
Papel de los canales de potasio dependientes del voltaje, de la PKC ζ y de las especies reactivas de oxígeno en la vasoconstricción pulmonar inducida por tromboxano A₂. Estudios funcionales frente a técnicas complementarias

F. Pérez-Vizcaíno, A. Cogolludo y L. Moreno

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Resumen: Los canales de potasio dependientes del voltaje (K_v) desempeñan un importante papel en la contracción del músculo liso vascular pulmonar y en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar. Nuestros trabajos recientes, empleando experimentos funcionales, antagonistas de los receptores e inhibidores selectivos de distintas vías de señalización, y diversas técnicas complementarias que incluyen la medida del calcio intracelular, el análisis de corrientes iónicas, la medida de segundos mensajeros y análisis de expresión, fosforilación y asociación de proteínas, indican que los vasoconstrictores implicados en la hipertensión pulmonar inducen una respuesta contráctil mediada por los canales K_v . En particular, el tromboxano A₂ (TXA₂) produce una respuesta contráctil en las arterias pulmonares cuyo mecanismo de señalización implica la activación y la translocación de una isoforma de la proteína cinasa C (PKC) atípica, la PKC ζ , hacia la membrana, y la producción de especies reactivas de oxígeno por la NADPH oxidasa de la membrana y el bloqueo de los canales K_v . La proteína adaptadora p62 también está implicada en la asociación entre la PKC ζ y los canales K_v 1.5. Estos mecanismos de señalización pueden variar en función de la especie animal y de la edad. Tales resultados permiten establecer por primera vez una conexión entre dos mecanismos fisiopatológicos fundamentales en la hipertensión pulmonar, como son los canales K_v y la activación de los receptores del tromboxano (TP) por el TXA₂ y los isoprostanos.

Palabras clave: Canales de K⁺ – Tromboxano A₂ – Proteína cinasa C – Hipertensión pulmonar.

Papel de los canales de potasio dependientes del voltaje en el control del tono pulmonar

Los canales de K⁺ desempeñan un importante papel en el control del potencial de mem-

brana, de la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) y de la contracción del músculo liso vascular.¹ Así, la activación de los canales de K⁺ produce hiperpolarización de la membrana, mientras que su inhibición la despolariza, produciendo la activación de los canales de Ca²⁺

dependientes del voltaje de tipo L, aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y vasoconstricción. En células musculares lisas de arteria pulmonar se han identificado distintos tipos de canales de K^+ : dependientes del voltaje (K_V), activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK_{Ca}) y dependientes de ATP (K_{ATP}).¹ De ellos, en los últimos años los K_V vienen suscitando un creciente interés en la circulación pulmonar debido a diversas razones. En primer lugar, estos canales determinan el potencial de membrana en las células musculares lisas de arteria pulmonar. Asimismo, son modulados negativamente por mediadores vasoactivos implicados en la hipertensión pulmonar, como la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina II (ATII) y el tromboxano A_2 (TXA_2), y por la hipoxia.²⁻⁴ Por último, la reducción tanto de la expresión como de la función de estos canales se ha implicado en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar primaria y de la inducida por fármacos anorexígenos.

Vasoconstricción inducida por TXA_2 y papel en la hipertensión pulmonar

El TXA_2 es un metabolito del ácido araquidónico producido por la actividad secuencial de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y de la tromboxano sintetasa. El TXA_2 activa los receptores del tromboxano (TP) e induce agregación plaquetaria, vasoconstricción e hipertrofia/hiperplasia del músculo liso vascular, así como un estado protrombótico en la superficie endotelial. Dichos receptores se activan también por diversos isoprostanos, principalmente el 8-isoPGF_{2 α} , que se generan a partir de la peroxidación del ácido araquidónico de la membrana celular mediada por radicales libres de oxígeno. Se han descrito concentraciones elevadas locales y sistémicas de TXA_2 y de isoprostanos en diversas enfermedades vasculares.⁵ Sus acciones vasoconstrictoras son especialmente pronunciadas en el territorio pulmonar, donde participa en el control del tono vascular en situaciones fisiológicas y, especialmente, patológicas. De hecho, el TXA_2 se ha implicado en diversas formas de hipertensión pulmonar primaria y secundaria.⁶

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA_2 y papel de los canales K_V

