa con $\beta 1$ o en la interfase entre α y $\beta 1$.

Tao y MacKinnon demostraron que la hélice TM1 de $\beta 4$ se asocia principalmente con la subunidad α del canal a través de interacciones hidrofóbicas con los segmentos S1 y con la α -hélice situada en la región de poro del canal, y encontraron moléculas lipídicas en las interfaces entre α y $\beta 4$, tanto en la cara interna como externa de la membrana celular [64]. La homología de secuencia entre las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$, especialmente en los segmentos transmembrana TM1 y TM2, nos permite especular que estas interfaces lipídicas que se forman en el heteromultímero $\alpha + \beta 4$ también existen en el complejo $\alpha + \beta 1$, constituyendo un posible sitio de acción para el AA y donde la presencia del mismo podría modificar la comunicación entre ambas subunidades, afectando, en este caso, la modulación de $\beta 1$ sobre el PGD y el VSD.

Conclusiones



En conclusión, los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral contribuyen al conocimiento del mecanismo de acción molecular específico y directo por el cual el AA puede modular la actividad del canal BK asociado a la subunidad $\beta 1$, y cobran relevancia en el contexto fisiológico y fisiopatológico relacionado con la función de las células musculares lisas (CML), donde el canal se asocia específicamente con esta subunidad. Teniendo en cuenta que el AA es un PUFA involucrado en una vía compleja de señalización celular, este trabajo demuestra que su acción directa podría sumarse potenciado o modificando los efectos biológicos de sus metabolitos como las prostaglandinas, leucotrienos y ácidos epoxieicosatrienoicos.

El análisis del efecto del AA sobre el dominio del poro del canal BK, permite proponer que el AA (o un análogo sintético) podría activar al canal cuando la célula se encuentra en reposo, hiperpolarizando la membrana celular y reduciendo la contractilidad celular aún en ausencia de estímulos excitatorios (despolarización y aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+}). Además, este PUFA podría aumentar la actividad del canal cuando las CML reciben estímulos excitatorios como la despolarización que genera un potencial de acción (por ejemplo: músculo detrusor de la vejiga y células del músculo liso uterino) o el aumento del Ca^{2+} intracelular por acción de un agonista (por ejemplo: angiotensina II o norepinefrina en CMLV). Finalmente, debido a que el efecto del AA es independiente de Ca^{2+} , no interferiría en el efecto relajante inducido por las corrientes STOC, sino que podría generar un efecto aditivo contribuyendo a la relajación del vaso sanguíneo.

Finalmente, demostramos que el AA, mediante la activación específica del canal BK, fue capaz de disminuir la resistencia del lecho vascular mesentérico de la rata, lo cual tendría un efecto positivo sobre el sistema cardiovascular mediando una reducción de la presión arterial. Por lo tanto, el conocimiento del mecanismo molecular del AA sobre el canal BK $\alpha+\beta 1$, y sus diferencias respecto a lo reportado para el canal $\alpha+\beta 2$ y $\alpha+\beta 3$, podría ser útil para la búsqueda de compuestos con efecto selectivo sobre el músculo liso vascular, posicionando a este canal como un blanco terapéutico novedoso en el tratamiento antihipertensivo.

Bibliografía



- [1] R.M. Carey, P.K. Whelton, Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Synopsis of the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Hypertension Guideline, *Ann. Intern. Med.* 168 (2018) 351. <https://doi.org/10.7326/M17-3203>.
- [2] R. Ingaramo, Guía de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial para el diagnóstico, estudio, tratamiento y seguimiento de la hipertensión arterial, (2016).
- [3] M.J. Marin, G. Fábregues, P.D. Rodríguez, M. Díaz, O. Paez, J. Alfie, G. Caruso, P.S. Pantalena, B. Schiavi, M. González, Registro nacional de hipertensión arterial. Conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial: estudio RENATA, *Rev. Argentina Cardiol.* ISSN-e 0034-7000, Vol. 80, N° 2, 2012, Págs. 121-129. 80 (2012) 121–129.
- [4] W. Ganong, Trastornos cardiovasculares: Enfermedad vascular., in: S. McPhee, W. Ganong (Eds.), *Fisiopatol. Médica*, 5th ed., Manual Moderno, México, 2007: pp. 297–324.
- [5] P.A. James, S. Oparil, B.L. Carter, W.C.ushman, C. Dennison-Himmelfarb, J. Handler, D.T. Lackland, M.L. LeFevre, T.D. MacKenzie, O. Ogedegbe, S.C. Smith, L.P. Svetkey, S.J. Taler, R.R. Townsend, J.T. Wright, A.S. Narva, E. Ortiz, 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults, *JAMA*. 311 (2014) 507. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.284427>.
- [6] B.H. Bentzen, S.-P. Olesen, L.C.B. Rønn, M. Grunnet, BK channel activators and their therapeutic perspectives., *Front. Physiol.* 5 (2014) 389. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00389>.
- [7] B. Eichhorn, D. Dobrev, Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential., *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 376 (2007) 145–55. <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0193-3>.
- [8] T. Hoshi, S.H. Heinemann, Modulation of BK Channels by Small Endogenous Molecules and Pharmaceutical Channel Openers, in: *Int. Rev. Neurobiol.*, 2016: pp. 193–237. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.020>.
- [9] R. Latorre, K. Castillo, W. Carrasquel-Ursulaez, R. V. Sepulveda, F. Gonzalez-Nilo, C. Gonzalez, O. Alvarez, Molecular Determinants of BK Channel Functional

