

32. Salud Humana

Diferencias en la expresión de canales de potasio en un modelo de hipertensión arterial: su participación en el efecto del péptido natriurético tipo C

¹Martínez Tambella, Joaquín; ¹Soria, Damián; ¹Echeverría Paredes, Franklin; ¹Magaldi, Rocío; ¹Ciancio, Nicolás; ¹²Tomat, Analía; ¹²Elesgaray, Rosana; ¹²Arranz, Cristina; ¹²Caniffi, Carolina.

joaquinmt96@hotmail.com; ccaniffi@ffyb.uba.ar

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Fisiología. Buenos Aires, Argentina.

²CONICET – Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA). Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Objetivos: Evaluar la expresión de canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia (BKCa) y de rectificación interna (Kir) en ratas Wistar (W) y espontáneamente hipertensas (SHR), y su participación en el efecto vasodilatador del péptido natriurético tipo C (CNP).

Metodología: Se extrajo la aorta torácica de W y SHR macho de 14 semanas para determinar: expresión de BKCa y Kir (Western blot, UA); y reactividad vascular ante el agregado de CNP (1 pM-1 uM), en anillos sin endotelio precontraídos con fenilefrina (1 uM), en ausencia o presencia de tetraetilamonio (TEA, bloqueante no selectivo de canales de potasio, 1 mM), iberiotoxina (IbTx, bloqueante de BKCa, 30 nM), o BaCl₂ (bloqueante de Kir, 30 uM). Análisis estadístico: ANOVA 2 factores postest Bonferroni y t de Student para comparación entre dos grupos, n=6/grupo.

Resultados: Se expresan como media±ESM. La expresión de BKCa y Kir fue menor en SHR. La respuesta máxima (Emax,%) y la potencia del CNP (log negativo de la concentración que induce 50% de Emax, pCE50) fueron similares en ambos grupos. TEA bloqueó el efecto vasodilatador del CNP en W y en SHR. IbTx y BaCl₂ disminuyeron Emax en forma similar en ambos grupos. Sin embargo, la pCE50 con IbTx fue menor en W, y con BaCl₂ fue menor en SHR.

	W	SHR
BKCa	1,1±0,1	0,7±0,1*
Kir	0,8±0,1	0,4±0,1*
E _{max}	54,8±7,3	57,6±3,1
pCE50	6,7±0,1	6,8±0,1
E _{max} _{lbTx}	36,1±4,8**	33,5±3,2##
pCE50 _{lbTx}	6,3±0,1**	6,8±0,1
E _{max} _{BaCl2}	35,5±3,6**	34,0±3,2##
pCE50 _{BaCl2}	6,7±0,1	6,4±0,1##

*p<0,05 vs W; **p<0,01 vs W; ##p<0,01 vs SHR.

Conclusión: El efecto del CNP parece ser más sensible al bloqueo de Kir y menos sensible al bloqueo de BKCa en las SHR, si bien la expresión de ambos canales se encuentra disminuida en este modelo de hipertensión arterial.

Palabras clave: péptidos natriuréticos, presión arterial, canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia, canales de potasio de rectificación interna.

Introducción

El péptido natriurético tipo C (CNP) está ampliamente distribuido en el sistema cardiovascular, principalmente en las células endoteliales y del músculo liso vascular (MLV) (Chen HH y Burnett JC Jr, 1998; D'Souza SP, Davis M y Baxter GF, 2004), situación que lo coloca estratégicamente formando parte de los mecanismos involucrados en la regulación de la presión arterial (PA) y en la protección de los diferentes órganos blanco de la hipertensión arterial (HTA). Las acciones vasculares del CNP están mediadas por la activación de los receptores natriuréticos tipo B y C (NPR-B, NPR-C), los cuales se expresan en

aorta y vasos periféricos (Pandey KN, 2005; Potter LR, Abbey-Hosch S y Dickey DM, 2006). El CNP posee mayor afinidad por el NPR-B, que es un receptor de membrana guanilato ciclasa (GC) y su activación induce la síntesis de cGMP, el cual media las respuestas a nivel celular (Potter LR *et al.* 2006). El NPR-C, inicialmente identificado como un receptor de clearance, es también responsable de algunos de los efectos biológicos del péptido (Anand-Srivastava MB, Sehl PD y Lowe DG, 1996). En estudios *in vivo*, realizados en nuestro laboratorio, demostramos que la administración aguda de CNP aumenta la síntesis de óxido nítrico (NO) en aorta de ratas

normotensas y espontáneamente hipertensas (SHR) (Caniffi C, Elesgaray R, Gironacci M, Arranz C y Costa MA, 2010; Costa MA, Elesgaray R, Caniffi C, Fellet A y Arranz C, 2007). Sin embargo, la respuesta del sistema del NO vascular al péptido está disminuida en las ratas SHR, respecto a las normotensas (Caniffi C *et al.* 2010). La activación de la NOS está mediada por la interacción del CNP con el receptor NPR-C acoplado a proteína Gi y la activación de la isoforma endotelial de la NOS (eNOS) Ca²⁺-calmodulina dependiente (Caniffi C *et al.* 2010; Costa MA *et al.* 2007).

