

VI RESULTADOS

VI.1 Efecto del As_2O_3 sobre la corriente rectificante de entrada (I_{k1}) en miocitos de rata.

Se estudió el efecto del As_2O_3 a las dosis de 100 y 300 μM , encontrándose un efecto bloqueador del 3% de la amplitud máxima de la corriente a un voltaje de -120mV, que al analizarse estadísticamente no fue significativo ($P < 0.05$).

El protocolo para activar esta corriente consistió en la aplicación de pasos de voltaje, desde un potencial de -120 mV hasta 0 mV en incrementos de 10 mV, con un segundo de duración, aplicados cada 20 segundos, con un potencial de sostenimiento de -60 mV. En los registros crudos (Fig. 7A) se observa una disminución de la corriente cuando se aplica As_2O_3 a la concentración de 100 μM ; los registros obtenidos para la concentración de 300 μM no se muestran debido a que se observó el mismo efecto con ambas dosis. Para realizar la gráfica corriente contra voltaje, se tomó la magnitud máxima de la corriente al final de cada pulso de voltaje. Al construir las curvas corriente-voltaje para ambas dosis se muestra claramente que el As_2O_3 a las concentraciones estudiadas bloquea en igual magnitud a la corriente I_{k1} (Fig. 7B). Es importante señalar que los resultados del efecto del As_2O_3 , sobre las corrientes I_{to} e I_{k1} sólo se presentan para las concentraciones de 100 μM , ya que observamos que a dosis por debajo y más de 100 μM no las afectó significativamente.

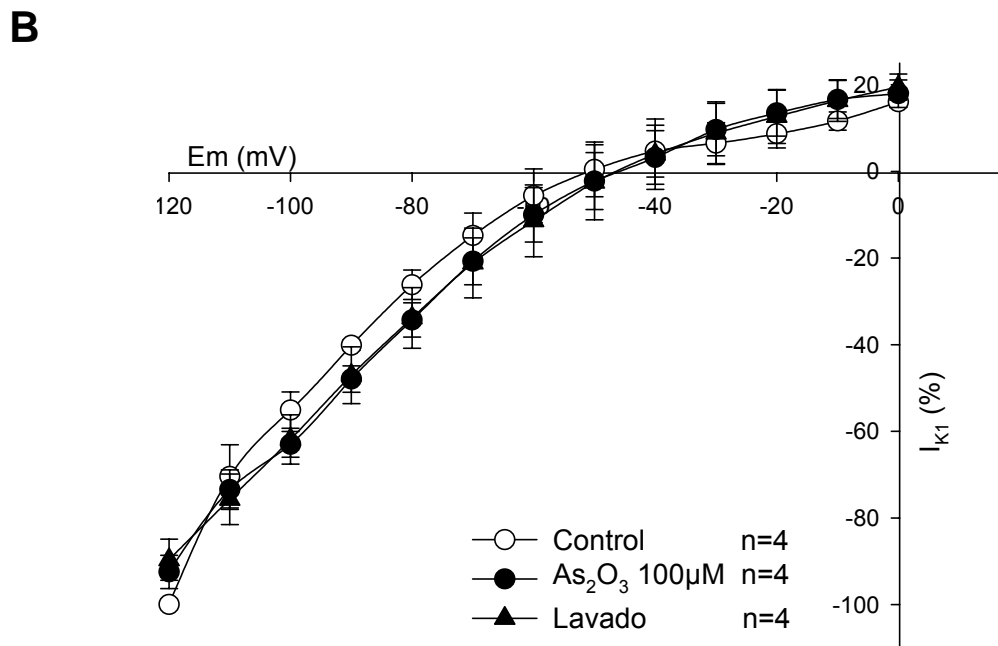
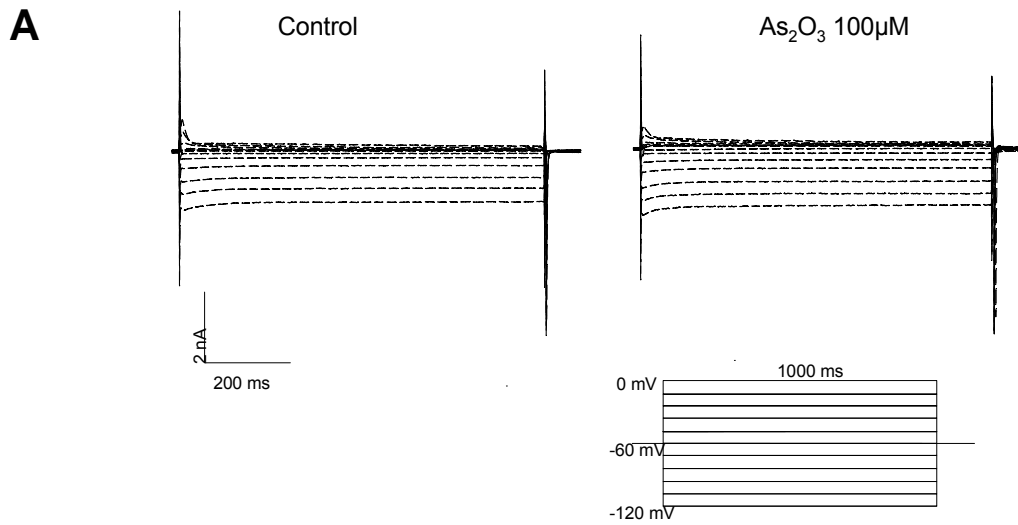