- Diversity and Functioning, *Physiol. Rev.* 97 (2017) 39–87.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2016>.
- [10] W.F. Boron, E.L. Boulpaep, *Fisiología Médica*, 3a edición, Elsevier, 2017.
- [11] N. Enrique, Receptores purinérgicos en células de músculo liso vascular de la arteria umbilical humana: caracterización electrofisiológica y su rol en la regulación del calcio intracelularl, 2015.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/44918>.
- [12] J.T. Stull, P.J. Gallagher, B.P. Herring, K.E. Kamm, Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation., *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. 17 (1991) 723–32. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3182540562>.The.
- [13] G.J. Tortora, B.H. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*, 11th editi, John Wiley & Sons, 2006.
- [14] H. Jiang, N.L. Stephens, Calcium and smooth muscle contraction, *Mol. Cell. Biochem.* 135 (1994) 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00925956>.
- [15] Z. Liu, R.A. Khalil, Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease, *Biochem. Pharmacol.* 153 (2018) 91–122. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.012>.
- [16] D.C. Hill-Eubanks, M.E. Werner, T.J. Heppner, M.T. Nelson, Calcium signaling in smooth muscle, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–20.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004549>.
- [17] A. Rebolledo, F. Speroni, J. Raingo, S. V. Salemme, F. Tanzi, V. Munin, M.C. Añón, V. Milesi, The Na⁺/Ca²⁺ exchanger is active and working in the reverse mode in human umbilical artery smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 840–845. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.084>.
- [18] J.H. Jaggar, V.A. Porter, W.J. Lederer, M.T. Nelson, Calcium sparks in smooth muscle., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278 (2000) C235-56.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C235>.
- [19] D.U. Silverthorn, *Human Physiology: An Integrated Approach*, 7th Editio, Pearson, 2015.
- [20] M. Félétou, P.M. Vanhoutte, EDHF: an update., *Clin. Sci. (Lond)*. 117 (2009) 139–55. <https://doi.org/10.1042/CS20090096>.
- [21] R.F. Furchgott, J. V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the

- relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*. 288 (1980) 373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.
- [22] P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, M. Feletou, E.H.C. Tang, Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update, *Acta Physiol*. 219 (2017) 22–96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>.
- [23] T.W. Sadler, J. Langman, *Langman's Medical Embryology*, 12 th edit, Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [24] C. Barnes, M. Schnek, *Curtis Biología*, 7a edición, Panamericana, 2008.
- [25] S.B. Fox, T.Y. Khong, Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study, *Placenta*. 11 (1990) 59–62. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80443-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80443-6).
- [26] A.J. Sexton, M. Turmaine, W.Q. Cai, G. Burnstock, A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels., *J. Anat*. 188 (Pt 1 (1996) 75–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8655418>.
- [27] A. Çetin, A. Kükner, F. Öztürk, Ultrastructure of human umbilical vessels in pre-eclampsia, *J. Matern. Neonatal Med*. 12 (2002) 178–184. <https://doi.org/10.1080/jmf.12.3.178.184>.
- [28] S. Salemme, A. Rebolledo, F. Speroni, S. Petruccelli, V. Milesi, L. P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery., *Cell. Physiol. Biochem*. 20 (2007) 55–64. <https://doi.org/10.1159/000104153>.
- [29] J. Raingo, A. Rebolledo, F. Iveli, A.O. Grassi de Gende, V. Milesi, Non-selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries., *Placenta*. 25 (2004) 723–9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.01.028>.
- [30] A.R. Roldán Palomo, P. Martín, A. Rebolledo, N. Enrique, L.E. Flores, V. Milesi, Human umbilical artery smooth muscle exhibits a 2-APB-sensitive capacitative contractile response evoked by vasoactive substances and expresses mRNAs for STIM, Orai and TRPC channels., *Biocell*. 36 (2012) 73–81. <https://doi.org/10.1177/19337191113504468>.
- [31] M.T. Nelson, J.M. Quayle, Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle., *Am. J. Physiol*. 268 (1995) C799-822. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799>.
- [32] V. Milesi, E.A. Aiello, A. Rebolledo, A. Gomez Alvis, A.O. Grassi de Gende, Role of

- a Ca²⁺-activated K⁺ current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells., *Pflugers Arch.* 437 (1999) 455–61. <https://doi.org/10.1007/s004240050801>.
- [33] H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kümmerlen, S. Hinnah, D. Müller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. Wagner, A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*., *EMBO J.* 14 (1995) 5170–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489706>.
- [34] F.H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G.A. Gutman, W.A. Catterall, Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 387–395. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.13>.
- [35] D.A. Doyle, J.M. Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science* (80-.). 280 (1998) 69–77. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69>.
- [36] A.D. Wei, G.A. Gutman, R. Aldrich, K.G. Chandy, S. Grissmer, H. Wulff, International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels., *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 463–72. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.9>.
- [37] G.A. Gutman, K.G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L.A. Pardo, G.A. Robertson, B. Rudy, M.C. Sanguinetti, W. Stühmer, X. Wang, International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels., *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 473–508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>.
- [38] S. a N. Goldstein, D. a Bayliss, D. Kim, F. Lesage, L.D. Plant, International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 527–540. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.12.1>.
- [39] C. González, D. Baez-Nieto, I. Valencia, I. Oyarzún, P. Rojas, D. Naranjo, R. Latorre, K(+) channels: function-structural overview., *Compr. Physiol.* 2 (2012) 2087–149. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>.
- [40] Y. Kubo, J.P. Adelman, D.E. Clapham, L.Y. Jan, A. Karschin, Y. Kurachi, M. Lazdunski, C.G. Nichols, S. Seino, C.A. Vandenberg, International union of

- pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 509–526.
<https://doi.org/10.1124/pr.57.4.11>.
- [41] P. Martín, N. Enrique, A.R.R. Palomo, A. Rebolledo, V. Milesi, Bupivacaine inhibits large conductance, voltage- and Ca²⁺- activated K⁺ channels in human umbilical artery smooth muscle cells., *Channels (Austin)*. 6 (2012) 174–80.
<https://doi.org/10.4161/chan.20362>.
- [42] P. Martín, A. Rebolledo, A.R.R. Palomo, M. Moncada, L. Piccinini, V. Milesi, Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: a review of their roles in human umbilical artery contraction., *Reprod. Sci.* 21 (2014) 432–41. <https://doi.org/10.1177/1933719113504468>.
- [43] V. Milesi, J. Raingo, A. Rebolledo, A.O. Grassi de Gende, Potassium channels in human umbilical artery cells., *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10 (2003) 339–46.
[https://doi.org/10.1016/S1071-5576\(03\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1071-5576(03)00117-5).
- [44] L. Salkoff, A. Butler, G. Ferreira, C. Santi, A. Wei, High-conductance potassium channels of the SLO family., *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 921–31.
<https://doi.org/10.1038/nrn1992>.
- [45] N.S. Atkinson, G.A. Robertson, B. Ganetzky, A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus, *Science* (80-). 253 (1991) 551–555. <https://doi.org/10.1126/science.1857984>.
- [46] R. Latorre, C. Vergara, C. Hidalgo, Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982) 805–9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.79.3.805>.
- [47] B.S. Pallotta, K.L. Magleby, J.N. Barrett, Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture, *Nature*. 293 (1981) 471–474.
<https://doi.org/10.1038/293471a0>.
- [48] A. Marty, Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes, *Nature*. 291 (1981) 497–500.
<https://doi.org/10.1038/291497a0>.
- [49] P. Martín, Canales de potasio en el músculo liso vascular humano: ácido araquidónico como factor hiperpolarizante dependiente de endotelio, UNLP,

2012. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18955> (accessed July 2, 2020).
- [50] E. a Ko, J. Han, I.D. Jung, W.S. Park, Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells., *J. Smooth Muscle Res.* 44 (2008) 65–81.
<https://doi.org/JST.JSTAGE/jsmr/44.65> [pii].
- [51] R. Lu, A. Alioua, Y. Kumar, M. Eghbali, E. Stefani, L. Toro, MaxiK channel partners: physiological impact., *J. Physiol.* 570 (2006) 65–72.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098913>.
- [52] H. Berkefeld, C.A. Sailer, W. Bildl, V. Rohde, J.O. Thumfart, S. Eble, N. Klugbauer, E. Reisinger, J. Bischofberger, D. Oliver, H.G. Knaus, U. Schultes, B. Fakler, BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling, *Science* (80-.). 314 (2006) 615–620. <https://doi.org/10.1126/science.1132915>.
- [53] D.H. Cox, Modeling a Ca²⁺ channel/BKCa channel complex at the single-complex level, *Biophys. J.* 107 (2014) 2797–2814.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.069>.
- [54] R. Rehak, T.M. Bartoletti, J.D.T. Engbers, G. Berecki, R.W. Turner, G.W. Zamponi, Low Voltage Activation of KCa1.1 Current by Cav3-KCa1.1 Complexes, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061844>.
- [55] Y. Tanaka, K. Koike, L. Toro, MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms., *J. Smooth Muscle Res.* 40 (2004) 125–53.
<https://doi.org/10.1540/jsmr.40.125>.
- [56] J. Ledoux, M.E. Werner, J.E. Brayden, M.T. Nelson, Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone, *Physiology.* 21 (2006) 69–79.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2005>.
- [57] M. Félétou, Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?, *Br. J. Pharmacol.* 156 (2009) 545–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x>.
- [58] G. Liu, S.I. Zakharov, L. Yang, S.X. Deng, D.W. Landry, A. Karlin, S.O. Marx, Position and role of the BK channel α subunit s0 helix inferred from disulfide crosslinking, *J. Gen. Physiol.* 131 (2008) 537–548.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200809968>.
- [59] J.P. Morrow, S.I. Zakharov, G. Liu, L. Yang, A.J. Sok, S.O. Marx, Defining the BK

- channel domains required for β 1-subunit modulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5096–5101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600907103>.
- [60] G.F. Contreras, K. Castillo, N. Enrique, W. Carrasquel-Ursulaez, J.P. Castillo, V. Milesi, A. Neely, O. Alvarez, G. Ferreira, C. González, R. Latorre, A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology., *Channels (Austin)*. 7 (2013) 442–58. <https://doi.org/10.4161/chan.26242>.
- [61] Z. Ma, X.J. Lou, F.T. Horrigan, Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels, *J. Gen. Physiol.* 127 (2006) 309–328. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509421>.
- [62] L. Díaz, P. Meera, J. Amigo, E. Stefani, O. Alvarez, L. Toro, R. Latorre, Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32430–32436. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32430>.
- [63] A. Pantazis, A.P. Kohanteb, R. Olcese, Relative motion of transmembrane segments S0 and S4 during voltage sensor activation in the human BKCa channel, *J. Gen. Physiol.* 136 (2010) 645–657. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010503>.
- [64] X. Tao, R. Mackinnon, Molecular structures of the human slo1 k⁺ channel in complex with b4, *Elife*. 8 (2019). <https://doi.org/10.7554/eLife.51409>.
- [65] P. Miranda, M. Holmgren, T. Giraldez, Voltage-dependent dynamics of the BK channel cytosolic gating ring are coupled to the membrane-embedded voltage sensor, *Elife*. 7 (2018). <https://doi.org/10.7554/eLife.40664>.
- [66] Peng Yuan, M.D. Leonetti, A.R. Pico, Y. Hsiung, R. MacKinnon, Structure of the Human BK Channel Ca²⁺-Activation Apparatus at 3.0 Å Resolution, *Science (80-)*. 329 (2010) 182–186. <https://doi.org/10.1126/science.1190414>.
- [67] T. Yusifov, N. Savalli, C.S. Gandhi, M. Ottolia, R. Olcese, The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 376–381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705261105>.
- [68] A.D. Javaherian, T. Yusifov, A. Pantazis, S. Franklin, C.S. Gandhi, R. Olcese, Metal-driven operation of the human large-conductance voltage- and Ca²⁺-dependent potassium channel (BK) gating ring apparatus, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20701–20709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.235234>.

