



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

EFECTO DEL AMP_c SOBRE EL INTERCAMBIADOR K⁺/Ca²⁺ DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado ante la
Ilustre Universidad Central de Venezuela por el Bachiller
Daniel Roberto Landi Conde como requisito parcial para
optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Jesús G. Romero M.

Caracas, Venezuela

Octubre - 2015

Resumen

El eritrocito humano (EH) presenta una vida media de 120 días; luego, éstos son retirados del torrente sanguíneo. Al ser células anucleadas, éste no es un proceso de apoptosis clásica. La concentración intracelular del ión calcio aumenta con la edad de estas células. Se ha planteado que el proceso de senescencia de los eritrocitos está relacionado con el paso de éstos a través del lecho capilar. En nuestro laboratorio se ha propuesto la “hipótesis del K^+ ” que presenta una explicación a este proceso, la cual se fundamenta en dos mecanismos: el canal de K^+ mecanoactivado del eritrocito humano (HEMKCA) y el intercambiador K^+/Ca^{2+} , evidenciados en nuestro laboratorio mediante el uso de la técnica del T.U.G.O. (The U-Shaped Giga Ohm) Patch Clamp, que simula el estrés mecánico que experimenta un eritrocito al pasar a través de un capilar sanguíneo. La activación de este intercambiador presenta características de dependencia no lineal con el voltaje y una secuencia de permeabilidad $K^+ > Rb^+ \gg Cs^+$ y $Ca^{2+} > Ba^{2+} \gg Mg^{2+}$.

El Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc) es un nucleótido cíclico generado a partir de ATP por acción de la proteína de membrana adenilato ciclasa (AC) en respuesta a diversas señales extracelulares. Esta molécula actúa como un importante segundo mensajero en la mayoría de los tipos celulares. Su concentración normal en el citosol está alrededor de los 100 nM, pero una señal extracelular puede incrementar considerablemente su concentración en cuestión de segundos.

Esta investigación se plantea como objetivo principal la determinación del efecto que ejerce el AMPc sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} del EH.

El AMPc produce una inhibición dosis-dependiente sobre la actividad del intercambiador (con un máximo de $45,33 \pm 5,12$ % en el modo directo y $58,64 \pm 15,68$ % en el modo inverso) que presenta saturación a concentraciones superiores a $1,0 \mu M$. Esta inhibición es independiente del potencial de membrana. Este efecto es ejercido por el AMPc sobre las vías de permeación del intercambiador (con un máximo de $42,66$ % inhibición en el modo directo y un máximo de $54,29$ % de inhibición en el modo inverso) y no sobre el mecanismo de activación del mismo. Adicionalmente, la inhibición lentifica el proceso de desactivación del transporte (aumentando la τ_d hasta $215,22$ % en el modo directo y τ_i hasta un $229,25$ % en el modo inverso) de manera dosis-dependiente, mostrando saturación a concentraciones superiores a $1,0 \mu M$. Este efecto también es independiente del potencial de membrana.

Se propone la existencia de un único sitio de unión directa al intercambiador en el lado intracelular para el AMPc que muestra una K_i en el orden submicromolar.

Palabras clave: Eritrocito humano, Intercambiador K^+/Ca^{2+} , Patch Clamp, AMPc

Índice general

Introducción	1
La membrana del eritrocito humano	2
Metabolismo y Tiempo de vida	4
Algunos transportadores en la membrana de los eritrocitos	5
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	5
Cotransportador K ⁺ /Cl ⁻	6
Ca ²⁺ -ATPasa	7
Canal Gárdos	7
Banda 3 o Anion Exchanger 1 (AE1)	8
Intercambiador Na ⁺ /H ⁺	8
Transportador de glucosa	8
Transporte de agua: aquaporinas	9
Otras vías de transporte	9
Cascada citotóxica del Calcio	9
AMPc en el eritrocito	10
Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CNGC, Cyclic Nucleotide-Gated Channels)	13
Antecedentes	15
Senescencia del eritrocito humano	15
Corrientes del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺ en la membrana del Eritrocito Humano	17
Corrientes Instantáneas del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	18
Desactivación del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	19
Objetivos	20
Objetivo General	20

Índice general

Objetivos Específicos	20
Materiales y Métodos	21
Obtención del material biológico	21
Soluciones utilizadas	21
Medidas electrofisiológicas	22
El T.U.G.O. (The U-Shaped Giga Ohm) Patch Clamp	22
Protocolo para agregar AMPc a la cámara	23
Protocolos de estimulación	24
Adquisición de los datos	27
Análisis estadístico	27
Resultados	28
Efecto del AMPc sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+}	28
Efecto del AMPc sobre la vía de permeación del intercambiador K^+/Ca^{2+}	31
Efecto del AMPc sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+}	37
Discusión	44
Conclusiones	48
Bibliografía	48

Índice de figuras

1.	Micrografía de eritrocitos normales	2
2.	Distribución normal de los lípidos de la membrana del eritrocito humano	3
3.	Esquema del funcionamiento de los transportadores de fosfolípidos	4
4.	Composición iónica de la solución intracelular de los eritrocitos humanos y de la solución extracelular que los rodea	5
5.	Principales mecanismos de transporte presentes en la membrana del eritrocito humano	6
6.	Cascada citotóxica del calcio en los eritrocitos humanos	10
7.	Estructura del AMPc y su ruta de síntesis y degradación	11
8.	Activación de la PKA	12
9.	Topología de los canales iónicos modulados por nucleótidos cíclicos: HCNC y CNGC	14
10.	Hipótesis del K^+	16
11.	Corrientes I_{mic}	17
12.	Comparación de la forma de la pipeta usada en T.U.G.O. Patch Clamp con la usada en el Patch Clamp convencional	22
13.	Esquema de la región de membrana del eritrocito en el interior de la pipeta en el T.U.G.O. Patch Clamp	23
14.	Esquema del posible proceso de formación del sello	24
15.	Esquema del protocolo de sustracción de fuga P/10	25
16.	Esquema de los protocolos de estimulación para la construcción de las curvas IV . . .	25
17.	Esquema de los protocolos de estimulación para las corrientes instantáneas, INST . .	26
18.	Esquema de los protocolos de estimulación para construir las curvas de desactivación DEAC	27

Índice de figuras

19.	Curva I/V control	28
20.	Curva I/V para el efecto del AMPc con una concentración de $0,1 \mu\text{M}$ sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	29
21.	Curva I/V para el efecto del AMPc con una concentración de $1,0 \mu\text{M}$ sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	30
22.	Curva I/V para el efecto del AMPc con una concentración de $10,0 \mu\text{M}$ sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	31
23.	Porcentaje de inhibición obtenido para el modo directo bajo el efecto del AMPc a las diferentes concentraciones utilizadas	32
24.	Porcentaje de inhibición obtenido para potencias negativos bajo el efecto del AMPc a las diferentes concentraciones utilizadas	33
25.	Porcentaje de inhibición promedio obtenido a un potencial de $\pm 120 \text{ mV}$ en presencia de las distintas concentraciones de AMPc	34
26.	Curva control de corrientes instantáneas	34
27.	Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de $0,1 \mu\text{M}$ de AMPc en el baño	35
28.	Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc en el baño	36
29.	Corrientes desarrolladas por el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de $10,0 \mu\text{M}$ en el baño	36
30.	Pendiente de la recta obtenida mediante el protocolo de corrientes instantáneas con respecto a la concentración de AMPc	37
31.	Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$: Condición control.	38
32.	Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de $0,1 \mu\text{M}$ de AMPc	40
33.	Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc	41
34.	Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de $10,0 \mu\text{M}$ de AMPc	42
35.	Valores de constante de tiempo calculados para el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo DEAC	43

Índice de tablas

1.	Composición de los fantasmas de eritrocitos	2
2.	Composición de las soluciones normal y experimentales.	21
3.	Resumen de los resultados obtenidos.	43

Introducción

Las células están rodeadas por una membrana plasmática, una estructura extraordinariamente fina y compleja de carácter principalmente lipídico que encierra al citoplasma. Con la ayuda de diversos mecanismos metabólicos que se describen más adelante, la membrana regula el tráfico molecular entre el interior ordenado de la célula y el ambiente externo. Esta membrana, según Singer y Nicolson (1972), puede verse como un “mosaico” fluido, compuesto por lípidos y proteínas. En este modelo, las cadenas no polares de los ácidos grasos de los fosfolípidos están unidas mediante fuerzas de Van der Waals lejos del medio hidrofílico. Por otro lado, las cabezas polares de estos lípidos se encuentran mirando hacia afuera, en contacto con el medio acuoso. Todas estas interacciones contribuyen a la estabilidad de la estructura. Las proteínas integrales de membrana son un conjunto heterogéneo de macromoléculas globulares arregladas en una estructura anfipática con sus cargas y aminoácidos polares saliendo de la membrana hacia el medio acuoso y los aminoácidos no polares orientados hacia el interior hidrofóbico de la membrana (Singer y Nicolson, 1972; Bagatolli y col., 2010).

Las proteínas de membrana son de una excepcional importancia fisiológica. La mayoría de los receptores extracelulares tienen un dominio transmembrana que es esencial en el funcionamiento del receptor. Otras proteínas de membrana son vitales en el transporte de moléculas a través de la membrana, llamadas proteínas transportadoras.

Los glóbulos rojos —o eritrocitos— (Figura 1) son células altamente diferenciadas especializadas en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre, en la cual constituyen el 99.9 % de los elementos celulares (en Cokelet (2011), citado por Simmonds y col. (2013)). Consisten esencialmente de una membrana plasmática que rodea una solución concentrada de hemoglobina. Carecen de núcleo, mitocondria y otros organelos y por ello, desde el punto de vista estructural, son las células eucarióticas más simples que se conocen, y además son las células más flexibles conocidas en mamíferos (en Chien (1987), citado por Simmonds y col. (2013)).

La mayoría de los eritrocitos de mamíferos exhiben normalmente una forma discoidal bicóncava. Esta forma y la correspondiente deformabilidad del eritrocito consisten elementos claves en su funcionalidad biológica (Diez-Silva y col., 2010). Bajo condiciones anormales estas células pueden transformarse en formas “espinosas”, llamadas equinocitos, o en estructuras con forma de copa llamadas estomatocitos (Deuticke,

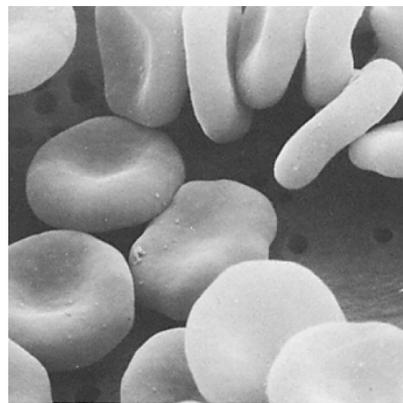


Fig. 1: Micrografía de eritrocitos normales. Tomado de Sheetz y col. (1976).

1968). Cada disco bicóncavo tiene un diámetro de aproximadamente entre $7,5$ y $8,7 \mu\text{m}$, ocupa un volumen de $91 \mu\text{m}^3$ y tiene un área superficial de $133 \mu\text{m}^2$, con un grosor de $2,4 \mu\text{m}$ en el anillo externo y de $1,0 \mu\text{m}$ en el centro con una osmolaridad de 300mOsm/kg (Diez-Silva y col., 2010). Experimentos han demostrado que esta forma no se ve alterada por cambios de potencial eléctrico, siempre y cuando éste se mantenga en un intervalo entre -85 a $+10 \text{mV}$ (Bifano y col., 1984).

El potencial de membrana del eritrocito es aproximadamente -10mV , el cual es muy cercano al potencial de equilibrio del Cl^- debido a que la permeabilidad de la membrana a este anión es alrededor de 100 veces mayor que para las otras especies iónicas presentes (Hastings y col., 1928, citado por Bifano y col., 1984).

La membrana del eritrocito humano

La membrana del eritrocito encierra una solución citoplasmática viscosa del pigmento respiratorio hemoglobina, que se encuentra a una concentración de $5,2 \text{mM}$. En ella pueden encontrarse entre 150 y 200 tipos de lípidos (Van Deenen, 1969). La composición química de estas membranas aisladas (fantasmas de eritrocitos) está resumida en la Tabla 1, la cual indica que estas membranas están compuestas por partes

Tabla 1: Composición de los fantasmas de eritrocitos. Modificado de Rosenberg y Guidotti (1968).

Sustancia	Porcentaje en masa
Proteína	49 %
Fosfolípido	33 %
Colesterol	11 %
Carbohidratos totales	7 %

aproximadamente iguales (en términos de masa) de lípidos y proteínas, con una fracción adicional de carbohidratos. Estos carbohidratos existen como azúcares en glicoproteínas o en glicolípidos o en el ácido siálico; estos azúcares siempre quedan del lado exterior de la membrana. Debido a los

ácidos siálicos en la glicoforina, una proteína integral de membrana, la superficie celular está cargada negativamente (Seaman y Uhlenbruck, 1963). Es bien conocido que en la membrana de los glóbulos rojos, como en muchas otras membranas eucarióticas, los lípidos están distribuidos asimétricamente (Bretscher, 1972; Bitbol y col., 1987; Chandra y col., 1987; Bitbol y Devaux, 1988; Connor y col., 1990; Bevers y col., 1992; Díaz y Schroit, 1996; Artmann y col., 1997; Bevers y col., 1999; Daleke y Lyles, 2000). La distribución de los fosfolípidos a lo largo de la membrana de las células eucarióticas no es azarosa: ciertos fosfolípidos —como la fosfatidilcolina y la esfingomiélinea, localizadas principalmente en la monocapa exterior de la bicapa— se distribuyen asimétricamente a lo largo de la membrana (Figura 2). Los fosfolípidos neutros (fosfatidilcolina y esfingomiélinea) están localizados preferencialmente del lado extracelular. Los fosfolípidos cargados negativamente (fosfatidil inositol y fosfatidilserina) se encuentran localizados del lado intracelular, con las cargas negativas de sus cabezas apuntando hacia el citosol (Chandra y col., 1987). Esta composición se mantiene más o menos constante durante la vida del eritrocito maduro, debido a que éste carece de síntesis de lípidos de novo (Haest, 2003).

La orientación transmembrana de los lípidos tiene influencias sobre la estructura de la membrana plasmática y sobre la función de varios sistemas enzimáticos que se encuentran unidos a ésta. También hay evidencias de que ciertos lípidos ubicados en sitios específicos de la membrana participan en procesos tan diversos como el reconocimiento célula-célula y la coagulación de la sangre (Díaz y Schroit, 1996).

Alrededor del 80 % de la esfingomiélinea y 75 % de la fosfatidilcolina se encuentran en la monocapa exterior de la bicapa. 80 % de la fosfatidiletanolamina y prácticamente toda la fosfatidilserina se encuentran en la monocapa interior (Zwaal y col., 1973). Debido a que los eritrocitos no tienen la capacidad de sintetizar nuevos lípidos, cambios en la localización de los lípidos presentes en la membrana (que implican un cambio en alguna característica de ésta), sólo pueden ser resultado de un remodelado molecular mediado por una flipasa que facilita de manera activa el movimiento selectivo de fosfatidilserina

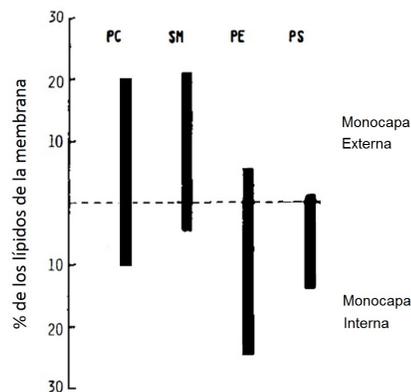


Fig. 2: Distribución normal de los lípidos de la membrana del eritrocito humano. PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomiélinea, PE: fosfatidiletanolamina, PS: fosfatidilserina. Modificado de Devaux (1992).

y fosfatidiletanolamina desde la monocapa externa a la interna (Seigneuret y Devaux, 1984), cuya actividad es inhibida por concentraciones de Ca^{2+} elevadas en el citosol (Bitbol y col., 1987); una flopasa, que facilita la migración de fosfolípidos a través de la bicapa desde la monocapa interior a la exterior (Bitbol y Devaux, 1988; Connor y col., 1992); y una scramblasa (Díaz y Schroit, 1996; Boas y col., 1998; Bevers y col., 1999) que promueve el movimiento bidireccional de los lípidos de la membrana (Daleke y Lyles, 2000), de la cual se encuentran alrededor de 10^3 copias en la membrana del eritrocito (Bevers y col., 1999) y que es responsable directo de la pérdida de la asimetría de los lípidos que conforman la membrana, y cuya actividad es estimulada por concentraciones elevadas de Ca^{2+} , tales como las encontradas durante la senescencia normal del eritrocito (Boas y col., 1998), llevando especialmente a excesos de fosfatidilserina en la cara extracelular. Bajo estas condiciones, la superficie externa de la membrana adquiere actividad procoagulante (Díaz y Schroit, 1996; Bevers y col., 1999). Un esquema que resume el funcionamiento de estas proteínas se presenta en la Figura 3.

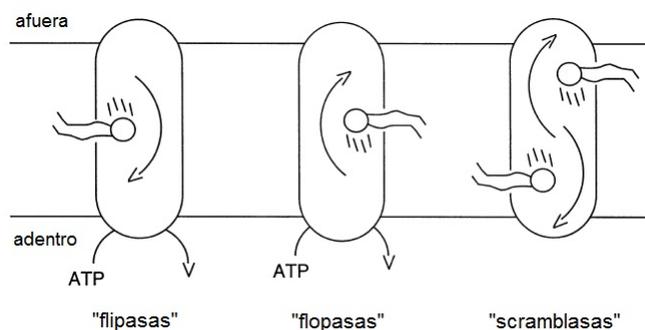


Fig. 3: Esquema del funcionamiento de los transportadores de fosfolípidos. Tomado de Daleke y Lyles (2000).