Figura 7. Efecto del As_2O_3 100 μ M sobre la corriente I_{K1} . En el panel A, se muestran registros crudos de la corriente I_{K1} en condiciones control, en presencia de As_2O_3 100 μ M. En el panel B, se muestra la relación corriente-voltaje para la corriente I_{K1} ; en condiciones control, en presencia de As_2O_3 100 μ M y lavado.

Con la relación corriente-voltaje, se prueba que el As_2O_3 bloquea parcialmente la corriente I_{k1} (3%), y para constatar este resultado, se realizó el análisis del curso temporal de la corriente I_{k1} , para ello se realizó un protocolo de estimulación el cual consistió de un pulso fijo de -120 mV a 0 mV con una duración de 1s. El protocolo fue aplicado en condiciones control, en presencia de As_2O_3 100 μM y lavado en el cual se puede apreciar que el As_2O_3 no ejerce un bloqueo dependiente de tiempo (Fig. 8A). El análisis se realizó tomando el primer y último pulso de corriente y se analizó en función del tiempo, finalmente se gráfico en función del numero de pulsos, obteniendo un bloqueo del 3%., por lo cual se busco el tiempo de instalación del efecto del As_2O_3 sobre la corriente I_{k1} , este tiempo fue de 8.62 min. Con este tiempo se puede bloquear el 100% de nuestra corriente (Fig. 8B).