- [69] T. Hoshi, A. Pantazis, R. Olcese, Transduction of voltage and Ca²⁺ signals by Slo1 BK channels., *Physiology (Bethesda)*. 28 (2013) 172–89.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00055.2012>.
- [70] M. Wallner, P. Meera, M. Ottolia, G.J. Kaczorowski, R. Latorre, M.L. Garcia, E. Stefani, L. Toro, Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium., *Receptors Channels*. 3 (1995) 185–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8821792> (accessed June 5, 2018).
- [71] P. Orio, P. Rojas, G. Ferreira, R. Latorre, New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits., *News Physiol. Sci.* 17 (2002) 156–61.
<https://doi.org/10.1152/nips.01387.2002>.
- [72] V.N. Uebele, A. Lagrutta, T. Wade, D.J. Figueroa, Y. Liu, E. McKenna, C.P. Austin, P.B. Bennett, R. Swanson, Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23211–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910187199>.
- [73] G. Liu, X. Niu, R.S. Wu, N. Chudasama, Y. Yao, X. Jin, R. Weinberg, S.I. Zakharov, H. Motoike, S.O. Marx, A. Karlin, Location of modulatory β subunits in BK potassium channels, *J. Gen. Physiol.* 135 (2010) 449–459.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201010417>.
- [74] Y.P. Torres, S.T. Granados, R. Latorre, Pharmacological consequences of the coexpression of BK channel α and auxiliary β subunits., *Front. Physiol.* 5 (2014) 383. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00383>.
- [75] A.N. Bukiya, T. Vaithianathan, L. Toro, A.M. Dopico, Channel beta2-4 subunits fail to substitute for beta1 in sensitizing BK channels to lithocholate., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 995–1000.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.091>.
- [76] J. Yan, R.W. Aldrich, BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 7917–7922.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1205435109>.
- [77] P. Orio, R. Latorre, Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel activity., *J. Gen. Physiol.* 125 (2005) 395–411.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200409236>.

- [78] D.H. Cox, R.W. Aldrich, Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca(2+) sensitivity., *J. Gen. Physiol.* 116 (2000) 411–32.
<https://doi.org/10.1085/jgp.116.3.411>.
- [79] J. Tseng-Crank, C.D. Foster, J.D. Krause, R. Mertz, N. Godinot, T.J. DiChiara, P.H. Reinhartt, Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca2+-Activated K+ channel isoforms from human brain, *Neuron*. 13 (1994) 1315–1330. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90418-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90418-9).
- [80] H.G. Knaus, M. Garcia-Calvo, G.J. Kaczorowski, M.L. Garcia, Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3921–4.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7508434>.
- [81] U.S. Lee, J. Shi, J. Cui, Modulation of BK channel gating by the β 2 subunit involves both membrane-spanning and cytoplasmic domains of Slo1, *J. Neurosci.* 30 (2010) 16170–16179. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-10.2010>.
- [82] M. Wallner, P. Meera, L. Toro, Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca2+-activated K+ channels: A transmembrane β -subunit homolog, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 4137–4142.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4137>.
- [83] X.M. Xia, J.P. Ding, X.H. Zeng, K.L. Duan, C.J. Lingle, Rectification and rapid activation at low Ca2+ of Ca2+-activated, voltage-dependent BK currents: Consequences of rapid inactivation by a novel β subunit, *J. Neurosci.* 20 (2000) 4890–4903. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-13-04890.2000>.
- [84] R. Brenner, T.J. Jegla, A. Wickenden, Y. Liu, R.W. Aldrich, Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel β subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 6453–6461. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6453>.
- [85] X.H. Zeng, G.R. Benzinger, X.M. Xia, C.J. Lingle, BK channels with β 3a subunits generate use-dependent slow afterhyperpolarizing currents by an inactivation-coupled mechanism, *J. Neurosci.* 27 (2007) 4707–4715.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0758-07.2007>.