Metabolismo y Tiempo de vida

En comparación con otras células, los eritrocitos presentan unas rutas metabólicas relativamente simples. La glicólisis produce ATP y lactato a partir de glucosa, fosfato inorgánico y adenina exógena. La ruta de las pentosas fosfato proporciona equivalentes reductores en la forma de glutatión, NADH y NADPH, los cuales —en conjunto con la catalasa, la superóxido dimutasa y la glutatión reductasa— actúan en la prevención de la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y del Fe^{2+} de la hemoglobina. No se conoce que ocurra el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el sistema de los citocromos o catabolismo de lípidos en estas células, aunque se sabe que el colesterol y otros fosfolípidos presentan un recambio con los lípidos del plasma (Shohet y Mohandas, 1988). La síntesis de proteínas no ocurre en los glóbulos rojos maduros, no se produce replicación o transcripción del DNA, ni metabolismo de RNA.

Cada uno de los $2,5 \times 10^{13}$ eritrocitos presentes en un humano adulto vive alrededor de 120 días (Rifkind, 1966; Daugas y col., 2001; Arese y col., 2005; Arashiki y col., 2013). Con una tasa de recambio de cerca de 1%/día, se liberan de la médula ósea cerca de $2,5 \times 10^{11}$ eritrocitos diariamente, lo que corresponde a 3 millones de nuevos eritrocitos por segundo. Pasados los 120 días, los eritrocitos senescentes unen a su membrana autoanticuerpos IgG y son entonces reconocidos por macrófagos en la etapa inicial de su desincorporación, un proceso que lleva al reciclaje del hierro, los aminoácidos y otros constituyentes esenciales de los glóbulos rojos (Bartosz y col., 1982; Bosman y col., 2005). Estos datos referentes a la vida media del eritrocito sugieren la existencia de un reloj biológico que obviamente no viene determinado ni regulado por transcripción o traducción de genes en el eritrocito maduro. Evidencia considerable indica que los sitios de reconocimiento antigénico están compuestos por agrupaciones de una forma oxidada de la proteína Banda 3, también llamada Capnoforina o Anion Exchanger 1 (Bartosz y col., 1982).

Algunos transportadores en la membrana de los eritrocitos

En la Figura 4 se muestran las concentraciones de los iones más relevantes en el interior de los eritrocitos humanos y en el plasma sanguíneo que los rodea. Estos gradientes electroquímicos son mantenidos gracias a la actividad de una amplia variedad de proteínas transportadoras presentes en la membrana de los eritrocitos. Estos mecanismos (representados en la Figura 5) se exponen a continuación.

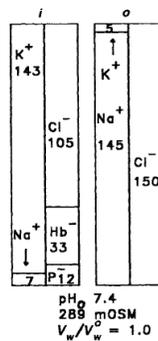


Fig. 4: Composición iónica de la solución intracelular de los eritrocitos humanos y de la solución extracelular que los rodea, denominados *i* y *o*, respectivamente. Los fosfatos orgánicos son representados por P⁻. Tomado de Freedman (2001).

Na⁺/K⁺ ATPasa

Reportada por primera vez hace más de medio siglo (Skou, 1965), la bomba Na⁺/K⁺ es una proteína integral de membrana que actúa en todas las células eucarióticas conocidas manteniendo concentraciones altas de K⁺ y concentraciones bajas de Na⁺ en el interior celular con relación al

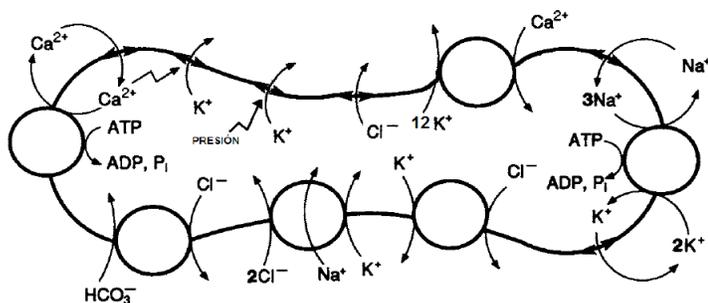


Fig. 5: Principales mecanismos de transporte presentes en la membrana del eritrocito humano. Comenzando con la bomba Na^+/K^+ y las vías pasivas de fuga de Na^+ y K^+ a la derecha, y siguiendo en sentido de las agujas del reloj, se encuentran el cotransporte K^+/Cl^- , el cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, la bomba de Ca^{2+} junto con una vía de fuga de Ca^{2+} , el canal de K^+ activado por Ca^{2+} , el canal de K^+ mecanosensible (HEMKCA), la conductancia del Cl^- y el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ del eritrocito humano. Modificado de Freedman (2001).

exterior utilizando ATP como fuente de energía (Mercer y col., 1989). Presenta una estequiometría de 3:2 $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (3 iones sodio transportados hacia afuera de la célula por cada 2 iones potasio transportados hacia adentro de ésta) (Mercer y col., 1989). Se estima que alrededor de 23 % del ATP consumido por una célula corresponde al funcionamiento de esta bomba (Mercer y col., 1989; Lingrel y Kuntzweiler, 1994). El estado estacionario de esta célula es alcanzado gracias a la acción de este transporte activo primario y a la concomitante fuga de iones potasio e iones sodio (hacia afuera y hacia adentro de la célula, respectivamente) por vías pasivas paralelas.

Cotransportador K^+/Cl^-

El movimiento de K^+ hacia afuera de la célula a través de este mecanismo permite que las células se encojan cuando son expuestas a valores de pH ácidos. Esto es gracias a que la salida de iones potasio está obligatoriamente acoplada a una salida de iones cloruro con una estequiometría de 1:1 (Kaji, 1993), que mantiene la electroneutralidad del medio intracelular. Esto, por lo tanto, se traduce en que el transporte a través de este mecanismo no es impulsado por el potencial de membrana. Este transporte activo secundario, electroneuro, no es sensible a la inhibición por ouabaína, ni tampoco por bumetanida (como lo son la Na^+/K^+ ATPasa y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, respectivamente). No obstante, es inhibido por furosemida y por cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} (Brugnara y Tosteson, 1987; Brugnara y col., 1993).

Ca²⁺-ATPasa

La bomba de Calcio de la membrana plasmática [PMCA, Plasma Membrane Calcium ATPase, (Schatzmann, 1966)] es una ATPasa de tipo P (Pedersen y Carafoli, 1987) que presenta una muy elevada afinidad por Ca²⁺, por lo que generalmente se supone que es responsable de la regulación de [Ca²⁺]_i (Stauffer y col., 1995); se ha determinado que la estequiometría de transporte es 1:1 Ca²⁺:ATP (Vincenzi, 1989; Brini y Carafoli, 2009). Es activada por calmodulina (CaM) e inhibida por iones Lantano (La³⁺) y Vanadato (VO₄³⁻) de manera no específica (Tiffert y Lew, 2001; Brini y Carafoli, 2009). Además, se conoce que el diacilglicerol estimula la actividad de esta proteína, produciendo un incremento en la V_{max} de la enzima y en su afinidad por Ca²⁺ (Pérez-Gordones y col., 2009). Existen evidencias de que su actividad es estimulada por ceramidas de manera dosis-dependiente con un efecto aditivo en presencia de CaM (Colina y col., 2002).

En el humano, esta enzima es codificada por cuatro genes (Stauffer y col., 1995). En los eritrocitos, esta bomba representa menos del 0,1 % de las proteínas de membranas totales y es el único mecanismo conocido de expulsión de Ca²⁺ (Stauffer y col., 1995; Knauf y col., 1974). Está compuesta de 1220 aminoácidos que forman 10 dominios transmembrana, dos *loops* intracelulares que contienen sitios de unión a ATP y de fosforilación, y presenta los extremos N- y C-terminal orientados hacia el citosol. Éste último contiene un dominio de unión de calmodulina unida a Ca²⁺, sitios de fosforilación y un dominio de unión PDZ que sirve como *docking* terminal para numerosas proteínas (Strehler y col., 2007).

Canal Gárdos

El canal Gárdos es un canal de K⁺ dependiente de Ca²⁺ (Grygorczyk y Schwarz, 1983). Presenta una conductancia de ~20 pS a 0 mV, la cual es independiente del voltaje. Es altamente selectivo por iones K⁺, con una relación de selectividad de aproximadamente 15:1 K⁺:Na⁺ (Grygorczyk y Schwarz, 1983). Presenta rectificación a la entrada de K⁺ a la célula. Es inhibido por drogas específicas como el clortrimazol (Maher y Kuchel, 2003) o el tetraetilamonio (TEA), que bloquea el poro del canal impidiendo el paso de K⁺ a través de él (Dunn, 1998).

Usando fantasmas de eritrocitos resellados, Romero y col. (1990) reportaron que el funcionamiento de este canal está bajo un control metabólico complejo via mecanismos mediados por AMPc; algunos de estos mecanismos requieren ATP y se cree que involucran la fosforilación del canal.

Banda 3 o Anion Exchanger 1 (AE1)

Esta proteína, de la que se encuentran aproximadamente un millón de copias en la membrana de un eritrocito (Steck, 1974), juega dos roles importantes en estas células: (1) sirve de ancla para las interacciones proteína-proteína que acoplan la membrana con el citoesqueleto (Golan y Veatch, 1980; Branton y col., 1981; Alenghat y Golan, 2013) y (2) mantiene el intercambio aniónico (HCO_3^- y Cl^-) entre el interior celular y el ambiente extracelular (Alenghat y Golan, 2013).

El AE1 del eritrocito desempeña estas dos funciones mediante dos dominios estructurales: el dominio citoplásmico (N-terminal) une el citoesqueleto de espectrina-actina a la membrana plasmática via interacciones de unión con ankyrina, proteína 4.1 y proteína 4.2, y el dominio embebido en la membrana (C-terminal), que media un intercambio entre Cl^- y HCO_3^- que incrementa la capacidad de carga de CO_2 de la sangre (Alper, 1991) gracias al Efecto Bohr (Hilpert y col., 1963). La función normal de la AE1 es mediar el intercambio electroneutro de Cl^- por HCO_3^- con una estequiometría 1:1 a través de la membrana de los eritrocitos durante el intercambio de gases en los capilares pulmonares y sistémicos. Además, tiene un rol importante en la regulación del pH en el interior del eritrocito al expulsar los iones HCO_3^- presentes, así como también en el mantenimiento de la forma del eritrocito mediante interacciones con los componentes del citoesqueleto (Peters y col., 1996).

Intercambiador Na^+/H^+

El intercambiador Na^+/K^+ (NHE, Na^+/H^+ Exchanger) es encontrado virtualmente en todas las células de mamíferos, donde juega un papel importante en la regulación del pH intracelular y el volumen de la célula, y se han descrito seis isoformas de esta proteína (Aharonovitz y col., 1999). Se ha estudiado el papel de gradientes transmembrana de pH sobre el transporte de Na^+ resistente a ouabaína y a bumetanida observado en eritrocitos humanos y con estos estudios se determinó que el flujo hacia adentro de Na^+ en células con $\text{pH} = 6,4$ incrementaba al aumentar el pH intracelular, con la concomitante salida de protones (Escobales y Canessa, 1986). Este intercambio presenta una estequiometría 1:1 y es sensible a amilorida (Semplicini y col., 1989), y en todos los casos estudiados parece que la reacción es reversible y que es impulsada únicamente por los gradientes electroquímicos de Na^+ y H^+ (Aharonovitz y col., 1999).

Transportador de glucosa

La mayoría de las células transportan azúcares rápidamente hacia adentro o hacia afuera de ellas a favor de su gradiente de concentración. Este proceso es mediado por una familia de transportadores

de azúcares llamadas GLUTs (Carruthers y col., 2009). La GLUT1 fue la primera de estas proteínas en ser identificada (Kasahara y Hinkle, 1977), purificada (Zoccoli y col., 1978) y clonada (Mueckler y col., 1985); es una proteína que contiene 12 dominios transmembrana (Mueckler y col., 1985).

Esta proteína transporta glucosa a través de la membrana, aportando el sustrato energético requerido por la glicólisis anaerobia (Mueckler, 1989) y se encuentra expresada en grandes cantidades en la membrana de los eritrocitos, siendo la GLUT1 la isoforma más abundante (Takata y col., 1997). Este transporte es modulado por ATP con inhibición competitiva por AMP y ADP, pero no requiere la hidrólisis de ATP para su funcionamiento (Heard y col., 2000).

Transporte de agua: aquaporinas

En el eritrocito, como en muchos otros tipos celulares, el agua fluye a través de aquaporinas (Preston y col., 1992). Este transporte es inhibido por cloruro mercuríco (Chrispeels y Agre, 1994) y no es acompañado por cambios medibles de conductancia, lo que indica que esta proteína no permite el paso de iones, formando un canal selectivo al agua (Preston y col., 1992).

Otras vías de transporte

Las vías para el transporte pasivo de electrolitos en los glóbulos rojos humanos incluyen cotransportadores como el $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y el K^+/Cl^- (Agre y Parker, 1989), intercambiadores como el $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{Na}^+$ (Duhm y Becker, 1977) y Na^+/H^+ (Escobales y Canessa, 1986), canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Schwarz y Passow, 1983), conductancia de Cl^- (Freedman, 1983; Freedman y Novak, 1997), y cotransporte de HCl (Bisognano y col., 1993). Otros mecanismos median el transporte de nucleósidos, lactato y otros aniones orgánicos, glutatión oxidado, colina y aminoácidos (LeFevre, 1961; Raess y Tunnicliff, 1989).

Cascada citotóxica del Calcio

A pesar de la importancia del Ca^{2+} como disparador y modulador de una variedad de actividades celulares, niveles elevados de Ca^{2+} intracelular son dañinos para las células en general, especialmente para los eritrocitos. Un nivel elevado de Ca^{2+} estimula una cascada citotóxica de cambios bioquímicos y patofisiológicos (Figura 6). Someter a los eritrocitos a estrés mecánico incrementa el flujo pasivo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Brody y col., 1995; Larsen y col., 1981). Cuando la concentración intracelular de Ca^{2+} se eleva, la permeabilidad al K^+ incrementa dramáticamente, un fenómeno conocido como el efecto Gárdos, lo que produce una hiperpolarización de la célula. Este incremento

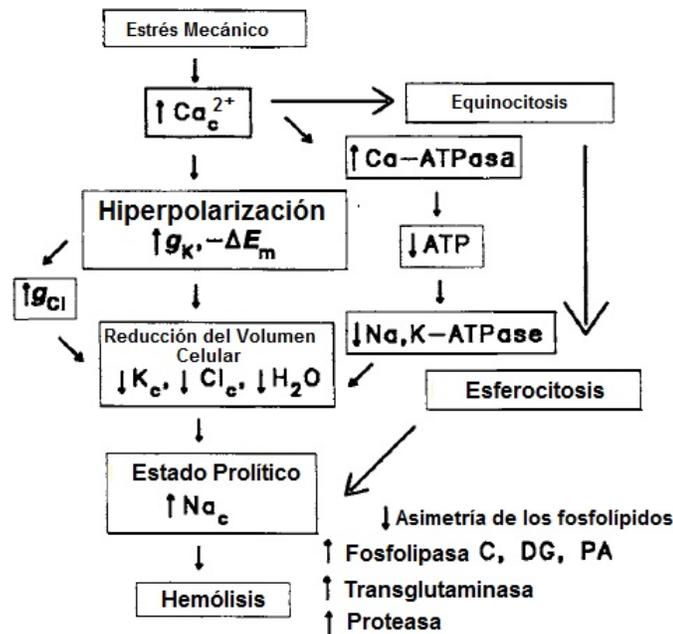


Fig. 6: Cascada citotóxica del calcio en los eritrocitos humanos. Tomado de Freedman (2001).

en la permeabilidad al K^+ es debido a la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , y resulta en una pérdida de K^+ y Cl^- intracelular, con la concomitante salida de agua (Schwarz y Passow, 1983). Además, concentraciones elevadas de Ca^{2+} estimulan el funcionamiento de la Ca^{2+} ATPasa, acelerando el consumo de ATP en la célula (Chandra y col., 1987; Crespo y col., 1987), que en consecuencia inhibe a la Na^+/K^+ ATPasa. Cuando $[Ca^{2+}]_i$ es muy elevada, el eritrocito pasa de tener una forma bicóncava lisa a una forma equinocítica y posteriormente a un esferocito. A niveles aún más altos, el Ca^{2+} activa una transglutaminasa que entrelaza proteínas del citoesqueleto y reduce la capacidad de deformación de la célula. También activa proteasas y una fosfolipasa C que convierte la fosfatidilcolina de la membrana a diacilglicerol. Adicionalmente, el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} induce alteraciones marcadas en la asimetría de la membrana (Chandra y col., 1987).

AMPc en el eritrocito

El AMPc [o AMP cíclico (Figura 7a en la página siguiente)] es un nucleótido cíclico generado a partir de ATP (liberando dos P_i) por acción de la proteína de membrana adenilato ciclasa (AC) —que presenta su unidad catalítica en el lado citosólico— en respuesta a diversas señales extracelulares (Sunahara y col., 1996). Esta molécula actúa como un importante segundo mensajero en la mayoría de los tipos celulares, principalmente mediante la activación de proteínas quinasas (PK)

dependientes de AMPc (Avruch y Fairbanks, 1974; Dreyfuss y col., 1978; Adderley y col., 2010b). El AMPc es hidrolizado a AMP por una enzima fosfodiesterasa (PDE) que funciona constitutivamente (Figura 7b), y el balance entre su síntesis y su degradación regula estrechamente su concentración espacio-temporal en el interior de la célula. Su concentración normal en el citosol está alrededor de los 100 nM, pero una señal extracelular puede incrementar considerablemente esta concentración en cuestión de segundos. Adicionalmente, las PDE (de las que se conocen once familias con múltiples isoformas, tanto citosólicas como asociadas a la membrana) limitan la difusión del AMPc a las inmediaciones de su sitio de síntesis, permitiendo la activación de eventos de señalización discretos dentro de la célula (Baillie y col., 2005; Adderley y col., 2009, 2010b,a), y existen evidencias de que isoformas específicas de PDEs están asociadas a vías de señalización particulares en los eritrocitos y que éstas participan en la regulación de la producción de cAMP mediada por receptores (Adderley y col., 2010a).