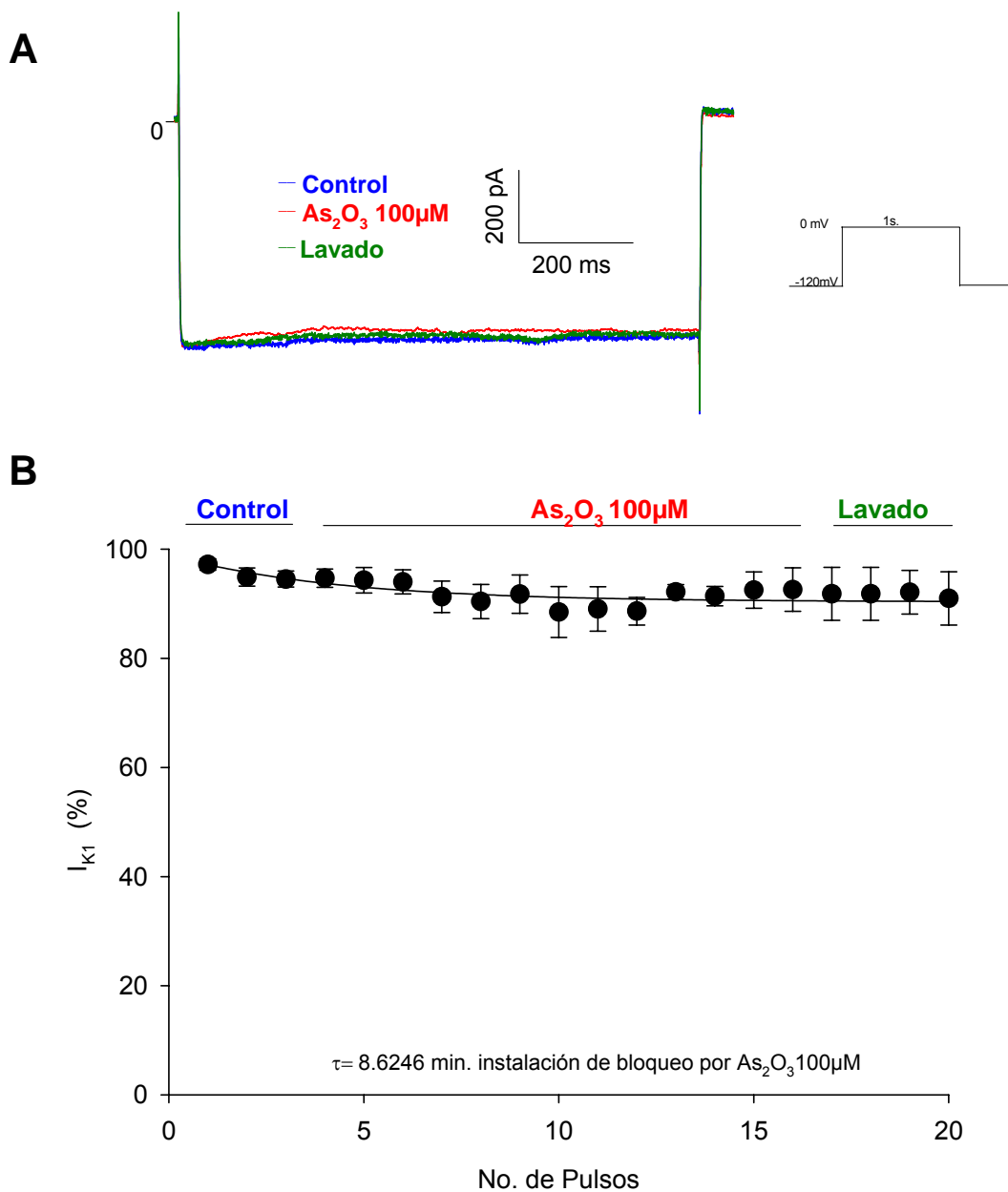


Figura 8. Curso temporal de la corriente I_{k1} . En el panel A, se muestran los registros crudos control, en presencia de As_2O_3 100 μM y lavado; en los cuales se puede apreciar que el As_2O_3 no bloquea la corriente con respecto al tiempo. En el panel B, se muestra el análisis estadístico de las corrientes obtenidas del panel A. Este análisis nos indica que el As_2O_3 100 μM no bloquea la corriente I_{k1} con respecto al tiempo.

VI.2 Efecto de bloqueo del As_2O_3 sobre la corriente transitoria de salida (I_{to}) en miocitos de rata.

Se estudió el efecto del As_2O_3 a las concentraciones 30, 50, 80, 100 y 300 μM . Para el análisis se tomó la EC_{50} de 100 μM para estudiar su efecto sobre el componente rápido, el cual consistió en una disminución de la corriente en un 60% respecto al control y el componente sostenido decreció un 30%; en ambos casos el efecto fue significativo ($p < 0.05$). El efecto observado es irreversible (Fig. 9B).

Para la activación de la corriente transitoria de salida se aplicó un protocolo de estimulación que consistió en pasos de voltaje de -60 mV hasta +50 mV en intervalos de 10 mV, partiendo de un potencial de sostenimiento de -60 mV., con una duración de 1s, aplicados cada 20s; la magnitud de la corriente se midió al pico máximo después de cada paso de voltaje. Los registros crudos muestran que el As_2O_3 bloquea esta corriente en su componente rápido como también su componente sostenido, siendo importante el hecho de que al retirar el As_2O_3 de la perfusión el efecto es irreversible (Fig. 9A).

En la figura 9B, se muestra el análisis de corriente-voltaje de la corriente I_{to} en presencia de As_2O_3 en la cual se aprecia que hay una disminución del 60% de la corriente total, también se muestra que no existe una recuperación de la corriente después de retirar este fármaco.