- [86] X. Zeng, X.M. Xia, C.J. Lingle, Species-specific differences among KCNMB3 BK β 3 auxiliary subunits: Some β 3 N-terminal variants may be primate-specific subunits, *J. Gen. Physiol.* 132 (2008) 115–129.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200809969>.
- [87] C.J. Lingle, X.H. Zeng, J.P. Ding, X.M. Xia, Inactivation of BK channels mediated by the NH2 terminus of the β 3b auxiliary subunit involves a two-step mechanism: Possible separation of binding and blockade, *J. Gen. Physiol.* 117 (2001) 583–605. <https://doi.org/10.1085/jgp.117.6.583>.
- [88] P. Meera, M. Wallner, L. Toro, A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 5562–5567.
<https://doi.org/10.1073/pnas.100118597>.
- [89] P. Jin, T.M. Weiger, I.B. Levitan, Reciprocal modulation between the α and β 4 subunits of hSlo calcium-dependent potassium channels, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 43724–43729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205795200>.
- [90] B. Wang, B.S. Rothberg, R. Brenner, Mechanism of β 4 subunit modulation of BK channels, *J. Gen. Physiol.* 127 (2006) 449–465.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200509436>.
- [91] R. Behrens, A. Nolting, F. Reimann, M. Schwarz, R. Waldschütz, O. Pongs, HKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel β subunit family, *FEBS Lett.* 474 (2000) 99–106. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01584-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01584-2).
- [92] M. Chen, G. V. Petkov, Identification of Large Conductance Calcium Activated Potassium Channel Accessory β 4 Subunit in Rat and Mouse Bladder Smooth Muscle, *J. Urol.* 182 (2009) 374–381.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.02.109>.
- [93] J. Yan, R.W. Aldrich, LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium, *Nature.* 466 (2010) 513–516.
<https://doi.org/10.1038/nature09162>.
- [94] Q. Li, J. Yan, Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits., *Int. Rev. Neurobiol.* 128 (2016) 51–90.
<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.015>.

- [95] Y.W. Wang, J.P. Ding, X.M. Xia, C.J. Lingle, Consequences of the stoichiometry of Slo1, α and auxiliary β subunits on functional properties of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, *J. Neurosci.* 22 (2002) 1550–1561.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-05-01550.2002>.
- [96] V. Gonzalez-Perez, X.M. Xia, C.J. Lingle, Two classes of regulatory subunits coassemble in the same BK channel and independently regulate gating, *Nat. Commun.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms9341>.
- [97] K. Castillo, G.F. Contreras, A. Pupo, Y.P. Torres, A. Neely, C. González, R. Latorre, Molecular mechanism underlying $\beta 1$ regulation in voltage- and calcium-activated potassium (BK) channels., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 4809–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504378112>.
- [98] G. Coiret, A.-S. Borowiec, P. Mariot, H. Ouadid-Ahidouch, F. Matifat, The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells., *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 843–51.
<https://doi.org/10.1124/mol.106.028290>.
- [99] A.I. Fernández-Mariño, M.A. Valverde, J.M. Fernández-Fernández, BK channel activation by tungstate requires the $\beta 1$ subunit extracellular loop residues essential to modulate voltage sensor function and channel gating, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 466 (2014) 1365–1375. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1379-9>.
- [100] S.T. Granados, K. Castillo, F. Bravo-Moraga, R. V. Sepúlveda, W. Carrasquel-Ursulaez, M. Rojas, E. Carmona, Y. Lorenzo-Ceballos, F. González-Nilo, C. González, R. Latorre, Y.P. Torres, The molecular nature of the 17β -Estradiol binding site in the voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} (BK) channel $\beta 1$ subunit, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45942-1>.
- [101] S. Plugger, J. Faulhaber, M. Furstenau, M. Lohn, R. Waldschutz, M. Gollasch, H. Haller, F.C. Luft, H. Ehmke, O. Pongs, Mice With Disrupted BK Channel 1 Subunit Gene Feature Abnormal Ca^{2+} Spark/STOC Coupling and Elevated Blood Pressure, *Circ. Res.* 87 (2000) e53–e60.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.87.11.e53>.
- [102] R. Brenner, G.J. Pérez, A.D. Bonev, D.M. Eckman, J.C. Kosek, S.W. Wiler, A.J. Patterson, M.T. Nelson, R.W. Aldrich, Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the

- calcium-activated potassium channel, *Nature*. 407 (2000) 870–876.
<https://doi.org/10.1038/35038011>.
- [103] F.T. Horrigan, R.W. Aldrich, Allosteric voltage gating of potassium channels II. Mslo channel gating charge movement in the absence of Ca(2+), *J. Gen. Physiol.* 114 (1999) 305–36. <https://doi.org/10.1085/JGP.114.2.305>.
- [104] F.T. Horrigan, R.W. Aldrich, Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels., *J. Gen. Physiol.* 120 (2002) 267–305. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028605>.
- [105] O.B. McManus, K.L. Magleby, Kinetic states and modes of single large-conductance calcium-activated potassium channels in cultured rat skeletal muscle., *J. Physiol.* 402 (1988) 79–120.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3236256>.
- [106] K.L. Magleby, Gating mechanism of BK (Slo1) channels: So near, yet so far, *J. Gen. Physiol.* 121 (2003) 81–96. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028721>.
- [107] O.B. McManus, K.L. Magleby, Accounting for the Ca(2+)-dependent kinetics of single large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat skeletal muscle., *J. Physiol.* 443 (1991) 739–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1822543>.
- [108] D.H. Cox, J. Cui, R.W. Aldrich, Allosteric Gating of a Large Conductance Ca-activated K⁺ Channel, *J. Gen. Physiol.* 110 (1997) 257–281.
<https://doi.org/10.1085/jgp.110.3.257>.
- [109] N. Savalli, A. Pantazis, T. Yusifov, D. Sigg, R. Olcese, The contribution of RCK domains to human BK channel allosteric activation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 21741–21750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346171>.
- [110] J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux, On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6).
- [111] E. Smyth, T. Grosser, G. FitzGerald, Autacoides derivados de lípidos: eicosanoides y factor activador de plaquetas, in: B. Chabner, B. Knollman (Eds.), Goodman Gilman. Las Bases Farm. La Ter., McGraw-Hill Medical, 2011: pp. 937–957.
- [112] D.S. Ahn, Y.B. Kim, Y.H. Lee, B.S. Kang, D.H. Kang, Fatty acids directly increase the activity of Ca(2+)-activated K⁺ channels in rabbit coronary smooth muscle

