



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Programa de Magíster en Ciencias Mención Fisiología

**Rol de canales de potasio en la regulación del transporte
de L-arginina por insulina en endotelio fetal humano.**



Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Mención Fisiología

MARTA LISSETTE CABRERA JORQUERA
CONCEPCIÓN-CHILE
2014

Profesor Guía: Marcelo González Ortiz
Depto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

En endotelio humano el transportador de aminoácidos catiónicos 1 (hCAT-1) está relacionado con la síntesis de óxido nítrico (NO). Insulina tiene un efecto vasodilatador en este tipo celular mediante una vía de señalización que involucra el aumento del transporte de L-arginina. Los canales de potasio de alta conductancia activados por calcio (BKCa) juegan un rol importante en la función fisiológica de endotelio y músculo liso. El objetivo de este trabajo fue determinar si el efecto agudo de insulina sobre la actividad de hCAT-1 depende de la actividad de canales BKCa y si el efecto crónico de insulina sobre la actividad transcripcional de hCAT-1 depende de estos canales. HUVEC fueron aisladas (digestión por colagenasa a 37°C) y mantenidas en medio para cultivo primario (M199) desde embarazos fisiológicos (previo consentimiento informado). Las células fueron tratadas (1-30 minutos u 8 horas) con insulina (1 nM) en ausencia o presencia de iberiotoxina (IbTx 100 nM). Se midió el transporte de L-arginina (L-Arginina 31.25-100 μ M, L-[³H]arginina 1 μ Ci/ml, 1 min) y la expresión de hCAT-1 por RT-PCR e inmunocitoquímica. El transporte de L-arginina aumentó ($p < 0.05$ vs control) en presencia de insulina de una manera tiempo-dependiente, con un efecto máximo (2.4 veces) luego de 30 minutos de incubación. El efecto de insulina en el transporte de L-arginina fue bloqueado ($p < 0.05$ vs insulina 30 min) al co-incubar las células con IbTx. Insulina (8 horas) aumenta el nivel de mRNA de hCAT-1, siendo este efecto bloqueado por la co-incubación con genisteína (5 μ M, inhibidor de quinasas de tirosina), calfofostina C (100 nM, inhibidor de proteína quinasa C) e IbTx. La inmunofluorescencia confocal mostró que insulina aumenta los niveles de proteína de hCAT-1 luego de 30 minutos de tratamiento, efecto bloqueado por la co-incubación con IbTx. Este aumento de la proteína se observó principalmente en la membrana plasmática. En conclusión, insulina aumenta el transporte de L-arginina y la expresión en la membrana plasmática de hCAT-1 por un mecanismo que, en forma aguda, está relacionado con la activación de canales BKCa. Esto produce aumento de la actividad del transportador, probablemente mediante hiperpolarización, aumentando así la captación de L-arginina y la producción de NO a nivel endotelial. En incubación prolongada (8 h), insulina aumenta el nivel de mRNA de hCAT-1 mediante la activación una vía de señalización de relacionada con la activación de proteínas tirosina quinasas, efecto que también requeriría de un paso de activación de canales BKCa en HUVEC.