

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**Efecto de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  sobre la actividad tipo ráfaga del canal de  $\text{K}^+$  mecanoactivado del eritrocito humano, HEMKCA (Human Erythrocyte Mechano-activated  $\text{K}^+$  Channel A)**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad de Central de Venezuela, por la bachiller **Yeimar Evelyn Portillo Castellano** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

**Tutor:** Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz

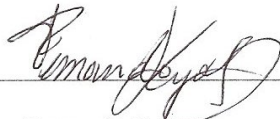
Caracas, Venezuela

Octubre, 2016

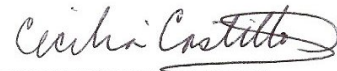
DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes suscribimos, los miembros del Jurado Evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. **Yeimar Evelyn Portillo Castellano** C.I. 21.343.753, titulado, "EFECTO DE LOS IONES  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  Y  $\text{Ba}^{2+}$  SOBRE LA ACTIVIDAD TIPO RÁFAGA DEL CANAL DE  $\text{K}^+$  MECANOACTIVADO DEL ERITROCITO HUMANO, HEMKCA (Human Erythrocyte Mechano-activated  $\text{K}^+$  Channel A)" para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

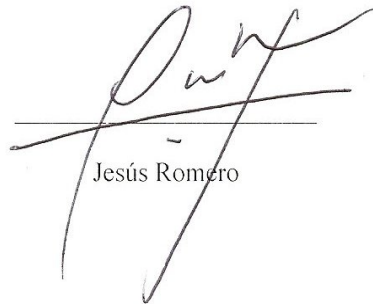
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de octubre del año 2016, dejando constar que el Dr. Jesús Romero actuó como coordinador del jurado examinador.



Fernando González



Cecilia Castillo



Jesús Romero

## Resumen

Los canales de potasio son proteínas transmembrana que permiten el flujo selectivo de este ion y son importantes en numerosas funciones celulares. El HEMKCA es un canal de  $K^+$  activado por presión, que se encuentra en la membrana de los eritrocitos humanos y que fue registrado por primera vez en nuestro laboratorio. La selectividad de los canales es uno de los procesos más exquisito estudiados en la biología, igualmente es bien conocido que algunos iones en solución pueden actuar como bloqueadores de canales, obstruyendo la vía de conducción iónica por un intervalo de tiempo dado. En este sentido, el presente trabajo se centra en estudiar el efecto de los iones  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA, empleando para ello la técnica de T.U.G.O patch clamp. De esta manera, se evaluó el efecto de los iones  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  sobre la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) y las variables intra-ráfaga del modelo cinético que hemos propuesto para este canal. Una ráfaga es un grupo de aperturas del canal separadas por estados no conductivos (cerrados), cuya duración es menor que un tiempo crítico dado en un universo de por lo menos dos poblaciones diferentes de estados cerrados (cortos y largos). Se encontró que el efecto que generan los tres iones es distinto. El  $Na^+$  produce un bloqueo rápido que afecta únicamente las variables intra-ráfaga, a diferencia del bloqueo generado por  $Mg^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  que afectan tanto la  $P_o$  como las variables intra-ráfaga, actuando como bloqueadores rápidos de la vía de permeación del canal. En presencia de  $Ba^{2+}$ , el tiempo que pasa el canal en el estado no conductivo es mayor que con  $Mg^{2+}$ , generando largos períodos de inactividad. La presencia de 1 mM  $Ba^{2+}$  produce la aparición de un conjunto de eventos cerrados cuya constante de tiempo se encuentra entre la de cerrado corto ( $\tau_1$ ) y cerrado largo ( $\tau_2$ ). De esta manera, se modificó el modelo cinético desarrollado previamente en nuestro laboratorio, agregando un cuarto estado denominado estado *bloqueado*. Estos resultados nos permiten describir un nuevo estado cinético para el HEMKCA, que surge por efecto de la interacción rápida del ion  $Ba^{2+}$  con el canal. El ion  $Ba^{2+}$  produce dos tipos de bloqueo en el canal, uno rápido y otro lento y presenta dos sitios de unión, uno de alta afinidad y

otro de baja afinidad. Adicionalmente, se propone que los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  actúan como bloqueadores rápidos de la actividad del HEMKCA. El efecto de estos iones sobre la actividad del HEMKCA revela dos tipos de interacción con el canal, una rápida y una lenta, cuyas diferencias se atribuyen al radio iónico y su afinidad por los sitios de unión de la vía de conducción de  $\text{K}^+$ .

**Palabras clave:** Canal iónico, HEMKCA, Ráfaga, modelo cinético

*Dedicado a Manuel Portillo*

## **Agradecimientos**

A Evelyn Castellano y Manuel Portillo

A Yenirey y Merlyn

A Jesús Romero

A Alejandro Mata

A Daniel Landi, Luis O. Romero, Diana Isturiz, Ángeles Zambrano

A Christian Calderón, Fernando González, Antonio Gutiérrez

A mi casi hermana, Naileth González

A Profesores

A amigos y compañeros de travesuras

Al Instituto de Biología Experimental

A la Facultad de Ciencias

Al proyecto de investigación G-2007001147 titulado "Alternativas nacionales para el tratamiento de enfermedades transmisibles" de la Misión Ciencias.

Y a la Universidad Central de Venezuela

Por el apoyo, su ejemplo, enseñanzas, trabajo y dedicación. Por enseñarme a ver lo grande de lo pequeño de la vida, a cultivar la curiosidad por el mundo y a cuestionarlo todo. Gracias totales!

# Índice de Contenido

INTRODUCCIÓN .....	1
CANALES DE POTASIO .....	2
<i>Canales mecanosensibles</i> .....	6
<i>CANALES TREK y TRAAK</i> .....	8
<i>Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup></i> .....	9
EL ERITROCITO HUMANO .....	10
CANALES DESCRITOS EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO .....	11
<i>El Canal Gárdos</i> .....	11
<i>El Canal catiónico no selectivo</i> .....	12
<i>Los Canales aniónicos</i> .....	13
Otras permeabilidades reportadas en la membrana de eritrocitos humanos a través de técnicas distintas a las electrofisiológicas .....	14
HEMKCA: .....	15
EL CANAL DE K <sup>+</sup> MECANOACTIVADO DEL ERITROCITO HUMANO (HUMAN ERYTHROCYTE MECANO-ACTIVATED K <sup>+</sup> CHANNEL A).....	15
ANTECEDENTES.....	23
Senescencia del Eritrocito Humano .....	23
Bloqueadores iónicos de canales de K <sup>+</sup> .....	25
Efecto de Na <sup>+</sup> sobre la actividad de canales de K <sup>+</sup> .....	26
Efecto de Mg <sup>2+</sup> sobre la actividad de canales de K <sup>+</sup> .....	27
Efecto de Ba <sup>2+</sup> sobre la actividad de canales de K <sup>+</sup> .....	28
OBJETIVOS .....	32
General .....	32
Específicos .....	32
MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
Obtención de material biológico .....	33
Soluciones Experimentales .....	33

Medidas electrofisiológicas.....	35
El T.U.G.O Patch Clamp (The U-shape Giga Ohm patch clamp) .....	35
Forma de la pipeta: .....	35
Cantidad de membrana aislada:.....	36
Elaboración de las pipetas .....	37
Visualización de las células.....	37
Formación del sello .....	38
Adquisición de datos .....	38
Protocolo de estimulación .....	39
Identificación del Canal .....	39
Análisis de los datos.....	39
Probabilidad de apertura.....	39
Modelo cinético.....	40
Análisis Estadístico .....	40
RESULTADOS .....	41
El HEMKCA .....	41
Efecto del ion $\text{Na}^+$ sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA.....	41
Efecto del ion $\text{Mg}^{2+}$ sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA.....	47
Efecto del ion $\text{Ba}^{2+}$ sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA.....	55
DISCUSIÓN .....	66
El modelo cinético.....	66
Efecto del ion $\text{Na}^+$ sobre la actividad del HEMKCA .....	66
Efecto del ion $\text{Mg}^{2+}$ sobre la actividad del HEMKCA.....	68
Efecto del ion $\text{Ba}^{2+}$ sobre la actividad del HEMKCA .....	70
Bloqueo iónico en el HEMKCA .....	74
CONCLUSIONES .....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	77



## Índice de Figuras

Figura 1. Modelo estructural del canal KcsA.....	2
Figura 2. Secuencia firma de canales de K <sup>+</sup> .....	4
Figura 3. Efecto de la tensión de la bicapa lipídica sobre la conformación del canal.....	6
Figura 4. Efecto de la [Ca <sup>2+</sup> ] sobre la actividad del canal Gárdos.....	11
Figura 5. Efecto de la presión sobre la actividad del HEMKCA. ....	16
Figura 6. Relación Po vs. presión del HEMKCA.....	17
Figura 7. Modulación de la actividad del HEMKCA por la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	18
Figura 8. Actividad tipo ráfaga del canal HEMKCA.....	21
Figura 9. Modelo cinético de la actividad tipo ráfaga del HEMKCA .....	22
Figura 10. Efecto de la [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sobre el curso temporal del canal de K <sup>+</sup> activado por Ca <sup>2+</sup> .....	26
Figura 11. Efecto de la [Mg <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> sobre la actividad del canal K <sub>Ca</sub> 3.1.....	28
Figura 12. Modelo de los posibles sitios de unión a Ba <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> y TEA <sup>+</sup> en el canal de K <sup>+</sup> .....	30
Figura 13. Visualización de Ba <sup>2+</sup> en el canal KcsA por cristalografía de rayos X y en un canal de K <sup>+</sup> activado por Ca <sup>2+</sup> a través del análisis de la función unitaria del canal.. .....	31
Figura 14. Forma de la pipeta en el T.U.G.O patch clamp y patch clamp clásico .....	36
Figura 15. Esquema de la región de la membrana en el interior de la pipeta en el T.U.G.O patch clamp. ....	37
Figura 16. Esquema del posible proceso de formación del sello en T.U.G.O Patch Clamp .....	38
Figura 17. Efecto del aumento de la [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sobre la Po del HEMKCA.....	42
Figura 18. Efecto de la [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA .....	43
Figura 19. Efecto de la [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sobre las constantes de tiempo del modelo cinético del HEMKCA .....	44
Figura 20. Efecto de la [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sobre el área de las fdp para los estados C1 y C2 .....	45

Figura 21. Funciones de densidad de probabilidad ajustadas a los histogramas de cada estado en ausencia y presencia de 1 mM de $\text{Na}^+$ .....	46
Figura 22. Efecto del aumento de la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ sobre la Po del HEMKCA.....	47
Figura 23. Efecto de la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ sobre las constantes de velocidad del modelo cinético del HEMKCA .....	48
Figura 24. Efecto de la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ sobre las constantes de tiempo del modelo cinético del HEMKCA . .....	50
Figura 25. Efecto de la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ sobre el área de las fdp para los estados C1 y C2 .....	51
Figura 26. Funciones de densidad de probabilidad ajustadas a los histogramas de cada estado en ausencia y presencia de 5 mM de $\text{Mg}^{2+}$ .....	52
Figura 27. Relación I/V del HEMKCA a distintas $[\text{Mg}^{2+}]_i$ .....	54
Figura 28. Efecto del aumento en la $[\text{Ba}^{2+}]_i$ de 100 $\mu\text{M}$ a 1 mM, sobre la Po del HEMKCA. ..	55
Figura 29. Efecto de la disminución en la $[\text{Ba}^{2+}]_i$ de 100 a 10 $\mu\text{M}$ , sobre la Po del HEMKCA. 56	
Figura 30. Efecto de la disminución en la $[\text{Ba}^{2+}]_i$ de 10 a 1 $\mu\text{M}$ , sobre la Po del HEMKCA. ....	56
Figura 31. Efecto de la $[\text{Ba}^{2+}]_i$ sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA....	57
Figura 32. Efecto de la $[\text{Ba}^{2+}]_i$ sobre las constantes de tiempo del modelo del HEMKCA .....	59
Figura 33. Efecto de la $[\text{Ba}^{2+}]_i$ sobre el área de las fdp para C1 y C2. ....	60
Figura 34. Actividad del HEMKCA en presencia de 100 $\mu\text{M}$ $\text{Ba}^{2+}$ en la solución del baño antes del intercambio de soluciones .....	61
Figura 35. Actividad del HEMKCA en presencia de 1 mM $\text{Ba}^{2+}$ en la solución del baño, después del intercambio de soluciones.....	62
Figura 36. Funciones de densidad de probabilidad ajustadas a los histogramas de cada estado en ausencia y presencia de 1 mM $\text{Ba}^{2+}$ .....	63
Figura 37. Modificación del modelo cinético del HEMKCA .....	64
Figura 38. Ajuste de las fdp para los histogramas de cada estado, obtenidos bajo modificación del modelo cinético propuesto para el HEMKCA.....	65

## Índice de tablas

Tabla 1. Composición iónica de la solución control. ....	33
Tabla 2. Composición de las soluciones empleadas en el baño, antes y después de realizar el intercambio con $\text{Na}^+$ y $\text{Mg}^{2+}$ .....	34
Tabla 3. Composición de las soluciones empleadas en el baño, antes y después de realizar el intercambio para el ensayo con $\text{Ba}^{2+}$ .....	35
Tabla 4. Efecto del $\text{Na}^+$ sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA .....	44
Tabla 5. Efecto del $\text{Na}^+$ sobre las constantes de tiempo del modelo del HEMKCA.....	45
Tabla 6. Efecto de $\text{Mg}^{2+}$ sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA .....	49
Tabla 7. Efecto de $\text{Mg}^{2+}$ sobre las constantes de tiempo del modelo del HEMKCA .....	49
Tabla 8. Efecto de la presencia y $[\text{Mg}^{2+}]$ sobre la relación I/V del HEMKCA. ....	53
Tabla 9. Efecto de $\text{Ba}^{2+}$ sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA.....	58
Tabla 10. Efecto de $\text{Ba}^{2+}$ sobre las constantes de tiempo del modelo del HEMKCA.....	60
Tabla 11. Constantes cinéticas del HEMKCA en presencia de 1mM $\text{Ba}^{2+}$ , evaluadas con la modificación del modelo cinético .....	65

## INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática es una barrera fisicoquímica constituida por una bicapa de lípidos, carbohidratos y proteínas. Esta estructura separa y contribuye al mantenimiento de un medio interno distinto en composición a la del ambiente externo, cuyas propiedades hidrofóbicas dificultan el paso de moléculas eléctricamente cargadas, como son los iones en solución (Voet, Voet y Pratt, 1999). Así es que, es más probable que los iones se mantengan en la solución acuosa a que atraviesen la membrana de forma pasiva. De esta manera, el paso de partículas cargadas de forma pasiva a través de la membrana, está mediado por proteínas transmembrana específicas que regulan el flujo, e incrementan la conductividad de la membrana. Dentro de esta clase de proteínas se encuentran los *canales iónicos* que forman poros acuosos y median el flujo de iones. La estructura tridimensional de estas proteínas se estabiliza en la membrana por interacciones hidrofóbicas específicas con los lípidos de la bicapa. La molécula proteica que forma un canal de  $K^+$  está constituida por subunidades y cada subunidad consiste de varios dominios helicoidales que atraviesan la membrana (Friedman, 2008).