- cells., *Yonsei Med. J.* 35 (1994) 10–24.
<https://doi.org/10.3349/ymj.1994.35.1.10>.
- [113] D.D. Denson, X. Wang, R.T. Worrell, D.C. Eaton, Effects of fatty acids on BK channels in GH(3) cells., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C1211-9.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.4.C1211>.
- [114] A.L. Clarke, S. Petrou, J. V Walsh, J.J. Singer, Modulation of BK Ca channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action, *Am. J. Physiol. Physiol.* 283 (2002) C1441–C1453.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00035.2002>.
- [115] H.-F. Zheng, X.-L. Li, Z.-Y. Jin, J.-B. Sun, Z.-L. Li, W.-X. Xu, Effects of unsaturated fatty acids on calcium-activated potassium current in gastric myocytes of guinea pigs., *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 672–5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655819>.
- [116] L.H. Lai, R.X. Wang, W.P. Jiang, X.J. Yang, J.P. Song, X.R. Li, G. Tao, Effects of docosahexaenoic acid on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and voltage-dependent K⁺ channels in rat coronary artery smooth muscle cells, *Acta Pharmacol. Sin.* 30 (2009) 314–320. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.7>.
- [117] T. Hoshi, Y. Tian, R. Xu, S.H. Heinemann, S. Hou, Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 4822–4827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222003110>.
- [118] X. Sun, H. Yao, D. Zhou, X. Gu, G.G. Haddad, Modulation of hSlo BK current inactivation by fatty acid esters of CoA, *J. Neurochem.* 104 (2008) 1394–1403.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05083.x>.
- [119] A.L. Clarke, S. Petrou, J. V Walsh, J.J. Singer, Site of action of fatty acids and other charged lipids on BK Ca channels from arterial smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Physiol.* 284 (2003) C607–C619.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00364.2002>.
- [120] M.T. Kirber, R.W. Ordway, L.H. Clapp, J. V Walsh, J.J. Singer, Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells., *FEBS Lett.* 297 (1992) 24–8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1551431>.

- [121] A.M. Dopico, A.N. Bukiya, Lipid regulation of BK channel function., *Front. Physiol.* 5 (2014) 312. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00312>.
- [122] A.N. Bukiya, A.K. Singh, A.L. Parrill, A.M. Dopico, The steroid interaction site in transmembrane domain 2 of the large conductance, voltage- and calcium-gated potassium (BK) channel accessory β 1 subunit., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 20207–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112901108>.
- [123] S.I. Börjesson, S. Hammarström, F. Elinder, Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids., *Biophys. J.* 95 (2008) 2242–53. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.130757>.
- [124] A.N. Bukiya, J. Liu, L. Toro, A.M. Dopico, Beta1 (KCNMB1) subunits mediate lithocholate activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and dilation in small, resistance-size arteries., *Mol. Pharmacol.* 72 (2007) 359–69. <https://doi.org/10.1124/mol.107.034330>.
- [125] J.M. LaLonde, M.A. Levenson, J.J. Roe, D.A. Bernlohr, L.J. Banaszak, Adipocyte lipid-binding protein complexed with arachidonic acid. Titration calorimetry and X-ray crystallographic studies, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25339–25347. <https://doi.org/10.2210/pdb1adl/pdb>.
- [126] E. Connell, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (5th edn), *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* 49 (2012) 615–615. <https://doi.org/10.1258/acb.2012.201217>.
- [127] T.A. Shouk, M.N. Omar, S.T. Fayed, Essential Fatty Acids Profile and Lipid Peroxides in Severe Pre-Eclampsia, *Ann. Clin. Biochem. An Int. J. Biochem. Lab. Med.* 36 (1999) 62–65. <https://doi.org/10.1177/000456329903600108>.
- [128] W.B. Campbell, J.R. Falck, Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors., *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. 49 (2007) 590–6. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000255173.50317.fc>.
- [129] Y. Qiu, J. Quilley, Vascular effects of arachidonic acid in the rat perfused heart. Role of the endothelium, cyclooxygenase, cytochrome P450, and K^{+} channels., *J. Lipid Res.* 40 (1999) 2177–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10588943>.
- [130] T. Grosser, E. Smyth, G. FitzGerald, Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos; farmacoterapia de la gota., in: B. Chabner, B. Knollman (Eds.), *Goodman Gilman*.

- Las Bases Farm. La Ter., 12th editi, McGraw-Hill Medical, 2011: pp. 959–1003.
- [131] S. Moncada, A.G. Herman, E.A. Higgs, J.R. Vane, Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium, *Thromb. Res.* 11 (1977) 323–344. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(77\)90185-2](https://doi.org/10.1016/0049-3848(77)90185-2).
- [132] B.T. Larsen, H. Miura, O.A. Hatoum, W.B. Campbell, B.D. Hammock, D.C. Zeldin, J.R. Falck, D.D. Gutterman, Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (2006) H491-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00927.2005>.
- [133] G. Edwards, M. Féletou, A.H. Weston, Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 459 (2010) 863–879. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0817-1>.
- [134] D. Panigrahy, A. Kaipainen, E.R. Greene, S. Huang, Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer., *Cancer Metastasis Rev.* 29 (2010) 723–35. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9264-x>.
- [135] A.J. Lonigro, N.L. Weintraub, C.A. Branch, A.H. Stephenson, L. McMurdo, R.S. Sprague, Endothelium-dependent relaxation to arachidonic acid in porcine coronary artery: is there a fourth pathway?, *Pol. J. Pharmacol.* 46 (1994) 567–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7620517>.
- [136] H. Miura, D.D. Gutterman, Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca²⁺-activated K⁺ channels., *Circ. Res.* 83 (1998) 501–7. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.5.501>.
- [137] C. Moreno, A. Macias, A. Prieto, A. De La Cruz, C. Valenzuela, Polyunsaturated Fatty Acids Modify the Gating of Kv Channels, *Front. Pharmacol.* 3 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00163>.
- [138] M. Fink, F. Lesage, F. Duprat, C. Heurteaux, R. Reyes, M. Fosset, M. Lazdunski, A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids., *EMBO J.* 17 (1998) 3297–308. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3297>.
- [139] H. Meves, Arachidonic acid and ion channels: An update, *Br. J. Pharmacol.* 155 (2008) 4–16. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.216>.