Además de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, numerosos autores han demostrado que la activación de NPR-B y NPR-C se encuentra involucrada en el efecto vasodilatador del CNP, en diversos lechos vasculares y modelos animales. La unión del CNP a estos receptores induce la apertura de canales de potasio y la consecuente relajación del MLV (Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A y Hobbs AJ, 2003; Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R y Ahluwalia A, 2004; Simon A, Harrington EO, Liu GX, Koren G y Choudhary G, 2009). Sin embargo, aún poco se conoce sobre el papel del CNP como factor hiperpolarizante derivado de endotelio en la hipertensión arterial.

Los canales de potasio tienen también un papel importante en la regulación del tono

vascular (Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M, 2000) y se clasifican en 4 familias: los canales de potasio activados por voltaje (KV), los canales de potasio activados por calcio (KCa), los canales de potasio con dominio de dos poros (K2P) y los canales de potasio con rectificación interna (Kir) (Gutman GA *et al.* 2003). En el MLV la población más relevante corresponde a los canales de potasio BKCa (Eichler I *et al.* 2003; Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A y Reinhart PH, 1999). Estos canales son activados por aumentos en la concentración de calcio intracelular así como también por la despolarización de la membrana. Además, se ha demostrado que están regulados por numerosos factores, entre ellos el NO (Archer SL *et al.* 1994), y la fosforilación vía distintas proteínas kinasas (PK), como PKA, PKC y PKG que pueden alterar su sensibilidad al calcio y/o al voltaje (Ko EA, Han J, Jung ID y Park WS, 2008). Los canales BKCa parecen no contribuir al potencial de membrana de reposo bajo condiciones fisiológicas, pero se encuentran abiertos y tienen un importante papel como feedback negativo en la vasoconstricción inducida por la despolarización de la membrana plasmática y el aumento del flujo de calcio hacia el citosol mediado por la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC).

Por otra parte, la familia de los canales Kir se divide a su vez en 7 subfamilias (Kir1.0 a Kir7.0), siendo la subfamilia Kir2.0 la más relevante a nivel de la pared vascular, tanto a nivel del endotelio como del MLV (Bradley KK *et al.* 1999; Droogmans G y Nilius B, 2001; Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE y Nelson MT, 1993; Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT y Schwarz TL, 2000). Su actividad es determinante de la hiperpolarización de la membrana, amortiguando el potasio extracelular y modulando además la despolarización, al evitar la pérdida excesiva de potasio (Jackson WF, 2005). La expresión de los canales Kir es más abundante en las células del MLV de los lechos vasculares de pequeño calibre, y la expresión de estos canales parece aumentar a medida que disminuye el diámetro de los vasos (Haddy FJ, Vanhoutte PM y Feletou M, 2006; Jackson WF, 2005; Kim MY *et al.* 2005; Quayle JM *et al.* 1993). Su actividad puede ser modulada por fosforilación mediante PKA y PKC y tirosin kinasa (TK) (Ko EA *et al.* 2008; Wischmeyer E, Döring F y Karschin A, 1998), por la activación de proteína G inhibitoria (Gi) (Kamouchi M, Van den Bremt K, Eggermont J, Droogmans G y Nilius B, 1997) y por el NO (Schubert R *et al.* 2004), y se encontrarían down-regulados en la hipertensión arterial (Sobey CG, 2001).

Existen evidencias que muestran que las acciones del CNP sobre el tono vascular están mediadas por la apertura de canales de potasio Kir mediante la activación de NPR-C acoplado a proteína Gi (Chauhan SD *et al.* 2003; Villar IC *et al.* 2007). Por otra parte, en arterias de resistencia subcutáneas humanas se observó que el CNP induce la relajación del MLV, mediante su interacción con NPR-B y la apertura de los canales de potasio BKCa (Garcha RS y Hughes AD, 2006). Esta vía de señalización también ha sido propuesta como la responsable del efecto vasodilatador del CNP descrito en la microvasculatura pulmonar (Simon A *et al.* 2009) y en vasos de mayor calibre (Banks M, Wei CM, Kim CH, Burnett JC Jr. y Miller VM, 1996; Wei CM, Kim CH, Khraibi AA, Miller VM y Burnett JC Jr. 1994). Sin embargo, aún poco se conoce sobre el efecto del CNP, y los mecanismos involucrados, como factor hiperpolarizante derivado de endotelio en la HTA. Las ratas SHR constituyen un modelo genético de hipertensión que presenta disfunción endotelial, aumento del estrés oxidativo, incremento de factores vasoconstrictores y disminución en la biodisponibilidad del NO (Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O y Balligand JL, 2003). Esto podría modificar la apertura de los canales de potasio en respuesta a distintos agentes vasoactivos impactando sobre el tono contráctil del MLV. Profundizar en los

