

Estandarización de la técnica de *Patch-clamp* para el estudio de canales iónicos en un modelo de cardiomiocitos murinos

Alejandro Gómez-Restrepo¹, Marco A. Giraldo², Juan C. Calderón³

Palabras clave: *Patch-clamp*; cardiomiocitos; murino; canal iónico; sodio; potasio

Key words: *Patch-clamp*; cardiomyocytes; murine, ionic channel; sodium; potassium

INTRODUCCIÓN

La técnica de *patch-clamp*, en su configuración *whole cell*, permite registrar con gran resolución temporal las corrientes iónicas que pasan a través de todos los canales del mismo tipo que estén presentes en una membrana celular (corrientes macroscópicas). Esto la convierte en la técnica estándar para evaluar el potencial efecto modulador sobre canales iónicos de moléculas sintéticas o naturales, tales como péptidos, toxinas, compuestos inorgánicos, entre otros. Nuestro grupo cuenta con un nuevo laboratorio de electrofisiología celular con alto potencial para estudios de *patch-clamp*, pero se requiere estandarizar el modelo de estudio y los protocolos experimentales.

OBJETIVO

Estandarizar la técnica *patch-clamp* para medición de corrientes iónicas de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) en un modelo de cardiomiocitos de ratón (*Mus musculus*).

METODOLOGÍA

Para el aislamiento de cardiomiocitos se utilizó la técnica de perfusión inversa de Langendorff. Para ello ratones adultos (n=7) entre 22 y 25 g de peso se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cora-

zón rápidamente y se puso en solución externa fría. Bajo estereoscopio se canuló la aorta dentro de los 10 siguientes minutos. Se lavó con solución fisiológica (Tyrode) libre de Ca²⁺ suplementada con enoxaparina y se perfundió a 5 ml/min de solución con colagenasa tipo 2 (1 mg/ml) y proteasa XIV (0,1 mg/ml) a 37°C por 20 minutos. Finalmente, el corazón se lavó con solución Tyrode libre de Ca²⁺ y se disoció hasta obtener cardiomiocitos intactos.

Las células fueron suspendidas en solución externa específica para cada corriente iónica (Na⁺ y K⁺), se montaron en una cámara experimental (RC-26, WI®) sobre la platina de un microscopio invertido y se utilizaron para la obtención de corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺ mediante la técnica de *patch-clamp*, en configuración *whole-cell*. Para ello se utilizaron pipetas pulidas (PuI-1000, WPI®), llenas con solución interna específica para la medición de cada tipo de corriente iónica. Se implementó un sistema de micromanipulación y presión hidrostática para facilitar el abordaje de las células, la obtención y el mantenimiento de los sellos. El *holding potential* se estableció en -80 mV. Una vez aplicados los protocolos de estimulación en modo *voltage-clamp* para Na⁺ y K⁺, se registraron corrientes iónicas con ayuda de los programas especializados Multiclamp y pClamp, v10.05; este último se utilizó para compensar la resistencia en serie y las capacitancias de las pipetas y las células.

RESULTADOS

La preparación tuvo típicamente un 75-80% de cardiomiocitos vivos aproximadamente (inspección visual de su tamaño y brillo), similar a lo reportado en la literatura. Se han realizado 121 experimentos con las células, utilizando pipetas con resistencias de $2,45 \pm 1,44$ MΩ. Se obtuvieron 29 gigasellos con resistencias entre 1 y 16 GΩ, sin una distribución normal, por lo cual no se describen con valores de tendencia central y dispersión. Los sellos obtenidos se mantienen por un periodo de 5 a 10 minutos. La cinética de las corrientes y de las curvas corriente-voltaje coincide con las reportadas en la literatura para Na⁺ y K⁺ en cardiomiocitos de ratón.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se obtuvieron exitosamente corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺. Ante la presencia de algunos artefactos

1 Estudiante de Maestría. Médico veterinario, Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas. Grupo PHYSIS. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. alejandro.gomezr@udea.edu.co

2 Cotutor. Físico. PhD. Grupo de Biofísica. Instituto de Física, Universidad de Antioquia. mantonio.giraldo@udea.edu.co

3 Tutor. Médico. PhD. Grupo PHYSIS. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. jcalderonv00@yahoo.com

Financiación: Proyecto Colciencias (Código 111577757673)

por contaminación de corrientes entre sí, es necesario mejorar el uso de bloqueadores de canales iónicos como TTX, TEA y CdCl₂. Las modificaciones a las soluciones serán implementadas para próximos experimentos.

La temperatura tiene un efecto importante sobre la cinética de las corrientes iónicas, por lo que es necesario estandarizar un método para su control, el cual se encuentra por definir.

La técnica se utilizará para medir el efecto de péptidos derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga*, sobre corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺ en cardiomiocitos murinos.

BIBLIOGRAFÍA

Conforti L. Patch-Clamp Techniques. In: Cell Physiology Source Book [Internet]. Fourth Edi. Elsevier; 2012. p. 369–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00020-2>

Gualdani R, Cavalluzzi MM, Tadini-Buoninsegni F, Lentini G. Discovery of a new mexiletine-derived agonist of the hERG K⁺ channel. Biophys Chem [Internet]. 2017;229(June):62–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2017.06.005>

Sun JF, Xu YJ, Kong XH, Su Y, Wang ZY. Fenamates inhibit human sodium channel Nav1.7 and Nav1.8. Neurosci Lett [Internet]. 2019;696:67–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.12.008>

Van der Peet PL, Sandanayake S, Jarrott B, Williams SJ. Discovery of N-Aryloxypropylbenzylamines as Voltage-Gated Sodium Channel Na_v 1.2-Subtype-Selective Inhibitors. ChemMedChem. 2019;14:570-582. Available from: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800781>

Ranjan R, Logette E, Marani M, Herzog M, Tâche V, Scantamburlo E, et al. A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (K_v) Family. Front Cell Neurosci. 2019;13(August):1–25.