- [140] S. Bendahhou, T.R. Cummins, W.S. Agnew, Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 272 (1997).
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.2.c592>.
- [141] M. Radenković, M. Stojanović, N. Skorupan, M. Prostran, Pharmacological analysis of the rat femoral artery response to Bradykinin, *Sci. Pharm.* 81 (2013) 749–761. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1305-13>.
- [142] X. Sun, D. Zhou, P. Zhang, E.G. Moczydlowski, G.G. Haddad, β -Subunit-Dependent Modulation of hSlo BK Current by Arachidonic Acid, *J. Neurophysiol.* 97 (2007) 62–69. <https://doi.org/10.1152/jn.00700.2006>.
- [143] T. Lu, P. V Katakam, M. VanRollins, N.L. Weintraub, A.A. Spector, H.C. Lee, Dihydroxyeicosatrienoic acids are potent activators of Ca(2+)-activated K(+) channels in isolated rat coronary arterial myocytes., *J. Physiol.* 534 (2001) 651–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483698>.
- [144] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 391 (1981) 85–100.
<https://doi.org/10.1007/BF00656997>.
- [145] U. Klöckner, Intracellular calcium ions activate a low-conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 424 (1993) 231–237. <https://doi.org/10.1007/BF00384347>.
- [146] A. Carl, K.M. Sanders, Measurement of single channel open probability with voltage ramps., *J. Neurosci. Methods.* 33 (1990) 157–63.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700233>.
- [147] R.W. Aldrich, D.P. Corey, C.F. Stevens, A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording., *Nature.* 306 (1983) 436–41.
<https://doi.org/10.1038/306436a0>.
- [148] J.J. Clare, D.J. Trezise, *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels*, Wiley, 2006. <https://doi.org/10.1002/3527608095>.
- [149] S.D. Silberberg, K.L. Magleby, Preventing errors when estimating single channel properties from the analysis of current fluctuations., *Biophys. J.* 65 (1993) 1570–84. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81196-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81196-2).

- [150] D. Riendeau, M.D. Percival, S. Boyce, C. Brideau, S. Charleson, W. Cromlish, D. Ethier, J. Evans, J.-P. Falguyret, A.W. Ford-Hutchinson, R. Gordon, G. Greig, M. Gresser, J. Guay, S. Kargman, S. Léger, J.A. Mancini, G. O'Neill, M. Ouellet, I.W. Rodger, M. Thérien, Z. Wang, J.K. Webb, E. Wong, L. Xu, R.N. Young, R. Zamboni, P. Prasit, C.-C. Chan, Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 105–117. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701076>.
- [151] W.H. Wang, M. Lu, Effect of arachidonic acid on activity of the apical K⁺ channel in the thick ascending limb of the rat kidney, *J. Gen. Physiol.* 106 (1995) 727–743. <https://doi.org/10.1085/jgp.106.4.727>.
- [152] D.B. Shieh, S.R. Yang, X.Y. Shi, Y.N. Wu, S.N. Wu, Properties of BKCa channels in oral keratinocytes, *J. Dent. Res.* 84 (2005) 468–473. <https://doi.org/10.1177/154405910508400513>.
- [153] R.M. Gu, L. Yang, Y. Zhang, L. Wang, S. Kong, C. Zhang, Y. Zhai, M. Wang, P. Wu, L. Liu, F. Gu, J. Zhang, W.H. Wang, CYP-omega-hydroxylation-dependent metabolites of arachidonic acid inhibit the basolateral 10 pS chloride channel in the rat thick ascending limb, *Kidney Int.* 76 (2009) 849–856. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.287>.
- [154] K. Nithipatikom, D.M. Brody, A.T. Tang, V.L. Manthati, J.R. Falck, C.L. Williams, W.B. Campbell, Inhibition of carcinoma cell motility by epoxyeicosatrienoic acid (EET) antagonists, *Cancer Sci.* 101 (2010) 2629–2636. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01713.x>.
- [155] A. Gruslova, I. Semenov, B. Wang, An extracellular domain of the accessory β 1 subunit is required for modulating BK channel voltage sensor and gate, *J. Gen. Physiol.* 139 (2012) 57–67. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110698>.
- [156] C.M. Armstrong, F. Bezanilla, Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels, *J. Gen. Physiol.* 63 (1974) 533–552. <https://doi.org/10.1085/jgp.63.5.533>.
- [157] P. Martín, M. Moncada, N. Enrique, A. Asuaje, J.M. Valdez Capuccino, C. Gonzalez, V. Milesi, Arachidonic acid activation of BKCa (Slo1) channels associated to the β 1-subunit in human vascular smooth muscle cells., *Pflugers Arch.* 466 (2014) 1779–92. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1422-x>.