mecanismos que subyacen a los distintos procesos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la HTA, puede reflejarse en la optimización del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, en mejorar la calidad de vida y disminuir los riesgos de eventos que conduzcan a discapacidad y riesgo de vida, repercutiendo en una significativa reducción del costo socioeconómico en el tratamiento de las patologías asociadas.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son: evaluar la expresión de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia y de rectificación interna en ratas Wistar normotensas y SHR jóvenes adultas macho, y la participación de estos en el efecto vasodilatador del CNP.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas macho adultas, de 14 semanas de edad, de las cepas: Wistar (peso corporal 290-340 g), y SHR (peso corporal 280-330 g), mantenidos en un ambiente con temperatura y humedad controladas, con ciclos automáticos de luz y oscuridad de 12/12 horas y alimentados con una dieta estándar (Nutrimentos Purina) y agua ad libitum, en el bioterio de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Los animales utilizados fueron tratados de acuerdo con los

lineamientos de la American Heart Association sobre el uso de animales de investigación. Los protocolos experimentales fueron diseñados de acuerdo con las recomendaciones para el uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (Human Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, National Institutes of Health, Publication No. 86-23, Washington, DC, 1985, Revisión 1996) y bajo la disposición 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Diseño experimental

Ratas Wistar y SHR fueron sacrificadas por decapitación y se extrajo rápidamente la porción descendente de la aorta torácica.

Estudios de reactividad vascular

La aorta se colocó en solución Krebs fría, se removió cuidadosamente el tejido conectivo y se obtuvieron anillos de 3 a 5 mm de espesor. Para evaluar el efecto vasodilatador del CNP independiente de endotelio, los anillos fueron desnudados removiendo mecánicamente el endotelio con un raspador.

Los segmentos obtenidos de aorta se suspendieron en solución Krebs

gasificada (95 % de O₂ y 5 % de CO₂, 37 ± 1°C, pH=7,4); utilizando un sistema de baño de órgano aislado en donde los anillos son estabilizados durante 60 minutos ajustando a una tensión basal de 1 g (transductor de fuerza TRI201, PanLab SL) y las mediciones fueron registradas con un polígrafo (Fisiógrafo modular Power Lab, ADInstruments; programa de adquisición de datos PowerLab 8/30 and Labchart, Australia). Durante este período de estabilización, la solución Krebs se renovó cada 15 minutos y en caso de ser necesario la tensión se reajustó a 1 g.

Los anillos de aorta provenientes de ratas Wistar y SHR fueron incubados durante 30 minutos con: tetraetilamonio clorhidrato (TEA, bloqueante no selectivo de los canales de potasio, 10⁻³ M); BaCl₂ (bloqueante de los canales de potasio con rectificación interna (Kir), 3x10⁻⁵ M); glibenclamida (Glib, bloqueante de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), 3x10⁻⁶ M); iberiotoxina (IbTx, bloqueante de los canales de potasio activados por calcio (BKCa), 3x10⁻⁸ M). Posteriormente se midió la tensión isométrica ante el agregado de concentraciones crecientes de CNP (10⁻¹² M - 10⁻⁶ M) o cANP₍₄₋₂₃₎ (10⁻¹⁵ M - 10⁻⁷ M) en los anillos pre-contraídos con fenilefrina (10⁻⁶ M - 10⁻⁵ M). Las concentraciones utilizadas fueron seleccionadas de acuerdo con la literatura (Chrissobolis S y Sobey CG, 2002; Liang

CF *et al.* 2010; Villar IC *et al.* 2007; Wei CM *et al.* 1994). La respuesta vasodilatadora se expresa como la tensión obtenida luego del agregado de CNP o cANP₍₄₋₂₃₎ respecto de la tensión máxima alcanzada con fenilefrina, en porcentaje. De cada animal se obtuvieron 3 anillos de aorta torácica y se realizó un solo experimento en cada anillo de aorta.

Expresión de canales BKCa y Kir
Secciones de aorta torácica fueron homogeneizadas y centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C y por 10 minutos. Los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta el momento de realizar las determinaciones. Las proteínas de los homogenatos (0,08 mg proteínas/calle, cuantificadas mediante Bradford) fueron separadas por electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 12%, transferidas en sistema húmedo a una membrana de nitrocelulosa y luego incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-Kir 2.1 (aminoácidos 392-410, dilución 1/500), anti-BKCa (anti subunidad Slo1, dilución 1/500) (Alomone Lab, Israel) y anticuerpo monoclonal de conejo anti-β-actina (dilución 1/2000, Sigma-Aldrich). Se empleó como anticuerpo secundario anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución 1/3000 o 1/5000 en el caso del anticuerpo primario anti-β-actina, BioRad, Germany).

Las muestras fueron reveladas por quimioluminiscencia usando reactivo ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) por 4 minutos. La cuantificación de las bandas se realizó por análisis digital de las imágenes, usando un scanner Hewlett–Packard y un software ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA).

Los niveles proteicos de los canales de potasio fueron expresados como la densidad óptica de cada banda normalizada por la densidad óptica correspondiente a la banda de β -actina corrida en el mismo gel. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm EEM (error estándar de la media) y para cada resultado, n indica el número de ratas utilizadas. Se calcularon la media y la desviación estándar de cada variable para cada grupo de animales. Los valores de las respuestas de la reactividad vascular a CNP o cANP₍₄₋₂₃₎ se analizaron mediante regresión no lineal para las diferentes curvas analizadas. La concentración del agonista que produce el 50 % de la respuesta máxima (CE50) se determinó después de la transformación *logit* de las curvas normalizadas de concentración-respuesta, y los resultados se expresaron como el logaritmo negativo (pCE50) de la media de los valores individuales de cada variable para cada

grupo. Se consideró el efecto vasodilatador máximo (Emax) como la máxima amplitud alcanzada en las curvas de concentración-respuesta para el CNP o el cANP₍₄₋₂₃₎.