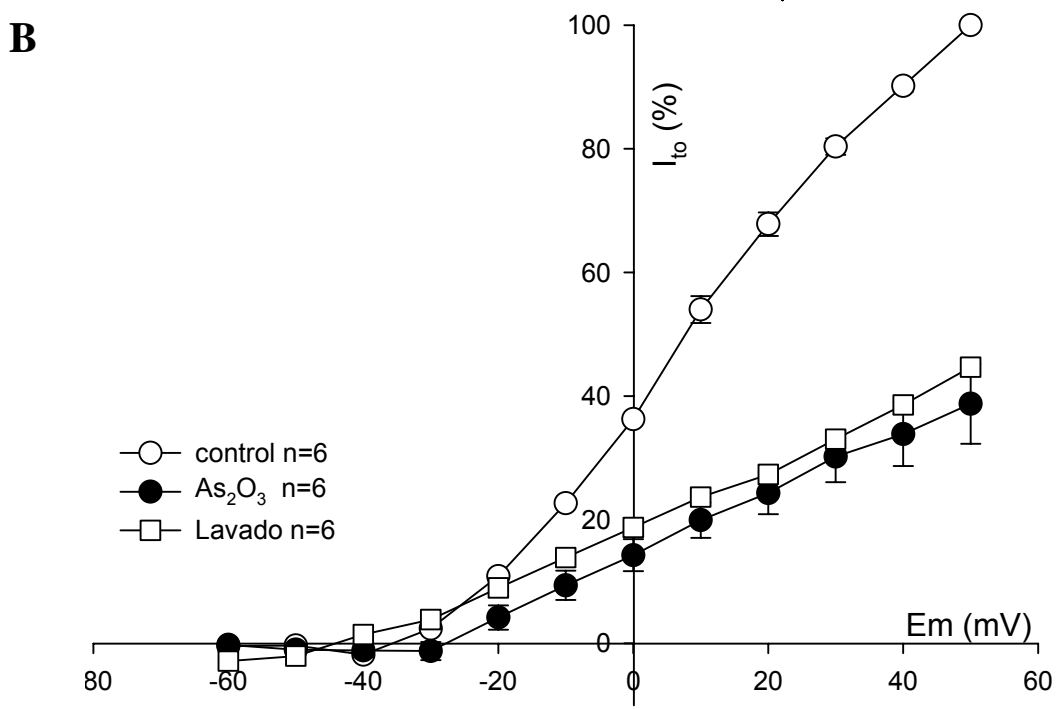
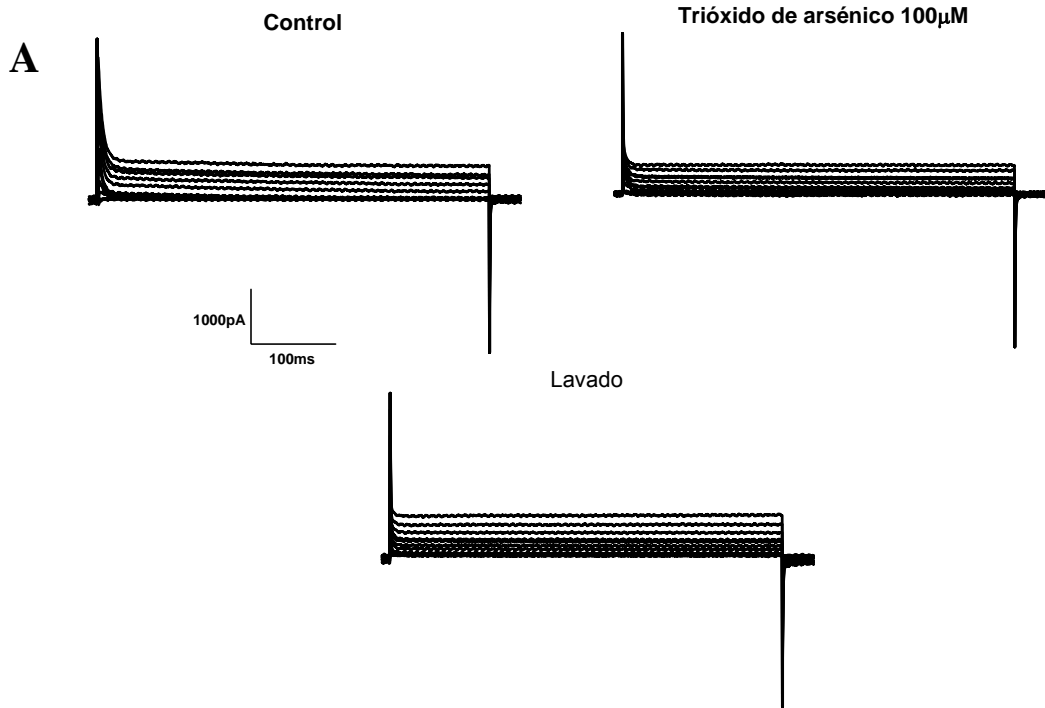