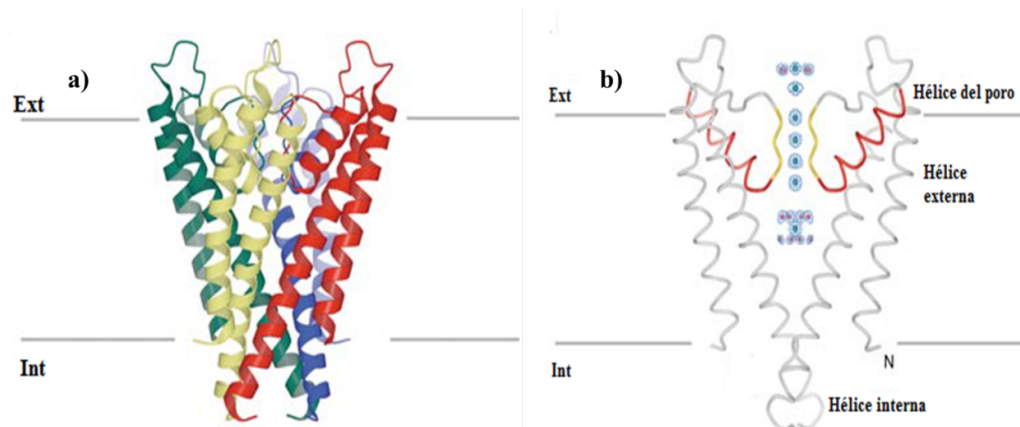
Los canales iónicos, exhiben tres propiedades esenciales: 1) La velocidad de conducción de iones es alta (por ejemplo, en los canales de  $K^+$  se encuentra en el orden de  $10^8$  iones  $K^+$  por segundo), 2) muchos son altamente selectivos, lo que significa que ciertas especies iónicas fluyen a través del canal mientras que otras prácticamente no lo hacen, 3) su función está regulada por la apertura de compuertas (conocido en inglés como “gating”), cuya probabilidad de apertura cambia en respuesta a estímulos ambientales específicos (Mackinnon, 2004).

Existe una amplia variedad de canales iónicos, que se puede caracterizar por los distintos patrones de selectividad que exhiben y los diversos procesos que “encienden” la vía de conducción iónica. En esta sección nos centraremos en describir los canales de  $K^+$  debido a que el canal “Human Erythrocyte Mechano-activated  $K^+$  Channel A”, denominado HEMKCA, es un canal selectivo al ion  $K^+$  y es el objeto de estudio del presente trabajo.

## CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio son proteínas transmembrana que permiten el flujo selectivo de este ion y son particularmente importantes en: la forma y duración de potencial de acción, control del potencial de membrana, función epitelial y endotelial, modulación de la secreción hormonal, amortiguación de la señal de excitación celular y muchas otras funciones (González y col., 2012). Los diferentes tipos de canales de potasio se distinguen más por sus diferencias en las características de apertura de la vía de conducción, que por diferencias farmacológicas o de patrones selectividad iónica (Hille, 2001).

El clonamiento del gen del canal Shaker de  $K^+$  de *Drosophila melanogaster*, reveló por primera vez la secuencia de aminoácidos del canal de potasio (Tempel y col., 1987). Posteriormente, se desarrollaron estudios dirigidos a identificar los aminoácidos que constituían la vía de permeación del canal. Estos experimentos dieron evidencia de que la región SS1-SS2 del canal atraviesa la membrana dos veces y está íntimamente asociada con el poro de conducción iónico (Yellen y col., 1990).



**Figura 1.** a) Representación del canal KcsA de  $K^+$  con sus cuatro subunidades, b) El canal KcsA de  $K^+$  con las subunidades anterior y posterior removidas. Se muestran las hélices del poro en rojo y el filtro de selectividad en amarillo. [Modificado de Mackinnon, 2004]

La cristalografía de los canales  $K^+$  de *Streptomyces lividans* (KcsA), llevada a cabo por el grupo de Mackinnon, reveló que este canal es un tetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas estructuradas en dos dominios transmembrana conectados por la región del poro (región P), en la cual reside el filtro de selectividad (Figura 1). El largo del poro es de 45 amstrongs (Å), y su diámetro varía a lo largo de la distancia. Desde el interior celular, el poro comienza como un túnel de 18 Å de longitud y termina en una cavidad amplia cerca del centro de la membrana con aproximadamente 10 Å de diámetro. El canal de potasio disminuye la barrera dieléctrica de la membrana a través de la coordinación a nivel del poro de los iones  $K^+$  con las cargas negativas de los grupos carboxilo de los aminoácidos que lo forman, permitiendo así una muy alta velocidad de conducción y una estricta selectividad de estos canales (Doyle y col., 1998).

Una de las características más resaltantes de este grupo de canales, es la presencia de una secuencia de ocho aminoácidos altamente conservada, la cual es responsable de la selectividad del canal por el ion  $K^+$ , la secuencia del poro. La selectividad a potasio ocurre en el filtro de selectividad, localizado en el tercio extracelular de la vía de conducción iónica (Heginbotham y col., 1994). En la Figura 2 se muestra una secuencia de alineamiento de la región P de varios canales de potasio, donde se aprecia la homología de los canales en esta región de ocho aminoácidos, así como también las variaciones que puede presentar. En el filtro de selectividad existen cuatro posiciones que puede ocupar el ion  $K^+$ , pero sólo 2 configuraciones son posibles: la 1,3 y la 2,4, en las cuales los iones  $K^+$  se encuentran separados por una molécula de agua. Cada sitio de unión a  $K^+$  es una caja formada por ocho átomos de oxígeno ubicados en los vértices del cubo; estos átomos de oxígeno rodean al ion  $K^+$  en la cavidad de una manera similar a lo que sucede cuando el ion está hidratado totalmente en solución. A pesar de la alta afinidad del canal por los iones  $K^+$ , las altas velocidades de conducción se deben a que las fuerzas de repulsión entre los iones ayudan a superar la afinidad intrínseca de cada ion por cada sitio de unión. La dirección del flujo se encuentra determinada por el gradiente electroquímico para  $K^+$  existente entre los medios que son separados por la membrana (Mackinnon, 2003).

← -----P-REGION----->

-----12345678-----

Sh	DAFWWAVVTMTTVGYGDMT
Kv1.1	DAFWWAVVSMTTVGYGDMY
Shab	EAFWWAGITMTTVGYGDIC
Kv2.1	ASFWWATITMTTVGYGDIY
Shaw	LGLWWALVTMTTVGYGDMA
Kv3.1	IGFWWAVVTMTTLGYGDMY
Shal	AAFWYTIIVTMTTLGYGDMV
Kv4.1	AAFWYTIIVTMTTLGYGDMV
mSlo	ECVYLLMVTNSTVGYGDVY
fSlo	TCVYFLIVTMSTVGYGDVY
eag	TALYFTMTCMTSVGFGNVA
AKT1	TSMYWSITTLTTVGYGDLH
KAT1	TALYWSITTLTTTGYGDFH
ROMK1	SAFLFSLETQVTIGYGFRF
IRK1	AAFLFSIETQTTIGYGFRF
GIRK1	SAFLFFIETEATI GYG YRY

**Figura 2.** Secuencia firma de canales de K<sup>+</sup>. Alineación de la región P de varios canales de K<sup>+</sup>. La secuencia firma se muestra numerada del 1-8; aquellos residuos idénticos al canal *Shaker* (Sh) se encuentran resaltados. Se muestran 4 genes independientes de *Drosophila*: *Shaker*, *Shab*, *Shaw* y *Shal*, y sus homólogos en mamíferos Kv1.1, Kv2.1, Kv3.1 y Kv4.1, respectivamente, que codifican canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje. fSlo y mSlo son canales activados por Ca<sup>2+</sup> clonados de *Drosophila* y ratón, eag es un canal de K<sup>+</sup> regulado por nucleótidos cíclicos, AKT1, KAT1, ROM1 y IRK1 son rectificadores hacia adentro, y GIRK1 es modulado por proteínas G. [Tomado de Heginbotham y col., 1994].

Los canales de potasio (y de otras especies iónicas) son proteínas con función alostéricas cuya probabilidad de apertura cambia en respuesta a estímulos externos (Jiang y col., 2002b). Para cada tipo de canal, el estímulo que cambia la probabilidad de apertura y consecuentemente la conducción iónica, es variado y puede ser: unión de ligandos, cambios en el potencial de membrana, tensión generada sobre la membrana celular, entre otros. La apertura de la compuerta en canales iónicos, como los canales de potasio, ocurre como un proceso aleatorio del movimiento de regiones específicas en la cara citoplasmática de estas proteínas, los dominios de compuerta, cuya función básica es desarrollar un trabajo mecánico entre las conformaciones abierta y cerrada permitiendo así la conducción iónica del poro (Jiang y col., 2002a). Este proceso puede ser modulado por

otras subunidades proteicas propias del canal, compuestos farmacológicos, condiciones fisicoquímicas del medio, entre muchos otros. Del estudio del KcsA, se evidencia que el proceso de apertura de la compuerta del canal puede ser modulado por condiciones fisicoquímicas del medio, como se comprobó al encontrar que esta apertura es dependiente del pH de la solución (Cuello y col., 1998). Actualmente se propone que los canales iónicos oscilan entre el estado abierto y cerrado debido a que son estados parecidos desde el punto de vista energético y se supone que este cambio está permitido en las condiciones fisicoquímicas de la vida, por lo tanto los moduladores de la apertura aumentan o disminuyen la estabilidad de un estado en particular, favoreciendo la estadía en uno de ellos, y aumentando o disminuyendo la probabilidad de apertura, lo que normalmente se conoce como estado abierto o cerrado de los canales iónicos.

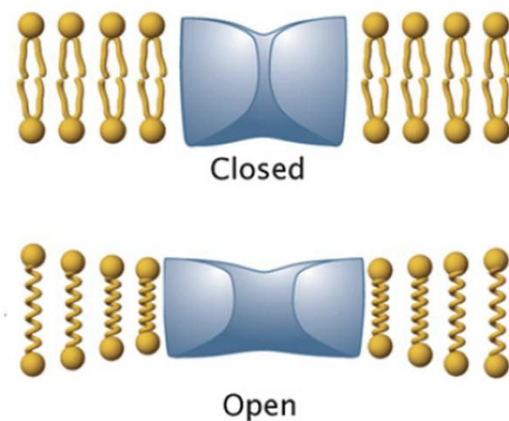
Existen dominios reguladores de la conductancia a  $K^+$ , como por ejemplo, los dominios RCK que se encuentran en muchos canales de potasio dependientes de ligando, la mayoría ligados al extremo C terminal del lado intracelular (Jiang y col., 2001). Trabajando con canales de células procariontas que presentan estos dominios, se identificó, purificó y cristalizó la estructura de un canal de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *MthK*, el cual es un canal selectivo a potasio que presenta un arreglo de ocho dominios RCK idénticos, denominado anillo de gating, y es activado por la presencia de calcio intracelular (Jiang y col., 2002a). En otro trabajo, Jiang y col. (2002b) comparan las estructuras del canal MthK y KcsA, reportando que la estructura que rodea el filtro de selectividad es similar en ambos canales y que el movimiento de la compuerta, corresponde a un residuo de glicina en la posición 83 en el canal MthK y en la posición 99 para el canal KcsA. La estructura del MthK reveló el significado de un residuo de glicina, que permite el movimiento flexible de la compuerta y de un residuo de alanina, que de esta manera estabilizan un amplio camino hacia el filtro de selectividad. Además, ellos proponen que las estructuras MthK y KcsA representan los estados abiertos y cerrados de la mayoría de los canales de  $K^+$ , dependientes de ligando o voltaje (Jiang y col., 2002b)

Como se menciona antes, los estímulos que modifican la actividad de los canales iónicos son variados dependiendo del tipo de canal. Por ejemplo, el HEMKCA es un canal mecanoactivado y modulado por la presencia de calcio intracelular, razones por las cuales se describe este tipo de canales a continuación.



## ***Canales mecanosensibles***

Se ha encontrado la presencia de canales mecanosensibles (Msc) en bacterias, hongos, plantas, células animales, etc, que además presentan una selectividad iónica variada (Morris, 1990). La designación de los canales iónicos como mecanosensibles es empírica y significa que la probabilidad de apertura responde a la deformación de la membrana (Morris, 2001). El término “sensibles a presión” viene del uso del método de patch clamp donde los Msc son identificados por el aumento en la probabilidad de apertura del canal, al aplicar presión negativa sobre las membranas una vez formado el sello eléctrico (Sachs, 2010).



**Figura 3.** Efecto de la tensión generada sobre la bicapa lipídica sobre la conformación del canal. En ausencia de tensión en la membrana se ve favorecida la conformación cerrada del canal (arriba), mientras que la aplicación de tensión favorece la conformación abierta del canal (abajo). [Tomado de Haswell y col., 2011].

El conocimiento acerca de la estructura, mecanismo y funcionamiento de los canales mecanosensibles se basa principalmente en el estudio de canales de bacterias (Martinac y col., 1987; Hamill y Martinac, 2001; Perozo y col., 2002; Sachs, 2010). Los canales mecanosensibles de *Escherichia coli* de conductancia alta (MscL) y conductancia baja (MscS), son los principales canales mecanosensibles en bacterias, que exhiben altos umbrales de “gating” en comparación con los canales conocidos de  $K^+$  (Booth y col., 2015). En estos canales, la interacción entre los lípidos de la bicapa y la proteína es

importante debido a que responden directamente a cambios en la tensión que se genera sobre la membrana (Figura 3) (Kung y col., 2010). La importancia de la membrana viene dada por la observación de que variaciones en el grosor de la bicapa lipídica o la adición de componentes que generen curvatura en la membrana, afectan las conformaciones en las que se puede encontrar al canal (Perozo y col., 2002).

Actualmente, no existe una estructura proteica única para los Msc, aunque algunas han sido asociadas correcta o incorrectamente con la superfamilia de canales TRP (Sachs, 2010). Como evidencia, aunque los canales MscL y MscS comparten una organización común de un dominio transmembrana N-terminal y un dominio citoplasmático C-terminal, los arreglos generales del plegamiento de los péptidos son distintos para cada proteína, indicando que no comparten un ancestro común (Haswell y col., 2011).

El desacople hidrofóbico es una de la hipótesis que explica la base de la sensibilidad a la tensión en los canales mecanosensibles. Esta hipótesis se basa en la variación del grosor de la membrana y su relación con la zona hidrofóbica de las alfa hélices anfipáticas transmembrana del canal. Si la composición lipídica de la membrana se ve alterada, se espera que sucedan cambios conformacionales en la proteína que tiendan a favorecer con mayor probabilidad un estado u otro del canal. De esta manera, cambios en la curvatura de la membrana debido a la inserción de lípidos pueden afectar la apertura de los canales Msc (Hamill y Martinac, 2001; Romero 2004).