Se utilizaron los siguientes test estadísticos:

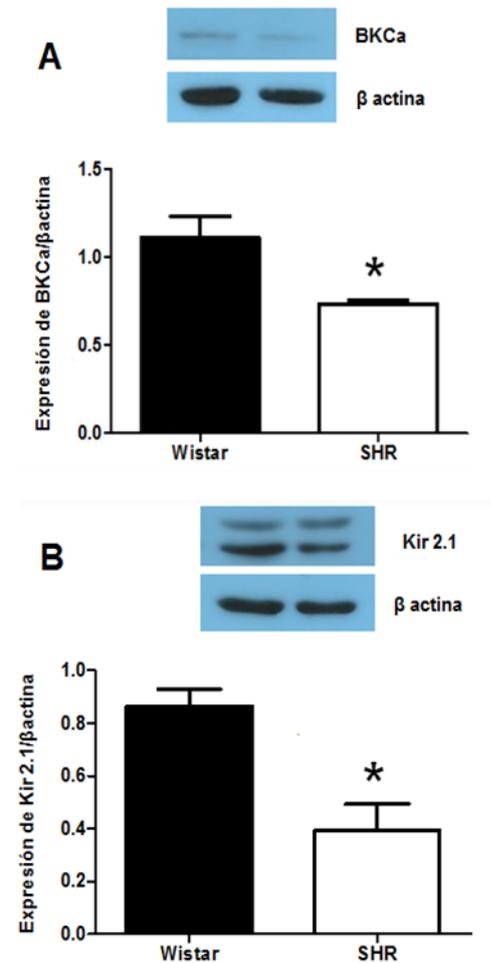
- El t-test de Student para comparar dos grupos experimentales ante el agregado de un determinado agonista o antagonista.
- El análisis de la varianza (ANOVA de un factor) y el test *a posteriori* de Bonferroni para comparaciones múltiples entre los diferentes grupos ante el agregado de un determinado agonista, bloqueante o antagonista.

Se utilizó el software Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., San Diego CA, USA) para el análisis estadístico.

Resultados y Discusión

Al evaluar mediante Western blot la expresión proteica de los canales BKCa y Kir en la aorta, observamos que las ratas hipertensas presentan menor contenido de ambos canales en este tejido (Figura 1).

Figura 1: expresión proteica de BKCa y Kir en aorta de ratas Wistar y SHR

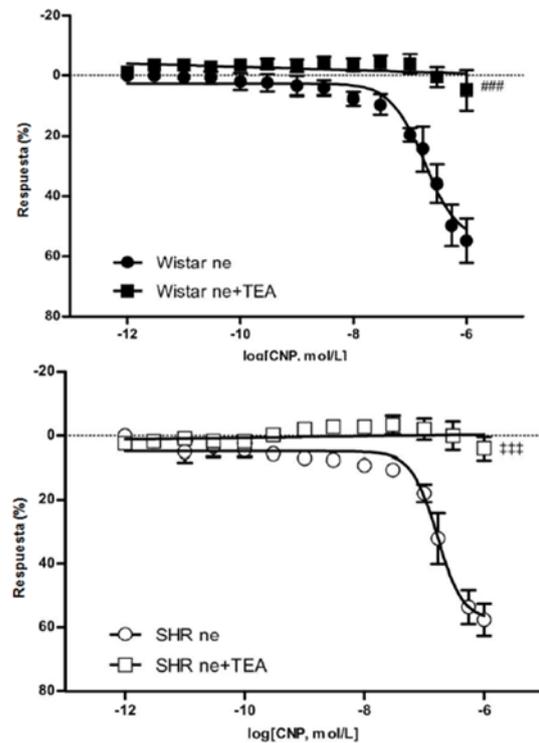


(A) Análisis densitométrico para BKCa. (B) Análisis densitométrico para Kir 2.1. n = 6 ratas por grupo. *p<0,05 vs Wistar.

Para evaluar la participación de los canales de potasio en el efecto vasodilatador del CNP en ausencia de endotelio, se realizaron curvas concentración respuesta, ante el agregado de concentraciones crecientes de CNP, en anillos de aorta pre-contraídos con fenilefrina que previamente fueron denudados e incubados con TEA, un bloqueante no selectivo de los canales de potasio. Tal como se muestra en la Figura 2, en los anillos denudados que fueron pre-incubados con TEA, no se observó el

efecto vasodilatador del CNP, indicando que la respuesta vasodilatadora al péptido se encontraría mediada por la apertura de canales de potasio en ambos grupos de animales.

Figura 2: Efecto del agregado de concentraciones crecientes de CNP en anillos de aorta sin endotelio, pre-contraídos con fenilefrina y en presencia de TEA.