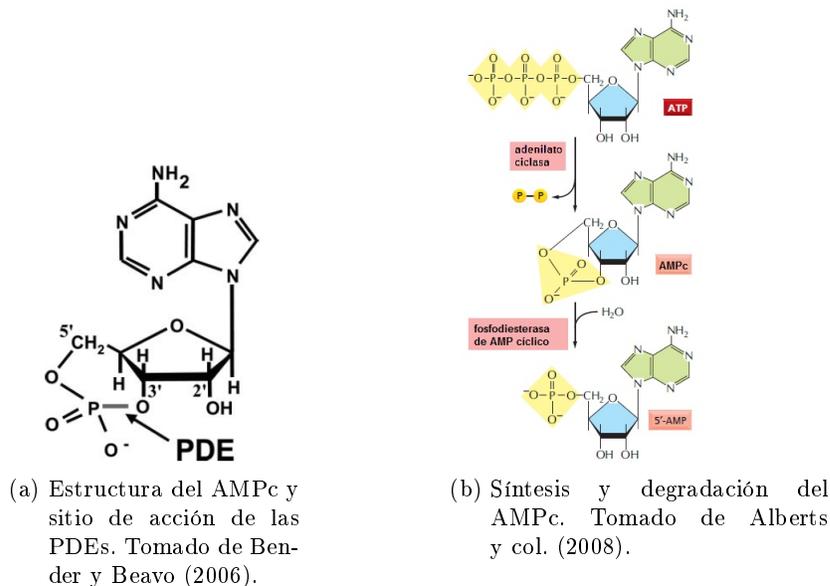


Fig. 7: Estructura del AMPc y su ruta de síntesis y degradación.

Cuando se recibe una señal extracelular, se incrementa la actividad de la AC (la cual es modulada por proteína G y Ca^{2+}) en contra de un nivel basal de actividad constitutiva de la PDE, aumentando la concentración citosólica de AMPc. En la mayoría de las células animales, el AMPc ejerce sus efectos principalmente mediante la activación de las PK. Estas quinasas forman una parte integral de las vías de transducción de señales que median funciones específicas en las células: modifican la actividad de proteínas blanco específicas mediante la fosforilación de residuos de serina o treonina específicos de éstas (Dreyfuss y col., 1978; Adderley y col., 2010b). Estas proteínas blanco difieren ampliamente de un tipo celular a otro, lo que explica por qué los efectos del AMPc varían tan

marcadamente de un tipo celular a otro. En el eritrocito se han identificado dos proteínas quinasas: la PKA y la PKC (Adderley y col., 2010b). Las PKA son activadas por AMPc, mientras que las PKC son activadas por incrementos en la $[Ca_i^{2+}]$ y/o diacilglicerol (Dreyfuss y col., 1978; Adderley y col., 2010b). Adicionalmente, existen evidencias de fosforilación de proteínas de membrana tanto dependiente como independiente de AMPc (Hosey y Tao, 1977).

En el eritrocito humano se han identificado dos tipos de proteínas quinasas dependientes de AMPc: una de tipo I asociada a la membrana, y otra de tipo II, predominante, encontrada en el citoplasma. Las subunidades catalíticas de estas quinasas encontradas en el eritrocito son idénticas, pero las reguladoras son diferentes (razón por la cual se considera que existen dos tipos de PKAs en los glóbulos rojos humanos) y son ellas quienes determinan su localización dentro de la célula. Se ha propuesto que la subunidad reguladora de la PKA de tipo I interactúa específicamente con una o más proteínas de la membrana y que esta interacción puede colocar a la quinasa en una posición preferencial, cerca de sus sustratos (Dreyfuss y col., 1978; Dekowski y col., 1983; Baillie y col., 2005).

En su estado inactivo, la PKA consiste en un complejo de dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras (Fimia y Sassone-Corsi, 2001; Alberts y col., 2008). Cuando el AMPc se une a las unidades reguladoras, altera la conformación de éstas y causa la disociación del complejo activando las unidades catalíticas (Figura 8). Las unidades catalíticas activadas entonces fosforilan a sus blancos específicos, modificando su función (Dreyfuss y col., 1978). Por otro lado, las unidades reguladoras se unen a las proteínas ancla de las quinasas A (AKAP, A-kinase anchoring protein). Estas AKAP están unidas a un componente del citoesqueleto, por lo que enlazan a la proteína quinasa a un compartimiento subcelular particular (Fimia y Sassone-Corsi, 2001; Baillie y col., 2005).

Estudios realizados sobre el canal Gárdos demostraron que la salida de K^+ de los fantasmas de eritrocitos se veía reducida cuando éstos eran incubados en una solución que contenía AMPc y metilxantinas. Dado que el grado de fosforilación se observó reducido en aquellas condiciones que lleva-

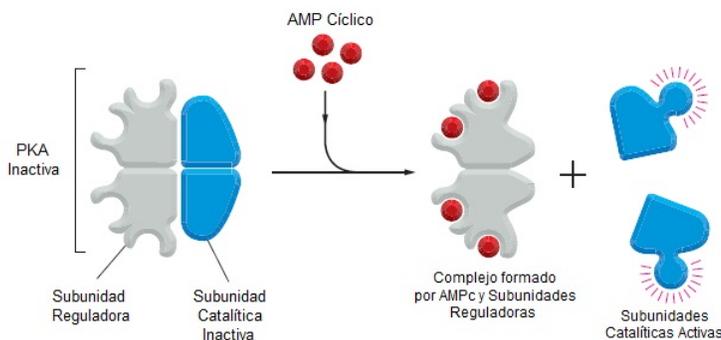


Fig. 8: Activación de la PKA. Tomado de Alberts y col. (2008).

ron a un incremento en los niveles de AMPc, los autores sugirieron un control inhibitorio del canal

por proteínas quinasas dependientes de AMPc a través de la activación de una fosfatasa (Romero y col., 1990).

En función de esto, Pellegrino y Pellegrini (1998) estudiaron, a nivel de canales unitarios, los efectos de activación o inhibición de PKA endógena sobre la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de la membrana de eritrocitos humanos; todo esto con la finalidad de explorar la modulación por proteína quinasa que podría ser responsable de la variación de la sensibilidad a Ca^{2+} de estos canales. Para estos experimentos usaron una solución experimental del lado intracelular que contenía AMPc, Mg-ATP y teofilina. Esta solución experimental promueve la fosforilación. Observaron que la actividad del canal se ve aumentada cuando se encuentran presentes sólo Mg-ATP y Ca^{2+} , pero que ésta se reduce a niveles normales cuando se agrega la solución experimental. De esta manera confirman, a nivel de canales unitarios, que la actividad de estos canales de la membrana de los glóbulos rojos está estrechamente regulada por la fosforilación mediada por PKA (Pellegrino y Pellegrini, 1998).

Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CNGC, Cyclic Nucleotide-Gated Channels)

Los canales que son activados por la unión de un nucleótido cíclico juegan un papel importante en la regulación del perfil excitatorio de las células del músculo cardíaco, así como en las neuronas visuales y olfatorias. Estos canales se dividen en canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC, Cyclic Nucleotide-Gated Channels) y canales activados por hiperpolarización modulados por nucleótidos cíclicos (HCNC, Hyperpolarization-activated and Cyclic Nucleotide-gated Channels) (Biel y col., 1999a,b; Craven y Zagotta, 2006; Biel, 2009; Schünke y Stoldt, 2013).

Ambos tipos de canales son proteínas tetraméricas cuyas subunidades están ordenadas alrededor de un poro central (Figura 9). Cada subunidad está compuesta por seis segmentos transmembrana (S1-S6), incluyendo la región que actúa como sensor de voltaje localizada en el segmento S4 (con residuos cargados positivamente), y regiones N- y C-terminales orientadas hacia el lado intracelular. El poro del canal iónico está formado por los segmentos transmembrana S5 y S6, con el *loop* del poro posicionado entre los dos segmentos (sin atravesar completamente la membrana). Los nucleótidos cíclicos se unen al sitio de unión de los nucleótidos cíclicos (CNBD, Cyclic Nucleotide-Binding

Introducción

Domain), ubicado en el extremo C-terminal de cada subunidad (Craven y Zagotta, 2006; Schünke y Stoldt, 2013).

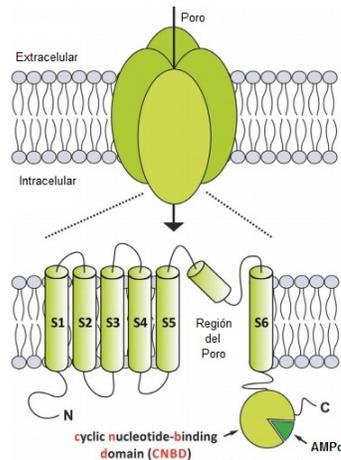


Fig. 9: Topología de los canales iónicos modulados por nucleótidos cíclicos: HCNC y CNGC. Ambos tipos de canales están compuestos por cuatro subunidades (arriba). Cada subunidad consiste de seis segmentos transmembrana (S1-S6), incluyendo regiones N- y C-terminal (abajo). La región C-terminal contiene un CNBD. Se señala también una molécula de AMPc en el modelo. Tomado de Schünke y Stoldt (2013).

Tanto en los HCNC como en los CNGC, el CNBD (que tiene aproximadamente 120 residuos) está directamente conectado con el segmento transmembrana S6 (Craven y Zagotta, 2006). Los HCNC se abren cuando la membrana se hiperpolariza, y la unión de los nucleótidos cíclicos modula la actividad del canal cambiando la dependencia de la activación con el voltaje hacia potenciales más positivos. En cambio, la unión directa de los nucleótidos cíclicos es requerida para abrir los CNGC. En estos canales la unión del ligando al CNBD favorece la apertura del canal mediante cambios conformacionales que probablemente se propaguen hasta el poro del canal. Sin embargo, los mecanismos subyacentes que activan estos canales no son conocidos todavía (Craven y Zagotta, 2006; Schünke y Stoldt, 2013).

Antecedentes

Senescencia del eritrocito humano

Como se señaló anteriormente, existen evidencias de que el estrés mecánico sobre la membrana del eritrocito aumenta la entrada de Ca^{2+} a la célula (Larsen y col., 1981). En función de esto, Romero y Romero (1999) estudian un canal de Ca^{2+} en la membrana de los eritrocitos, el cual es activado por estrés mecánico, y que tal activación es dependiente de la edad de la subpoblación utilizada, teniendo que eritrocitos de diferentes edades tratados con soluciones hipo- o hipertónicas en presencia de niveles normales de ATP presentan un aumento de la entrada de Ca^{2+} , particularmente en la subpoblación densa (correspondiente a células viejas). Este tipo de resultados parece indicar que en los eritrocitos viejos se ha producido un cambio, posiblemente relacionado con la membrana, que genera que estas células sean afectadas en mayor grado por el estrés mecánico producido sobre ellas (Romero, 2004). Adicionalmente, es bien sabido que la composición de los lípidos que forma cada lado de la bicapa de la membrana de los eritrocitos es asimétrica (Bretscher, 1972), siendo que en el lado exterior predominan la fosfatidilcolina y la esfingomiélin, mientras que del lado interno predominan la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina. Sin embargo, se presume que esta asimetría se pierde con el envejecimiento del eritrocito gracias a la acción de una scramblasa (Boas y col., 1998).

Se ha planteado una hipótesis que explica el disparo de los procesos de envejecimiento de los eritrocitos humanos. Ésta se fundamenta en que la concentración de Ca^{2+} aumenta gradualmente con la edad de la célula, por lo que dicho aumento debería pasar de gradual a abrupto alrededor del día 120, llevando a la célula a su muerte (Romero y col., 1997). Se propone que el canal Gárdos se activaría con el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , el cual sería consecuencia de la activación de una permeabilidad a Ca^{2+} que se cree es dependiente del estrés mecánico sobre la membrana a nivel de la microcirculación (cuando los glóbulos rojos pasan a través de los capilares

sanguíneos), lo que generaría la salida de K^+ de la célula y por consiguiente la pérdida de Cl^- , además de una hiperpolarización, que a su vez incrementaría la entrada de Ca^{2+} gracias a un proceso de retroalimentación positiva. La salida de esta sal impulsaría la salida de agua, por lo que la célula se haría más densa. En el Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica (IBE-UCV) llamamos a este planteamiento “hipótesis clásica de senescencia”.

En nuestro laboratorio se propone una hipótesis alternativa (Figura 10) que, en contraste con la hipótesis clásica, se basa en dos mecanismos: el canal de K^+ mecanoactivado del eritrocito humano A (HEMKCA, por sus siglas en inglés: Human Erythrocyte Mechano-activated K^+ Channel A) y el Intercambiador K^+/Ca^{2+} dependiente de voltaje. Ambos mecanismos se han podido observar utilizando la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp (ver página 22). Esta hipótesis propone que la célula, durante su paso por el capilar sanguíneo, se ve sometida a un gran estrés mecánico. Esto activa el HEMKCA, incrementando la permeabilidad de la membrana al K^+ y, a su vez, hiperpolarizando la membrana, lo que activa el intercambiador K^+/Ca^{2+} , que permite la entrada de Ca^{2+} al eritrocito. Así, estos dos mecanismos generan la salida del ión K^+ , y por consiguiente la salida de iones Cl^- y la concomitante salida de agua, haciendo que aumente la densidad de las células. Al salir del capilar sanguíneo, los mecanismos que se encuentran en la membrana del eritrocito vuelven a su estado inicial. Cada vez que la célula ingresa a un capilar, la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, lo que conlleva a la activación de las calpaínas, las cuales disminuirán la actividad de las bombas de Ca^{2+} . Debido a que estos efectos son acumulativos, llegará un punto en el que la capacidad de extraer Ca^{2+} de la célula será muy baja y las vías de salida de K^+ no se desactivarán, por lo que la membrana continuará hiperpolarizada, incrementando la entrada de Ca^{2+} y eventualmente la célula entrará en un proceso de desincorporación (Romero, 2004).

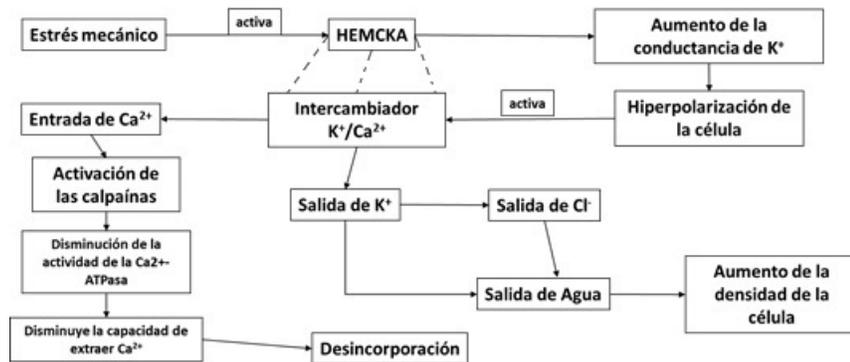


Fig. 10: Hipótesis del K^+ .

Corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+} en la membrana del Eritrocito Humano

Gracias a la utilización de la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp fueron evidenciadas por primera vez unas corrientes que no se presentaban como cambios abruptos de conductancia y que además eran de muy baja conductancia, cuando menos al comienzo del desarrollo de las mismas (Romero, 2003). Estas corrientes fueron denominadas corrientes microscópicas (I_{mic}), ya que no eran del tipo de canal unitario y eran de una amplitud mucho menor. Igualmente, se reportó que no se comportaban de manera óhmica y que presentaban mayor amplitud cuando se desarrollan a potenciales positivos que a potenciales negativos. A potenciales positivos, el intercambiador funciona transportando K^+ hacia afuera de la célula y permitiendo la entrada de Ca^{2+} a ésta, por lo que se dice que éste es su modo directo de funcionamiento. A potenciales negativos ocurre lo contrario y por lo tanto se dice que éste es su modo inverso de funcionamiento (Figuras 11a y 11b). Con base en esto fueron diseñados y llevados a cabo experimentos que demostraron la existencia de un mecanismo electrogénico de intercambio que permite la salida de K^+ y la entrada de Ca^{2+} al eritrocito (Romero, 2004).

Experimentos realizados posteriormente en nuestro laboratorio determinaron que la estequiometría de este intercambiador es de 12:1 y que éste presenta una secuencia de permeabilidad para cationes monovalentes de $K^+ > Rb^+ \gg Cs^+$; y para cationes divalentes de $Ca^{2+} > Ba^{2+} \gg Mg^{2+}$ (Matthes, 2005). Además, se determinó que el Na^+ no es transportado por este intercambiador (Forsyth, 2006). Por otro lado, Galué (2008) determinó que al someter a la membrana al estrés oxidativo, por el lado intracelular o por ambos lados de la membrana, con Ter-Butil Hidroperóxido (t-BPH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las corrientes desarrolladas por el intercambiador se ven disminuidas con respecto a la condición control, siendo este efecto dependiente de la concentración del agente

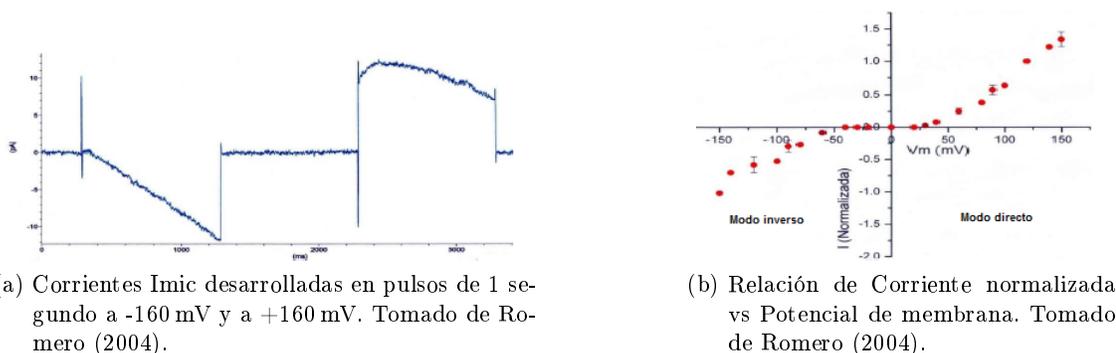


Fig. 11: Corrientes I_{mic} . Tomado de Romero (2004).

oxidante utilizado y más evidente en el modo directo (modo de salida de K^+) del intercambiador (Galué, 2008). También fue determinado que esta disminución en la actividad del intercambiador es debida al proceso de permeación del mecanismo, y que el estrés oxidativo no afecta su dependencia con el potencial de membrana. Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador (Galué, 2008).