Respecto al mecanismo de apertura de canales mecanosensibles, se conocen tres modelos, denominados: a) de “bicapa”, b) de “atadura”, y c) híbrido. El modelo de bicapa se basa en experimentos de reconstitución de canales en liposomas y plantea que el estiramiento de la membrana favorece una disminución en la densidad de empaquetamiento de los lípidos y del grosor de la membrana, de forma que si el canal sufre una variación en el área que ocupa y/o desacople hidrofóbico, se producirá un cambio entre las conformaciones abierta y cerrada. Por su parte, el modelo de atadura propone que una proteína del citoesqueleto está directamente conectada al canal, generando así un proceso de acoplamiento mecánico, entre el citoesqueleto y el mecanismo de compuerta, mediando de esta manera la apertura y cierre del canal. Y el modelo híbrido, propone una mezcla de los modelos anteriores (Hamill, 2006).

Al igual que en canales dependientes de ligando o voltaje, la herramienta farmacológica ha sido ampliamente utilizada en el estudio de canales mecanosensibles (Hamill y Martinac, 2001). La falta de especificidad en los inhibidores de canales Msc, dificulta su estudio desde el punto de vista funcional. Sin embargo, a pesar de que no se han descubierto inhibidores específicos hasta la fecha, se ha identificado un número de compuestos que modifican la actividad del canal (Hamill, 2006; Sachs, 2010). Entre los principales inhibidores se encuentran, gadolinio ( $Gd^{3+}$ ) y la *mecanotoxina 4* de *Grammostola spatulata* (GsMTx4).  $Gd^{3+}$  es un inhibidor no específico de canales Msc que produce una inhibición a través de una disminución en la tasa de apertura y en la conductancia unitaria del canal (Caldwell y col., 1998). Por su parte, GsMTx4 es un péptido de 34 aminoácidos aislado de veneno de tarántula (Gottlieb, y col., 2004). GsMTx4 es el inhibidor de canales Msc más específico identificado hasta la fecha, y debido a su estructura se espera que sea atraído por las regiones negativas de la interfase lípido/proteína, pudiendo esparcirse en bolsillos hidrofóbicos, bien sea dentro de la proteína o en la interfase proteína/lípido (Hamill, 2006).

### **CANALES TREK y TRAAK**

TREK y TRAAK fueron los primeros canales de potasio de doble poro mecanosensibles clonados de mamíferos. TREK/TRAAK es considerada una subfamilia polimodal de canales de  $K^+$  debido a que son regulados por diversos de estímulos (González y col., 2012)

En el caso de TREK-1, es un canal activado por ácido araquidónico (AA), siendo la activación dosis dependiente e independiente de la concentración de calcio intracelular. Este es un canal que puede ser abierto por estiramiento de la membrana, la presencia de AA y es modulado por el volumen celular. Tanto en condiciones fisiológicas como simétricas de  $K^+$ , la relación I-V del canal muestra que es rectificador hacia afuera (Patel y col., 1998). Asimismo, ha sido demostrado que el cambio en la actividad de TREK-1 es altamente dependiente de los fosfolípidos presentes en la membrana celular (Chemin y col., 2005)

En el caso de TRAAK es una proteína de 398 aminoácidos clonada por Fink y col. (1998). Se encontró que las corrientes de TRAAK son insensibles a cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y a acidificación del medio, tanto interna como externa.

Al igual que TREK-1, TRAAK se ve estimulado y activado por la presencia de AA, esta estimulación es reversible y presenta un efecto dosis dependiente (Fink y col., 1998).

### ***Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>***

Aumentos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en eritrocitos humanos produce un incremento marcado en la permeabilidad a K<sup>+</sup> de la membrana (Gárdos, 1958). Los canales de potasio activados por calcio se agrupan en la familia de canales de potasio con seis segmentos transmembrana y un dominio del poro. Éstos han sido descritos en función de la conductancia del canal; su sensibilidad a Ca<sup>2+</sup>; la dependencia de voltaje y propiedades farmacológicas (Latorre y col., 1989; Ishii y col., 1997; Begenisich y col., 2004). Dentro de esta clase de canales se encuentran los canales de conductancia alta (BK), entre 100-220pS, los canales de pequeña conductancia (SK), entre 2-20pS, y los canales de conductancia intermedia (IK), entre 20-85pS (Ishii y col., 1997).

La familia de canales de alta conductancia (BK), es codificada por el gen Slo en mamíferos. Experimentos en membranas lipídicas y patch clamp demostraron que la probabilidad de apertura del canal incrementaba al enfrentar a la célula a depolarizaciones o a incrementos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Por otro lado, los canales de baja conductancia (SK) son activados por aumentos en la concentración intracelular de calcio, se clasifican en tres subtipos SKCa1; SKCa2 y SKCa3 y son codificados por los genes KCNN1; KCNN2 y KCNN3 respectivamente. Esta familia incluye un canal de conductancia intermedia, IKCa1, codificado por el gen KCNN4 (González y col., 2012). Los canales SK e IK, son codificados por estos cuatro genes de la familia KCNN, de los cuales el canal de conductancia intermedia, comparte el 40% de la identidad con cada uno de los tres canales SK (Begenisichy col., 2004).

Desde el punto de vista farmacológico, los canales de conductancia intermedia (IK) se distinguen de otros canales activados por Ca<sup>2+</sup>, debido a que son bloqueados por derivados Imidazolicos, tales como el clotrimazol, pero no son bloqueados por compuestos como apamina o iberotoxina, bloqueadores de canales SK y BK, respectivamente (Ishii y col., 1997; Begenisichy y col., 2004).

## EL ERITROCITO HUMANO

Los glóbulos rojos o eritrocitos de mamíferos son células eucariotas simples desde el punto de vista estructural y están altamente diferenciados en su función primaria en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Estas células están libres de las complejidades asociadas a los compartimientos intracelulares, por ello han sido empleadas como modelo clásico en el estudio del transporte de iones, nutrientes, y otros solutos a través de la membrana (Freedman, 2001a).

En la membrana de eritrocitos humanos, tal como en todas las células eucariotas, los fosfolípidos de la membrana se distribuyen asimétricamente. Los fosfolípidos neutros, fosfatidilcolina y esfingomiélin, se localizan principalmente en la monocapa externa, mientras que el fosfolípido neutro fosfatidiletalona y los fosfolípidos cargados negativamente, fosfatidilinositol y fosfatidilserina, se localizan principalmente en la monocapa interna con las cargas negativas apuntando hacia el citoplasma (Freedman, 2001b).

Los eritrocitos normales muestran una forma de disco bicóncavo, que les permite maximizar la relación área / volumen. Una característica importante de los glóbulos rojos es la habilidad de someterse a distorsiones y deformaciones y luego restaurar su forma normal sin fragmentación o pérdida de la integridad celular (Freedman, 2001a; Yawata, 2003).

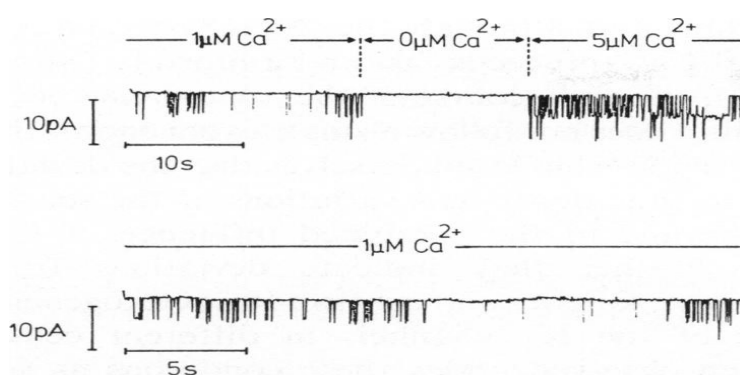
Bajo condiciones normales, los glóbulos rojos son relativamente impermeables a cationes en comparación con los aniones, a diferencia de la gran mayoría de tipos celulares y mantienen concentraciones intracelulares altas de potasio, bajas en sodio y extremadamente bajas en calcio. Los eritrocitos son altamente permeables a aniones y agua y estas moléculas pueden ser intercambiadas rápidamente a través de la membrana. Estas células normalmente tienen al menos tres sistemas para mantener constante su volumen, tales como transportadores activos dependientes de energía, transportadores pasivos a favor de gradientes y varios canales (Yawata, 2003). A continuación se describen algunos canales iónicos presentes en la membrana de los eritrocitos humanos, y otras permeabilidades que han sido reportadas en este tipo celular, que será el modelo de estudio del presente trabajo.

## CANALES DESCRITOS EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO

### *El Canal Gárdos*

En casi todas las células, el aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca un incremento selectivo en la permeabilidad a  $\text{K}^+$ . En eritrocitos, este fenómeno se conoce como efecto Gárdos. El estudio de la permeabilidad a  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  hasta los años 70's se había basado en las medidas de flujos por métodos radioactivos, pero el desarrollo de la técnica de Patch Clamp permitió realizar estudios electrofisiológicos que demostraron que la permeabilidad de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  se debía a la presencia de canales iónicos selectivos a  $\text{K}^+$  (Grygorczyk y col., 1984; Grygorczyk y Schwarz, 1985).

La actividad del canal Gárdos es dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y su efecto es reversible pues en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no se registra actividad de canal mientras que al agregarlo a la solución la actividad es restaurada (Figura 4) (Grygorczyk y col., 1984; Grygorczyk y Schwarz, 1985; Leinders y col., 1992). Este canal presenta una conductancia de aproximadamente 25 pS a un potencial de 0 mV en 140 mM de  $\text{K}^+$  en la solución externa y además muestra rectificación hacia adentro (Grygorczyk y col., 1984).



**Figura 4.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad del canal Gárdos. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no se observa actividad de canal, la cual es restaurada al agregar nuevamente  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución [Tomado de Grygorczyk y col., 1984].

Se ha demostrado que cationes impermeables pequeños inhiben las corrientes de  $K^+$  en una manera dependiente de voltaje y de la concentración del ion.  $Mg^{2+}$  altera la susceptibilidad del canal, requiriéndose de concentraciones mayores de  $Ca^{2+}$  para producir la misma actividad de canal que se observa en ausencia del ion (Grygorczyk y Schwarz, 1985).

Estudios de selectividad revelan que este canal es también permeable a  $NH_4^+$  y  $Rb^+$ , pero impermeable a  $Na^+$ ,  $Cs^+$  y  $Li^+$ , con una secuencia de selectividad ( $P_k/P_x$ ):  $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ \gg Na^+ > Cs^+ > Li^+$ ; y en el caso de la conductancia de iones ( $g_k/g_x$ )  $K^+ > TI^+ > NH_4^+ > Rb^+ \gg Na^+; Cs^+, Li^+$  (Christophersen, 1991).

### *El Canal catiónico no selectivo*

En eritrocitos ha sido reportada la presencia de dos tipos de canales catiónicos no selectivos, uno que depende de voltaje (Christophersen y Bennekou, 1991) y otro que no (Huber y col., 2001).

El canal catiónico no selectivo dependiente de voltaje no muestra discriminación entre iones los iones  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  y  $NH_4^+$ , pero es impermeable a  $Cl^-$ . Este canal presenta una conductancia de 35 pS y en un intervalo de  $\pm 40$  mV la relación I/V es casi lineal (Christophersen y Bennekou, 1991). Se demostró que la dependencia de voltaje de este canal depende fuertemente del tipo de protocolo ensayado, presentando un comportamiento de tipo histéresis. Por otro lado, se determinó que también es permeable a iones divalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  (Kaestner y col., 2000).

Por otro lado, el canal catiónico no selectivo independiente de voltaje es sensible a cambios en el volumen celular y a la concentración de  $Cl^-$  en el medio (Huber y col., 2001). Este canal presenta una relación de conductividad para las corrientes de entrada de:  $Na^+ \geq K^+ \geq Cs^+ \geq Li^+ > NMDG^+$ , mostrando que el canal no discrimina entre cationes monovalentes y comprobando que se trata de un canal catiónico no selectivo (Duranton y col., 2002).

### ***Los Canales aniónicos***

La membrana de los eritrocitos humanos es altamente permeable a aniones, de hecho el potencial de membrana es cercano al potencial de equilibrio del ion  $\text{Cl}^-$  en la célula. El primer reporte de conductancia aniónica en eritrocitos fue realizado por Schwarz y su equipo, en el cual registran un canal que muestra una conductancia de 6 y 15 pS en un medio con cloruro y nitrato, respectivamente (Schwarz y col, 1989). Más tarde, Kaestner y Bernhardt (2002) sugieren que es más probable que la baja conductancia del canal que describen Schwarz y su equipo, se deba a un canal iónico modulado por protones o hidroxilos, más que a un canal de cloruro presente en la membrana de eritrocitos humanos.

En eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* fue identificada la presencia de dos tipos de canales aniónicos propios de la membrana de los eritrocitos: uno que presenta rectificación hacia afuera y otro con un patrón de conductancia lineal. Este último registraba una conductancia entre 12-15 pS, sensible a proteinkinasa A en presencia de ATP y sensible a la deformación de la membrana, cuya presencia se registró en más del 80% de los parches, tanto en membranas infectadas como en no infectadas, mientras que el canal rectificador hacia afuera presentó una frecuencia de aparición en los parches menor a 5% y fue registrado sólo en membranas no infectadas con el parásito (Egée y col., 2002). Luego, el equipo de Thomas obtuvo resultados similares identificando una conductancia pequeña para  $\text{Cl}^-$  entre 8-12 pS en membranas de eritrocitos normales y de pacientes con fibrosis quística y demostraron la presencia de otra conductancia aniónica que mostraba rectificación hacia afuera, presente en 27% de los parches de eritrocitos de pacientes con fibrosis quística pero no en eritrocitos normales (Decherf y col., 2007). Adicionalmente, Kucherenko y col. (2009) sugieren la presencia de una conductancia de  $\text{Cl}^-$  que muestra rectificación hacia afuera y es sensible a cambios en el pH de la solución.

El trabajo realizado por Lang y su equipo demostró la existencia de canales CIC-2 que permanecen inactivos en condiciones normales, son dependientes de voltaje, activados por oxidación e inhibidos por la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  (Huber y col., 2004). Por otro lado, Glogowska y col. (2010) proponen la existencia de un canal aniónico con múltiples niveles de conductancia, con propiedades cinéticas complejas, cuya farmacología y apertura de las compuertas depende de las condiciones a la que se exponga al canal.



