

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 MODELO ANIMAL

Se utilizaron 30 corazones de ratas Wistar adultas de 250-300g, sin importar el sexo, todos los animales fueron proporcionados por el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El modelo animal utilizado en este trabajo fue elegido con base a la amplitud de las corrientes que se presentan, de acuerdo con lo reportado en la literatura

V.1.1 METODOLOGÍA PARA LA DISOCIACIÓN CELULAR

Para disociar los miocitos ventriculares se utilizó una técnica de digestión enzimática la cual consistió en colagenasa 0.8mg/ml y proteasa 1mg/ml. Los animales fueron heparinizados y posteriormente anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal con una dosis de 35 mg/Kg de peso, el corazón fue extraído y se colocó en un sistema modificado de Langendorff, para perfundirlo vía retrógrada a través de la aorta. Durante este procedimiento la temperatura se mantuvo a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Para aislar a las células cardiacas el corazón se perfundió con solución Tyrode con calcio normal durante 6min., con el fin de recuperar la actividad contráctil del músculo cardiaco, además de eliminar residuos sanguíneos; posteriormente se perfundió de manera continua con las siguientes soluciones: 1) 5 min., con la solución Tyrode sin calcio con el fin de detener la actividad contráctil, 2) seguido de 13 min. con solución enzimática (colagenasa 0.8mg/ml y proteasa 1mg/ml), la cual nos permitió degradar el tejido de unión entre

las células, 3) 8 min. con solución de lavado, con el propósito de eliminar los restos enzimáticos.

Una vez realizado el lavado, el corazón se retiró del sistema de perfusión y se realizó la disección del tejido cardiaco separando: ventrículo derecho e izquierdo, *septum* interventricular y aurículas; cada tejido se colocó en solución de almacén para obtener los miocitos por agitación mecánica. Las células se conservaron en la solución de almacén.

V.2 SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA DISOCIACIÓN DE MIOCITOS

1.- Solución Tyrode (mM): NaCl 120; KCl 5.4; MgCl₂ 1.2; Dextrosa 5.0; Hepes-Na⁺ 10 y Taurina 10. Se ajustó el pH=7.4 con NaOH 1 M.

2.- Solución Tyrode con calcio (mM): NaCl 120; KCl 5.4; MgCl₂ 1.2; Dextrosa 5.0; CaCl₂ 1.8; Hepes-Na⁺ 10 y Taurina 10. Se ajustó el pH=7.4 con NaOH 1 M.

3.-Solución enzimática (colagenasa 0.8mg/ml y proteasa 1mg/ml): Se preparó utilizando la solución Tyrode sin calcio.

4.- Solución de lavado y almacén "Sopa" (mM): Taurina 10; Ac.Glutámico 70; Creatina 0.5; Ac.Succínico 5; K₂HPO₄ 10; Dextrosa 10; KCl 20; Hepes-K⁺ 10 y EGTA-K⁺ 0.2. Se ajustó el pH=7.4 con KOH 1 M (Isenberg *et al*, 1982).

V.3 SOLUCIONES DE REGISTRO PARA LA CORRIENTE I_{to}

1.- Solución de registro externa (mM): NaCl 120; KCl 5.4; Hepes- Na^+ 10; CaCl_2 1.8; MgCl_2 1.0; Dextrosa 5 y CoCl_2 2. Se ajustó el pH=7.4 con NaOH 1 M.

2.- Solución de registro interna (mM): Ac. Aspártico 70; K_2HPO_4 0.3; MgSO_4 1.0; KCl 50; Hepes- K^+ 10; EGTA 5 y ATP- Na^+ 10. Se ajustó el pH=7.3 con KOH 1 M.

V.4 FÁRMACO UTILIZADO

Se preparó una solución stock de Trióxido de arsénico (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.01M (Chiang *et al*, 2002).

Todas las soluciones fueron burbujeadas con O_2 al 100%.

V.5 METODOLOGÍA DE REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1.- La cámara de registro se situó en la platina del microscopio invertido (ZEISS IM 35), en la cual se depositó 1 ml de la solución de almacén (medio de almacén donde se depositaron las células aisladas). Se dejó reposar a las células durante 6 min, favoreciendo que precipiten por gravedad al fondo de la cámara adhiriéndose a ella.

2.- Posteriormente las células fueron perfundidas con la solución externa. El flujo de las soluciones de registro se controló con un sistema electrónico de válvulas que permitió el recambio de las soluciones en un tiempo aproximado de 30 seg. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 36 ± 1 °C.