- [158] M. Özgül, C. Silan, O. Yillar, C. Küçüküseyin, 4-Aminopyridine Can Induce Release Of Calcium From The Sarcoplasmic Reticulum Of Frog Heart, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 11 (2000) 57–62.
<https://doi.org/10.1515/JBCPP.2000.11.1.57>.
- [159] M. Grimaldi, M. Atzori, P. Ray, D.L. Alkon, Mobilization of calcium from intracellular stores, potentiation of neurotransmitter-induced calcium transients, and capacitative calcium entry by 4-aminopyridine, *J. Neurosci.* 21 (2001) 3135–3143. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-09-03135.2001>.
- [160] P. Petkova-Kirova, H. Gagov, U. Krien, D. Duridanova, T. Noack, R. Schubert, 4-Aminopyridine affects rat arterial smooth muscle BKCa currents by changing intracellular pH, *Br. J. Pharmacol.* 131 (2000) 1643–1650.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703742>.
- [161] A.N. Bukiya, J. McMillan, J. Liu, B. Shivakumar, A.L. Parrill, A.M. Dopico, Activation of calcium- and voltage-gated potassium channels of large conductance by leukotriene B₄, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 35314–25.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577825>.
- [162] C.M. Nimigean, K.L. Magleby, The β subunit increases the Ca²⁺ sensitivity of large conductance Ca²⁺-activated potassium channels by retaining the gating in the bursting states, *J. Gen. Physiol.* 113 (1999) 425–439.
<https://doi.org/10.1085/jgp.113.3.425>.
- [163] W. Hagmann, D. Kagawa, C. Renaud, K. V Honn, Activity and protein distribution of 12-lipoxygenase in HEL cells: induction of membrane-association by phorbol ester TPA, modulation of activity by glutathione and 13-HPODE, and Ca(2+)-dependent translocation to membranes., *Prostaglandins.* 46 (1993) 471–7.
[https://doi.org/10.1016/0090-6980\(93\)90066-g](https://doi.org/10.1016/0090-6980(93)90066-g).
- [164] C.A. Rouzer, S. Kargman, Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 10980–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134355>.
- [165] S.-N. Wu, A. Wu, M.-W. Lin, Pharmacological Roles of the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel, *Curr. Top. Med. Chem.* 6 (2006) 1025–1030. <https://doi.org/10.2174/156802606777323764>.
- [166] T. Lu, X. Wang, T. He, W. Zhou, T.L. Kaduce, Z.S. Katusic, A.A. Spector, H. Lee,

- Impaired arachidonic acid-mediated activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in coronary arterial smooth muscle cells in Zucker Diabetic Fatty rats., *Diabetes*. 54 (2005) 2155–63.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983217>.
- [167] J.O. Burnette, R.E. White, PGI₂ opens potassium channels in retinal pericytes by cyclic AMP-stimulated, cross-activation of PKG, *Exp. Eye Res.* 83 (2006) 1359–1365. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2006.07.011>.
- [168] A.A. Spector, Plasma Free Fatty Acid and Lipoproteins as Sources of Polyunsaturated Fatty Acid for the Brain, *J. Mol. Neurosci.* 16 (2001) 159–166. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:159>.
- [169] A.N. Bukiya, J.E. McMillan, A.L. Fedinec, S. a Patil, D.D. Miller, C.W. Leffler, A.L. Parrill, A.M. Dopico, Cerebrovascular dilation via selective targeting of the cholane steroid-recognition site in the BK channel β 1-subunit by a novel nonsteroidal agent., *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 1030–44. <https://doi.org/10.1124/mol.112.083519>.
- [170] J.E. McMillan, A.N. Bukiya, C.L. Terrell, S.A. Patil, D.D. Miller, A.M. Dopico, A.L. Parrill, Multi-generational pharmacophore modeling for ligands to the cholane steroid-recognition site in the β 1 modulatory subunit of the BKCa channel, *J. Mol. Graph. Model.* 54 (2014) 174–183. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2014.10.008>.
- [171] T. Hoshi, B. Wissuwa, Y. Tian, N. Tajima, R. Xu, M. Bauer, S.H. Heinemann, S. Hou, Omega-3 fatty acids lower blood pressure by directly activating large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 4816–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221997110>.
- [172] T. Hoshi, R. Xu, S. Hou, S.H. Heinemann, Y. Tian, A point mutation in the human Slo1 channel that impairs its sensitivity to omega-3 docosahexaenoic acid., *J. Gen. Physiol.* 142 (2013) 507–22. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311061>.
- [173] Y. Tian, M. Aursnes, T.V. Hansen, J.E. Tungen, J.D. Galpin, L. Leisle, C.A. Ahern, R. Xu, S.H. Heinemann, T. Hoshi, Atomic determinants of BK channel activation by polyunsaturated fatty acids., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 13905–13910. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615562113>.
- [174] S. Chowdhury, B. Chanda, Estimating the voltage-dependent free energy change

- of ion channels using the median voltage for activation, *J. Gen. Physiol.* 139 (2012) 3–17. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110722>.
- [175] O. Gavrilova-Ruch, R. Schönherr, S.H. Heinemann, Activation of hEAG1 potassium channels by arachidonic acid, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 453 (2007) 891–903. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0173-3>.
- [176] S. Ferroni, P. Valente, M. Caprini, M. Nobile, P. Schubert, C. Rapisarda, Arachidonic acid activates an open rectifier potassium channel in cultured rat cortical astrocytes, *J. Neurosci. Res.* 72 (2003) 363–372. <https://doi.org/10.1002/jnr.10580>.
- [177] F. Elinder, S.I. Liin, Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels., *Front. Physiol.* 8 (2017) 43. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00043>.
- [178] G. Kuntamallappanavar, L. Toro, A.M. Dopico, Both transmembrane domains of BK β 1 subunits are essential to confer the normal phenotype of β 1-containing BK channels., *PLoS One.* 9 (2014) e109306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109306>.