Empleando arterias pulmonares aisladas de rata montadas en un baño de órganos observamos que la vasoconstricción inducida por U46619, un análogo de TXA_2 , se inhibía con el antagonista del Ca^{2+} nifedipino y con el antagonista de receptores TP SQ29548.² Estos sencillos experimentos funcionales nos indicaban que el efecto estaba mediado por receptores TP y que implicaba la activación de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje de tipo L. Para corroborar este mecanismo estudiamos las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) de manera simultánea a la respuesta contráctil cargando las arterias con Fura-2 y analizando la fluorescencia emitida por este fluoróforo. Efectivamente, encontramos una correlación entre el aumento de ($[Ca^{2+}]_i$) y la contracción, y que ambos se inhibían con nifedipino.² En un estudio posterior realizado en arterias pulmonares de lechón encontramos que el U46619 también estimulaba el aumento de $[Ca^{2+}]_i$, y que éste también se inhibía con nifedipino.⁷ En principio, estos datos indicarían que también la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de tipo L sería fundamental para la contracción de las arterias pulmonares de lechón. Sin embargo, a pesar de reducir marcadamente el $[Ca^{2+}]_i$, el nifedipino apenas afectaba a la respuesta contráctil. Por tanto, entraban en contradicción los estudios funcionales con los del análisis del Ca^{2+} . Los datos nos indicaban que, a pesar de que se produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en las arterias pulmonares de lechón, este aumento no es esencial para la respuesta contráctil. Por el contrario, los inhibidores de la Rho cinasa relajaban la contracción inducida por U46619 sin apenas cambios en el $[Ca^{2+}]_i$, lo cual indica que los mecanismos de sensibilización al $[Ca^{2+}]_i$ mediante la Rho cinasa son más importantes en esta especie.

Volviendo a las arterias pulmonares de rata, donde los canales L sí son importantes, analizamos el efecto del U46619 sobre la entrada de Ca^{2+} empleando la técnica del parche de membrana, el patrón oro en los es-

tudios de canales iónicos. De nuevo encontramos una clara discordancia entre los estudios funcionales y el estudio electrofisiológico: el U46619 no aumenta las corrientes de Ca^{2+} .² Nos enfrentamos, por tanto, a la disyuntiva de “creernos” los estudios funcionales o los electrofisiológicos. Sin embargo, la explicación era sencilla. Con la técnica del parche de membrana controlamos el potencial de membrana y así estamos eliminando un factor fundamental que regula la actividad de los canales L, ya que son dependientes del voltaje. Al analizar qué ocurría con el potencial de membrana, observamos que el análogo del TXA $_2$ inducía una despolarización de la membrana y, por tanto, este mecanismo nos explica por qué se activan los canales L.

En otro experimento funcional pretratamos las arterias pulmonares con KCl, produciendo una despolarización de la membrana y una vasoconstricción debida a la disminución de la actividad de los canales de K^+ . En estas condiciones, el U46619 apenas era capaz de aumentar el $[Ca^{2+}]_i$ ni la contracción. Esto era una evidencia indirecta que apuntaba que el U46619 podría estar despolarizando la membrana mediante la inhibición de los canales de K^+ . Para corroborarlo empleamos de nuevo la técnica del parche de membrana, y en esta ocasión sí observamos que el U46619 tenía un efecto inhibitorio sobre las corrientes de potasio dependientes del voltaje, acorde con la despolarización observada y con los estudios funcionales.

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA $_2$ y proteínas cinasas

Para analizar las posibles vías de señalización, y en particular el papel de las proteínas cinasas, recurrimos de nuevo a las arterias pulmonares montadas en un baño de órganos. Los inhibidores de la tirosina cinasa genisteína o de la Rho cinasa Y27632 no modificaron la respuesta contráctil al U46619, pero sí lo hicieron los inhibidores de la proteína cinasa C estaurosporina y calfofistina. La proteína cinasa C es en realidad una familia de cinasas

que comprende 11 isoformas distintas, que se agrupan en tres subfamilias: clásicas (cPKC), nuevas (nPKC) y atípicas (aPKC). Empleando inhibidores con selectividad parcial por algunas isoformas encontramos que el G66983 inhibía la respuesta, mientras que el G66976 y la bisindolilmaleimida no tenían efecto. Las únicas isoformas sensibles al G66983 e insensibles al G66976 y la bisindolilmaleimida eran las aPKC, que incluyen la PKC ζ y la PKC λ . Pudimos confirmar el papel de las aPKC mediante el efecto inhibitorio de un péptido pseudosustrato que inhibe de manera selectiva a las aPKC. Además, mediante Western blot confirmamos la presencia de la PKC ζ , mientras que la PKC λ no se expresaba en las arterias pulmonares de rata.² La activación de los receptores TP inducía también la translocación de la PKC ζ hacia la membrana.² Estos resultados permiten establecer por primera vez una conexión entre dos mecanismos fisiopatológicos fundamentales en la hipertensión pulmonar, como son los canales K_v y la activación de los receptores TP por el TXA $_2$ y los isoprostanos.