Figura 9. Bloqueo del As_2O_3 sobre la corriente I_{to} . En el panel A, se muestran los registros crudos de la corriente I_{to} en condiciones control, en presencia de As_2O_3 100 μM y lavado, hay disminución en la amplitud de la corriente en un 60% a un potencial de sostenimiento de +50mV. En el panel B, se muestra la relación corriente-voltaje para la corriente I_{to} , en condiciones control, cuando se perfunde As_2O_3 100 μM y al retirar el As_2O_3 de la perfusión y lavado.

Para obtener la IC_{50} del As_2O_3 se realizaron una serie de experimentos con diferentes concentraciones. Finalmente se graficaron las relaciones corriente-voltaje y de ahí se tomaron los valores máximos de bloqueo y se graficaron en función de la corriente total, estos datos fueron ajustados con la ecuación del Hill. La cual nos dio un número de Hill de 2.3 y una EC_{50} de $97.55\mu M$ (Fig. 10).

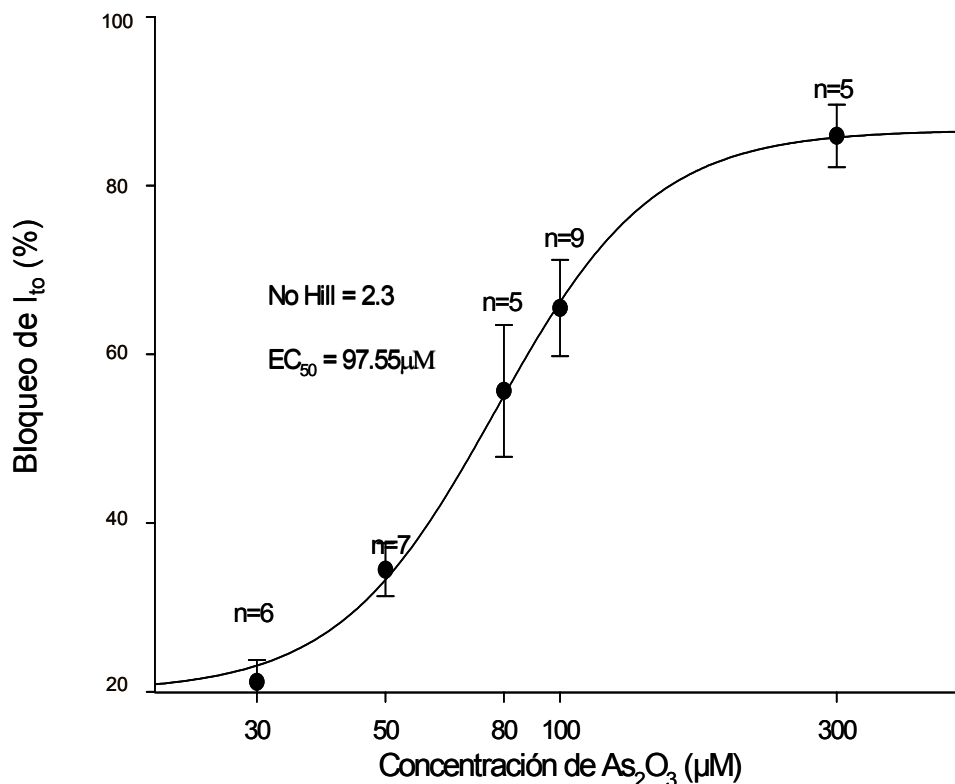


Figura 10. Curva concentración-efecto. EC_{50} de As_2O_3 , concentración efectiva para bloquear el 50% de la corriente I_{to} , el ajuste se realizó con la ecuación de Hill. Las concentraciones utilizadas fueron: 10 μM , 30 μM , 50M, 100 μM y 300 μM .