Adicionalmente fue estudiado el efecto de la concentración intracelular de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador (Guerra, 2012). Estos experimentos concluyeron que:

- El ATP-Mg aumenta la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} de manera dosis-dependiente, observándose un efecto mayor en el modo inverso del intercambiador.
- El proceso de permeación del intercambiador también se ve afectado por el ATP-Mg, siendo más pronunciado el efecto en el modo inverso del intercambiador.
- El ATP-Mg disminuye la dependencia de potencial de la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} .
- El desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador es más lento en presencia de ATP-Mg.
- Los mecanismos responsables de la activación, desactivación y transporte en el intercambiador K^+/Ca^{2+} son susceptibles a modulación por parte del ATP-Mg desde el lado intracelular.

Corrientes Instantáneas del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Entre los estudios realizados en nuestro laboratorio se encuentra la caracterización de las corrientes instantáneas del intercambiador, las cuales dependen únicamente de la permeabilidad de éste. Éstas se obtienen al aplicar un pulso activante justo antes del pulso de prueba, eliminando así la fase de activación del mecanismo, que es dependiente de potencial. Por esta razón, las curvas que se generan a partir de estos datos conforman líneas rectas que muestran el comportamiento óhmico del proceso de permeación del intercambiador. La pendiente de estas curvas es mayor en el modo directo del

intercambiador que en su modo inverso, lo que indica que la tasa de transporte en este modo es mayor que en el contrario.

Desactivación del Intercambiador K^+ / Ca^{2+}

También se han desarrollado estudios que miden el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador. El protocolo utilizado con este fin consiste en dos pulsos iguales de ± 160 mV, variando el tiempo transcurrido entre pulsos. De esta manera es posible cuantificar el nivel de activación del intercambiador desde que finaliza el pulso activante hasta que comienza el segundo pulso. Las curvas obtenidas con este protocolo forman exponenciales negativas con una constante temporal τ que es mayor para el modo inverso que para el modo directo, lo que se traduce en que el proceso de desactivación es más lento en el modo de entrada de K^+ que en el de salida de este ion.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar los efectos del AMPc sobre el funcionamiento del intercambiador K^+/Ca^{2+} dependiente de voltaje de la membrana del eritrocito humano.

Objetivos Específicos

- Determinar la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} bajo condiciones fisiológicas.
- Estudiar la activación del contra-transporte y las corrientes desarrolladas por el paso de iones K^+ y Ca^{2+} a través de éste bajo diferentes concentraciones de AMPc del lado intracelular.
- Estudiar el efecto del AMPc sobre la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} .

Materiales y Métodos

Obtención del material biológico

Para la determinación del efecto del AMPc sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano se utilizaron glóbulos rojos tomados de donantes sanos, obtenidos por punción epidérmica y que fueron utilizados inmediatamente para los experimentos electrofisiológicos sin ningún otro tratamiento. Usando una micropipeta con $5 \mu L$ de la solución normal (descrita en la Tabla 2) previamente filtrada con filtros para inyectora de poro de $0,22 \mu m$, se tomó $1 \mu L$ de muestra, directamente sobre la piel y se colocó en la cámara experimental, la cual contenía la solución experimental (descrita en la Tabla 2).

Soluciones utilizadas

Inicialmente se usó la solución normal (Tabla 2) tanto en la cámara experimental como en la pipeta (condiciones simétricas), lo que representa la condición control. Posteriormente se usaron en la cámara tres soluciones experimentales con concentraciones diferentes de AMPc, creando un gradiente de éste hacia la pipeta, es decir, hacia el exterior celular.

Tabla 2: Composición de las soluciones normal y experimentales.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
NORMAL	140 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 10 mM TRIS
EXPERIMENTAL 1	140 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 10 mM TRIS, 0,1 μM AMPc
EXPERIMENTAL 2	140 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 10 mM TRIS, 1,0 μM AMPc
EXPERIMENTAL 3	140 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 10 mM TRIS, 10,0 μM AMPc

Medidas electrofisiológicas

El T.U.G.O. (The U-Shaped Giga Ohm) Patch Clamp

Todos los experimentos fueron realizados usando la técnica del Patch Clamp en su modalidad T.U.G.O. Patch Clamp, desarrollada especialmente en nuestro laboratorio con la finalidad de simular en algún grado los cambios mecánicos que se dan sobre los eritrocitos cuando éstos pasan a través del lecho capilar, particularmente manipulando los cambios de presión sobre ellos y estudiar los procesos que se dan en las membranas de éstas células desde el punto de vista electrofisiológico (Romero, 2004). En el Patch Clamp convencional, luego de fabricar la micropipeta, el diámetro de ésta se reduce puliendo la punta con una microforja, asegurando que el parche aislado de membrana sea lo más pequeño posible. En el T.U.G.O. Patch Clamp las paredes de la pipeta son prácticamente paralelas y su apertura interna es lo suficientemente grande como para permitir que una parte importante de la membrana de la célula permanezca en el interior de la pipeta —teniendo una gran área de contacto con las paredes internas de ella, donde se forma el sello eléctrico—, pero sin permitir el paso de la célula entera hacia ésta (Figura 12).

En el Patch Clamp clásico, debido a la forma de la pipeta, la membrana asociada ésta toma una forma de “Ω”, mientras que en el T.U.G.O. Patch Clamp la membrana toma forma de “U” invertida, en donde se supone que la porción de membrana que se encuentra en contacto con la pipeta tiene una forma cónica y mide entre 3 y 8 μm , mientras que la región de la membrana que está bajo control de potencial adopta una forma semiesférica (Figura 13 en la página siguiente).

Las pipetas a utilizar fueron elaboradas a partir de capilares de borosilicato con las siguientes medidas: diámetro externo: 1,5 mm, diámetro interno: 0,86 mm y 10 cm de largo (Sutter Instruments CO., Novato CA, USA). Estos capilares fueron halados en dos pasos, con ayuda de un *puller* vertical por gravedad, modelo 700C (David Kopf Instruments, Tujunga CA, USA). Únicamen-

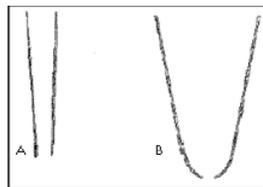


Fig. 12: Comparación de la forma de la pipeta usada en T.U.G.O. Patch Clamp con la usada en el Patch Clamp convencional. (A) Forma de la pipeta usada en el T.U.G.O. Patch Clamp vs (B) Forma de la pipeta usada en el Patch Clamp convencional. Tomado de Romero (2004).

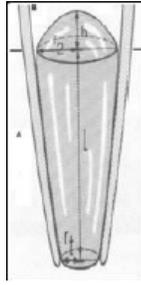


Fig. 13: Esquema de la región de membrana del eritrocito en el interior de la pipeta en el T.U.G.O. Patch Clamp. (A) Región cónica que conforma el sello eléctrico. (B) Región semi-esférica. Tomado de Romero (2004).

te se utilizaron las pipetas que presentaron una resistencia entre 11 y 14 M Ω en la solución normal.

La visualización de las células se hizo mediante el uso de un microscopio invertido Nikon Diaphot (Nikon CO., LTD, Tokio, Japón), con oculares de 10 X CFW y objetivos de 20 y 40 DL, y para la manipulación de las pipetas se utilizó un micromanipulador hidráulico Narishige modelo MO-203 (Narishige CO, LTD, Tokio, Japón).

La formación del sello eléctrico se realizó seleccionando un eritrocito para hacer el patch, luego de que éstos se asientan en el fondo de la cámara. A continuación, usando el micromanipulador, se colocó la punta de la pipeta frente al eritrocito y se succionó hacia dentro de ella con ayuda de una inyectora hasta obtener un sello estable de alta resistencia (un valor de entre 1 y 3 G Ω). Luego se pasó de la configuración *cell-attached* a la configuración *inside-out* rozando la punta de la pipeta con el fondo de la cámara hasta que se rompió la zona de membrana que sobresale de ésta y se liberó el contenido intracelular, de manera que la solución en la cámara pase a hacer el papel de solución intracelular (Figura 14).

Protocolo para agregar AMPc a la cámara

Para determinar el efecto del AMPc sobre la actividad del intercambiador se incorporó AMPc en la solución de la cámara experimental en distintas concentraciones (0,1 μ M, 1,0 μ M y 10,0 μ M) utilizando una micropipeta P10.

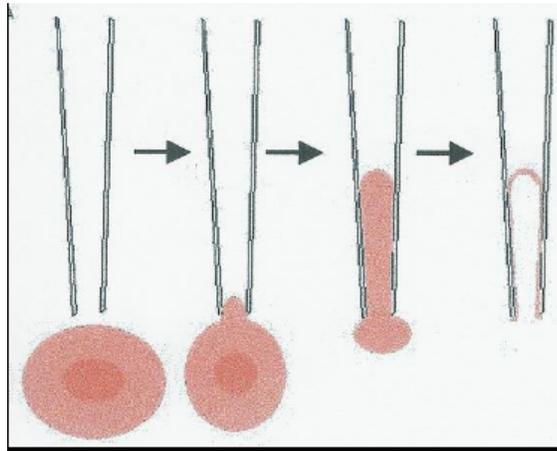


Fig. 14: Esquema del posible proceso de formación del sello. Tomado de Romero (2004).

Las soluciones stock de AMPc que se agregaron a la cámara experimental fueron preparadas utilizando la misma solución normal usada para los experimentos control, y el mayor volumen agregado a la cámara es de $19 \mu\text{L}$ en un volumen de $980 \mu\text{L}$, lo que asegura que no se produzcan cambios osmóticos importantes en la solución experimental.

Protocolos de estimulación

A continuación se presentan los diferentes protocolos de estimulación que se aplicaron a los parches de membrana.

PROTOCOLO DE SUSTRACCIÓN DE FUGA

Al aplicar los protocolos de estimulación, las corrientes obtenidas incluyen corrientes producidas por el intercambiador y corrientes producidas por las características físicas de la membrana (capacitativas) y por las características del sello eléctrico (óhmicas); para poder registrar sólo aquellas producidas por el intercambiador, es necesario sustraer las otras de las corrientes totales registradas, ya que éstas son mayores que las que pueda desarrollar el intercambiador e impiden su estudio.

El protocolo de sustracción tipo P/N se aplicó antes de cada protocolo de estimulación. En este caso consiste en aplicar 10 veces un pulso con un décimo de la amplitud del pulso final, alternando el signo de éste. Este protocolo se denomina P/10 (Figura 15 en la página siguiente). Cada uno de estos pulsos generará un 10 % de la corriente total de fuga que se registra en el pulso final. La suma de todas las corrientes obtenidas en cada uno de los 10 pulsos resulta en el 100 % de las corrientes registradas en el pulso final que no son producidas por la acción de la proteína estudiada. Se usa un voltaje de un décimo del pulso final ya que a estos voltajes no se desarrolla la corriente del

intercambiador (siendo ± 16 mV la amplitud máxima del prepulso), sino que sólo se desarrollan las corrientes que se desea sustraer de las totales.

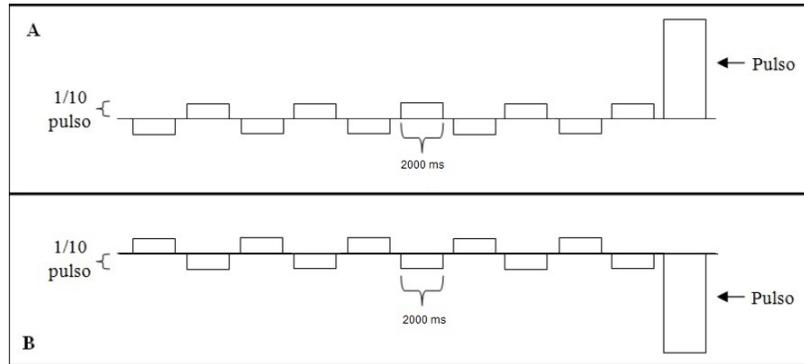


Fig. 15: Esquema del protocolo de sustracción de fuga P/10. (A) Protocolo P/10 con un pulso de prueba con voltaje positivo. (B) Protocolo P/10 con un pulso de prueba con voltaje negativo. Modificado de Guerra (2012).

Es posible aplicar protocolos de sustracción con más de 10 pulsos. Sin embargo, al sumar cada una de las corrientes obtenidas en cada prepulso también se está sumando el ruido asociado a cada una de ellas, lo que podría generar un ruido de una amplitud que afecte la medición de las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} .

PROTOCOLO I vs. V

Para el estudio del efecto de las diferentes concentraciones del AMPc sobre la activación de las corrientes del intercambiador se aplicó el protocolo IV. Con esto es posible la construcción de curvas de Corriente contra Voltaje, en las que se puede observar el desarrollo de las corrientes del intercambiador. Se realizaron los protocolos con pulsos cuadrados de voltaje, cada uno de una duración de 2 segundos, con una amplitud que va de 0 a ± 160 mV, alejándose de cero en pasos de ± 20 mV (Figura 16).

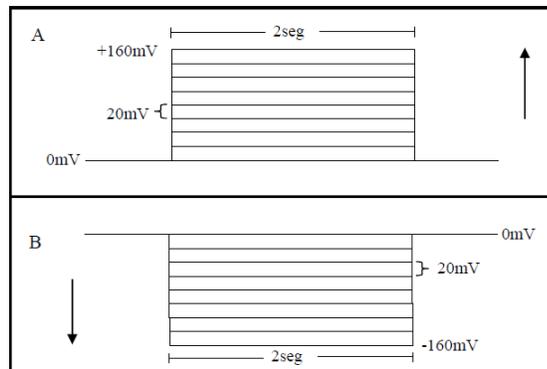


Fig. 16: Esquema de los protocolos de estimulación para la construcción de las curvas I/V. (A) Pulsos de 0 a +160 mV. (B) Pulsos de 0 a -160 mV. Tomado de Guerra (2012).

PROTOCOLO DE CORRIENTES INSTANTÁNEAS (INST)

Con este protocolo se pretende eliminar el efecto de la dependencia de potencial sobre la activación de las corrientes del intercambiador, de forma que sólo se observen los cambios de la permeabilidad como consecuencia de la variación de la concentración de AMPc en la cámara.

Este protocolo consiste en dos pulsos: el primero es activante, el cual posee una magnitud de +160 mV o de -160 mV, e inmediatamente después se aplica un pulso que empieza en ± 160 y va acercándose a cero en pasos de ± 40 mV dependiendo del signo del pulso activante. La duración del primer pulso es de 2000 ms, mientras que el segundo pulso se aplica solamente por 500 ms (Figura 17).

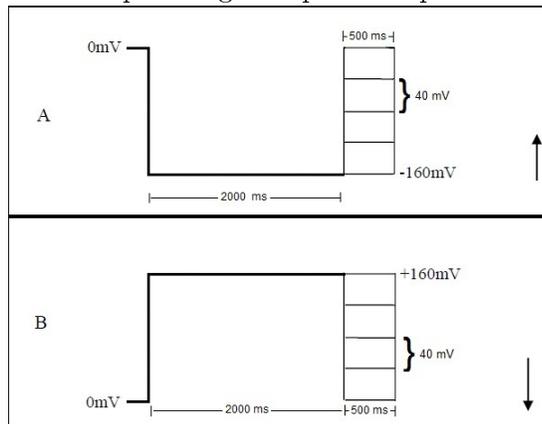


Fig. 17: Esquema de los protocolos de estimulación para las corrientes instantáneas, INST. (A) Pulso activante de +160 mV. (B) Pulso activante de -160 mV. Modificado de Guerra (2012).

PROTOCOLO DEAC

Con este protocolo se determinó el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador. Esto se consigue disminuyendo el tiempo entre pulsos.

El protocolo DEAC consiste en aplicar 2 pulsos iguales de ± 160 mV, con una duración entre los pulsos que varía desde 3000 ms a 0 ms en pasos de 500 ms para los potenciales positivos, y de 6000 ms a 0 ms en pasos de 1000 ms para potenciales negativos. La duración del primer pulso —el activante— es de 2000 ms, mientras que la duración del segundo es de 250 ms (Figura 18).