Más recientemente, con el fin de verificar nuestros hallazgos anteriores, hemos llevado a cabo experimentos en ratones deficientes para el gen de la PKC ζ (PKC $\zeta^{(-/-)}$).⁸ En las arterias pulmonares de ratones con fenotipo salvaje, al igual que en las de las ratas, el U46619 producía una inhibición de los canales K_v , despolarización, aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y vasoconstricción. Por el contrario, en los ratones PKC $\zeta^{(-/-)}$ el U46619 no inhibía los canales K_v ni la despolarización, y el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y la vasoconstricción estaban marcadamente reducidos; exactamente los mismos resultados que habíamos observado empleando el péptido inhibidor específico de la PKC ζ . Por lo tanto, los ratones modificados genéticamente confirmaban nuestros hallazgos farmacológicos previos.

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA $_2$ y proteínas adaptadoras

La PKC ζ es una cinasa que tiene una pobre especificidad por el sustrato y es capaz

de fosforilar, en sistemas acelulares, un gran número de proteínas. La especificidad por el sustrato se logra mediante la localización subcelular y la participación de proteínas adaptadoras, como la p62, que actúan a manera de andamios (*scaffold*), uniéndose simultáneamente a dos o más proteínas y facilitando su interacción. Para analizar el papel de la p62 empleamos de nuevo ratones genéticamente deficientes en esta proteína.⁸ Los estudios electrofisiológicos y el análisis del $[Ca^{2+}]_i$ nos indicaban que la p62 era esencial para la respuesta al análogo del TXA₂. Por el contrario, la respuesta contráctil era muy similar en ambos casos. Así, de nuevo se nos planteaba

una discordancia entre el estudio funcional y los estudios complementarios del $[Ca^{2+}]_i$ y las corrientes iónicas. Como no disponemos de fármacos que inhiban la p62, la cuestión de si esta proteína es importante para la contracción del U46619 queda pendiente de resolver. Sin embargo, puesto que la contracción del U46619 es dependiente del Ca²⁺ en ratas y ratones con fenotipo salvaje, pero independiente en los ratones deficientes para el gen de la p62, creemos que esta deficiencia genética produce un cambio en la programación genética, de manera que la ausencia de p62 se compensa por una regulación al alza de mecanismos de señalización que implican