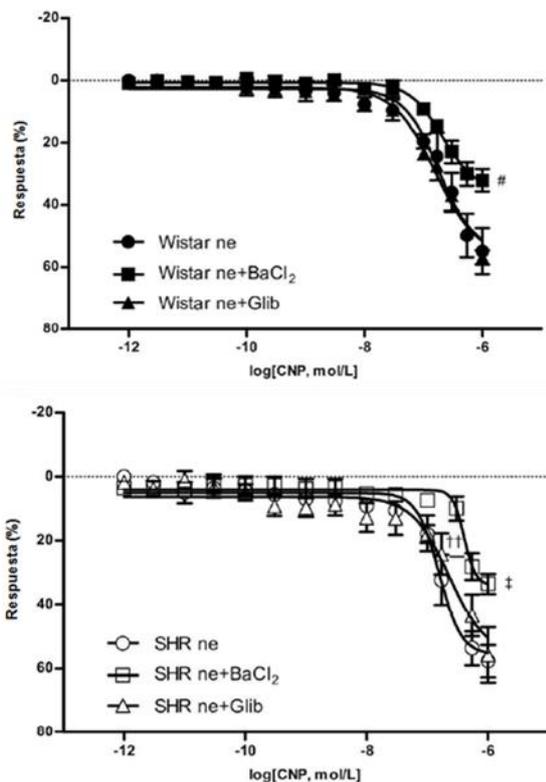
ne: sin endotelio. ###p< 0.001 vs. Emax Wistar ne; †††p< 0.001 vs. Emax SHR ne.

Además, para evaluar la participación del receptor NPR-C en la relajación independiente del endotelio inducida por CNP, se realizaron curvas de concentración-respuesta ante el agregado de concentraciones crecientes de cANP₍₄₋₂₃₎, agonista selectivo de este receptor, en anillos de aorta denudados. Se observó que, en ausencia del endotelio, la estimulación del receptor no indujo cambios en el estado contráctil de los anillos de aorta precontraídos con

fenilefrina en ambos grupos de animales, lo cual indicaría que el mecanismo vasodilatador independiente del endotelio del CNP estaría mediado por su receptor NPR-B.

Para evaluar la posible participación de los canales Kir en el efecto vasodilatador del CNP en la aorta, se realizaron curvas concentración-respuesta ante el agregado de concentraciones crecientes de CNP en presencia de BaCl₂, bloqueante de los canales Kir. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos.

Figura 3: Efecto del agregado de concentraciones crecientes de CNP en anillos de aorta sin endotelio, pre-contraídos con fenilefrina y en presencia de BaCl₂ o Glib.



#p < 0.05 Emax Wistar ne + BaCl₂ vs. Emax Wistar ne.
 ††p < 0.01 pEC₅₀ SHR ne + BaCl₂ vs. pEC₅₀ SHR ne;
 ‡ p < 0.05 Emax SHR ne+BaCl₂ vs. Emax SHR ne.

El bloqueo de los canales Kir en los anillos de aorta de ratas Wistar, disminuye

parcialmente el efecto vasodilatador del CNP, sin observarse una disminución de la potencia vasodilatadora del péptido. Sin embargo, el bloqueo de los canales Kir, disminuye el efecto vasodilatador del CNP, observándose tanto la disminución de la respuesta máxima como la disminución de la potencia vasodilatadora en las ratas hipertensas (Tabla 1).

Tabla 1: Respuesta máxima y potencia vasodilatadora del CNP en la aorta de ratas Wistar y SHR.

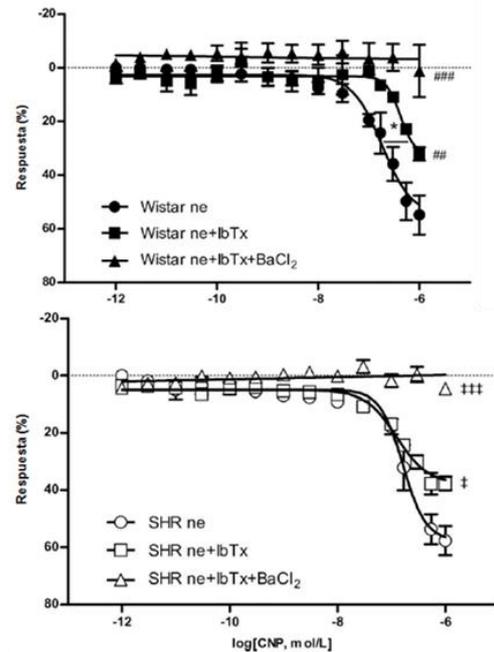
		Emax(%)	pEC ₅₀	
Wistar	ne	54,8±7,3	6,74±0,10	
	ne + BaCl ₂	35,5±3,6*	6,68±0,11	
	ne + Glib	56,8±3,3	6,80±0,06	
	ne + IbTx	36,1±4,8**	6,33±0,05*	
	SHR	ne	57,6±3,1*	6,78±0,06**
	ne + BaCl ₂	34,0±3,2#	6,39±0,05##	
	ne + Glib	55,7±5,7	6,64±0,08	
	ne + IbTx	33,5±3,2#	6,81±0,05	

*p < 0,05 vs Wistar ne; **p < 0,01 vs ne; # p < 0,05 vs SHR ne; ## p < 0,01 vs SHR ne.