La forma ideal de expresar las corrientes que se obtuvieron, a fin de poder compararlas entre los distintos experimentos, sería la de densidad de corriente (pA por unidad de área de membrana). Sin embargo, al usar el método del T.U.G.O. Patch Clamp es prácticamente imposible medir la cantidad de membrana que se encuentra bajo control de potencial dentro de la pipeta. Por esta razón las corrientes IV e instantáneas se estandarizaron con respecto al valor obtenido con el pulso de +120 mV, ya que este potencial se obtienen unas corrientes bastante evidentes en las que el ruido no es tan significativo como a otros potenciales. En el caso de las corrientes de desactivación, los

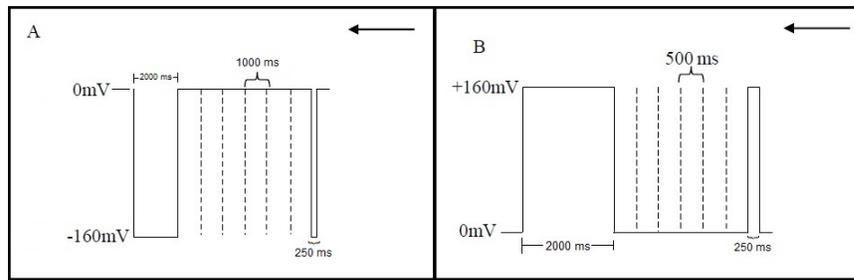


Fig. 18: Esquema de los protocolos de estimulación para construir las curvas de desactivación DEAC. (A) Pulsos de +160 mV. (B) Pulsos de -160 mV. Modificado de Guerra (2012).

datos se presentan como una relación entre la corriente máxima obtenida con el pulso activante y el valor de corriente obtenido en el instante en el que comienza el segundo pulso.

Adquisición de los datos

Las corrientes fueron adquiridas en modo Voltage-Clamp, con una ganancia de 100 mV/pA, con un filtro pasa-bajos a 1 KHz, para lo cual se utilizó un amplificador AXOPATCH-1C (Axon Instrumen, Burlingame, CA, USA). Simultáneamente se empleó un filtro de línea HumBug (50/60 Hz Noise Eliminator; Quest Scientific, North Vancouver, BC, Canada) para eliminar el ruido de 60 ciclos proveniente de la línea de corriente.

Para la digitalización de los datos se usó una interfase IT-16 (Instrutech, Port Washington, NY, USA), empleando un programa de control y adquisición PULSE (Heka, Lambrecht, Alemania).

Análisis estadístico

Como ya se dijo, la forma ideal de expresar las corrientes medidas sería la de densidad de corriente, es decir, picoamperios de corriente por unidad de área de membrana. Sin embargo, debido a la forma de las pipetas utilizadas en el T.U.G.O. patch clamp, es prácticamente imposible determinar la cantidad de membrana de eritrocito que se encuentra bajo control de potencial durante el experimento. Es por esto que las corrientes se estandarizan dividiéndolas entre el valor obtenido a un potencial de +120 mV durante el experimento control. Como consecuencia de esto, no es posible aplicar pruebas estadísticas que sean confiables para este tipo de datos. Es por esta razón que no se presenta un análisis estadístico de los datos que apoye las evidencias observadas.

Resultados

Efecto del AMPc sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+}

El desarrollo de las corrientes del intercambiador se estudió con el uso del protocolo IV (Figura 16). El control para estos experimentos presenta un $n=15$ en los potenciales con menos réplicas y $n=22$ en los potenciales con mayor número de réplicas. Puede observarse en la Figura 19, donde se demuestra que las corrientes obtenidas con este protocolo presentan características de dependencia no lineal con el potencial de membrana, teniéndose que el potencial de reversión se encuentra a 0 mV y que las corrientes que se desarrollan en el modo directo son mayores que aquellas obtenidas en el modo inverso.

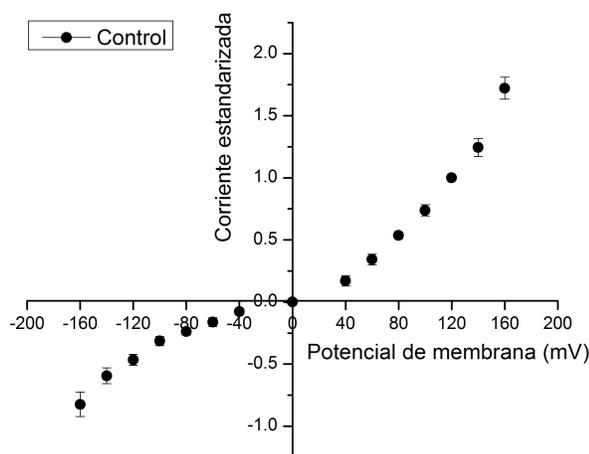


Fig. 19: Curva I/V control. Los círculos negros representan los valores de corriente estandarizados con respecto al valor obtenido al potencial de +120 mV acompañados por las barras de error estándar, teniendo $n_{mínimo}=15$ y $n_{máximo}=22$.

Una vez establecido este control, se probó el efecto del AMPc sobre estas corrientes:

CURVA IV EN PRESENCIA DE $0,1 \mu M$ AMPc:

La Figura 20 muestra que el AMPc reduce la magnitud de las corrientes producidas por el intercambiador. Esta inhibición presenta un valor promedio de 29,18 % (30,80 % en el modo inverso y

27,57 % en el modo directo). Puede verse, además, que la presencia del nucleótido no afecta la forma de la curva generada, es decir, éstas mantienen sus características de dependencia no lineal con el potencial de membrana impuesto.

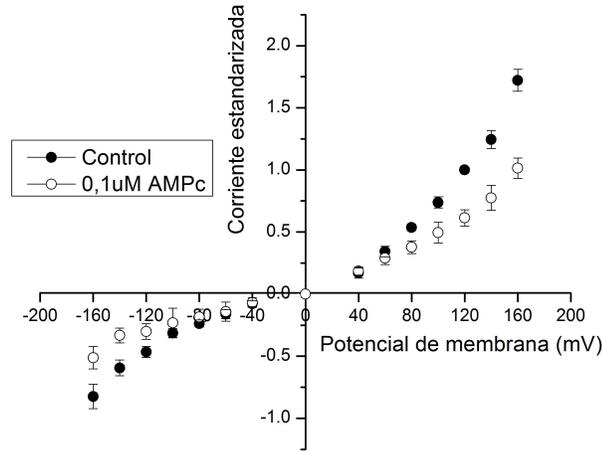


Fig. 20: Curva I/V para el efecto del AMPc con una concentración de $0,1 \mu\text{M}$ sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los círculos negros representan las corrientes obtenidas en la condición control ($n_{\text{mínimo}}=15$, $n_{\text{máximo}}=22$), mientras que los círculos blancos representan las corrientes desarrolladas por el intercambiador en presencia de $0,1 \mu\text{M}$ de AMPc ($n_{\text{mínimo}}=4$, $n_{\text{máximo}}=11$). Ambas curvas van acompañadas por sus barras de error estándar.

CURVA IV EN PRESENCIA DE $1,0 \mu\text{M}$ AMPc:

En la Figura 21 se observa que el efecto inhibitorio causado por la presencia de AMPc a una concentración de $1,0 \mu\text{M}$ es aun mayor, en promedio, que aquel obtenido a una concentración de AMPc de $0,1 \mu\text{M}$, siendo que la inhibición promedio es de 32,43 %. Sin embargo, en este caso, la inhibición en el modo directo (37,73 %) es mayor que la producida en el modo inverso (27,13 %); es decir, que la inhibición por AMPc es más fuerte en el modo de salida de K^+ que en el modo de entrada de este ión. Igualmente puede notarse que la presencia del nucleótido no afecta la forma de las curvas generadas, ya que éstas mantienen sus características de dependencia no lineal con respecto al potencial de membrana impuesto.

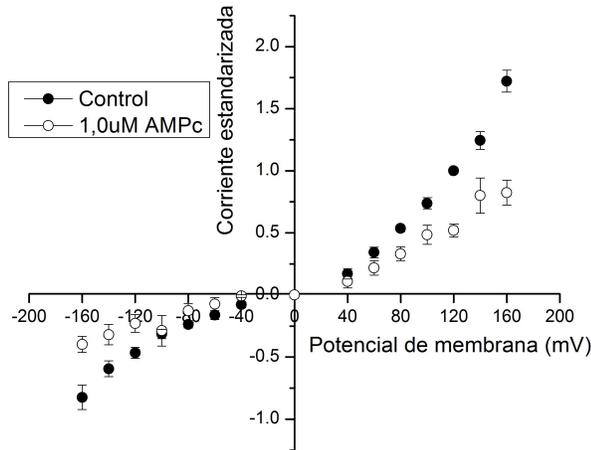


Fig. 21: Curva I/V para el efecto del AMPc con una concentración de $1,0 \mu\text{M}$ sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los círculos negros representan las corrientes obtenidas en la condición control ($n_{\text{mínimo}}=15$, $n_{\text{máximo}}=22$), mientras que los círculos blancos representan las corrientes desarrolladas por el intercambiador en presencia de $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc ($n_{\text{mínimo}}=7$, $n_{\text{máximo}}=9$). Ambas curvas están acompañadas por sus barras de error estándar.

CURVA IV EN PRESENCIA DE $10,0 \mu\text{M}$ AMPc:

En la Figura 22 está representado el efecto inhibitorio del AMPc a una concentración de $10,0 \mu\text{M}$. En este caso el porcentaje de inhibición promedio asciende a $42,95 \%$, siendo el más alto obtenido hasta ahora. Es de notar que la inhibición promedio en el modo inverso ($52,86 \%$) es mayor que aquella registrada en el modo directo ($33,03 \%$). Una vez más, las características de dependencia no lineal con el potencial de membrana no se ven afectadas por la acción del inhibidor.

DEPENDENCIA DE LA INHIBICIÓN CON EL POTENCIAL DE MEMBRANA (V_m)

A continuación se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos en cada experimento a los diferentes potenciales de membrana impuestos, y bajo las diferentes concentraciones de AMPc utilizadas (Figura 23 para el modo directo y Figura 24 para el modo inverso). Con estos datos se realizó un ajuste lineal, obteniéndose en todos los casos que el porcentaje de inhibición con respecto al potencial de membrana es extremadamente variable. En todos los casos, al tratar de buscar alguna correlación entre estas variables se obtuvieron líneas rectas con pendientes cercanas a cero, indicando que no existe correlación entre estas dos variables.

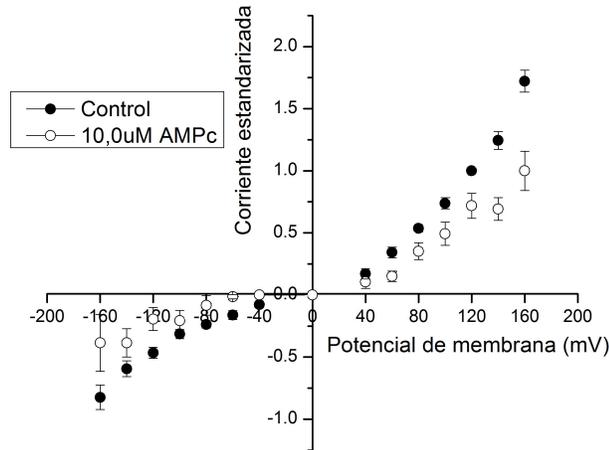


Fig. 22: Curva I/V para el efecto del AMPc con una concentración de $10,0 \mu\text{M}$ sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los círculos negros representan las corrientes obtenidas en la condición control ($n_{\text{mínimo}}=15$, $n_{\text{máximo}}=22$), mientras que los círculos blancos representan las corrientes desarrolladas por el intercambiador en presencia de $10,0 \mu\text{M}$ de AMPc ($n_{\text{mínimo}}=4$, $n_{\text{máximo}}=6$). Ambas curvas van acompañadas por sus barras de error estándar.

DEPENDENCIA DE LA INHIBICIÓN CON LA CONCENTRACIÓN DE AMPc

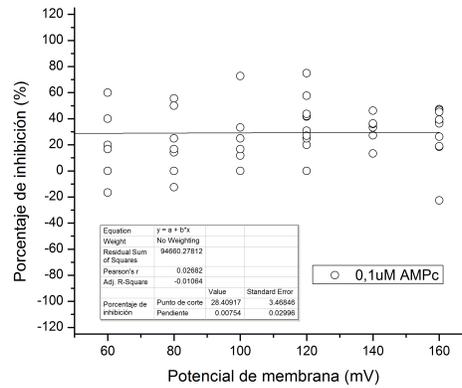
En contraste con lo observado al estudiar la dependencia de la inhibición con el potencial de membrana, cuando se estudia la relación que existe entre el porcentaje de inhibición bajo las diferentes concentraciones de AMPc a un mismo potencial (Figura 25), se obtiene que existe una curva logística que se satura después de una concentración de $1 \mu\text{M}$.

En este punto es evidente que el AMPc produce un efecto inhibitorio sobre las corrientes producidas por este intercambiador, sin embargo, con los datos presentados hasta ahora es imposible saber si esta inhibición afecta directamente al proceso de activación del mecanismo o si su efecto recae sobre las vías de permeación de éste. Para definir esto, es necesario observar el comportamiento de las corrientes instantáneas en presencia del nucleótido cíclico.

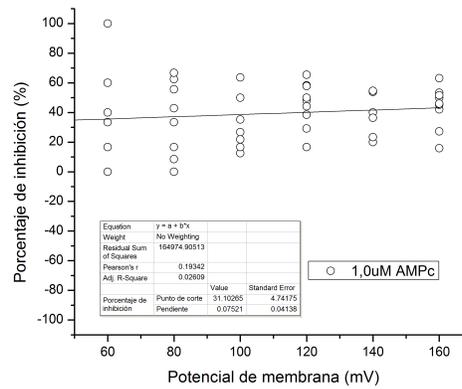
Efecto del AMPc sobre la vía de permeación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$

El primer paso fue establecer un control del comportamiento de las corrientes instantáneas del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ mediante el uso del protocolo INST (Figura 17 en la página 26). Este control presenta un $n=13$ y se muestra en la Figura 26. En ella se puede observar que las corrientes instantáneas tienen un comportamiento aproximadamente óhmico, pues tienen un crecimiento lineal

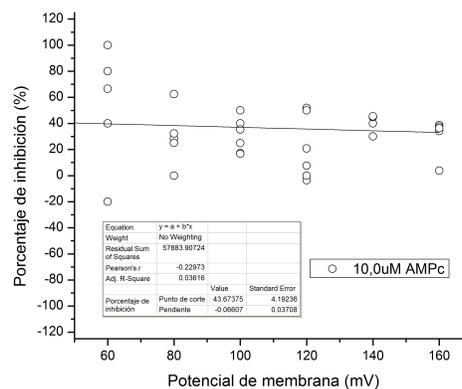
Resultados



(a) Porcentaje de inhibición obtenido para el modo directo con $0,1 \mu\text{M}$ de AMPc.



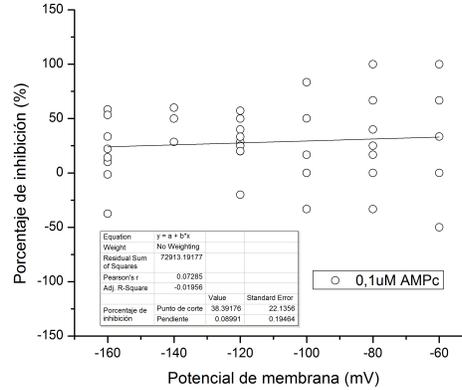
(b) Porcentaje de inhibición obtenido para el modo directo con $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc.



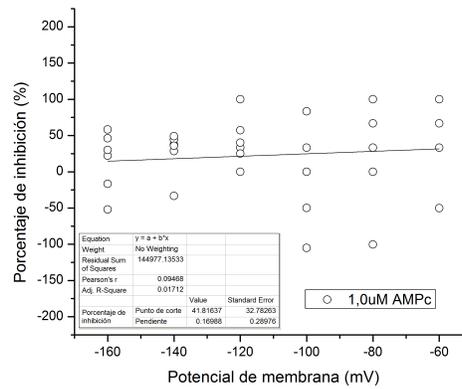
(c) Porcentaje de inhibición obtenido para el modo directo con $10,0 \mu\text{M}$ de AMPc.

Fig. 23: Porcentaje de inhibición obtenido para el modo directo bajo el efecto del AMPc a las diferentes concentraciones utilizadas. Los puntos en blanco representan los valores obtenidos en cada experimento, mientras que la línea representa el mejor ajuste calculado para estos datos. Se presenta una tabla donde se resumen los parámetros de dicho ajuste.

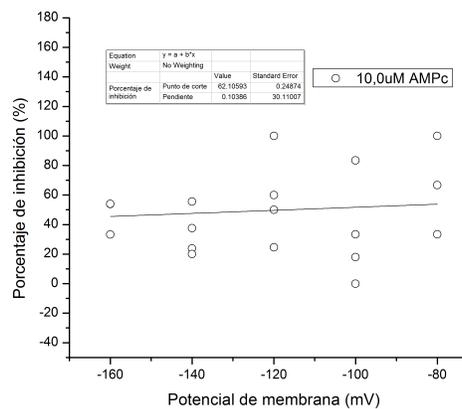
Resultados



(a) Porcentaje de inhibición obtenido para potenciales negativos con $0,1 \mu\text{M}$ de AMPc.



(b) Porcentaje de inhibición obtenido para potenciales negativos con $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc.



(c) Porcentaje de inhibición obtenido para potenciales negativos con $10,0 \mu\text{M}$ de AMPc.

Fig. 24: Porcentaje de inhibición obtenido para potencias negativas bajo el efecto del AMPc a las diferentes concentraciones utilizadas. Los puntos en blanco representan los valores obtenidos en cada experimento, mientras que la línea representa el mejor ajuste calculado para estos datos. Se presenta además una tabla donde se resumen los parámetros de dicho ajuste.

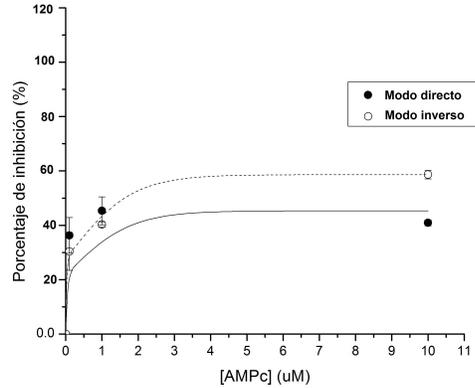


Fig. 25: Porcentaje de inhibición promedio obtenido a un potencial de ± 120 mV en presencia de las distintas concentraciones de AMPc.

con el potencial de membrana, y que la pendiente de la recta en el modo directo es mayor que la pendiente para el modo inverso, lo cual es consistente con lo probado en trabajos anteriores (Romero, 2004; Matthes, 2005; Forsyth, 2006; Galué, 2008; Guerra, 2012; Paredes, 2012).