Con el resultado de la gráfica 10, se empleó la EC_{50} para saber si el As_2O_3 bloqueaba al canal en su estado inactivación estado-estable, debido a que no sabíamos si el As_2O_3 interaccionaba con el canal en el estado abierto o inactivado,

por lo cual era necesario hacer un análisis más a fondo sobre la inactivación estado-estable de la corriente. Para obtener la inactivación estado-estable de la corriente se aplicó un protocolo de doble pulso de -60 mV a +50 mV con incrementos de 10mV (cada 20 s), con un segundo de duración, seguido de un pulso despolarizante fijo de -60 mV a +50 mV con una duración de 200 ms. Las corrientes generadas por el pulso despolarizante fueron medidas al pico para obtener la magnitud de dicha corriente en cada paso de voltaje. Este procedimiento se realizó en condición control y después de perfundir As_2O_3 100 μM con su respectivo lavado.

En la figura 11, se muestra el análisis realizado para la inactivación estado-estable de la corriente I_{to} . Por último se realizó un ajuste con la ecuación de Boltzmann para saber si había una dependencia del efecto del As_2O_3 sobre la inactivación del canal, y nos dió los siguientes parámetros: registros control (○): $V_{1/2} = -15.28$ mV y una $K = 8.8$ y con As_2O_3 100 μM (●): $V_{1/2} = -27.54$ mV; y una $K = 8.4$, esta diferencia no resultó significativa (t-student). Este análisis nos indica que el bloqueo realizado por As_2O_3 sólo se presenta si está activado el canal (corriente total) pero no así en el estado inactivado o cerrado, con ello podemos afirmar que el bloqueo ejercido por As_2O_3 no cambia la activación de la corriente.

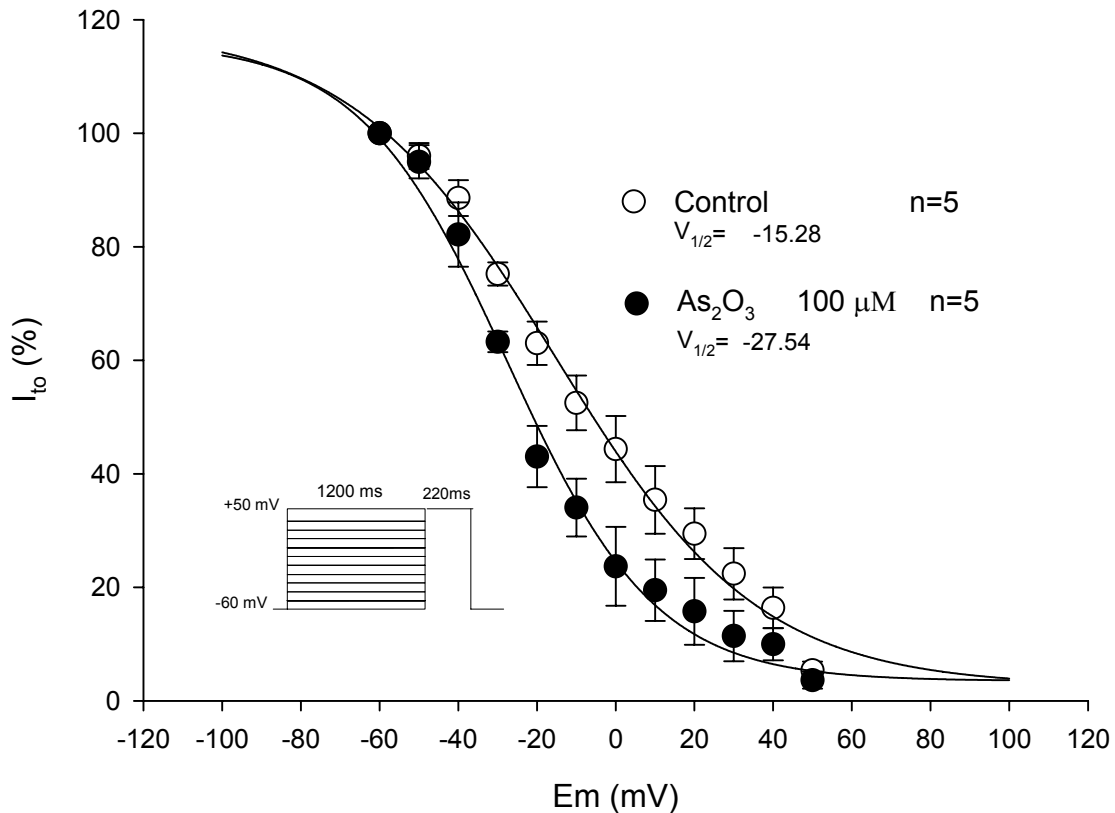


Figura 11. Inactivación estado-estable de la corriente I_{to} . Para obtener la $V_{1/2}$ y K, se utilizó la ecuación de Boltzmann. El análisis de los registros control (○) nos dió una $V_{1/2} = -15.28 mV$ y una $K = 8.8$; en presencia de As_2O_3 100 μM (●): $V_{1/2} = -27.54 mV$; y una $K = 8.4$. Las diferencias de las $V_{1/2}$ fueron de 12.26 mV.