También se ha descrito que los canales K_{ATP}, pertenecientes a la familia de los canales de potasio Kir, estarían participando del efecto vasodilatador del CNP (Wei CM y col, 1994). Con el objetivo de evaluar si en la aorta de las ratas Wistar y SHR, los canales K_{ATP} se encuentran involucrados en la relajación del MLV inducida por el CNP, se

bloquearon estos canales con Glib y se realizaron curvas concentración-respuesta en anillos de aorta pre-contraídos con fenilefrina. Observamos que el bloqueo de los canales K_{ATP} con Glib no induce cambios en el efecto vasodilatador del CNP en ambos grupos (Figura 3), indicando que estos canales no participarían en dicho efecto. Por otra parte, también se analizó la participación de los canales de potasio BKCa en el efecto vasodilatador del CNP. Se utilizó IbTx, un bloqueante selectivo de los canales BKCa. En las ratas Wistar se observó que los anillos de aorta denudados y pre-contraídos con fenilefrina, mostraban una menor respuesta al CNP, tanto en la E_{max} como en la pEC_{50} , cuando se bloqueaban previamente estos canales respecto de efecto observado en los anillos que no eran incubados con IbTx (Figura 4, Tabla 1).

Figura 4: Efecto del agregado de concentraciones crecientes de CNP en anillos de aorta sin endotelio, pre-contraídos con fenilefrina y en presencia de IbTx



* $p < 0.05$ pEC_{50} Wistar ne + IbTx vs. pEC_{50} Wistar ne; ## $p < 0.01$ E_{max} Wistar ne+IbTx vs. E_{max} Wistar ne; ### $p < 0.001$ E_{max} Wistar ne+IbTx+BaCl₂ vs. E_{max} Wistar ne; ††† $p < 0.001$ E_{max} SHR ne+IbTx+BaCl₂ vs. E_{max} SHR ne.

Por otra parte, en las SHR, el bloqueo de los canales de potasio BKCa disminuye la E_{max} al CNP, sin observarse cambios en la potencia vasodilatadora del péptido (Figura 4, Tabla 1). Por último, para verificar que los dos tipos de canales involucrados en el efecto vasodilatador del CNP sobre el MLV, son los canales BKCa y Kir, se utilizaron los bloqueantes IbTx y BaCl₂ en simultáneo. No se observó respuesta al CNP en ambos grupos de animales (Figura 4).

El presente trabajo demuestra que la expresión de los canales de potasio capaces de modular el potencial de reposo y las corrientes repolarizantes, se encuentra disminuida en las ratas hipertensas. Además, muestra la diferente

participación de los canales de potasio BKCa y Kir en la relajación del MLV inducida por el CNP en la aorta de las ratas normotensas e hipertensas, siendo el efecto del CNP más sensible al bloqueo de Kir en las SHR.

Previamente, otros autores mostraron que la apertura de los canales de potasio presentes en el MLV media, al menos en parte, las acciones del CNP sobre el tono vascular de grandes y pequeños vasos en distintos modelos animales de normotensión. Estudios realizados en arterias mesentéricas de ratas, mostraron que el CNP promueve la relajación del MLV a través de la activación del receptor natriurético NPR-C y la apertura de canales de potasio de la familia Kir3.x (Chauhan SD *et al.* 2003; Villar IC *et al.* 2007). Nuestros resultados obtenidos con el agonista del receptor natriurético NPR-C en ausencia de endotelio, sugieren que la activación de este receptor no induce cambios sobre el tono vascular en las arterias desnudas. Por lo tanto, los efectos directos del CNP sobre el MLV estarían mediados por su otro receptor, el NPR-B. En este sentido, se ha propuesto que el CNP induce la relajación mediante su interacción con el receptor NPR-B y la apertura de los canales de potasio BKCa en las arterias subcutáneas de resistencia humanas (Garcha RS y Hughes AD, 2006). Esta vía de señalización también ha sido propuesta como la responsable

del efecto vasodilatador del CNP descrito en la microvasculatura pulmonar (Simon A *et al.* 2009) y en el músculo liso de arterias y venas (Banks M *et al.* 1996; Liang CF *et al.* 2010; Wei CM *et al.* 1994;). En el presente estudio, también se observa que los canales de potasio Kir participan en el efecto vasodilatador del CNP sobre el MLV, tanto en las ratas Wistar como en las SHR, ya que el bloqueo de estos canales disminuye la relajación inducida por el CNP. Chauhan y colaboradores (2003) describieron, que los canales de potasio Kir participan del efecto vasodilatador del CNP en arterias mesentéricas de ratas normotensas. En este tejido, ellos observaron que la relajación del MLV inducida por el CNP, se encontraría mediada completamente por la activación de los canales Kir dependientes de proteína Gi (Chauhan SD y col, 2003). Sin embargo, nosotros observamos que el bloqueo de los canales de potasio Kir disminuye sólo parcialmente la respuesta vasorrelajante al CNP en los anillos de aorta de las ratas normotensas e hipertensas. Este hallazgo puede deberse a que la expresión del canal de potasio Kir es más abundante en el músculo liso de los lechos vasculares autorreguladores, tales como los de la circulación coronaria o cerebral (Quayle JM *et al.* 1993; Robertson BE, Bonev AD y Nelson MT, 1996). De hecho, la expresión del canal Kir parece aumentar a medida