### **Otras permeabilidades reportadas en la membrana de eritrocitos humanos a través de técnicas distintas a las electrofisiológicas**

Adicionalmente, ha sido reportada la presencia de otras permeabilidades en la membrana de los eritrocitos humanos, que han sido estudiadas por técnicas distintas a las electrofisiológicas, tales como los receptores de NMDA, la permeabilidad *Psickle*, y los canales *Piezo1* y *TRPC6*. Los receptores de NMDA son canales catiónicos no selectivos dependientes de ligando que median la transmisión neuronal rápida en el sistema nervioso, pero Makhro y col. (2010) muestran evidencias de la presencia de las subunidades de estos receptores en eritrocitos de mamíferos. Las subunidades de receptores NMDA son expresadas en células precursoras de eritrocitos y los eritrocitos humanos circulantes retienen un número limitado de estos receptores (Makhro y col., 2013). Por su parte, *Psickle* ha sido definida como un transporte catiónico anormal en eritrocitos de pacientes con anemia falciforme, de particular importancia porque lleva a la pérdida de solutos y encogimiento celular que incrementa la polimerización de la hemoglobina tipo S y causa el cambio de forma de la célula (Gibson y col., 2000). Además, se ha mostrado que DMA (dimetil adipimato) inhibe la polimerización y cambio de forma de los eritrocitos y esto inhibe el desarrollo de *Psickle*. Entre los estímulos que lo activan se encuentra la desoxigenación, polimerización de la hemoglobina tipo S y el cambio de forma en eritrocitos (Ma y col., 2012).

Estudios con *Piezo 1* sugieren que estas proteínas juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del volumen de los eritrocitos y han sido relacionados con la xerocitosis hereditaria, un tipo de anemia caracterizada por la deshidratación del eritrocito (Zarychanski y col., 2012). Más tarde, Patapoutian y su equipo proponen a *Piezo1* como una vía de entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular que se encuentra implicada en la regulación del volumen de los eritrocitos con el estrés mecánico como señal de activación (Cahalan y col., 2015). Por último, Föllner y colaboradores muestran evidencias de la expresión del canal catiónico *TRPC-6* en eritrocitos, a través de ensayos con Western-blot, e indican su posible papel en la entrada de  $Ca^{2+}$  hacia el interior de la célula (Föllner y col., 2008a).

## **HEMKCA:**

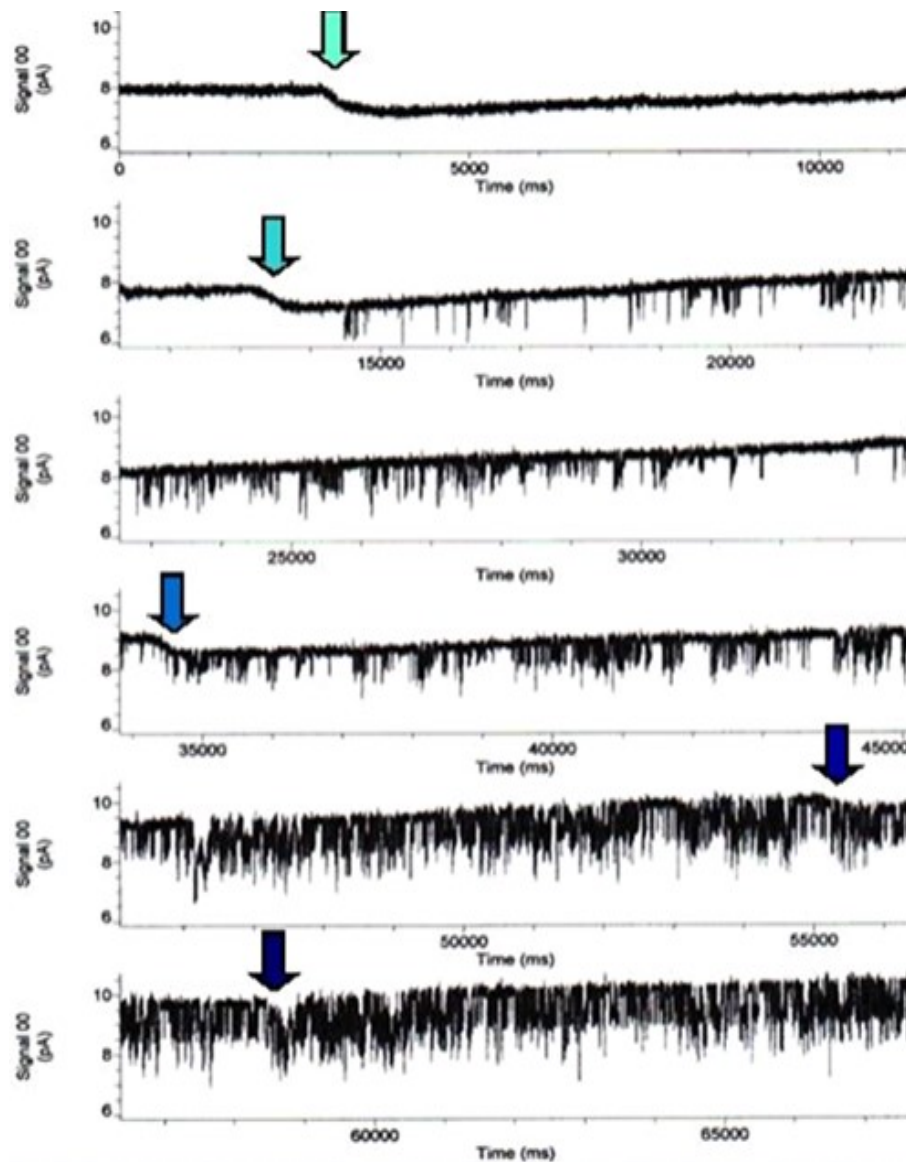
### **EL CANAL DE K<sup>+</sup> MECANOACTIVADO DEL ERITROCITO HUMANO (HUMAN ERYTHROCYTE MECANO-ACTIVATED K<sup>+</sup> CHANNEL A)**

#### ***1. Dependencia de la Po con el estrés mecánico***

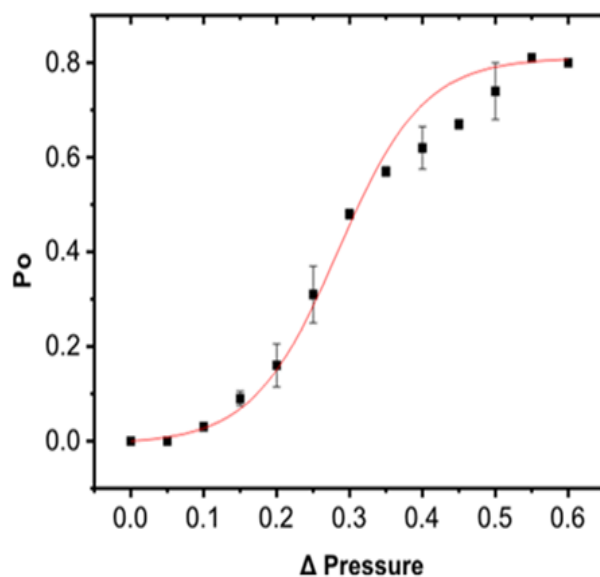
En nuestro laboratorio con la finalidad de estudiar el efecto del estrés mecánico sobre la membrana de los eritrocitos, se desarrolló una modalidad especial de patch clamp, el T.U.G.O patch clamp (The U-shape Giga Ohm patch clamp), que consiste en aplicar presión al eritrocito para simular las condiciones mecánicas que enfrentan al pasar por el lecho capilar, (explicada más adelante). Con el uso de esta técnica se evidencia por primera vez la existencia de un canal: el HEMKCA, cuya probabilidad de apertura depende de la tensión que se aplica sobre la membrana del eritrocito. En la Figura 5 se puede observar que al someter la membrana del eritrocito a estrés mecánico, por la aplicación de presión negativa sobre un parche de membrana, se activa una vía de conducción iónica. Esta dependencia de la Po con la presión aplicada sobre los parches de membrana, presenta un comportamiento de tipo sigmoideo como se muestra en la Figura 6.

#### ***2. Características del canal***

El HEMKCA presenta una conductancia dependiente de las condiciones experimentales, así se han propuesto valores entre 22-29 pS (Romero, 2004) o de 17 pS en condiciones simétricas de 120 mM KCl; 12 mM NaCl; 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM Tris pH 7,3. Se demostró que la actividad de este canal es modulada por la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>, pues al disminuir la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> desde 1 mM hasta 100 nM se observa una disminución dramática de la actividad de canal como se muestra en la Figura 7. Este efecto muestra un comportamiento sigmoideal con una Kd en el orden submicromolar (Romero y Zambrano, 2008).

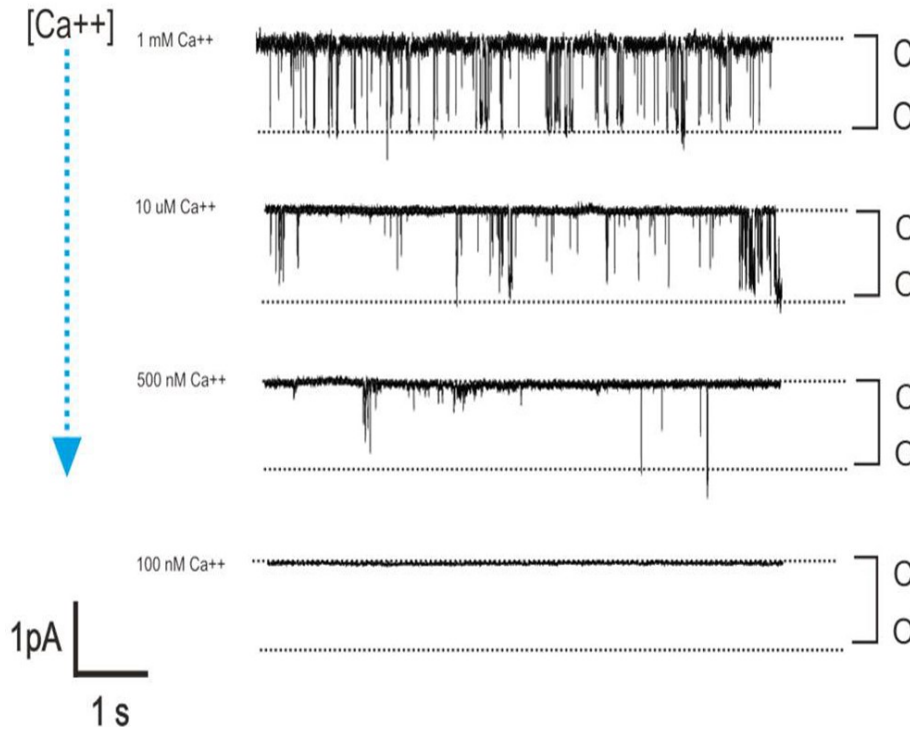


**Figura 5.** Efecto de la presión sobre la actividad del HEMKCA. Curso temporal de la actividad del HEMKCA a un potencial de  $-60$  mV en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a ambos lados de la membrana. Las flechas indican el momento en que se aplicaron pasos de presión consecutivos (0,05 mm Aire) de manera creciente. [Tomado de Romero, 2004]



**Figura 6.** Relación  $P_o$  vs. presión aplicada sobre los parches de membrana de los eritrocitos. [Tomado de Romero, 2004].

Con la finalidad de conocer la relación de permeabilidades de los iones monovalentes de importancia fisiológica,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se evaluó la relación corriente/voltaje en condiciones asimétricas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  con una fuerza iónica total constante para las soluciones en ambos lados de la membrana. De estos experimentos, se obtuvo un potencial de reversión de  $-8,5$  mV, cercano al potencial de equilibrio calculado para  $\text{K}^+$ , demostrando de esta manera que el HEMKCA es un canal selectivo a este ion. En este sentido, Romero (2004) demostró que este canal es 100 veces más permeable al ion  $\text{K}^+$  que al ion  $\text{Na}^+$ . Por otro lado, con el uso de gradientes bi-iónicos se realizó un estudio de la selectividad del canal, obteniendo la secuencia  $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$ , cuando el ion de prueba se encontraba presente en la solución extracelular y la secuencia  $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$  cuando el ion de prueba se encontraba presente en la solución intracelular (Romero, 2016).



**Figura 7.** Modulación de la actividad del HEMKCA por la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Curso temporal de la corriente a un potencial de  $-80$  mV a las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  indicadas en la figura. Las deflexiones hacia abajo representan las aperturas del canal. C: cerrado, O: abierto. [Tomado de Romero y Zambrano, 2008]

Este canal presenta un proceso de inactivación con un decaimiento exponencial de la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) en el tiempo con una  $\tau = 4,55 \pm 1,95$  min. Este proceso parece comenzar cuando se aplica un pulso de voltaje y se desarrolla el flujo de corriente, sugiriendo que el proceso de activación es necesario pero no suficiente para permitir el desarrollo de inactivación en el canal (Romero y Zambrano, 2010). Adicionalmente se estudió el efecto del pH sobre la actividad del HEMKCA, en el cual se mostró que la disminución del pH de la solución intracelular generaba una disminución dramática de la  $P_o$  mostrando una dependencia sigmoidea, que parece ser producto de la presencia de una histidina que pudiese estar siendo protonada y estar relacionada con el proceso de activación pero no con el proceso de permeación, pues el cambio en el pH no tiene efecto alguno sobre la conductancia del canal (Romero y Zambrano, 2011).

### 3. *Un Modelo cinético*

La mayoría de los mecanismos que han sido propuestos en el estudio de canales iónicos involucran transiciones reversibles entre estados discretos en los que se puede encontrar al canal, comúnmente entre estados conductivos (abiertos) o no conductivos (cerrados) (Colquhoun y Hawkes, 1995). En este sentido, un modelo cinético puede ser descrito como una formalización de la actividad de canal que se genera por el análisis detallado del curso temporal y la duración de cada apertura o cierre del mismo. El modelo que es generado de esta manera nos da una herramienta para un análisis formal de la actividad del canal y a su vez para dilucidar o proponer mecanismos de acción (Colquhoun y Hawkes, 1977, 1982).

En el estudio de canales iónicos, los eventos de apertura y cierre ocurren de forma aleatoria, por lo cual la constante de velocidad de la reacción debe ser interpretada en un modo probabilístico (Colquhoun y Hawkes, 1995). Esta probabilidad no depende del tiempo en que se comience a medir el intervalo y es independiente de lo que haya sucedido con anterioridad, por lo cual, en el estudio de canales iónicos se asume que la cinética puede ser estudiada como un proceso Markoviano, en el que la probabilidad de que el canal se encuentre en cualquier estado sólo depende del estado inicial en el que se encuentre la proteína (Colquhoun y Hawkes, 1982).