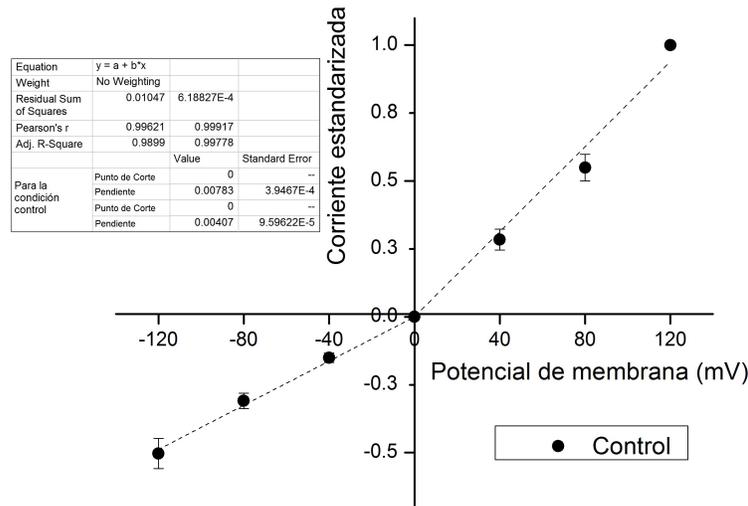


Fig. 26: Curva control de corrientes instantáneas (n=13). Los círculos negros representan las corrientes obtenidas al inicio del segundo pulso del protocolo INST para cada potencial de membrana impuesto acompañados por sus barras de error estándar. Se presenta además una tabla que contiene los parámetros del ajuste lineal.

CORRIENTES INSTANTÁNEAS EN PRESENCIA DE $0,1 \mu\text{M}$ DE AMPc:

El siguiente paso fue colocar AMPc en la cámara experimental a una concentración de $0,1 \mu\text{M}$ para estudiar los efectos de este nucleótido sobre la vía de permeación del intercambiador. En la

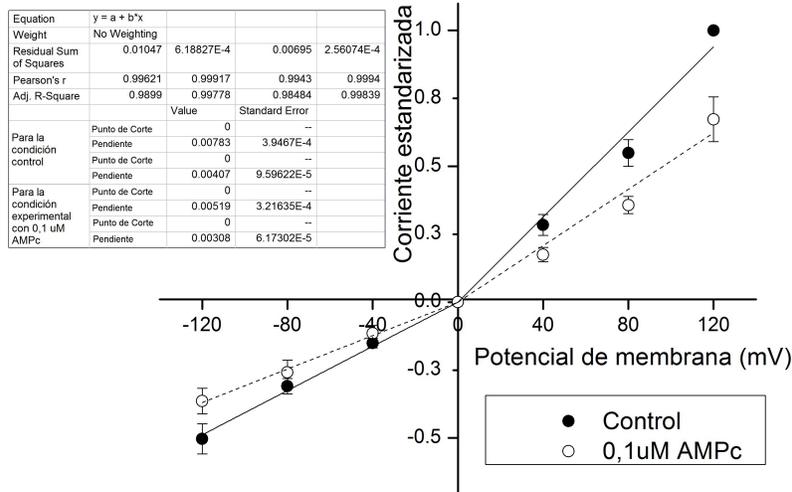


Fig. 27: Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de $0,1 \mu M$ de AMPc en el baño. Los círculos negros representan la condición control ($n=13$), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con $0,1 \mu M$ de AMPc ($n_{mínimo}=7$, $n_{máximo}=9$). Ambas curvas van acompañadas por sus barras de error estándar y se presenta una tabla con los datos correspondientes al ajuste lineal de cada curva.

Figura 27 puede observarse que el AMPc produce una disminución en la pendiente de la recta con respecto al control. Este cambio es más notable en el modo directo (33,72 % de disminución) que en el modo inverso (24,32 % de disminución).

CORRIENTES INSTANTÁNEAS EN PRESENCIA DE $1,0 \mu M$ DE AMPc:

La Figura 28 muestra la curva obtenida bajo la condición experimental en comparación con la obtenida en el control. Una vez más, puede verse que la acción del nucleótido en el baño produce una disminución mayor de la permeabilidad del intercambiador que la producida a una concentración de $0,1 \mu M$, teniéndose que cambia de 0,00783 a 0,00449 (42,66 % de disminución) en el modo directo y de 0,00407 a 0,00186 (54,29 % de disminución) en el modo inverso.

CORRIENTES INSTANTÁNEAS EN PRESENCIA DE $10,0 \mu M$ DE AMPc:

Utilizando una concentración del nucleótido de $10,0 \mu M$ (Figura 29) se obtiene que la pendiente de la curva cambia de 0,00783 a 0,00528 (32,57 % de disminución) en el modo directo y de 0,00407 a 0,00246 (39,56 % de disminución) en el modo inverso.

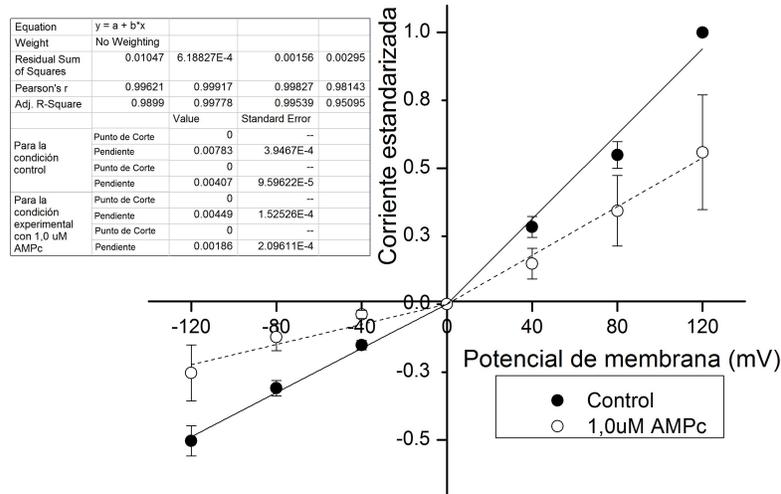


Fig. 28: Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de $1,0 \mu M$ de AMPc en el baño. Los círculos negros representan la condición control ($n=13$), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con $1,0 \mu M$ de AMPc ($n_{mínimo}=5$, $n_{máximo}=7$). Ambas curvas van acompañadas de sus barras de error estándar y se presenta una tabla con los datos correspondientes al ajuste lineal de cada curva.

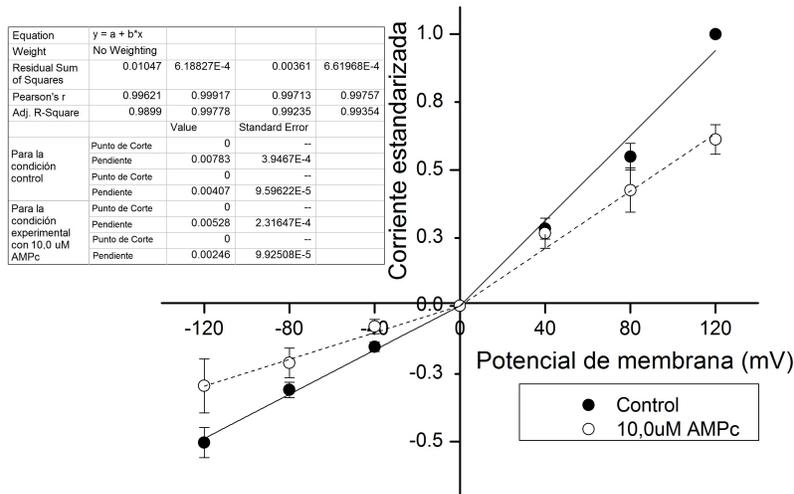


Fig. 29: Corrientes desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de $10,0 \mu M$ en el baño. Los círculos negros representan la condición control ($n=13$), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con $10,0 \mu M$ de AMPc ($n=5$). Ambas curvas van acompañadas de sus barras de error estándar y se presenta una tabla con los datos correspondientes al ajuste lineal de cada curva.

En todos los casos el AMPc causa una disminución en la permeabilidad del intercambiador tanto en el modo directo como en el modo inverso, sin afectar el comportamiento óhmico de las corrientes generadas. Esto se muestra en la Figura 30, en donde se observa que la tendencia es a la disminución de la pendiente de la recta a la que se ajustan los datos obtenidos con el protocolo INST. Es importante destacar, sin embargo, que los errores asociados a los datos registrados a una concentración de $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc son altos.

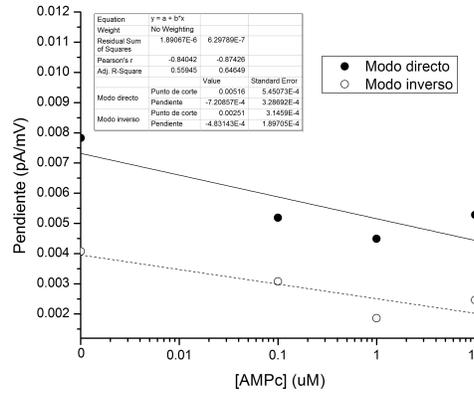
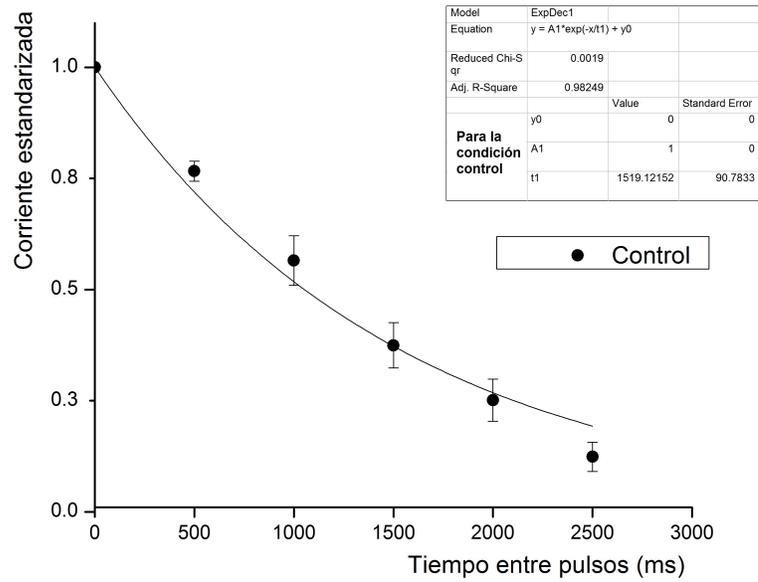


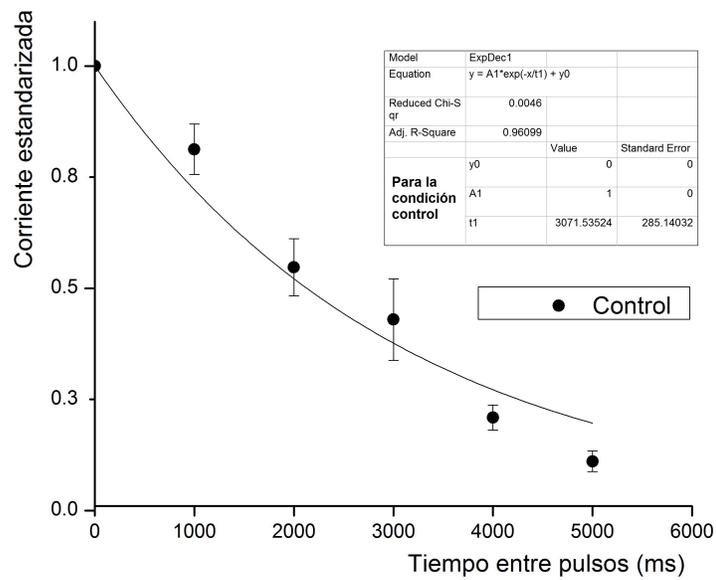
Fig. 30: Pendiente de la recta obtenida mediante el protocolo de corrientes instantáneas con respecto a la concentración de AMPc. Los puntos negros corresponden a los valores de pendiente obtenidos para el modo directo, mientras que los puntos blancos corresponden a aquellos que se obtienen para el modo inverso. Se muestran las líneas de tendencia correspondientes (la línea continua para el modo directo y la línea punteada para el modo inverso). Se muestra una tabla que contiene los parámetros correspondientes al ajuste lineal realizado.

Efecto del AMPc sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$

Por último, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de AMPc sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ utilizando el protocolo DEAC (Figura 18). De igual manera, se trabajó en establecer un control de la desactivación del intercambiador. Este control se presenta en la Figura 31, donde puede verse que la curva obtenida a ambos potenciales corresponde a una exponencial negativa con una $\tau_d=1519,12 \text{ ms}$ en el modo directo y una $\tau_i=3071,54 \text{ ms}$ en el modo inverso.



(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo directo. Condición control (n=7).



(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo inverso. Condición control (n=6).

Fig. 31: Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} : Condición control. Ambas curvas vienen acompañadas por sus barras de error estándar y una tabla que contiene los parámetros del ajuste exponencial.

DESARROLLO TEMPORAL DE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR EN PRESENCIA DE 0,1 μM DE AMPc:

Una vez establecido el comportamiento del intercambiador en la condición control, se agregó AMPc en la cámara a una concentración de 0,1 μM y se procedió a repetir el experimento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32. En ella se puede observar que en el modo directo el AMPc no produce un efecto sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador en el modo directo, teniéndose que la τ_d aumenta de 1519,12 a 1634,97 (7,57 % de aumento), mientras que en el modo inverso sí se observa un efecto inhibitorio, teniéndose que la τ_i aumenta de 3071,53 a 5085,28 (65,56 % de aumento).

DESARROLLO TEMPORAL DE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR EN PRESENCIA DE 1,0 μM DE AMPc:

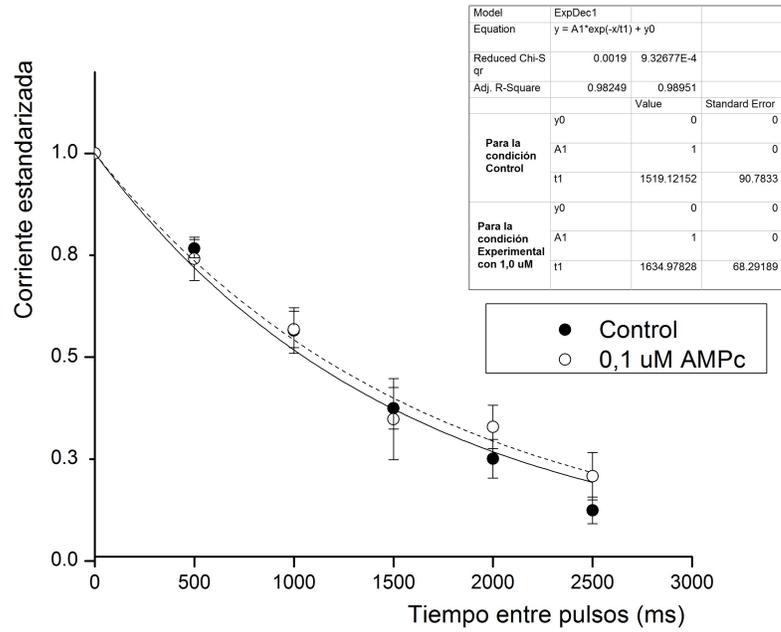
En la Figura 33 se presenta el efecto de 1 μM de AMPc sobre la desactivación de las corrientes del intercambiador. En ella puede verse que, una vez más, el efecto obtenido es mayor en el modo inverso, teniendo que la τ_i aumenta de 3071,53 a 6907,51 (124,89 % de aumento), mientras que en el modo directo el cambio para τ_d es de 1519,12 a 2987,70 (96,67 % de aumento).

DESARROLLO TEMPORAL DE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR EN PRESENCIA DE 10,0 μM DE AMPc:

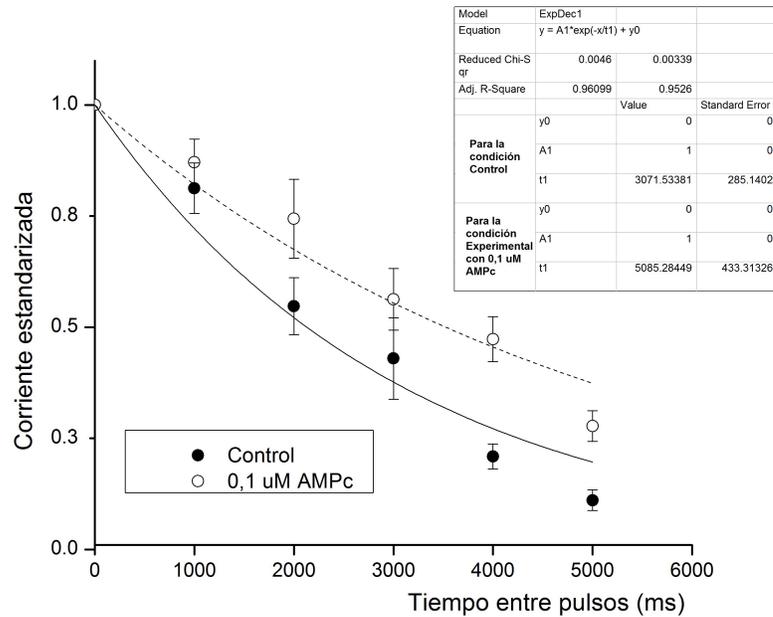
La última prueba se hizo en presencia de una concentración de 10,0 μM del nucleótido en el baño (Figura 34). Igualmente se observa que el efecto es más marcado en el modo inverso, ya que la τ_i aumenta de 3071,53 a 7041,52 (129,25 % de aumento), mientras que en el modo directo τ_d aumenta de 1519,12 a 3269,57 (115,23 % de aumento).