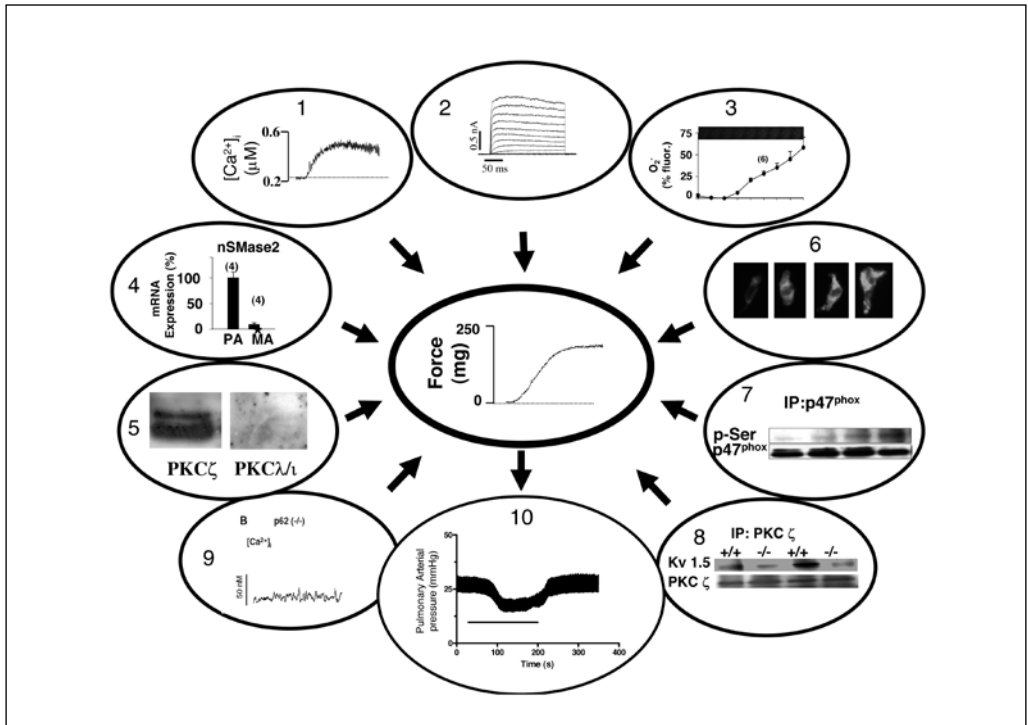


Figura 1. Los estudios funcionales que emplean las técnicas clásicas de contractilidad de arterias aisladas montadas en baño de órganos desempeñan un papel clave en el análisis de las vías de señalización. La medida del Ca^{2+} intracelular (1), las corrientes iónicas (2), la detección de los mensajeros intracelulares mediante fluorescencia (3), la expresión de genes en cuanto a RNAm (4) o proteína (5), la localización de proteínas o segundos mensajeros mediante inmunocitoquímica (6), los estudios de inmunoprecipitación para el estudio de la fosforilación (7) y la interacción de proteínas (8), y la utilización de sistemas de sobreexpresión o delección genética (9), son herramientas complementarias y deben servir para explicar o corroborar los hallazgos de los estudios funcionales. Finalmente, los estudios in vitro deben ser confirmados en estudios in vivo (10).

sensibilización a las proteínas contráctiles, de modo similar a lo que habíamos observado en los lechones.

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA $_2$ y especies reactivas de oxígeno

Para analizar el posible papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) estudiamos el efecto de la catalasa en su forma permeable a la membrana, la polietilenglicol-catalasa (PEG-catalasa), sobre la contracción con U46619 en arterias pulmonares aisladas.⁹ La PEG-catalasa inhibía la respuesta al U46619. De la misma manera, la apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa de membrana, la principal fuente vascular de ROS, también disminuía la respuesta contráctil y la inhibición de las corrientes K_v inducida por el U46619, lo que indica un papel clave de las ROS derivadas de este complejo enzimático.⁹ Para confirmarlo medimos la producción de ROS mediante la fluorescencia de la diclorofluoresceína, y observamos un aumento con el U46619 que se inhibía por la PEG-catalasa y por la apocinina. El análogo de H $_2$ O $_2$, t-butilhidroperóxido, reproducía el efecto contráctil del U46619. Sin embargo, esta contracción, al contrario que la del U46619, no se inhibía con el péptido inhibidor de la PKC ζ . Esto nos sugería que la producción de ROS estaba localizada más abajo de la PKC ζ en la cascada de señalización. La inhibición de la producción de ROS por el péptido inhibidor de la PKC ζ nos confirmaba esta hipótesis.

Conclusiones

La activación de los receptores TP por el análogo de TXA $_2$ U46619 produce una inhibición de los canales K_v , lo que conduce a la despolarización de la membrana, la activación de los canales de Ca $^{2+}$ de tipo L, el aumento del [Ca $^{2+}$] $_i$ y la vasoconstricción pulmonar.² El mecanismo de señalización implica la activación y la translocación de una isoforma de la proteína cinasa C (PKC) atípica, la PKC ζ , hacia

la membrana² y la producción de ROS por la NADPH oxidasa de la membrana.⁷ Los mecanismos de señalización varían en función de la especie y de la edad.⁵ En el lechón, la vía PKC ζ - K_v -Ca $^{2+}$ es la más importante en el recién nacido, mientras que tras los primeros días de vida aumenta la participación de la sensibilización al calcio mediante la Rho cinasa.

Para el estudio de los mecanismos de señalización, nuestro *modus operandi* es analizar siempre los efectos sobre la función empleando herramientas farmacológicas. Cualquier efecto o mecanismo que se observe en experimentos funcionales tiene una alta probabilidad de tener relevancia fisiológica, farmacológica o fisiopatológica. Los experimentos funcionales son económicos y tremendamente versátiles. Una limitación importante de estos estudios es la disponibilidad de herramientas farmacológicas lo suficientemente específicas. En nuestro laboratorio disponemos de una serie de técnicas complementarias que son de gran ayuda para corroborar, explicar o realzar los datos obtenidos en estudios funcionales (Fig. 1). Empleando un símil cinematográfico, los estudios funcionales deben ser el argumento de un trabajo y las técnicas complementarias los efectos especiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Golovina VA, Rubin LJ. Molecular basis and function of voltage-gated K $^+$ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1998;274:L621-35.
2. Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Pérez-Vizcaino F. Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K $^+$ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase Czeta. *Circ Res.* 2003;93:656-63.
3. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeño L, Tamargo J, et al. Serotonin inhibits voltage-gated K $^+$ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT2A receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res.* 2006;98:931-8.
4. Cogolludo A, Moreno L, Villamor E. Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary

- arterial hypertension: implications for vasodilator therapy. *Pharmacology*. 2007;79:65-75.
5. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L1067-82.
 6. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992;327:70-5.
 7. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. Postnatal maturational shift from PKCzeta and voltage-gated K⁺ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res*. 2005;66:84-93.
 8. Moreno L, Frazziano G, Cogolludo A, Cobeño L, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. Role of protein kinase C zeta and its adaptor protein p62 in voltage-gated potassium channel modulation in pulmonary arteries. *Mol Pharmacol*. 2007;72:1301-9.
 9. Cogolludo A, Frazziano G, Cobeño L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, et al. Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1091:41-51.

DISCUSIÓN

P. D'OCÓN: Quería comentar unos resultados que encontramos analizando *in vitro* la respuesta vascular a la hipoxia en arteria pulmonar. Observamos una respuesta trifásica que, en función de la magnitud de las fases, conseguía un tono final resultante más alto en la arteria pulmonar que en la mesentérica, pero que cualitativamente era muy similar en ambos vasos.

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: A veces la vasoconstricción observada no refleja bien la verdadera vasoconstricción pulmonar hipóxica *in vivo*. Para ello es necesario trabajar con las arterias de pequeño calibre, montarlas en un miógrafo, no utilizar pretono (sin un vasoconstrictor previo) y darles la tensión óptima, que es la equivalente a 15-20 mmHg (tensión de las arterias pulmonares en estado fisiológico).

P. D'OCÓN: ¿No crees que en la hipoxia, en condiciones fisiológicas, los vasos ya tienen un tono previo? Nosotros hemos probado con un tono inducido por fenilefrina en arteria pulmonar y hemos observado que responde a la hipoxia a concentraciones de oxígeno más bajas que la mesentérica. Sin embargo, cuando no utilizábamos un tono previo no había respuesta.

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: Las arterias pulmonares principales se consideran insensibles a la hipoxia, porque al ser su aporte principal al

pulmón, si respondieran a la hipoxia cerrarían el flujo a todo el pulmón. El mecanismo trata de redistribuir el flujo hacia el resto del pulmón que no está afectado por la hipoxia. En segundo lugar, el alvéolo está muy lejos de la arteria pulmonar, al contrario que las arterias de pequeño calibre, que son las que en realidad distribuyen el oxígeno.

J.M. BAEYENS: ¿Existen muchos estimuladores de los canales de potasio dependientes del voltaje?

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: Ése es un problema fundamental, porque no disponemos de fármacos agonistas específicos de estos canales.

J. LLENAS: ¿Crees que el modelo de la monocrotalina es todavía un modelo válido para evaluar agentes que actúen sobre la hipertensión pulmonar?

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: Sí, es un modelo ampliamente utilizado por su sencillez y además está muy estandarizado, pero hay muchos otros modelos.

J. SALLÉS: ¿A qué concentraciones la desipramina actúa como inhibidor de las esfingomielinasas en la cascada de activación de la PKCζ? ¿Es una propiedad específica o también la poseen otros tricíclicos?

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: La farmacología de las esfingomielinasas está aún poco descrita. Como inhibidores de la esfingomielinasa ácida se utilizan el D609 y la desipramina. En cuanto a si otros tricíclicos también tienen esta acción, es fácil pensar que la imipramina actúe como inhibidor por su analogía con la desipramina.

J.M. VELA: ¿Nos podrías dar unas pinceladas sobre el papel de la serotonina y de los receptores implicados?

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: La serotonina es un mediador implicado en la hipertensión pulmonar,

y la vasoconstricción que produce está relacionada con el bloqueo de los canales K_v e implica a los receptores 5-HT_{2A}, que se bloquean con ketanserina y su señalización es clásica: fosfolipasa C, diacilglicerol y PKC. En otros estudios observamos que la fluoxetina bloqueaba la respuesta de la serotonina y, en cambio, la fluvoxamina y el citalopram no tenía ningún efecto. Luego, en la literatura, encontramos que la fluoxetina tiene bastante afinidad por los receptores 5-HT_{2A}. Además, se ha propuesto que la fluoxetina podría ser un tratamiento de la hipertensión pulmonar por su papel en la recaptación de serotonina.