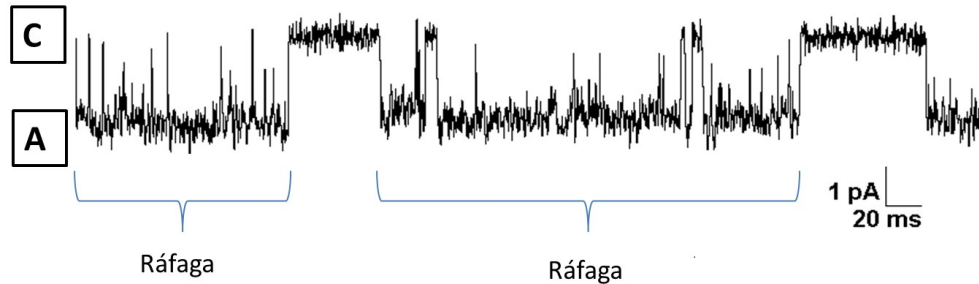
La información acerca de los mecanismos de apertura y cierre contenida en un registro eléctrico de canal unitario, se encuentra principalmente en la duración de los eventos abierto y cerrado. La duración de estos estados son variables aleatorias que pueden ser descritas por una función de densidad de probabilidad (fdp) ya que el tiempo es una variable continua. Esta función puede ser definida, tal que el área bajo la curva para un estado particular, represente la probabilidad de que la duración en dicho estado sea igual o menor que un tiempo  $t$  dado. La función de densidad de probabilidad es descrita por una distribución exponencial, con media  $1/\alpha$ , donde  $\alpha$  representa la constante de velocidad que describe la transición entre los estados. En general, para los mecanismos con varios estados, se espera que las distribuciones de estados sean una mezcla de exponenciales. La función de densidad de probabilidad está definida como:

$$f(t) = \sum_{i=1}^{i=n} a_i \lambda_i e^{-\lambda_i t}$$

Donde la  $\sum a_i = 1$  ; a: área bajo la curva;  $\lambda$ : recíproco de la constante de tiempo ( $1/\alpha$ )

En el análisis de registros de canales unitarios, los datos son representados como una serie de transiciones rectangulares entre estados discretos. Lo primero que se debe hacer es obtener una versión idealizada de los registros experimentales que sea lo más parecido a la actividad real del canal. La detección de estas transiciones se puede obtener a través del método de amplitud media, que consiste en fijar un umbral de corriente entre los estados conductivo y no conductivo, de manera que cada vez que la corriente cruce dicho umbral se considerará como una transición entre un estado u otro. De esta manera, se obtiene un registro idealizado que se aproxima a la actividad real del canal y describe la secuencia de transiciones que ocurren entre los estados (Colquhoun, 1994).

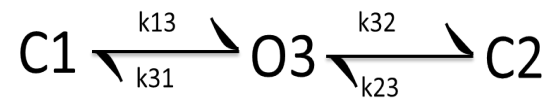
En el HEMKCA, la actividad de canal puede ser descrita por cerrados prolongados seguidos de aperturas consecutivas separadas por cerrados de corta duración, en un comportamiento tipo ráfaga (Mata, 2016). Una ráfaga se define como un grupo de aperturas separadas por lapsos cerrados cuya duración es menor que un tiempo crítico dado ( $t_c$ ) (Figura 8). La presencia de ráfagas sugiere que existen dos o más estados cerrados del canal, en el que al menos un estado presenta una constante de tiempo ( $\tau$ ) considerablemente más alta que el otro estado (Colquhoun, 1994). Las ráfagas aparentes reflejan el mecanismo molecular subyacente del canal, por lo cual el estudio cinético de esta variable provee información acerca del funcionamiento de estas proteínas (Magleby y Pallota, 1983).



**Figura 8.** Actividad tipo ráfaga del canal HEMKCA, registrada con una diferencia de potencial de  $-60$  mV. Las deflexiones hacia abajo representan las aperturas del canal. A: Estado abierto, C: estado cerrado.

El análisis de las ráfagas permite maximizar la probabilidad de que todas las aperturas observadas dentro de la ráfaga sean producto de la actividad de la misma proteína incluso en parches que contienen más de un canal (Colquhoun, 1994). En un parche de membrana es difícil conocer la cantidad de canales presentes incluso si sólo se observa la presencia de un solo nivel de corriente, aparte del cero, pues dicha actividad podría ser producto de la apertura no simultánea de dos o más canales. Sin embargo, la ausencia de aperturas simultáneas durante una ráfaga con una  $P_o$  cercana a la unidad, maximiza la probabilidad de que dicha actividad sea producto de una sola proteína. En este sentido, Mata (2016) propuso un modelo cinético que describe la actividad tipo ráfaga del HEMKCA que comprende un estado abierto y dos estados cerrados, de corta y larga duración, como se muestra en la Figura 9.





**Figura 9.** Modelo cinético propuesto para el HEMKCA que describe la actividad tipo ráfaga del canal. C1: cerrado corto, C2: cerrado largo, O3: abierto, k: constantes de velocidad del modelo.

El valor del modelo cinético para el HEMKCA radica en que las variables intra-ráfaga permiten encontrar diferencias significativas en el comportamiento del canal, ante diferentes tratamientos experimentales, además de que permite plantear hipótesis acerca de la interacción de las moléculas de estudio con el canal, tomando en cuenta la estructura de la proteína (Mata, 2016).

## ANTECEDENTES

### Senescencia del Eritrocito Humano

El eritrocito humano tiene una vida media de 120 días y al carecer de núcleo y demás organelos, es incapaz de pasar por un proceso de apoptosis clásico. Por tales motivos, debe existir algún tipo de reloj biológico que cuente la edad del eritrocito y participe en el retiro de los mismos de la circulación (Romero, 2004).

Empleando la técnica de separación por densidad de Percoll en poblaciones de eritrocitos densos y ligeros, se ha reportado que el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular es mayor en las células densas que en las ligeras, siendo de 30 nM y 8 nM, respectivamente. De esta manera, tomando en cuenta que el envejecimiento de los eritrocitos está relacionado con aumentos en la densidad celular, el aumento en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células densas sugiere que la homeostasis de este ion se altera durante la senescencia del eritrocito (Romero y col., 1997). La diferencia en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico entre células densas y ligeras, surge de: a) una disminución en la velocidad de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular y b) una reducción en la capacidad de bombear  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior celular durante el envejecimiento del eritrocito (Romero y Romero, 1997). Por otro lado, la incubación de células ligeras con gadolinio ( $\text{Gd}^{3+}$ ) produce un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, a diferencia de la incubación de las células densas, que registran una reducción en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . De estos experimentos se sugiere que  $\text{Gd}^{3+}$  está ejerciendo un bloqueo sobre canales mecanosensibles presentes en los eritrocitos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular (Romero y Romero, 1999).

El proceso de senescencia de los eritrocitos se caracteriza por reducción en el volumen celular, formación de vesículas y pérdida de la asimetría lipídica de la membrana con la translocación de fosfatidilserina (PS) hacia la monocapa externa (Föllner y col., 2008b; Rifkinds y Nagababu, 2013; Lang y col., 2010, 2012, 2015). El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es la principal señal que desencadena el proceso de senescencia, seguido por encogimiento celular debido a la activación de canales de  $\text{K}^+$  sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , hiperpolarización de la membrana y salida de  $\text{KCl}$  y agua de la célula. Se ha sugerido que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular es debida a la presencia de canales

cati6nicos no selectivos presentes en las membranas de los eritrocitos, posiblemente a trav6s de canales TRPC6 (Lang y col., 2010). El envejecimiento celular puede ser provocado tanto por aumentos en la concentraci6n de  $\text{Ca}^{2+}$  como por efecto de algunos estresores celulares, tales como el estr6s oxidativo. Los eritrocitos expresan caspasas sensibles a oxidaci6n que estimulan la exposici6n de PS a la monocapa externa (F6ller y col., 2008b). De esta manera, la presencia de agentes oxidantes en eritrocitos puede da1ar l6pidos y prote6nas de membrana y del citoesqueleto que son responsables de mantener la forma y capacidad de deformaci6n de los eritrocitos. Estos agentes pueden activar el aumento en la concentraci6n de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la capacidad de las caspasas y estar involucrados en la p6rdida de asimetr6a de la membrana y da1o de la banda 3 que contribuye a la remoci6n de los eritrocitos de la circulaci6n sangu6nea (Rifkind y Nagababu, 2013).

Durante toda su vida, los eritrocitos est6n sometidos a dos procesos c6clicos y fundamentales: 1) los cambios en las condiciones oxidativas del citoplasma, al tomar y liberar  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  en los pulmones y en los tejidos y 2) el estr6s mec6nico al que son sometidos al pasar por el lecho capilar. Debido a que durante su vida los eritrocitos se ven afectados por estr6s mec6nico cada vez que pasan a trav6s del lecho capilar, este proceso se transforma en un buen candidato para ser un mecanismo subyacente al reloj biol6gico que cuenta la edad del eritrocito. De esta manera, debido a la acumulaci6n progresiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y su efecto sobre los diversos componentes de la membrana celular, se disparar6a el retiro de los eritrocitos “viejos” de la sangre (Romero, 2004).

El aumento en la concentraci6n intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es el mayor disparador del proceso de senescencia, pero el mecanismo de entrada de dicho cati6n al interior celular no est6 bien dilucidado. Actualmente, las propuestas m6s aceptadas explican la entrada de calcio a trav6s de: a) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  mecanosensibles (Romero y Romero, 1999) o b) canales cati6nicos no selectivos, como TRPC6 o Piezo 1 (F6ller y col., 2008a, b; Lang y col., 2010, 2012, 2015; Cahalan y col., 2015). Sin embargo, en nuestro laboratorio empleando la t6cnica de T.U.G.O patch clamp se caracterizaron por primera vez dos nuevos mecanismos (el intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  y canal HEMKCA) que podr6an estar involucrados en el proceso de senescencia de los eritrocitos (Romero, 2004). 6sta se conoce como la *hip6tesis del  $\text{K}^+$*  que propone que durante su paso por el capilar sangu6neo, el eritrocito est6 sometido a un gran estr6s mec6nico, lo que activa al HEMKCA y aumenta la permeabilidad de  $\text{K}^+$  en

la membrana. Como consecuencia, la membrana se hiperpolariza y se activa el intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  el cual es dependiente de voltaje, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  al eritrocito. Así, estos dos mecanismos generan la salida de KCl y agua, generando células más densas. Al salir del capilar sanguíneo, el estrés mecánico desaparece y los mecanismos que se encuentran en la membrana regresan a su estado inicial. De esta manera, cada vez que el eritrocito ingresa al capilar sanguíneo la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  aumenta y se activan proteasas que disminuyen la capacidad de las  $Ca^{2+}$ -ATPasas de bombear  $Ca^{2+}$  al exterior celular; este hecho genera efectos que se acumulan en el tiempo, lo que provocará que la extrusión de  $Ca^{2+}$  disminuya conforme la edad del eritrocito avanza (Romero y col., 1997), provocando que las vías de salida de  $K^+$  se mantengan más tiempo activados cada vez que el eritrocito pasa por el lecho capilar, hasta que los cambios sean tales que se mantenga una hiperpolarización sostenida de la membrana, incrementando la entrada de  $Ca^{2+}$  al eritrocito y desencadenando de esta manera el proceso de retiro de los eritrocitos de la circulación sanguínea (Romero, 2004).

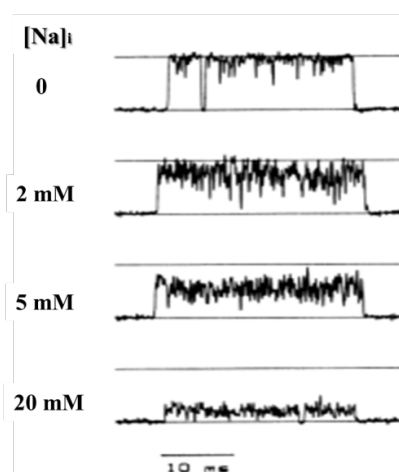
### **Bloqueadores iónicos de canales de $K^+$**

Desde el punto de vista biofísico, existen evidencias que soportan que algunos iones en solución pueden actuar como bloqueadores de canales, o afectar la actividad de los mismos. Los bloqueadores de canales constituyen una clase de moléculas que reducen la corriente (macroscópica) a través de ellos por un mecanismo común: obstruyen completamente el canal por un intervalo corto de tiempo. Se pueden distinguir tres clases: Los bloqueadores lentos, como el ion  $Ba^{2+}$ , que produce interrupciones claramente resueltas en las corrientes de canal unitario, donde cada evento de bloqueo parece un cierre del canal. Los bloqueadores rápidos, como el ion  $Cs^+$ , producen interrupciones extremadamente breves y frecuentes de las corrientes del canal que sólo pueden ser detectadas como reducciones aparentes en el nivel de corriente que pasa a través del estado abierto. Y una clase de bloqueadores intermedios, que incluye al ion  $Na^+$  que al aplicarlo desde el lado intracelular, produce rápidas fluctuaciones en la corriente mientras el canal está abierto, debido a interrupciones lo suficientemente largas para ser detectadas pero demasiado breves para ser resueltas como eventos individuales. Tales fluctuaciones se conocen como “flickering”, y los bloqueadores que los producen se conocen como

“bloqueadores de flicker” (Yellen, 1984a). A continuación se muestran algunas evidencias del efecto de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  sobre la actividad de canales selectivos a  $\text{K}^+$ .

### Efecto de $\text{Na}^+$ sobre la actividad de canales de $\text{K}^+$

Canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de células de cromafina, muestran reducción en la corriente que pasa a través de ellos cuando se agregan cantidades milimolares de  $\text{Na}^+$  al lado intracelular, registrando alto ruido (Figura 10). La reducción en la corriente incrementa con aumentos en la concentración de  $\text{Na}^+$  y el efecto mejora a potenciales positivos, lo que sugiere un bloqueo dependiente de voltaje. Las tasas de bloqueo de este ion incrementan linealmente con la concentración de  $\text{Na}^+$ , mientras que las tasas de desbloqueo se ven inalteradas por la concentración (Yellen, 1984a).



**Figura 10.** Efecto de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  sobre el curso temporal del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , registrado a un potencial de +80 mV. Las deflexiones hacia arriba representan las aperturas del canal. [Modificado de Yellen, 1983a]

En otro trabajo, Yellen demuestra que aumentos en la concentración externa de  $\text{K}^+$  disminuyen la reducción en la corriente y el flickering generado por una concentración fija de  $\text{Na}^+$ . Por su parte, la tasa de bloqueo se mantiene constante en un rango de concentraciones de  $\text{K}^+$ , lo que indica que no hay competición significativa entre el  $\text{K}^+$  externo y el  $\text{Na}^+$  interno bajo estas condiciones (Yellen, 1984b). Estudios similares en el canal Gárdos, muestran que  $\text{Na}^+$  aplicado desde el lado extracelular es prácticamente

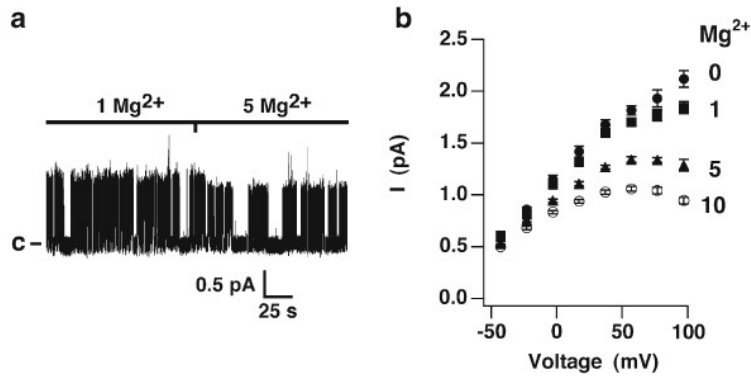
impermeable pero cuando se añade desde el lado intracelular bloquea el canal, reduciendo la corriente que pasa a través del mismo y haciéndola más ruidosa (Christophersen, 1991).