En la Figura 35 se muestran los valores de las constantes de tiempo calculadas para cada experimento usando el protocolo DEAC. En ella puede verse claramente que el efecto sobre el mecanismo de activación es dosis-dependiente y que éste presenta saturación a concentraciones superiores a 1,0 μM .

Por último, la Tabla 3 resume los valores de inhibición promedio y de aumento de las constantes de tiempo calculados a partir de los datos obtenidos durante esta investigación. En ella se observa que los valores de porcentaje de inhibición sobre la actividad y el proceso de permeación son muy similares en ambos modos de transporte para todos los casos evaluados, con la excepción del registrado para

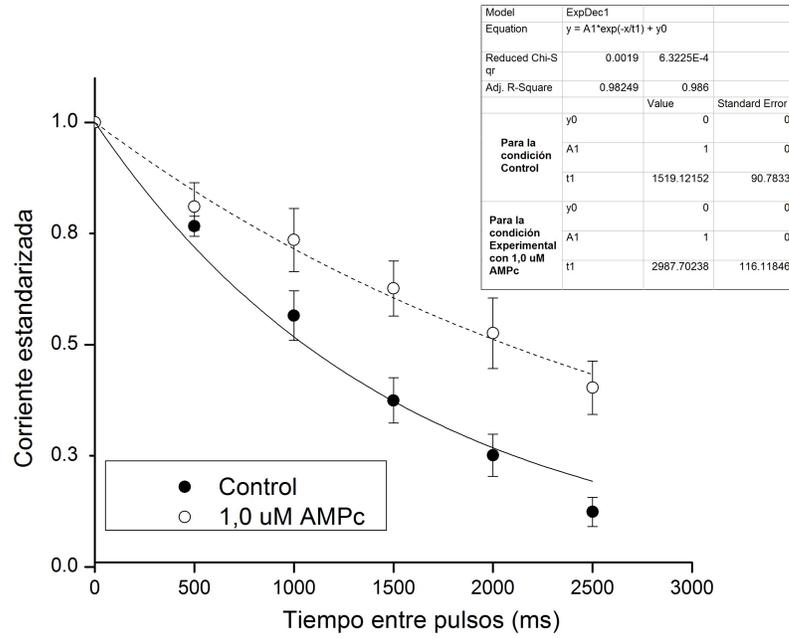


(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo directo en presencia de $0,1 \mu M$ de AMPc ($n=6$).

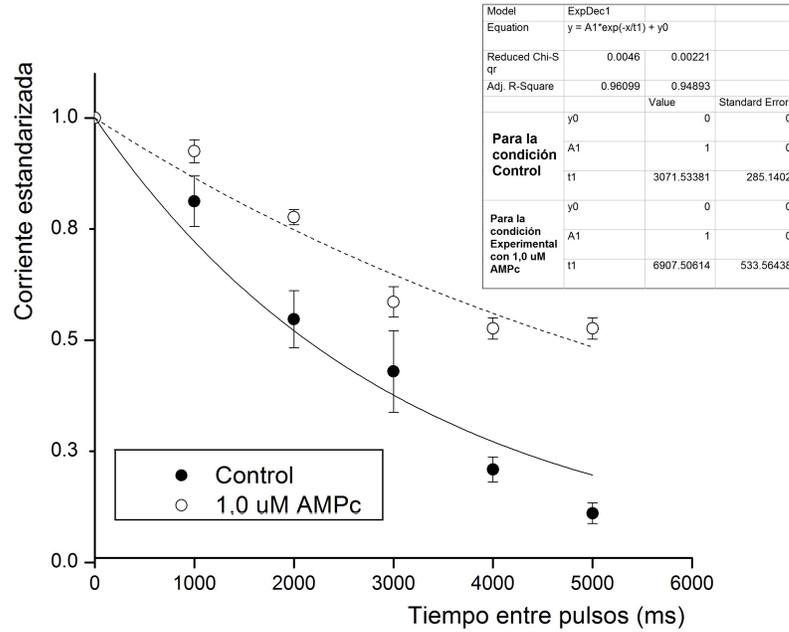


(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo inverso en presencia de $0,1 \mu M$ de AMPc ($n=5$).

Fig. 32: Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de $0,1 \mu M$ de AMPc. Ambas curvas vienen acompañadas por sus barras de error estándar y una tabla que contiene los parámetros del ajuste exponencial.



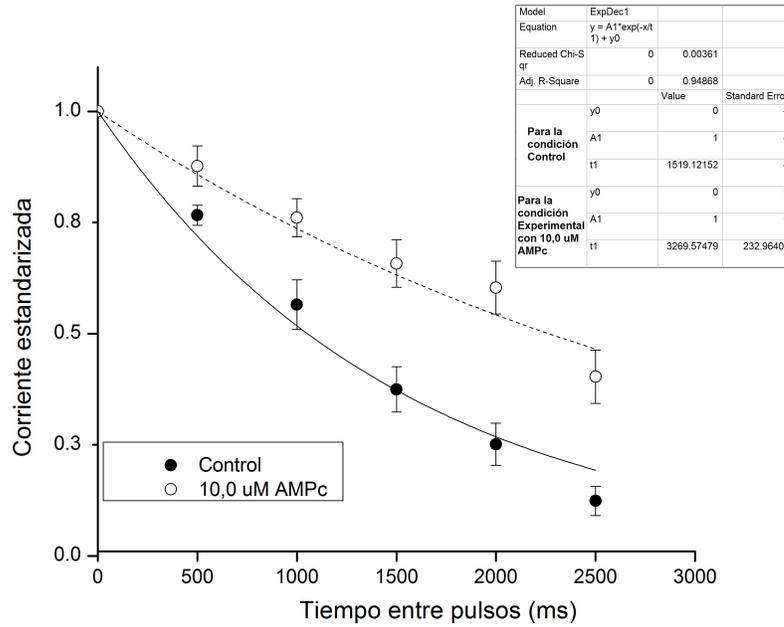
(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo directo en presencia de $1,0 \mu M$ de AMPc ($n=4$).



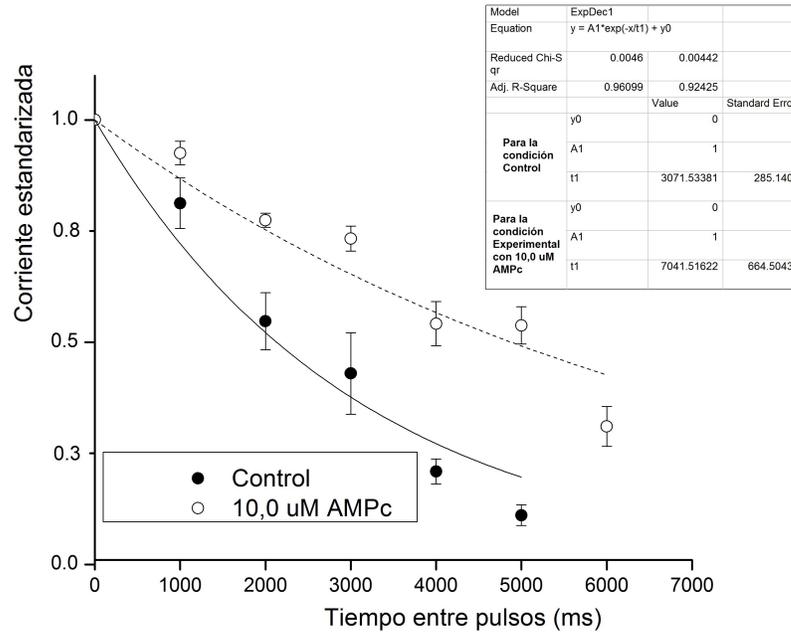
(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo inverso en presencia de $1,0 \mu M$ de AMPc ($n=4$).

Fig. 33: Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de $1,0 \mu M$ de AMPc. Ambas curvas vienen acompañadas por sus barras de error estándar y una tabla que contiene los parámetros del ajuste exponencial.

Resultados



(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo directo en presencia de $10,0 \mu M$ de AMPc (n=4).



(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo inverso en presencia de $10,0 \mu M$ de AMPc (n=4)

Fig. 34: Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de $10,0 \mu M$ de AMPc. Ambas curvas vienen acompañadas por sus barras de error estándar y una tabla que contiene los parámetros del ajuste exponencial.

Resultados

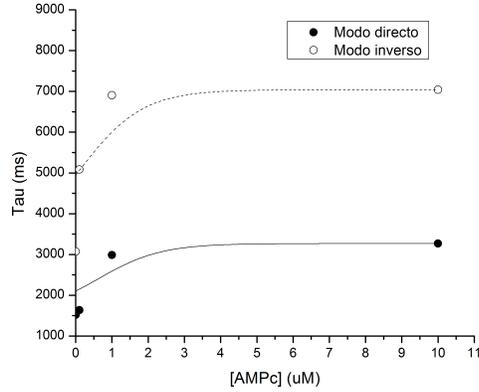


Fig. 35: Valores de constante de tiempo calculados para el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo DEAC. Los puntos negros representan los valores de τ para el modo directo, mientras que los puntos blancos representan aquellos valores de τ calculados para el modo inverso. Las líneas representan el ajuste de estas constantes a una curva sigmoide.

Tabla 3: Resumen de los resultados obtenidos.

[cAMP] (μM)	Porcentaje de inhibición promedio sobre la actividad del intercambiador		Porcentaje de inhibición promedio sobre el proceso de permeación del intercambiador		Aumento de la constante de tiempo para la desactivación del intercambiador	
	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso
0,1	27.57%	30.80%	33.72%	24.32%	7.63%	65.56%
1,0	37.73%	27.13%	42.66%	54.29%	96.67%	124.89%
10,0	33.03%	52.86%	32.57%	39.56%	115.23%	129.25%

el proceso de permeación en el modo inverso bajo una concentración de AMPC igual a $1,0 \mu\text{M}$, el cual es mayor que el efecto inhibitorio observado sobre la actividad del intercambiador.

Discusión

Buscando ampliar el conocimiento actual sobre el intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano se propuso estudiar el efecto que el AMPc tiene sobre la actividad de este transportador. Los experimentos aquí presentados aportan conocimientos sobre un efecto novedoso que ejerce este nucleótido cíclico sobre la actividad de esta proteína.

La actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} tiene una fase de activación del mecanismo y una fase en la que las corrientes desarrolladas dependen únicamente de la permeación del mismo. Al ver la Figura 25 puede observarse que al aumentar la concentración de AMPc del lado intracelular se reducen las corrientes generadas por el intercambiador de manera dosis-dependiente.

Ahora bien, considerando solo esta información no es posible determinar sobre cuál o cuáles mecanismos se ejerce el efecto observado. Debe realizarse un análisis por partes para responder esta pregunta.

En primer lugar se puede decir, de manera cualitativa, que el AMPc no afecta la forma de las curvas I/V, ya que ellas mantienen sus características de dependencia no lineal con el potencial de membrana independientemente de la concentración de AMPc utilizada. Esto se ve claramente al comparar las Figuras 19, 20, 21 y 22, en las que se muestra que la amplitud de las corrientes generadas por el intercambiador aumenta a medida que el potencial de membrana se aleja de 0 mV, siendo siempre mayor en el modo directo de transporte que en el modo inverso. Todo esto nos permite inferir que el AMPc no ejerce un efecto sobre la dependencia del mecanismo de activación con el potencial.

Posteriormente se analizó el efecto producido por el AMPc sobre el mecanismo de permeación. Esto se logró utilizando un protocolo que permite registrar las corrientes producidas por el intercambiador sin tener en cuenta su fase de activación, es decir, aquellas que dependen únicamente del mecanismo de permeación. Las curvas generadas a partir de estos datos (Figuras 26, 27, 28 y 29) muestran que el AMPc inhibe las vías de permeación en todos los casos estudiados. La Figura 30 evidencia

este comportamiento, en donde se observa que la permeabilidad de la proteína disminuye conforme aumenta la concentración de AMPc. Con base en esto puede decirse que el AMPc ejerce un efecto inhibitorio evidente sobre el mecanismo de permeación del intercambiador.

El siguiente paso fue comparar el efecto registrado sobre la actividad del intercambiador con el observado sobre sus vías de permeación. Con ayuda de la Tabla 3 podemos ver claramente que los valores de porcentaje de inhibición calculados son prácticamente iguales para ambos casos, independientemente del modo de transporte. Esto nos permite inferir que el efecto observado sobre la actividad del intercambiador puede ser explicado por la inhibición demostrada sobre el proceso de permeación. Esto se puede concluir porque los porcentajes de inhibición son similares en la mayoría de los casos, exceptuando el calculado para el proceso de permeación en presencia de $1,0 \mu\text{M}$ de AMPc durante el modo inverso, en el que se obtiene un valor mayor que el calculado para la inhibición sobre la actividad. Sin embargo, en cualquier caso, el efecto inhibitorio sobre el proceso de permeación no debe ser mayor que aquel observado sobre la actividad del intercambiador. Es posible que esta inconsistencia sea producida por la gran variabilidad de los datos obtenidos bajo estas condiciones (Figura 28) y podemos atribuirla a error experimental.

A pesar de esta inconsistencia es posible proponer que todo el efecto inhibitorio observado sobre la actividad del intercambiador es producto de un efecto ejercido por el AMPc sobre sus vías de permeación y que, por lo tanto, el mecanismo de activación no se ve afectado.

Adicionalmente, se construyeron curvas de correlación para evaluar si el efecto inhibitorio es dependiente del potencial de membrana (Figuras 23 y 24). Lo primero que resalta al analizar estas curvas es que los datos obtenidos presentan una alta variabilidad. Esto es debido, al menos en parte, al error experimental asociado a la medición de las corrientes del intercambiador, puesto que éstas presentan amplitudes muy pequeñas y el ruido asociado a ellas es alto en la mayoría de los casos. Al realizar un ajuste lineal de estos datos se obtiene en todos los casos una recta con pendiente cercana a cero. Esto indica que no existe correlación entre el porcentaje de inhibición producido por el AMPc con el potencial de membrana a ninguna de las concentraciones utilizadas, por lo que podría decirse que son independientes.

En este punto puede decirse, a manera de resumen, que el AMPc produce un efecto inhibitorio sobre el mecanismo de permeación del intercambiador sin afectar el mecanismo de activación o su dependencia con el potencial de membrana. Este efecto es dosis-dependiente e independiente del

potencial de membrana, presentando en todos los casos saturación a valores de concentración del nucleótido cíclico por encima de $1,0 \mu\text{M}$.

Finalmente se estudió el efecto que este inhibidor produce sobre el mecanismo de desactivación del intercambiador. En ausencia de AMPc este es un proceso que se ajusta a una exponencial negativa, teniéndose que la constante de tiempo asociada a su desarrollo es siempre mayor para el modo inverso que para el modo directo de transporte (Figura 31). En presencia del AMPc esta relación se mantiene, pero el proceso se ve lentificado de manera dosis-dependiente en ambos modos de transporte, produciendo un efecto mayor en el modo inverso y mostrando en todos los casos saturación a valores de concentración del nucleótido por encima de $1,0 \mu\text{M}$ (Figura 35).

En vista de que el AMPc afecta al proceso de desactivación sin afectar el proceso de activación, debe proponerse que éstos son mediados por mecanismos diferentes. Adicionalmente, si se comparan las Figuras 25 y 30 puede verse que el efecto inhibitorio producido sobre la actividad (explicado ya por un efecto sobre el proceso de permeación) presenta características similares a las observadas para el efecto sobre la desactivación. En este sentido puede decirse que ambos efectos son dependientes de la concentración de AMPc y que éstos presentan saturación a concentraciones por encima de $1,0 \mu\text{M}$.

Es bien sabido que en la mayoría de los casos el efecto producido por el AMPc ocurre mediante fosforilación mediada por proteínas quinasas A. Además, se han presentado evidencias de que existen bolsillos de ATP asociados a la membrana (Proverbio y col., 1988; Hoffman, 1997; Hoffman y col., 2009) que podrían permitir que el efecto observado sea producido por dichas proteínas quinasas. No obstante, en vista de las evidencias aquí presentadas, se propone la existencia de un único sitio de unión directa del AMPc en la estructura del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, que solo puede estar orientado hacia el citosol. Esto es debido a que, como se ha explicado antes, en todos los experimentos realizados se trabajó con parches de membrana aislados en soluciones salinas libres de ATP (descartando así la posibilidad de que el efecto observado sea producto de la acción de alguna PKA), agregando el AMPc exclusivamente del lado intracelular de la membrana y, como es bien sabido, esta molécula es impermeable a las membranas celulares. La unión del AMPc a este sitio de acción regula la actividad del intercambiador inhibiendo el proceso de permeación, así como también lentificando la desactivación del transporte. Ambos efectos se producen de manera dosis-dependiente mostrando saturación a valores de concentración de AMPc superiores a $1,0 \mu\text{M}$, por lo que la K_i del inhibidor se encuentra en el orden submicromolar.

Discusión

Ejemplos de interacción directa se han evidenciado en canales iónicos en los que el AMPc produce un efecto excitatorio sobre su actividad, ya sea activándolos o modulándolos (Biel y col., 1999a,b; Craven y Zagotta, 2006; Biel, 2009; Schünke y Stoldt, 2013), por lo que es razonable esperar que este importante y ubicuo segundo mensajero pueda ejercer algún efecto por acción directa sobre otros mecanismos de transporte. No obstante, no se descarta la posibilidad de que el efecto observado pueda ser producido por interacción indirecta, por fosforilación mediante proteínas quinasas A, aunque este escenario es muy poco probable, ya que, incluso si existen bolsillos de ATP asociados a la membrana de los eritrocitos, los parches de membrana utilizados se encontraron expuestos por decenas de minutos a una solución salina libre de ATP que permitió que aquellas moléculas presentes en los bolsillos difundieran a la cámara experimental, lejos de las proteínas que pudieran estar utilizándolas.