Este corrimiento de voltaje a valores negativos de la inactivación estado-estable de la corriente I_{to} en presencia de As_2O_3 100 μM , nos indica que la velocidad de inactivación del canal es más rápida. Por lo cual tenemos un incremento del componente sostenido de la corriente I_{to} .

Por último se analizó el tiempo de instalación del efecto del As_2O_3 sobre la corriente I_{to} , para ello utilizamos un protocolo de estimulación fijo de -60 mV a +50 mV con una duración de 1s. En la cual se empleó la IC_{50} del As_2O_3 100 μM . En la figura 12A, se muestran los registros crudos obtenidos bajo condiciones control, presencia de As_2O_3 y su respectivo lavado, en este análisis se indica nuevamente que el efecto de bloqueo del As_2O_3 es dependiente del tiempo, el bloqueo es dependiente del estado abierto del canal. El tiempo necesario para la instalación del efecto del As_2O_3 fue de 1.40min (Fig.12B).

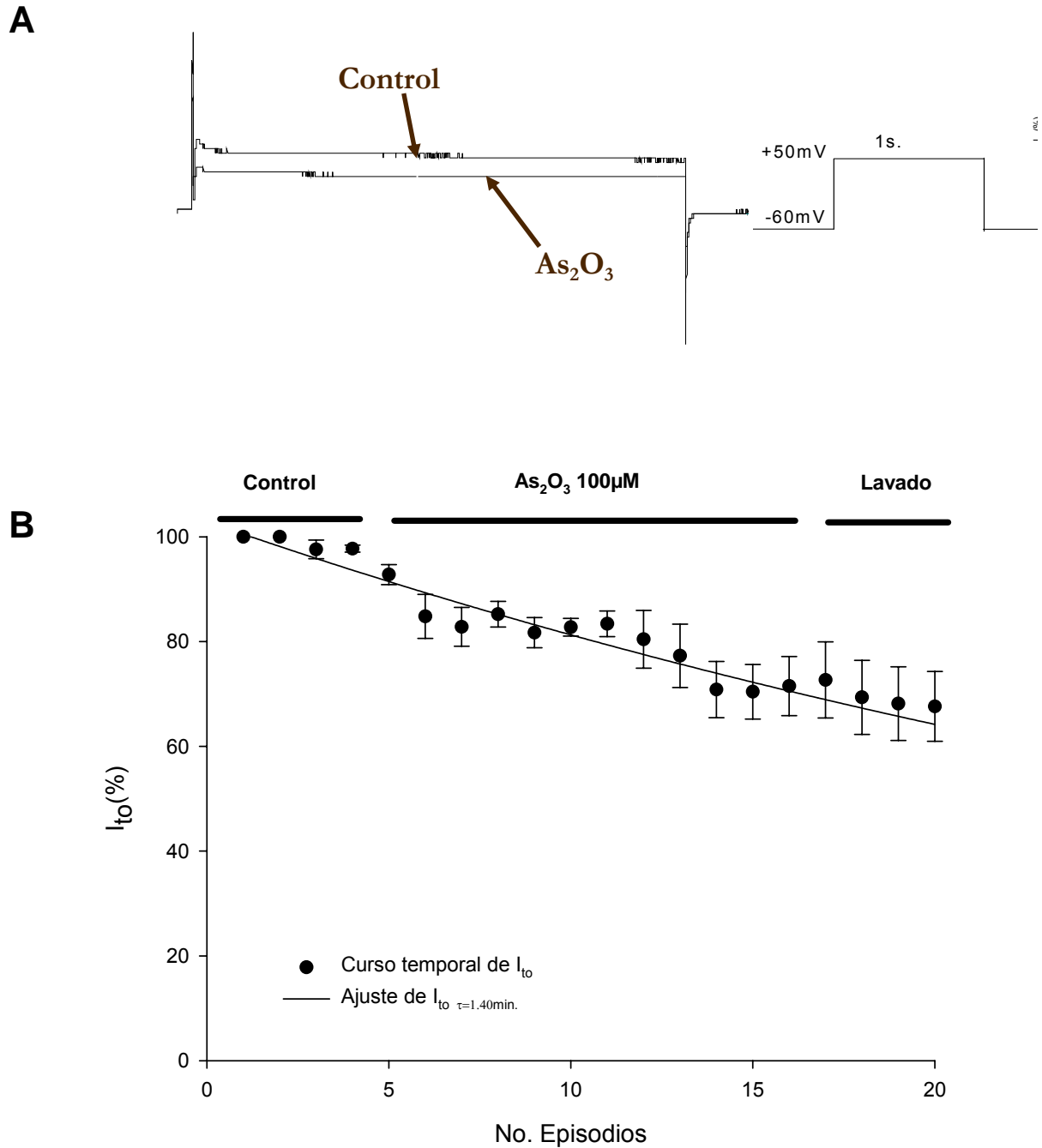