### **Efecto de $Mg^{2+}$ sobre la actividad de canales de $K^+$**

Magnesio es un catión divalente importante en la fisiología celular que se ha reportado como bloqueador de diferentes canales iónicos (Ferguson, 1991). La presencia de magnesio intracelular disminuye la magnitud de las corrientes del canal, en un proceso dependiente de la concentración del ion y del voltaje, que puede generar flickering en algunos canales de  $K^+$  (Vandenberg, 1987; Matsuda y col., 1987; Matsuda, 1988; 1991) y en otros no (Ferguson, 1991; Stoneking y Mason, 2013). En canales de  $K^+$  rectificadores hacia adentro (Kir), este patrón asimétrico del flujo de corriente es una consecuencia del bloqueo voltaje dependiente por  $Mg^{2+}$ . En canales Kir, al remover  $Mg^{2+}$  de la solución interna la rectificación desaparece, pero es restaurada con la adición de este ion a la solución (Vandenberg, 1987; Yang y col., 2012).

En canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia alta, aumentos en la concentración de  $Mg^{2+}$  de 0 a 5 mM generan una disminución en la corriente de canal unitario. Esta reducción se hace mayor a medida que el potencial de membrana se hace más positivo. El autor del trabajo, clasifica al ion  $Mg^{2+}$  como un bloqueador rápido, de acuerdo con la clasificación de bloqueadores de canales propuesta por Yellen (1984a). Además, propone una interacción competitiva entre los iones  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  (Ferguson, 1991).

De igual manera, el canal  $K_{Ca3.1}$  en presencia de  $Mg^{2+}$  intracelular registra una disminución en la amplitud de la corriente que fluye a través del canal. Este ion presenta un efecto dependiente de la concentración y el potencial de membrana (Figura 11). Se reporta también que  $Mg^{2+}$  reduce el nivel de actividad del canal, afectando la probabilidad de apertura del mismo. Sin embargo, los autores proponen que esta disminución en la probabilidad de apertura con aumentos en la concentración de  $Mg^{2+}$ , se debe en gran parte a la interacción competitiva de  $Mg^{2+}$  con  $Ca^{2+}$  por el sitio de activación del canal (Stoneking y Mason, 2013).



**Figura 11.** a) Efecto de la concentración de Mg<sup>2+</sup> intracelular sobre el curso temporal del canal K<sub>Ca3.1</sub>, registrado a un potencial de -3 mV. Las deflexiones hacia arriba representan la apertura del canal. b) relación I/V del canal K<sub>Ca3.1</sub> a diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> intracelular. [Tomado de Stoneking y Mason, 2013].

### Efecto de Ba<sup>2+</sup> sobre la actividad de canales de K<sup>+</sup>

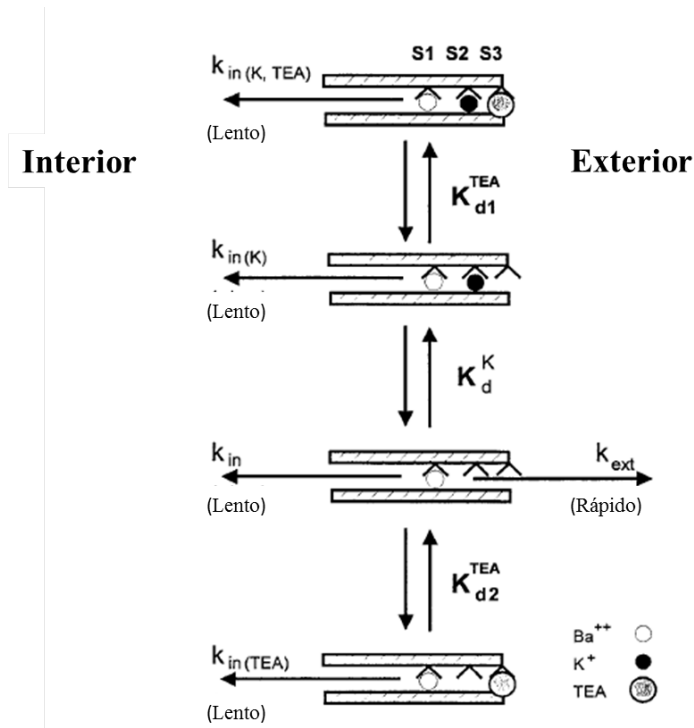
El ion Ba<sup>2+</sup> ha sido descrito como un bloqueador potente de la conductancia de potasio (Amstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick, 1980). En el canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> de células musculares esqueléticas de conejo, se encontró que la adición de Ba<sup>2+</sup> desde el lado intracelular causa una reducción del tiempo promedio de las ráfagas, y que la aparición de periodos de inactividad depende de la concentración de Ba<sup>2+</sup>. Este ion produce un efecto inhibitorio al agregarlo desde ambos lados de la membrana, requiriendo de cantidades micromolares desde el lado intracelular o milimolares desde el lado extracelular. El efecto de Ba<sup>2+</sup> es contrarrestado al aumentar la concentración de K<sup>+</sup>, debido a la competencia entre estos iones cuando ambos se agregan al lado intracelular (Vergara y Latorre, 1983).

La velocidad de bloqueo de Ba<sup>2+</sup> cambia linealmente con la P<sub>o</sub> del canal, lo que apoya la idea de que el canal no puede ser bloqueado mientras permanezca cerrado, es decir, que Ba<sup>2+</sup> puede escapar de la conformación cerrado-bloqueado sólo pasando a través de la conformación abierto-bloqueado del canal, de esta manera el canal debe estar abierto para permitir la unión o disociación de Ba<sup>2+</sup> del canal (Miller y col., 1987).

Cuando el ion  $K^+$  es removido de la solución externa la velocidad de disociación de  $Ba^{2+}$  es más rápida, para lo cual Neyton y Miller (1988a) proponen como explicación que con un sitio externo de unión a  $K^+$  vacío, ahora el ion  $Ba^{2+}$  tiene la oportunidad de disociarse hacia la solución externa. De esta manera, la tasa de asociación de  $Ba^{2+}$  disminuye a medida que la concentración de  $K^+$  externo aumenta, esto es, el sitio de unión a  $K^+$  tenderá a estar ocupado durante el bloqueo por  $Ba^{2+}$ , así, el ion  $Ba^{2+}$  que entra puede tanto disociarse hacia la solución interna o hacia la solución externa cuando el sitio externo de unión a  $K^+$  se encuentre vacío (Neyton y Miller, 1988a).

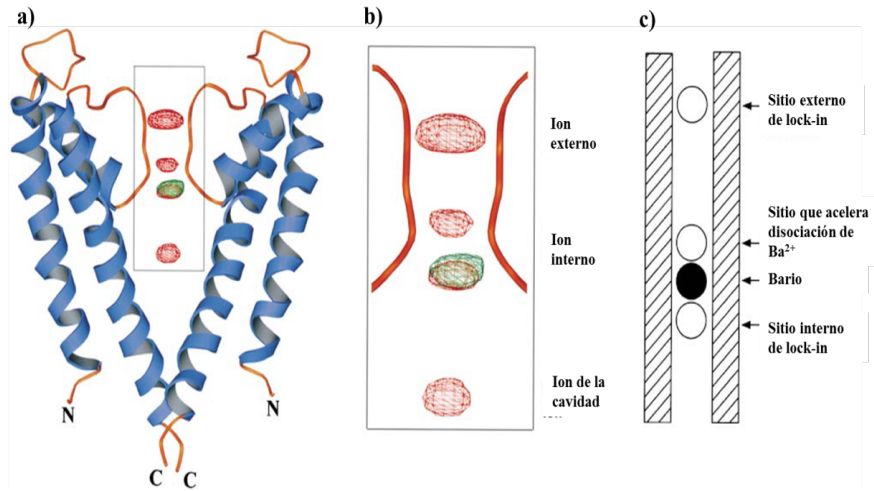
Otros estudios han demostrado que aumentos en la concentración interna de  $K^+$ , incrementan fuertemente la duración del bloqueo por  $Ba^{2+}$ . Se propuso que la vía de conducción contenía un sitio de unión para  $K^+$  localizado en el lado interno del lugar de bloqueo de  $Ba^{2+}$ . Este sitio de bloqueo (lock-in) debe estar desocupado para que el  $Ba^{2+}$  pueda entrar en el poro o para que el ion  $Ba^{2+}$  presente en el interior del poro se disocie hacia la solución interna. En dicho trabajo se propuso que la vía de conducción de  $K^+$  contiene cuatro sitios de unión alineados en fila india (Figura 13c): dos sitios que impiden la disociación de  $Ba^{2+}$  de la vía de conducción (sitios de lock-in), un sitio de bloqueo de  $Ba^{2+}$  y un sitio que acelera la disociación de  $Ba^{2+}$  del canal (Neyton y Miller, 1988b). En otro estudio, Vergara y col. (1999) utilizan el ion  $TEA^+$  para localizar el sitio de unión a  $K^+$  que impide la disociación de  $Ba^{2+}$  hacia la solución externa (sitio de lock-in).  $TEA^+$  es capaz de atrapar los iones  $K^+$  y  $Ba^{2+}$  dentro del poro, de esta manera, el ion  $Ba^{2+}$  puede tanto disociarse hacia la solución interna o hacia la solución externa, cuando los sitios de unión a  $TEA^+$  y  $K^+$  se desocupen. En este sentido, se propuso la presencia de tres sitios de unión: 1) el sitio de unión y bloqueo de  $Ba^{2+}$  (S1), 2) el sitio de unión a  $K^+$  localizado externamente al sitio de bloqueo (S2) y 3) el sitio externo de unión a  $TEA^+$  (S3) (Figura 12).





**Figura 12.** Modelo de los posibles sitios de unión a  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$  y  $TEA^+$ . Se representan las posibles rutas de salida del ion  $Ba^{2+}$  del canal. Tres posibles sitios de unión: S1, es el sitio de unión y bloqueo de  $Ba^{2+}$ ; S2, es el sitio de unión a  $K^+$  que impide la disociación de  $Ba^{2+}$  hacia la solución externa (sitio de lock-in) y S3 es el sitio de unión a  $TEA^+$ . [Modificado de Vergara y col., 1999]

En el canal KcsA, estudios cristalográficos muestran tres sitios de unión a iones, dos en el filtro de selectividad (uno externo y otro interno) y uno en la cavidad del canal. El ion  $Ba^{2+}$  se une claramente al sitio interno del filtro de selectividad, cerca de la cavidad del canal (Jiang y Mackinnon, 2000) (Figura 13). En otro trabajo, los cristales de KcsA en presencia de  $Ba^{2+}$  muestran dos patrones distintos de densidad dentro del filtro de selectividad: 1) un sitio interno que coincide con la posición 4 que puede ocupar  $K^+$ , cerca de la cavidad del canal y 2) un sitio en la posición 2 del filtro, indicando de esta manera que  $Ba^{2+}$  es un ion conductivo por la vía de  $K^+$  pero con una cinética de disociación  $10^7$  veces más lenta (Piasta y col., 2011). De manera similar, Guo y col. (2014) reportan para el canal MthK que  $Ba^{2+}$  ocupa predominantemente la posición 2 en el filtro de selectividad cuando  $K^+$  externo no se encuentra presente, mientras que ocupa la posición 3 y 4 con mayor probabilidad en presencia de  $K^+$  en la solución experimental (Guo y col., 2014).



**Figura 13.** Visualización de Ba<sup>2+</sup> en el canal KcsA por cristalografía de rayos X y en un canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> a través del análisis de la función unitaria del canal. a) esquema del canal mostrando dos subunidades del KcsA con diferencias en la densidad electrónica mostrando las posiciones para Rb<sup>+</sup> (en rojo) y Ba<sup>2+</sup> (en verde). B) vista magnificada de la vía de conducción mostrando la posición de los iones interno y externo del filtro de selectividad y el ion de la cavidad. c) esquema adaptado de Neyton y Miller (1988) mostrando las posiciones relativas de Ba<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> o Rb<sup>+</sup> a partir del análisis de canal unitario. [Modificado de Jiang y Mackinnon, 2000].

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Estudiar el efecto de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  sobre la actividad tipo ráfaga del canal de  $\text{K}^+$  mecanoactivado del eritrocito humano (HEMKCA)

### **Específicos**

- Determinar el efecto del  $\text{Na}^+$  sobre las características cinéticas de la actividad tipo ráfaga del canal de  $\text{K}^+$  mecanoactivado del eritrocito humano (HEMKCA)
- Determinar el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre las características cinéticas de la actividad tipo ráfaga del canal de  $\text{K}^+$  mecanoactivado del eritrocito humano (HEMKCA)
- Caracterizar el efecto del  $\text{Ba}^{2+}$  sobre la actividad tipo ráfaga del canal de  $\text{K}^+$  mecanoactivado del eritrocito humano (HEMKCA)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de material biológico

Se emplearon eritrocitos humanos tomados directamente por punción epidérmica, y se utilizaron para los experimentos electrofisiológicos sin aplicar ningún otro tratamiento. La muestra de sangre fue tomada con una micropipeta que contenía 5  $\mu$ L de solución previamente filtrada con poros de 0,22  $\mu$ m, y agregada directamente a la cámara con un volumen total conocido. Todos los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente.

### Soluciones Experimentales

Las determinaciones electrofisiológicas se realizaron bajo condiciones asimétricas de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución. Se emplearon 4 soluciones experimentales: solución “control”, solución “con  $\text{Na}^{+}$ ”, solución “con  $\text{Mg}^{2+}$ ” y solución “con  $\text{Ba}^{2+}$ ”, todas ajustadas a pH 7,4 y a 300 mOsm. La solución control contenía 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución intracelular (solución del baño) y 5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución extracelular (solución de la pipeta) para todos los ensayos (Tabla 1). A partir de la composición iónica de la solución control, se agregaron los iones de prueba para alcanzar las concentraciones indicadas en la Tabla 2 y Tabla 3.

**Tabla 1.** Composición iónica de la solución control.

Compuesto	Concentración en la solución del baño (mM)	Concentración en la solución de la pipeta (mM)
KCl	140	140
Hepes	10	10
$\text{CaCl}_2$	1	5

Para los ensayos con los iones de prueba, se comenzaron los experimentos bajo condiciones simétricas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ . Dependiendo del tratamiento experimental, se aumentó o disminuyó la concentración de los iones de prueba en la cámara, a través de intercambios de solución (ver composiciones iónicas antes y después del intercambio en la Tabla 2 y Tabla 3), evitando el establecimiento de gradientes infinitos en el sistema. De esta manera, se evaluó el efecto de la presencia y cambio en la concentración del ion de prueba sobre las variables cinéticas del HEMKCA. Los parches con canales múltiples se emplearon para el análisis de la probabilidad de apertura, cuantificado como NPo, mientras que los parches con uno o dos niveles de actividad con baja frecuencia de dobles aperturas fueron empleados para el análisis cinético, de los cuales luego se seleccionaron las ráfagas con un solo nivel de actividad para llevar a cabo el análisis cinético.