Conclusiones

- La dependencia de la activación del intercambiador con el potencial de membrana no se ve afectada por el AMPc.
- El AMPc produce un efecto inhibitorio afectando la vía de permeación del intercambiador, lo que reduce su permeabilidad.
- El AMPc lentifica el proceso de desactivación del intercambiador de manera dosis-dependiente. Este efecto presenta una K_i en el orden submicromolar.
- Se propone la existencia de un sitio de unión para AMPc del lado intracelular en la estructura del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano. Este sitio de unión tiene una K_i en el orden sumicromolar y la unión directa del AMPc a éste afecta tanto la vía de permeación como al mecanismo de desactivación de este transportador.

Bibliografía

- Adderley, S.P., Dufaux, E.A., Sridharan, M., Bowles, E.A., Hanson, M.S., Stephenson, A.H., Ellsworth, M.L., Sprague, R.S. 2009. Iloprost- and isoproterenol-induced increases in cAMP are regulated by different phosphodiesterases in erythrocytes of both rabbits and humans. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **296**: H1617–H1624.
- Adderley, S.P., Sprague, R.S., Stephenson, A.H., Hanson, M.S. 2010a. Regulation of cAMP by phosphodiesterases in erythrocytes. *Pharmacol. Rep.* **62**: 475–482.
- Adderley, S.P., Sridharan, M., Bowles, E., Stephenson, A., Ellsworth, M., Sprague, R. 2010b. Protein Kinases A and C regulate receptor-mediated increases in cAMP in rabbit erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **298**: H587–H593.
- Agre, P., Parker, J. 1989. Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical Implications. Hematology. Taylor & Francis.
- Aharonovitz, O., Demaurex, N., Woodside, M., Grinstein, S. 1999. ATP dependence is not an intrinsic property of Na⁺/H⁺ exchanger NHE1: requirement for an ancillary factor. *Am. J. Physiol.* **276**: C1303–C1311.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. Molecular Biology of the Cell: Reference edition. Garland Science.
- Alenghat, F.J., Golan, D.E. 2013. Membrane protein dynamics and functional implications in mammalian cells. *Curr. Top. Membr.* **72**: 89–120.
- Alper, S.L. 1991. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 549–564.

- Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., Takakuwa, Y. 2013. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for Band 3 clustering: Mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry* **52**: 5760–5769.
- Arese, P., Turrini, F., Schwarzer, E. 2005. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **16**: 133–146.
- Artmann, G.M., Sung, K.L., Horn, T., Whittemore, D., Norwich, G., Chien, S. 1997. Micropipette aspiration of human erythrocytes induces echinocytes via membrane phospholipid translocation. *Biophys. J.* **72**: 1434–1441.
- Avruch, J., Fairbanks, G. 1974. Phosphorylation of endogenous substrates by erythrocyte membrane protein kinases: I. A monovalent cation-stimulated reaction. *Biochemistry* **13**: 5507–5514.
- Bagatolli, L.A., Ipsen, J.H., Simonsen, A.C., Mouritsen, O.G. 2010. An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog. Lipid Res.* **49**: 378–389.
- Baillie, G.S., Scott, J.D., Houslay, M.D. 2005. Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. *FEBS Lett.* **579**: 3264–3270.
- Bartosz, G., Soszynski, M., Wasilewski, A. 1982. Aging of the erythrocyte. XVII. Binding of autologous immunoglobulin G. *Mech. Ageing Dev.* **20**: 223–232.
- Bender, A.T., Beavo, J.A. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* **58**: 488–520.
- Bevers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., Zwaal, R.F. 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1439**: 317–330.
- Bevers, E.M., Wiedmer, T., Comfurius, P., Shattil, S.J., Weiss, H.J., Zwaal, R.F., Sims, P.J. 1992. Defective Ca²⁺-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood* **79**: 380–388.
- Biel, M. 2009. Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *J. Biol. Chem.* **284**: 9017–9021.

Bibliografia

- Biel, M., Zong, X., Hofmann, F. 1999a. Cyclic nucleotide-gated channels. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **33**: 231–250.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A., Hofmann, F. 1999b. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 151–171.
- Bifano, E.M., Novak, T.S., Freedman, J.C. 1984. Relationship between the shape and the membrane potential of human red blood cells. *J. Membr. Biol.* **82**: 1–13.
- Bisognano, J.D., Dix, J.A., Pratap, P.R., Novak, T.S., Freedman, J.C. 1993. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells. *J. Gen. Physiol.* **102**: 99–123.
- Bitbol, M., Devaux, P.F. 1988. Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 6783–6787.
- Bitbol, M., Fellmann, P., Zachowski, A., Devaux, P.F. 1987. Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **904**: 268–282.
- Boas, F.E., Forman, L., Beutler, E. 1998. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 3077–3081.
- Bosman, G.J.C.G.M., Willekens, F.L.A., Werre, J.M. 2005. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell. Physiol. Biochem.* **16**: 1–8.
- Branton, D., Cohen, C.M., Tyler, J. 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* **24**: 24–32.
- Bretscher, M.S. 1972. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biol.* **236**: 11–12.
- Brini, M., Carafoli, E. 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* **89**: 1341–1378.
- Brody, J.P., Han, Y., Austin, R.H., Bitensky, M. 1995. Deformation and flow of red blood cells in a synthetic lattice: evidence for an active cytoskeleton. *Biophys. J.* **68**: 2224–2232.
- Brugnara, C., de Franceschi, L., Alper, S.L. 1993. Inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J. Clin. Invest.* **92**: 520–526.

Bibliografía

- Brugnara, C., Tosteson, D.C. 1987. Inhibition of K^+ transport by divalent cations in sickle erythrocytes. *Blood* **70**: 1810–1815.
- Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., Devaskar, S.U. 2009. Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**: E836–E848.
- Chandra, R., Joshi, P.C., Bajpai, V.K., Gupta, C.M. 1987. Membrane phospholipid organization in calcium-loaded human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **902**: 253–262.
- Chien, S. 1987. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* **49**: 177–192.
- Chrispeels, M.J., Agre, P. 1994. Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. *Trends in Biochemical Sciences* **19**: 421 – 425.
- Cokelet, G. 2011. Hemorheology and hemodynamics. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* **3**: 1–140.
- Colina, C., Cervino, V., Benaim, G. 2002. Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. *Biochem. J.* **362**: 247–251.
- Connor, J., Gillum, K., Schroit, A.J. 1990. Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* **1025**: 82–86.
- Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F., Schroit, A.J. 1992. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J. Biol. Chem.* **267**: 19412–19417.
- Craven, K.B., Zagotta, W.N. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.* **68**: 375–401.
- Crespo, L.M., Novak, T.S., Freedman, J.C. 1987. Calcium, cell shrinkage, and prolytic state of human red blood cells. *Am. J. Physiol.* **252**: C138–C152.
- Daleke, D.L., Lyles, J.V. 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**: 108–127.

Bibliografía

- Daugas, E., Candé, C., Kroemer, G. 2001. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ.* **8**: 1131–1133.
- Dekowski, S.A., Rybicki, A., Drickamer, K. 1983. A tyrosine kinase associated with the red cell membrane phosphorylates band 3. *J. Biol. Chem.* **258**: 2750–2753.
- Deuticke, B. 1968. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. *Biochim Biophys Acta* **163**: 494–500.
- Devaux, P.F. 1992. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 417–439.
- Díaz, C., Schroit, A. 1996. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J. Membr. Biol.* **151**: 1–9.
- Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.T., Suresh, S. 2010. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bull* **35**: 382–388.
- Dreyfuss, G., Schwartz, K., Blout, E. 1978. Compartmentalization of cyclic AMP-dependent protein kinases in human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**: 5926–5930.
- Duhm, J., Becker, B.F. 1977. Studies on the lithium transport across the red cell membrane. I.V.: Interindividual variations in the Na^+ -dependent Li^+ countertransport system of human erythrocytes. *Pflugers Arch.* **370**: 211–219.
- Dunn, P.M. 1998. The action of blocking agents applied to the inner face of Ca^{2+} -activated K^+ channels from human erythrocytes. *J. Membr. Biol.* **165**: 133–143.
- Escobales, N., Canessa, M. 1986. Amiloride-sensitive Na^+ transport in human red cells: Evidence for a Na^+/H^+ exchange system. *J. Membr. Biol.* **90**: 21–28.
- Fimia, G.M., Sassone-Corsi, P. 2001. Cyclic AMP signalling. *J. Cell Sci.* **114**: 1971–1972.
- Forsyth, P.I. 2006. El intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$: Efectos del ion Na^+ y caracterización cinética parcial. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Freedman, J.C. 1983. Partial requirements for in vitro survival of human red blood cells. *J. Membr. Biol.* **75**: 225–231.

Bibliografía

- Freedman, J.C. 2001. Membrane transport in red blood cells. En: N. Sperelakis (ed.), *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*, capítulo 23, págs. 377–392. Academic Press, Orlando, Florida, tercera edición.
- Freedman, J.C., Novak, T.S. 1997. Electrodiffusion, barrier, and gating analysis of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin. *J. Gen. Physiol.* **109**: 201–216.
- Galué, D. 2008. El intercambiador K^+/Ca^+ del eritrocito humano: efecto del estrés oxidativo en uno o en ambos lados de la membrana. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Golan, D.E., Veatch, W. 1980. Lateral mobility of band 3 in the human erythrocyte membrane studied by fluorescence photobleaching recovery: evidence for control by cytoskeletal interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 2537–2541.
- Grygorczyk, R., Schwarz, W. 1983. Properties of the Ca^+ -activated K^+ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* **4**: 499–510.
- Guerra, A. 2012. Estudio del efecto del ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Haest, C.W.M. 2003. Distribution and movement of membrane lipids. En: I. Bernhardt, J.C. Ellory (eds.), *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, capítulo 1, págs. 1–26. Springer, primera edición.
- Hastings, A., Sendroy, J., McIntosh, J.F., Van Slyke, D.D. 1928. Studies of gas and electrolyte equilibria in blood: XIII. The distribution of chloride and bicarbonate in the blood of normal and pathological human subjects. *J. Biol. Chem.* **79**: 193–209.
- Heard, K.S., Fidyk, N., Carruthers, A. 2000. ATP-dependent substrate occlusion by the human erythrocyte sugar transporter. *Biochemistry* **39**: 3005–3014.
- Hilpert, P., Fleischmann, R.G., Kempe, D., Bartels, H. 1963. The Bohr Effect related to blood and erythrocyte pH. *Am. J. Physiol.* **205**: 337–340.
- Hoffman, J.F. 1997. ATP compartmentation in human erythrocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **4**: 112–115.

Bibliografía

- Hoffman, J.F., Dodson, A., Proverbio, F. 2009. On the functional use of the membrane compartmentalized pool of ATP by the Na⁺ and Ca²⁺ pumps in human red blood cell ghosts. *J. Gen. Physiol.* **134**: 351–361.
- Hosey, M.M., Tao, M. 1977. Phosphorylation of rabbit and human erythrocyte membranes by soluble adenosine 3':5'-monophosphate-dependent and -independent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **252**: 102–109.
- Kaji, D.M. 1993. Effect of membrane potential on K⁺-Cl⁺ transport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.* **264**: C376–C382.
- Kasahara, M., Hinkle, P.C. 1977. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **252**: 7384–7390.
- Knauf, P.A., Proverbio, F., Hoffman, J.F. 1974. Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca²⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.* **63**: 324–336.
- Larsen, F.L., Katz, S., Roufogalis, B.D., Brooks, D.E. 1981. Physiological shear stresses enhance the Ca²⁺ permeability of human erythrocytes. *Nature* **294**: 667–668.
- LeFevre, P.G. 1961. Sugar transport in the red blood cell: structure-activity relationships in substrates and antagonists. *Pharmacol. Rev.* **13**: 39–70.
- Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T. 1994. Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**: 19659–19662.
- Maher, A.D., Kuchel, P.W. 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1182–1197.
- Matthes, E. 2005. Caracterización parcial del contratransporte K⁺/Ca⁺ del eritrocito humano: Estequiometría y efecto de iones mono y divalentes. Trabajo Especial de Grado, Universidad central de Venezuela, Caracas.
- Mercer, R.W., Schneider, J.W., Benz, E.J. 1989. Na⁺/K⁺-ATPase structure. En: P. Agre, J.C. Parker (eds.), *Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical implications*, capítulo 6, págs. 135–165. Marcel Dekker, Inc., New York, primera edición.

Bibliografía

- Mueckler, M. 1989. Structure and function of the Glucose Transporter. En: P. Agre, J.C. Parker (eds.), Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical implications, capítulo 2, págs. 31–45. Marcel Dekker, Inc., New York, primera edición.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**: 941–945.
- Paredes, M. 2012. Efecto del pH intracelular sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E. 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 146–150.
- Pellegrino, M., Pellegrini, M. 1998. Modulation of Ca^{2+} -activated K^+ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch.* **436**: 749–756.
- Pérez-Gordones, M.C., Lugo, M.R., Winkler, M., Cervino, V., Benaim, G. 2009. Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **489**: 55–61.
- Peters, L.L., Shivdasani, R.A., Liu, S.C., Hanspal, M., John, K.M., Gonzalez, J.M., Brugnara, C., Gwynn, B., Mohandas, N., Alper, S.L., Orkin, S.H., Lux, S.E. 1996. Anion Exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton. *Cell* **86**: 917–927.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., Agre, P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**: 385–387.
- Proverbio, F., Shoemaker, D.G., Hoffman, J.F. 1988. Functional consequences of the membrane pool of ATP associated with the human red blood cell Na^+/K^+ pump. *Prog. Clin. Biol. Res.* **268A**: 561–567.
- Raess, B., Tunncliff, G. 1989. The Red Cell Membrane: A Model for Solute Transport. Contemporary Biomedicine. Humana Press.
- Rifkind, R.A. 1966. Destruction of injured red cells in vivo. *Am. J. Med.* **41**: 711–723.

Bibliografía

- Romero, J.G. 2003. Conductancias iónicas del eritrocito humano: Caracterización parcial. Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asistente, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Romero, J.G. 2004. Diseño y aplicación de un símil físico de capilar sanguíneo para la caracterización biofísica de canales iónicos del eritrocito humano en condiciones fisiológicas. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Romero, P.J., Ortíz, C.E., Melitto, C. 1990. Metabolic control of the K^+ channel of human red cells. *J. Membr. Biol.* **116**: 19–29.
- Romero, P.J., Romero, E.A. 1999. Effect of cell ageing on Ca^{2+} influx into human red cells. *Cell Calcium* **26**: 131–137.
- Romero, P.J., Romero, E.A., Winkler, M.D. 1997. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim. Biophys. Acta* **1323**: 23–28.
- Rosenberg, S.A., Guidotti, G. 1968. The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization, and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **243**: 1985–1992.
- Schatzmann, H.J. 1966. ATP-dependent Ca^{2+} -extrusion from human red cells. *Experientia* **22**: 364–365.
- Schünke, S., Stoldt, M. 2013. Structural snapshot of cyclic nucleotide binding domains from cyclic nucleotide-sensitive ion channels. *Biological Chemistry* **394**.
- Schwarz, W., Passow, H. 1983. Ca^{2+} -activated K^+ channels in erythrocytes and excitable cells. *Annu. Rev. Physiol.* **45**: 359–374.
- Seaman, G.V., Uhlenbruck, G. 1963. The surface structure of erythrocytes from some animal sources. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**: 493–502.
- Seigneuret, M., Devaux, P.F. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 3751–3755.
- Semplicini, A., Spalvins, A., Canessa, M. 1989. Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na^+/H^+ exchanger. *J. Membr. Biol.* **107**: 219–228.

Bibliografía

- Sheetz, M.P., Painter, R.G., Singer, S.J. 1976. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J. Cell Biol.* **70**: 193–203.
- Shohet, S., Mohandas, N. 1988. Red Cell Membranes, Vol. 19, Methods in Hematology. Churchill Livingstone.
- Simmonds, M.J., Meiselman, H.J., Baskurt, O.K. 2013. Blood rheology and aging. *J. Geriatr. Cardiol.* **10**: 291–301.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720–731.
- Skou, J.C. 1965. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol. Rev.* **45**: 596–617.
- Stauffer, T.P., Guerini, D., Carafoli, E. 1995. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **270**: 12184–12190.
- Steck, T.L. 1974. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* **62**: 1–19.
- Strehler, E.E., Caride, A.J., Filoteo, A.G., Xiong, Y., Penniston, J.T., Enyedi, A. 2007. Plasma membrane Ca²⁺-ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1099**: 226–236.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., Gilman, A.G. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 461–480.
- Takata, K., Hirano, H., Kasahara, M. 1997. Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int. Rev. Cytol.* **172**: 1–53.
- Tiffert, T., Lew, V. 2001. Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. *Cell Calcium* **30**: 337 – 342.
- Van Deenen, L. 1969. Membrane lipids and lipophilic proteins. En: D. Tosteson (ed.), The molecular basis of membrane function, págs. 47–78. Printice-Hall, Englewood Cliffs.

Bibliografía

- Vincenzi, F.F. 1989. The plasma membrane calcium pump: The red blood cell as a model. En: P. Agre, J.C. Parker (eds.), *Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical implications*, capítulo 17, págs. 481–505. Marcel Dekker, Inc., New York, primera edición.
- Zoccoli, M.A., Baldwin, S.A., Lienhard, G.E. 1978. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J. Biol. Chem.* **253**: 6923–6930.
- Zwaal, R.F., Roelofsen, B., Colley, C.M. 1973. Localization of red cell membrane constituents. *Biochim. Biophys. Acta* **300**: 159–182.