que el diámetro de las arterias disminuye (Kim *et al.* 2005; Quayle JM *et al.* 1996). Por otra parte, se ha reportado previamente que los canales de potasio BKCa median el efecto vasodilatador del CNP. En el MLV de arterias coronarias porcinas, el CNP aumenta la amplitud de la corriente inducida por la apertura de estos canales de potasio (Liang CF *et al.* 2010). En arterias de resistencia subcutáneas humanas la apertura de los canales de potasio BKCa se encontraría modulada por la activación del NPR-B, al cual se une selectivamente el CNP (Garcha RS y Hughes AD, 2006). Se evaluó entonces la participación de los canales de potasio BKCa en el efecto vasodilatador del CNP sobre la aorta. Tanto en las ratas Wistar como en las SHR, el bloqueo selectivo de estos canales dependientes de calcio con IbTx, disminuye la respuesta vasodilatadora de la aorta al CNP, indicando su participación en el efecto vasodilatador del péptido en ambos grupos de animales. El estudio de su papel en la relajación del MLV en las ratas Wistar y SHR, en respuesta al CNP, sugiere una diferencia en el grado de participación de ambos canales. Mientras que el bloqueo de los canales Kir disminuye la potencia vasodilatadora del CNP en la aorta de las ratas hipertensas, no hay diferencias en este parámetro en las ratas normotensas. En cambio, en cuanto a los canales de

potasio BKCa, se observa lo contrario: El bloqueo de los canales BKCa disminuye la potencia vasodilatadora del CNP sólo en la aorta de las ratas normotensas, sin observarse diferencias en la potencia vasodilatadora del CNP en las SHR. Se postula que la función y/o la expresión de los canales de potasio Kir se encuentra alterada en la HTA (McCarron JG y Halpern W, 1990; Sobey CG, 2001). Esto podría explicar por qué el bloqueo de estos canales afecta aún más la relajación del MLV inducida por el CNP en las SHR al compararla con el efecto obtenido en las ratas Wistar normotensas. Más aún, este modelo animal de HTA también presenta alteraciones en los canales potasio BKCa (Sobey CG, 2001). En el MLV de las arterias femorales de las SHR se observó que el flujo de calcio a través de los canales de calcio VDCC hacia el interior celular y la actividad de los canales BKCa se encuentra aumentada (Asano M *et al.* 1995; Giachini FR *et al.* 2009). Sin embargo, la amplitud de las corrientes del ión K⁺ en el músculo liso de la aorta de las SHR se encuentra disminuida (Amberg GC y Santana LF, 2003). Estos resultados coinciden con los resultados que obtuvimos al evaluar la expresión proteica del canal BKCa, ya que la menor expresión de la subunidad reguladora Slo β1, que modula la sensibilidad de este canal podría explicar la disminución en las corrientes

observadas. Teniendo en cuenta la gran conductancia de estos canales de potasio BKCa y su elevada expresión a nivel vascular, además de la alta resistencia de la membrana celular del MLV, es de considerar que aún un pequeño cambio en la probabilidad de apertura del canal, puede tener un impacto significativo en el potencial de membrana y la excitabilidad celular. De este modo, las alteraciones descritas podrían explicar las diferencias observadas en el efecto del CNP, a través de los canales BKCa, sobre el tono vascular de la aorta en las ratas hipertensas, con respecto a las normotensas.

Conclusiones

En las ratas hipertensas, la expresión de los canales de potasio BKCa y Kir, responsables de modular el potencial de la membrana del MLV, se encuentra disminuida. Esto podría ser responsable, al menos en parte, de una menor capacidad de relajación vascular en estos animales.

El efecto vasodilatador del CNP parece ser más sensible al bloqueo de los canales Kir y menos sensible al bloqueo de los canales BKCa en este modelo de HTA, mientras que en los animales normotensos los canales BKCa parecen tener una mayor implicancia en la vasodilatación inducida por el CNP.

Estos resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas ya que permiten conocer las alteraciones involucradas en el desarrollo y/o mantenimiento de la HTA.