**Tabla 2.** Composición de las soluciones empleadas en el baño, antes y después de realizar el intercambio con  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La concentración de los iones de prueba en la pipeta es igual a la concentración indicada para la condición “antes” en cada caso. [\*Ch: abreviación de colina con fines prácticos].

Compuesto	Ensayo con NaCl		Ensayo con MgCl <sub>2</sub>	
	Antes (mM)	Después (mM)	Antes (mM)	Después (mM)
<b>KCl</b>	140	140	140	140
<b>Hepes</b>	10	10	10	10
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1	1	1	1
<b>NaCl</b>	1	10	0	0
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0	0	1	5
<b>ChCl</b>	10	1	11,5	1,5

**Tabla 3.** Composición de las soluciones empleadas en el baño, antes y después de realizar el intercambio para el ensayo con  $Ba^{2+}$ . La concentración de  $Ba^{2+}$  en la pipeta es igual a la concentración indicada para la condición “antes” en cada caso.

Compuesto	Ensayo con $BaCl_2$	
	Antes (mM)	Después (mM)
<b>KCl</b>	140	140
<b>Hepes</b>	10	10
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1	1
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	0,1	0,001
	0,1	0,01
	0,1	0,1
	0,1	1

## Medidas electrofisiológicas

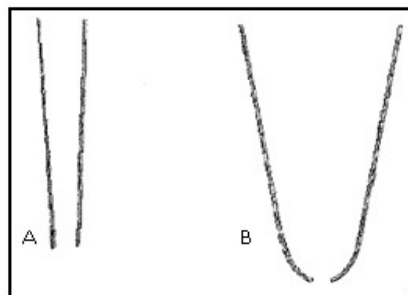
### El T.U.G.O Patch Clamp (The U-shape Giga Ohm patch clamp)

Los experimentos se realizaron usando la técnica de Patch Clamp en configuración inside-out en la modalidad de T.U.G.O Patch Clamp, desarrollada en nuestro laboratorio con la finalidad de simular los fenómenos mecánicos que ocurren en la membrana de los eritrocitos al pasar por los capilares sanguíneos (Romero, 2004).

### Forma de la pipeta:

En el Patch Clamp clásico, las puntas de las pipetas tienen un diámetro reducido, que se logra al pulir las pipetas con una microforja después de halarlas. Esto garantiza que la cantidad de membrana aislada sea lo suficientemente pequeña como para tener uno o muy pocos canales en el parche y que el área interna de la pipeta sea lo más amplia posible, disminuyendo la resistencia en serie asociada a esta zona. En el T.U.G.O. Patch Clamp, las pipetas son construidas de manera que las paredes queden lo más paralelas posible,

tratando de simular las paredes de un capilar sanguíneo tal como se muestra en la Figura 14 (Romero, 2004).

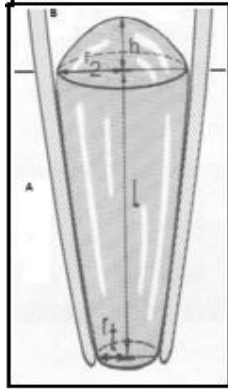


**Figura 14.** Diferencia en la forma de la punta de la pipeta en la modalidad de A) T.U.G.O Patch clamp B) y Patch clamp clásico. [Tomado de Romero, 2004]

#### **Cantidad de membrana aislada:**

La forma de las pipetas para el T.U.G.O. patch clamp permite aislar una gran cantidad de membrana y a su vez evita que el eritrocito sea succionado por completo, de esta forma el área de la membrana queda en contacto con las paredes internas de la pipeta es mayor.

Debido a la forma de la pipeta, en el patch clamp clásico la membrana asociada a la pipeta adopta forma de “ $\Omega$ ”, a diferencia de la modalidad T.U.G.O. patch clamp, donde la membrana adopta forma de “U” invertida, lugar donde la porción de la membrana que se encuentra en contacto con las paredes tiene una forma cónica y mide entre 3 y 8  $\mu\text{M}$ , mientras que la región de la membrana que está bajo control de potencial adopta una forma semiesférica (Romero, 2004). La Figura 15 muestra un esquema de la forma que adopta la célula en el interior de la pipeta en el T.U.G.O. patch clamp.



**Figura 15.** Esquema de la región de la membrana en el interior de la pipeta en el T.U.G.O patch clamp. La porción de la membrana que se encuentra en contacto con las paredes tiene forma cónica (A), y la región de la membrana que está bajo control de potencial adopta una forma semiesférica (B). [Tomado de Romero, 2004]

### **Elaboración de las pipetas**

Las pipetas se construyeron a partir de capilares de borosilicato con un diámetro externo de 1,5 mm; un diámetro interno de 0,86 mm y 10 cm de largo (Sutter instrument Co., Novato CA, USA), que fueron haladas en dos pasos con un halador (puller) vertical modelo 700C (David Kopf instruments). Las pipetas empleadas presentaron una resistencia entre 10-12 M $\Omega$  en solución.

### **Visualización de las células**

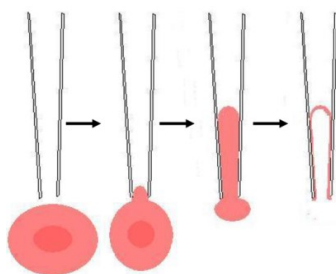
Para la observación de las células se empleó un microscopio de contraste de fases Nikon Diaphot (Nikon CO, LTD, Tokio, Japón), utilizando oculares de 10X CFW y objetivos 20DL. Para la manipulación de las pipetas en la cámara experimental, se utilizaron micromanipuladores hidráulicos Narishige modelo MO-203 (Narishige CO, LTD, Tokio, Japón).



## Formación del sello

Con la finalidad de obtener sellos de mejor calidad, de buena resistencia y duraderos en el tiempo, la solución de la pipeta contenía 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  en todos los casos. Una vez las células asentadas en el fondo de la cámara, se seleccionó aleatoriamente un eritrocito para realizar el sello. Empleando el micromanipulador, se colocó la pipeta cercana a la célula y se aplicó succión a través de un “Holder” conectado a una inyectora. La resistencia de los sellos empleados se encontraba en el orden de los gigaohm (gigasello), entre 1-2  $\text{G}\Omega$ .

Una vez formado el sello, es necesario lisar la porción de la célula que queda expuesta fuera de la pipeta. Para ello, se rozó la porción del eritrocito fuera de la pipeta contra el fondo de la cámara, hasta lograr su ruptura y pasar de la configuración cell-attached a la configuración inside-out (Figura 16).



**Figura 16.** Esquema del posible proceso de formación del sello en T.U.G.O Patch Clamp. [Tomado de Romero, 2004].

## Adquisición de datos

Las corrientes fueron adquiridas en modo voltage-clamp con una ganancia de 100 mV/pA filtradas con un filtro pasa-bajos a 2 KHz, utilizando un amplificador AXOPATCH-1C (Axon Instrument, Burlingame, CA, USA). Adicionalmente, se utilizó un filtro HumBug (50/60 Noise eliminator, Quest Scientific, North Vancouver, BC, Canadá) para eliminar el ruido de 60 ciclos proveniente de la línea.

Para la digitalización de los datos, se utilizó una interfase IT-16 (Instructech, Port Washington, NY, USA) usando el programa de control de adquisición PULSE (Heka,

Lambrecht, Alemania), y el análisis OFF-LINE de los datos se llevó a cabo con la utilización del programa de análisis QuB 2.0.0.29 (1998-2011 Universidad de Búfalo, Nueva York).

### **Protocolo de estimulación**

Para el estudio cinético y de la  $P_o$ , se registró la actividad del HEMKCA aplicando una diferencia potencial constante de -60 mV, durante la mayor cantidad de tiempo posible, o hasta que la integridad del sello lo permitiese; mientras que para la construcción de la curva I/V en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$ , se evaluó la actividad del canal en un intervalo de potenciales de -100 a +100 mV en pasos de 20 mV.

### **Identificación del Canal**

Una vez formados los sellos, la actividad del HEMKCA fue reconocida por su dependencia a la presión, ya que, previo a la realización de cada experimento se observó un incremento en la actividad del canal al aumentar la presión ejercida sobre el sistema (no se muestran estos resultados).

### **Análisis de los datos.**

#### **Probabilidad de apertura**

La probabilidad de apertura se define como la proporción de tiempo que el canal permanece en el estado conductivo o abierto, respecto al tiempo total del registro analizado. En este caso, la probabilidad de apertura fue cuantificada como  $NP_o$ , que se define como el producto del número de canales (N) por la probabilidad de apertura ( $P_o$ ), calculada en ventanas de tiempo de 100s justo antes y después de realizar el intercambio de soluciones para las condiciones evaluadas. Se calculó como:

$$NP_o = \frac{T_o}{T_o + T_c}$$

donde

$$T_o = \sum(P_o) (L)$$

To, es el tiempo que pasa el canal en el estado abierto; L el número de niveles de corriente respecto al cero (o el posible número de canales presente en el parche); y Tc, el tiempo que permanece el canal en el estado cerrado o no conductivo.

### **Modelo cinético**

Los mecanismos considerados en el estudio de canales iónicos, a través de modelos cinéticos, involucra transiciones reversibles entre estados discretos en los que el sistema se puede encontrar. El presente análisis cinético se basó en el modelo propuesto por Mata (2016), que describe la actividad tipo ráfaga del HEMKCA y comprende dos estados cerrados y uno abierto como se muestra en la Figura 9.

Para el análisis de la cinética de ráfagas se emplearon parches de membrana con uno o dos niveles de actividad de canal, de las cuales se consideraron los eventos de ráfaga que presentaron un único nivel de actividad y una probabilidad de apertura mayor que 0,8 para maximizar la probabilidad de que las aperturas dentro de la ráfaga fuesen producto de la actividad de una sola proteína.

### **Análisis Estadístico**

Los datos fueron reportados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Se trabajó con un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$  y fueron empleadas las pruebas de Wilcoxon para datos pareados en el estudio de la probabilidad de apertura (NPo) y la prueba U de Mann-Whitney para el análisis cinético del canal.

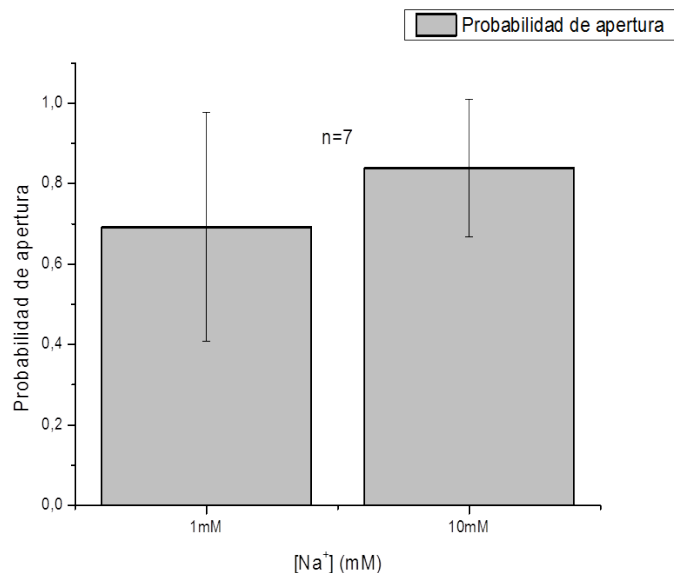
## RESULTADOS

### El HEMKCA

El HEMKCA es un canal de  $K^+$  activado por presión presente en la membrana de los eritrocitos humanos (Romero, 2004) y el centro de la presente investigación. Para la identificación del HEMKCA, se aplicó presión negativa sobre los parches de membrana y sólo fueron considerados aquellos en los que se registró un aumento en la actividad de canal. Se trabajó con soluciones asimétricas en cuanto a la concentración de  $Ca^{2+}$  y los iones de prueba dependiendo del tratamiento ensayado. Bajo el tratamiento control, la corriente que fluye a través del canal a un potencial de  $-60$  mV es de  $(-1,75 \pm 0,07)$  pA con una conductancia de  $(26,49 \pm 8,86)$  pS.

### Efecto del ion $Na^+$ sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA

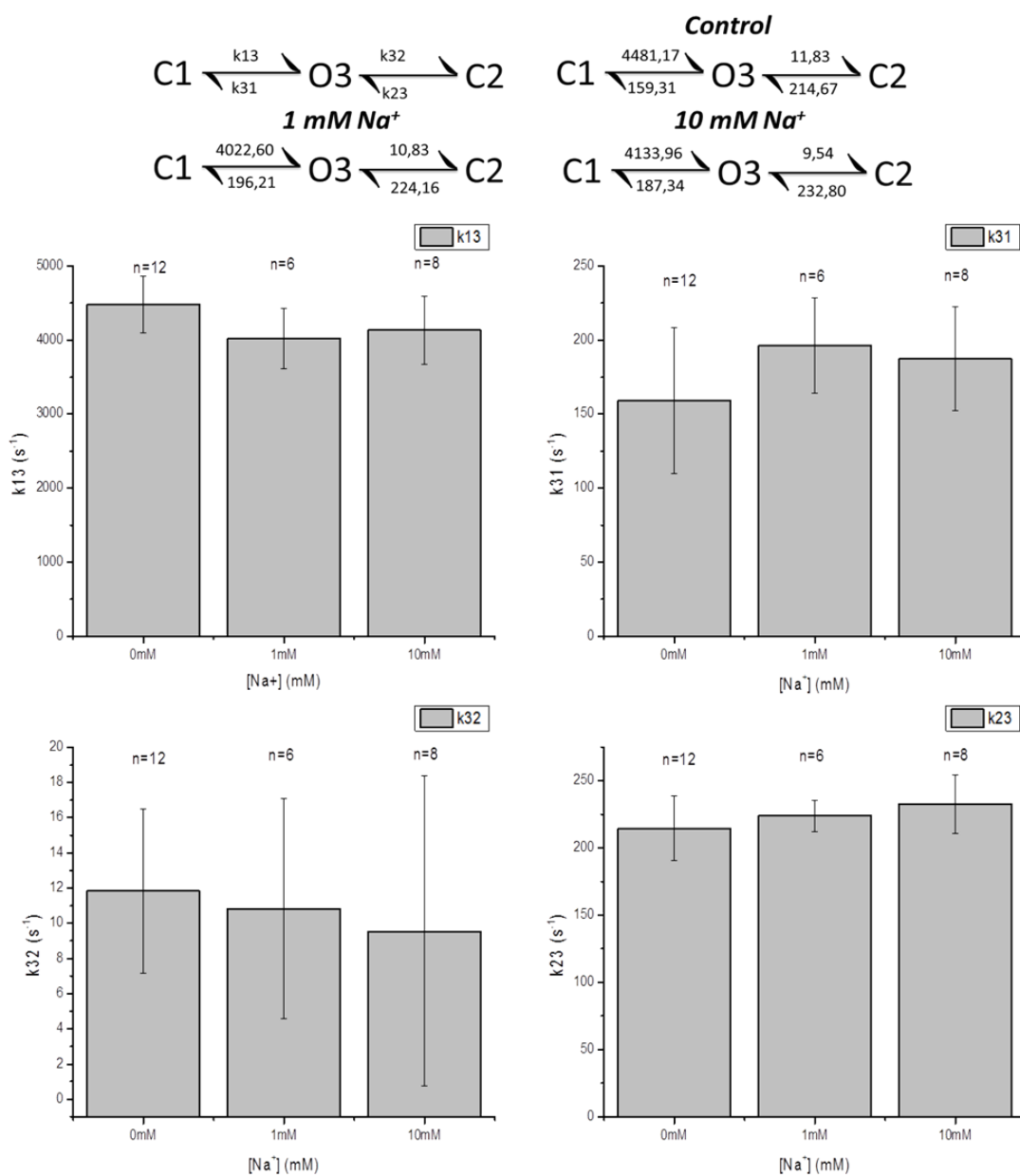
Al igual que potasio, sodio es un ion importante en la fisiología celular, por lo que se planteó evaluar el efecto de la presencia de  $Na^+$  sobre la actividad del canal. Los parches con múltiples canales fueron empleados para realizar un análisis de la probabilidad de apertura. Para este experimento se expuso al parche de membrana a  $1$  mM de  $Na^+$  al comienzo de cada ensayo y luego a una concentración de  $10$  mM lograda al intercambiar la solución del baño. De esta manera se demostró que la probabilidad de apertura del HEMKCA no se ve afectada por el aumento en la concentración intracelular de  $Na^+$  ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Efecto del aumento de la  $[Na^+]_i$  sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar

En cuanto a la cinética de las ráfagas, no se encontraron diferencias significativas en las constantes de velocidad del modelo ( $k_{13}$ ,  $k_{31}$ ,  $k_{32}$ ,  $k_{23}$ ). La Figura 18 muestra una representación gráfica de los parámetros obtenidos del efecto de la concentración de  $Na^+$  sobre las constantes de velocidad del modelo, contenidos en la Tabla 4.