Figura 12. Curso temporal de la corriente I_{t_0} . En el panel A, se muestran los registros crudos control, en presencia de As_2O_3 100 μM y lavado. En el panel B, se muestra el análisis estadístico de las corrientes obtenidas del panel A. As_2O_3 100 μM bloquea la corriente I_{t_0} con respecto al tiempo.

El As_2O_3 bloquea la corriente total de I_{to} , así mismo encontramos que tiene un efecto dual sobre la corriente, es decir el As_2O_3 bloquea la corriente total y al mismo tiempo decreta el componente sostenido de la corriente I_{to} . En la figura 13, se muestra la relación corriente-voltaje, se puede apreciar cuando se perfunde As_2O_3 100 μM , hay un decremento del 30% del componente sostenido de la corriente I_{to} . Este decremento del componente sostenido es parcialmente reversible al lavado.

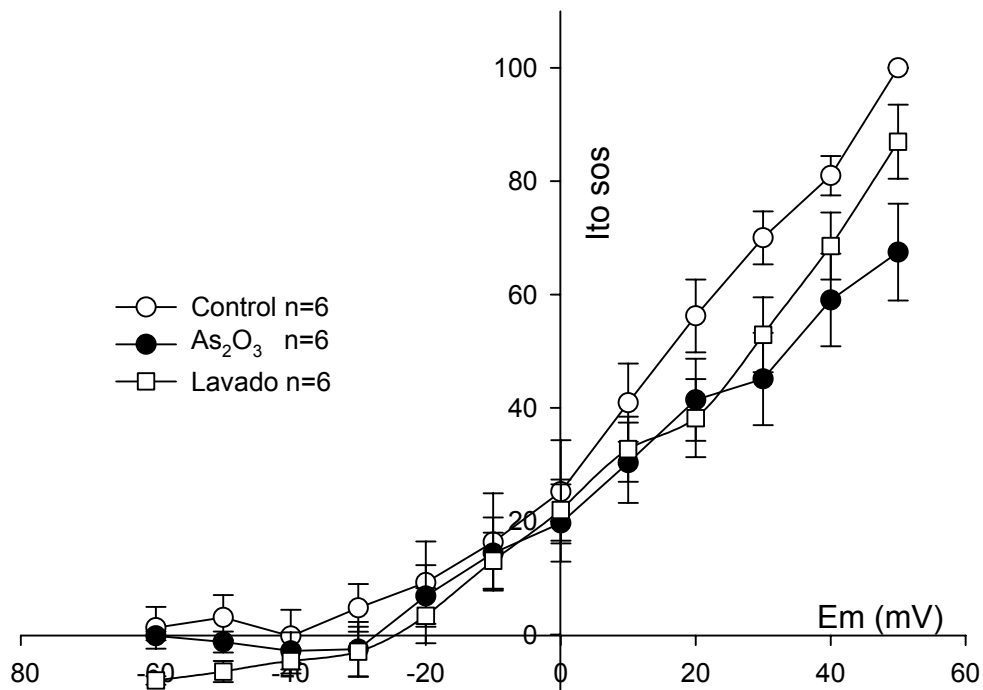


Figura 13. Curva corriente-voltaje del componente sostenido de la corriente I_{to} . Se presentan el análisis de registros control, en presencia de As_2O_3 100 μM y lavado sobre el componente sostenido de I_{to} .