3.- Los registros electrofisiológicos se realizaron empleando la técnica de fijación de voltaje (Hamill *et al*, 1981) en la configuración de célula completa. Para elaborar las micropipetas se utilizó vidrio de borosilicato (TW150F-6), las cuales tuvieron una resistencia de 1.5 a 2.5 M Ω una vez que contenían la solución interna.

4.- Para realizar el registro de las corrientes de K⁺ fue necesario tener un sello de alta resistencia (G Ω) entre la superficie de la célula y el microelectrodo; siendo anteriormente compensado el potencial de punta entre la solución interna y la externa. Una vez logrado el sello, se rompió la membrana por aspiración o mediante un pulso de corriente, lo que permitió el contacto de la solución interna con el medio intracelular del miocito.

5.- Posteriormente se aplicó el protocolo específico para cada tipo de corriente iónica. Todos los protocolos de estimulación y registro de corrientes se realizaron empleando el programa de pClamp6 (Axon instruments v.6.4), utilizando un convertidor analógico-digital de 12 bits (Digidata 12000, Axon Instruments). Las corrientes se filtraron a 3 KHz, se digitalizaron en intervalos de 45 a 250 μ s y se almacenaron en el disco duro de una computadora.

V.5.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los protocolos experimentales fueron aplicados en dos condiciones básicas: en ausencia y en presencia de trióxido arsénico para cada una de las células incluidas en el presente trabajo. En ningún caso se utilizaron concentraciones acumuladas. Para realizar el lavado del trióxido arsénico se cambió la perfusión a solución control durante 5 minutos para ver si había una recuperación. Durante el desarrollo de los protocolos experimentales siempre se mantuvo un flujo permanente y constante en el registro electrofisiológico. El intercambio de soluciones se realizó utilizando un sistema de perfusión desarrollado en el laboratorio, el cual consiste de un arreglo de 4 válvulas (pinch valves, NResearch[®] Inc., W. Caldwell, NJ. USA) operadas a distancia por un circuito controlador programable y compatible con la PC. Este sistema permitió una velocidad de perfusión de 1.5 ml/min con lo cual se aseguró un recambio completo de las soluciones en un tiempo estimado de 1 min (volumen de la cámara de registro de 1.2 ml).

Para generar la corriente de I_{to} en miocitos se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de sostenimiento de -60 mV hasta

+50 mV en incrementos de 10 mV, estimulados cada 10 segundos y con 1000 ms de duración. Para construir la relación corriente contra voltaje se midió la magnitud del pico de la corriente generada en cada paso de voltaje y se normalizó contra el pico máximo de la corriente obtenida en condiciones control; y estos valores fueron graficados en función del potencial de membrana.

Para analizar el efecto del trióxido de arsénico sobre la inactivación de estado estable se empleó un protocolo convencional de doble pulso. Este protocolo inicia con un potencial de sostenimiento de -60 mV hasta +50, con incrementos de 10mV con duración de 1000ms, cada pulso fue seguido por un retorno al potencial de sostenimiento durante 2 ms, seguido de un pulso despolarizante fijo de -60mV hasta +50mV con una duración de 200ms. Para obtener la relación de estado estable se midió la magnitud del pico de la corriente generada por el pulso de prueba y se graficó en función del potencial de membrana del pulso condicionante; los datos normalizados fueron ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann, $A_1/(1+\exp[(V-V_{1/2})/k])+A_2$, donde $V_{1/2}$ es el voltaje medio de inactivación, k es la pendiente, A_1 es la amplitud de la relación y A_2 es la amplitud del componente no inactivante.

Para determinar la EC_{50} de los datos presentados en las curvas concentración-efecto se ajustaron con la ecuación: $I_K^+ = 1/(1+([\text{trióxido arsénico}]/EC_{50})^n)$, donde [trióxido de arsénico] es la concentración de trióxido de arsénico utilizado y EC_{50} , la concentración a la cual el 50% de la corriente está bloqueada. Todas las gráficas se realizaron utilizando los programas Clampfit (Axon versión 6.01), Sigma Plot 2001 (SPSS Inc., Chicago, IL. USA). Todos los datos se presentaron como la media \pm el error estándar de una n de 5

experimentos, excepto en los casos donde se indicó lo contrario. La significancia de las diferencias entre medias se obtuvo con la prueba t-student pareada, una diferencia de $P < 0.05$ se consideró significativa.

Para realizar las gráficas, todas las corrientes fueron normalizadas respecto a la corriente máxima y expresadas en porcentaje, esto para descartar variaciones atribuibles a la amplitud de las corrientes iónicas.