Bibliografía

- Asano M, Nomura Y, Ito K, Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. (1995). Increased function of voltage-dependent Ca⁺⁺ channels and Ca(++)-activated K⁺ channels in resting state of femoral arteries from spontaneously hypertensive rats at prehypertensive stage. *J Pharmacol Exp Ther.* 275(2):775-83.
- Amberg GC, Santana LF. (2003). Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension. *Circ Res.* 93(10):965-71.
- Anand-Srivastava MB, Sehl PD, Lowe DG. (1996). Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem.* 271(32):19324-9.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(16):7583-7.
- Banks M, Wei CM, Kim CH, Burnett JC Jr, Miller VM. (1996). Mechanism of relaxations to

- C-type natriuretic peptide in veins. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2):H1907-11.
- Bradley KK, Jaggar JH, Bonev AD, Heppner TJ, Flynn ER, Nelson MT, Horowitz B. (1999). Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol.* 515 (Pt 3):639-51.
- Caniffi C, Elesgaray R, Gironacci M, Arranz C, Costa MA. (2010). C-type natriuretic peptide effects on cardiovascular nitric oxide system in spontaneously hypertensive rats. *Peptides.* 1309-18. doi: 10.1016/j.peptides.2010.03.030.
- Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. (2003). Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):1426-31.
- Chen HH, Burnett JC Jr. (1998). C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol*,32 Suppl 3:S22-8.
- Chrissobolis S, Sobey CG. (2002). Inhibitory effects of protein kinase C on inwardly rectifying K⁺- and ATP-sensitive K⁺ channel-mediated responses of the basilar artery. *Stroke.* 33(6):1692-7.
- Costa MA, Elesgaray R, Caniffi C, Fellet A, Arranz C. (2007). Role of cardiovascular nitric oxide system in C-type natriuretic peptide effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(1):180-6.
- D'Souza SP, Davis M, Baxter GF.(2004). Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther.*;101(2):113-29.
- Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Köhler R.(2003). Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol.* 594-601.
- Garcha RS, Hughes AD. (2006). CNP, but not ANP or BNP, relax human isolated subcutaneous resistance arteries by an action involving cyclic GMP and BKCa channels. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 7(2):87-91.
- Giachini FR, Carneiro FS, Lima VV, Carneiro ZN, Dorrance A, Webb RC, Tostes RC. (2009). Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Transl Res.*154(4):183-93. doi: 10.1016/j.trsl.2009.07.003.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W,

- Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS; International Union of Pharmacology. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev.* 55(4):583-6.
- Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. (2006). Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(3):R546-52.
- Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R, Ahluwalia A. (2004). Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation.* 110(10):1231-5.
- Jackson WF. (2005). Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation.* 12(1):113-27.
- Kamouchi M, Van Den Bremt K, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. (1997). Modulation of inwardly rectifying potassium channels in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol.* 504 (Pt 3):545-56.
- Kim MY, Liang GH, Kim JA, Park SH, Hah JS, Suh SH. (2005). Contribution of Na⁺-K⁺ pump and KIR currents to extracellular pH-dependent changes of contractility in rat superior mesenteric artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(2):H792-800.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. (2008). Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 44(2):65-81.
- Liang CF, Au AL, Leung SW, Ng KF, Félétou M, Kwan YW, Man RY, Vanhoutte PM. (2010). Endothelium-derived nitric oxide inhibits the relaxation of the porcine coronary artery to natriuretic peptides by desensitizing big conductance calcium-activated potassium channels of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 334(1):223-31. doi: 10.1124/jpet.110.166652.
- McCarron JG, Halpern W. (1990). Impaired potassium-induced dilation in hypertensive rat cerebral arteries does not reflect altered Na⁺,K⁺-ATPase dilation. *Circ Res.* 67(4):1035-9.
- Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. (1999). Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ Res.* 85(9):e33-43.
- Nilius B, Droogmans G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* 81(4):1415-59.
- Pandey KN. (2005). Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 901-32.
- Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. (2003). Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of

- hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 57(2):456-67.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006). Natriuretic peptides, their receptors and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* 47-72.
- Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. (1993). Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 265(5 Pt 1):C1363-70.
- Robertson BE, Bonev AD, Nelson MT. (1996). Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg²⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺. *Am J Physiol.* 271(2 Pt 2):H696-705.
- Schubert R, Krien U, Wulfsen I, Schiemann D, Lehmann G, Ulfing N, Veh RW, Schwarz JR, Gago H. (2004). Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension.* 43(4):891-6.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev.* 52(4):557-94.
- Simon A, Harrington EO, Liu GX, Koren G, Choudhary G. (2009). Mechanism of C-type natriuretic peptide-induced endothelial cell hyperpolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* L248-56. doi: 10.1152/ajplung.90303.2008.
- Sobey CG. (2001). Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(1):28-38.
- Villar IC, Panayiotou CM, Sheraz A, Madhani M, Scotland RS, Nobles M, Kemp-Harper B, Ahluwalia A, Hobbs AJ. (2007). Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Cardiovasc Res.* 74(3):515-25.
- Wei CM, Kim CH, Khraibi AA, Miller VM, Burnett JC Jr. (1994). Atrial natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats and their vasorelaxing actions in vitro. *Hypertension.* 23(6 Pt 2):903-7.
- Wischmeyer E, Döring F, Karschin A. (1998). Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J Biol Chem.* 18;273(51):34063-8.
- Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. (2000). Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K(+) current in K(+)-mediated vasodilation. *Circ Res.* 87(2):160-6.

Agradecimientos

Los autores del trabajo le agradecen a la Técnica en Bioterio Gabriela Noceti y a Sandra Landín por su asistencia técnica.

Financiamiento

El presente trabajo fue parcialmente financiado por la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, la Universidad de Buenos Aires y el Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET.