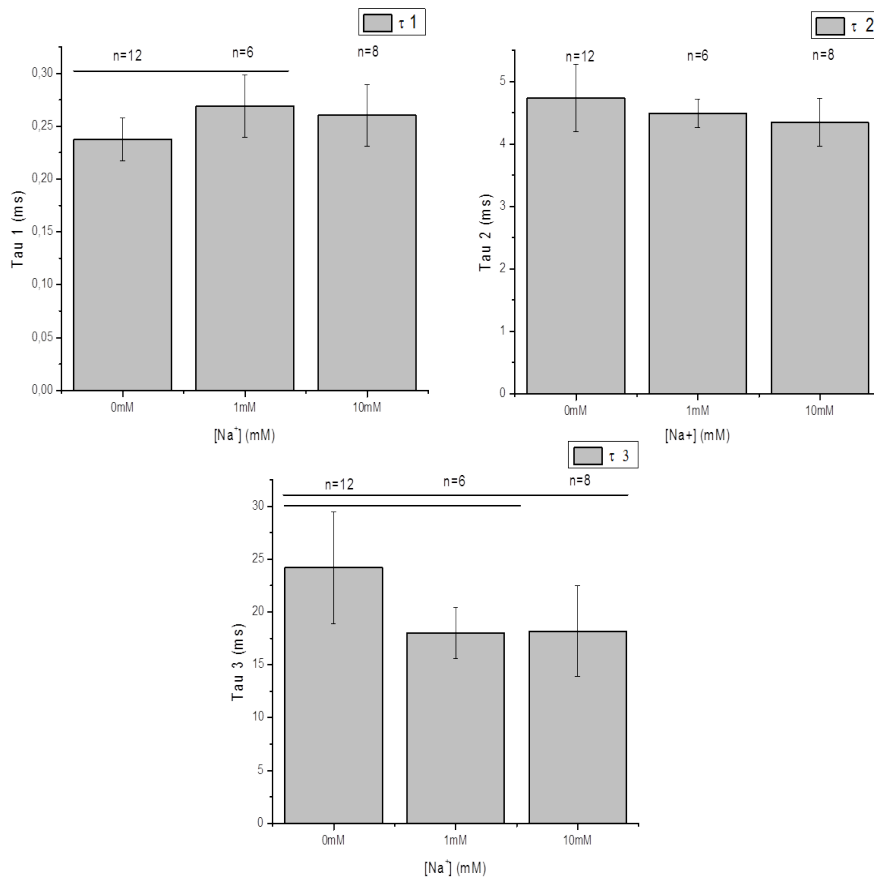
Respecto a las constantes de tiempo, se encontraron diferencias significativas para la constante de cerrado corto ( $\tau_1$ ) y abierto ( $\tau_3$ ). En la Figura 19 se observa un aumento significativo en el tiempo de permanencia del cerrado corto ( $\tau_1$ ) en presencia de 1 mM  $Na^+$ , mientras que una disminución en la duración del estado abierto ( $\tau_3$ ) tanto a 1 mM como 10 mM de  $Na^+$ . En la Tabla 5 se resumen los valores de los parámetros para las constantes de tiempo en presencia de  $Na^+$  representados gráficamente en la Figura 19.



**Figura 18.** Efecto de la presencia de  $[\text{Na}^+]$ , sobre las constantes de velocidad del modelo cinético del HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar.

**Tabla 4.** Efecto del  $\text{Na}^+$  sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA

	$[\text{Na}^+]_i$ (mM)					
	0		1		10	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
k13 ( $\text{s}^{-1}$ )	4481,17	385,52	4022,60	406,89	4133,96	461,15
k31 ( $\text{s}^{-1}$ )	159,31	49,30	196,21	32,14	187,34	35,06
k32 ( $\text{s}^{-1}$ )	11,83	4,68	10,83	6,27	9,54	8,81
k23 ( $\text{s}^{-1}$ )	214,67	23,85	224,16	11,66	232,80	21,72

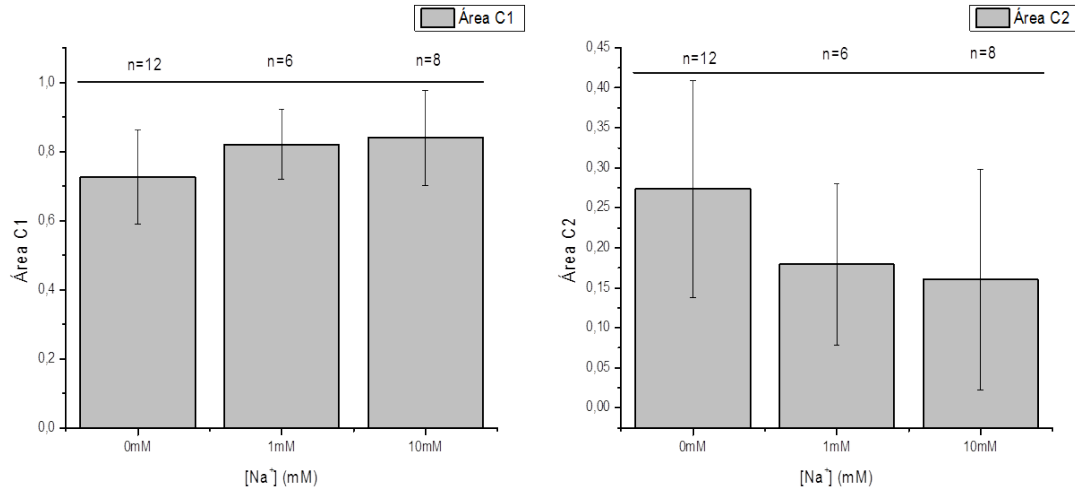


**Figura 19.** Efecto de la presencia de  $[\text{Na}^+]_i$  sobre las constantes de tiempo del modelo cinético propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.

**Tabla 5.** Efecto del  $\text{Na}^+$  sobre las constantes de tiempo del modelo del HEMKCA. El símbolo (\*) señala las constantes que reflejaron cambios significativos respecto a la condición control.

	$[\text{Na}^+]_i$ (mM)					
	0		1		10	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
$\tau 1$ (ms)	0,24	0,02	0,27*	0,03	0,26	0,03
$\tau 2$ (ms)	4,73	0,54	4,49	0,23	4,34	0,39
$\tau 3$ (ms)	24,20	5,31	17,98*	2,42	18,18*	4,29
Área C1	0,73	0,14	0,82	0,10	0,84	0,14
Área C2	0,27	0,14	0,18	0,10	0,16	0,14

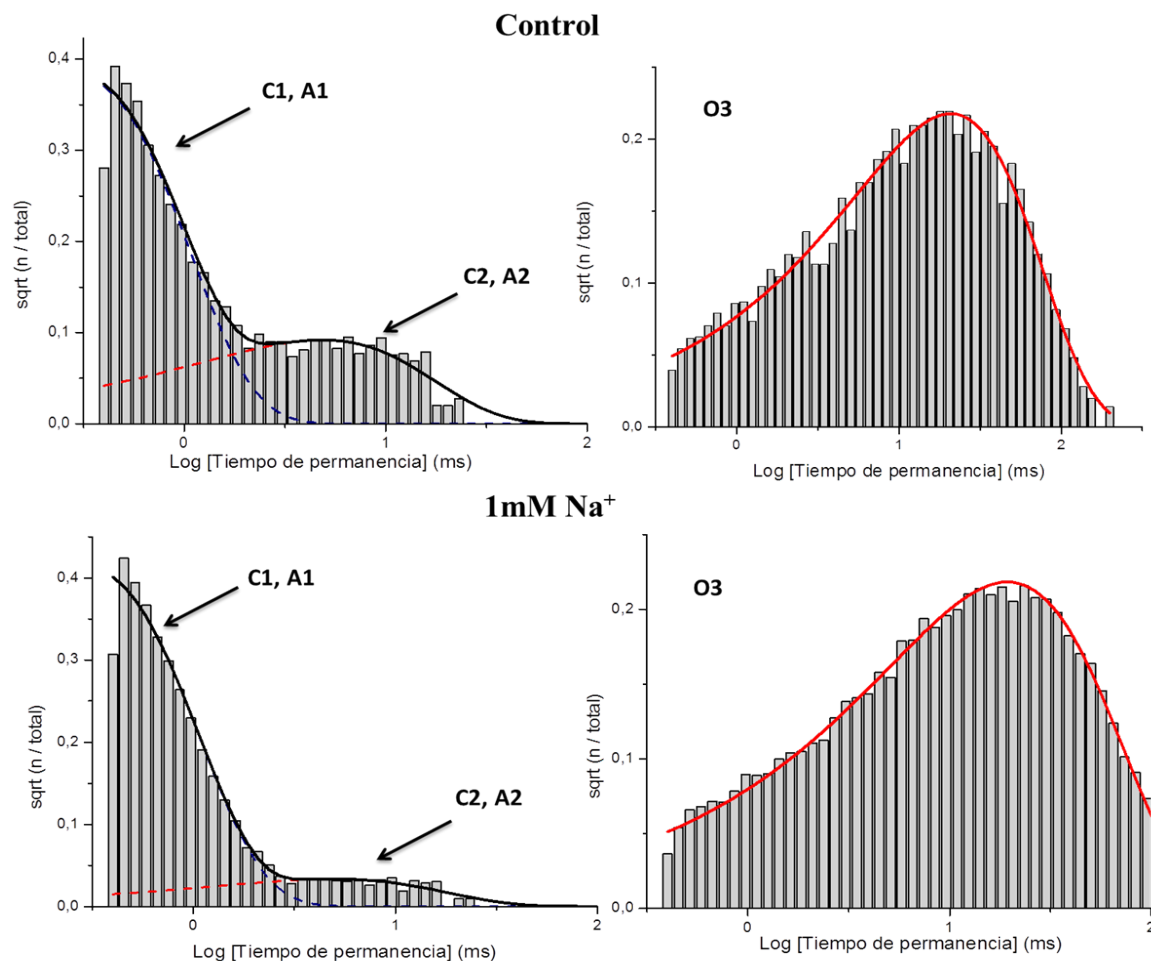
La Figura 20 muestra gráficamente el efecto de  $\text{Na}^+$  sobre el área asociada a la función de densidad de probabilidad (fdp) para el estado cerrado. El área asociada tanto a cerrado corto como a cerrado largo cambia significativamente ( $p > 0,05$ ) en presencia de 10 mM de  $\text{Na}^+$ , aumentando para el cerrado de corta duración mientras que disminuye para el cerrado largo en presencia de 10 mM  $\text{Na}^+$ .



**Figura 20.** Efecto de la presencia de  $[\text{Na}^+]_i$  sobre el área asociada a la función de densidad de probabilidad para el estado cerrado del componente corto (C1) y largo (C2) del modelo cinético propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.



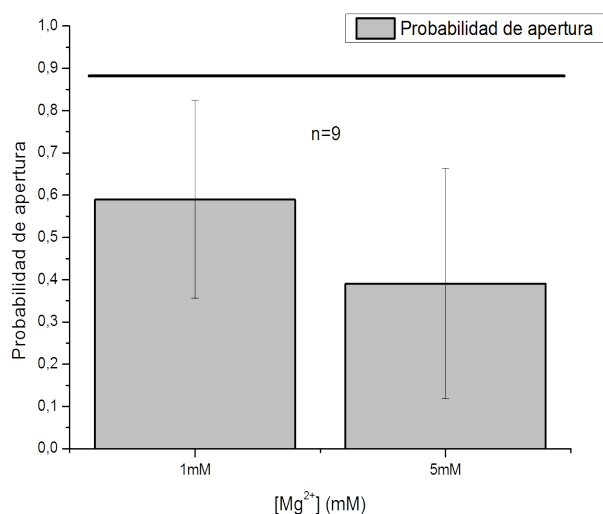
La Figura 21 muestra las funciones de densidad de probabilidad ajustadas a los histogramas para los estados abierto y cerrado. La fdp para el estado abierto muestra un comportamiento similar tanto en la condición control como en presencia de  $1\text{mM Na}^+$ . En el caso de la fdp para el estado cerrado, se observa una clara disminución del área asociada al componente de cerrado largo en presencia de  $1\text{ mM de Na}^+$  de manera consistente con el efecto observado sobre las áreas de cerrado en la Figura 20.



**Figura 21.** Funciones de densidad de probabilidad (fdp) ajustadas a los histogramas de cada estado en ausencia y presencia de  $1\text{ mM de Na}^+$ . Las figuras de la izquierda (de línea negra) corresponden al ajuste para el estado cerrado, mientras que las figuras de la derecha (de línea roja) corresponden al estado abierto. Se muestran las componentes para cada uno de los estados. Se muestran los registros 160622e para la condición control y 160331h para el tratamiento con  $1\text{ mM Na}^+$ .

## Efecto del ion $Mg^{2+}$ sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA

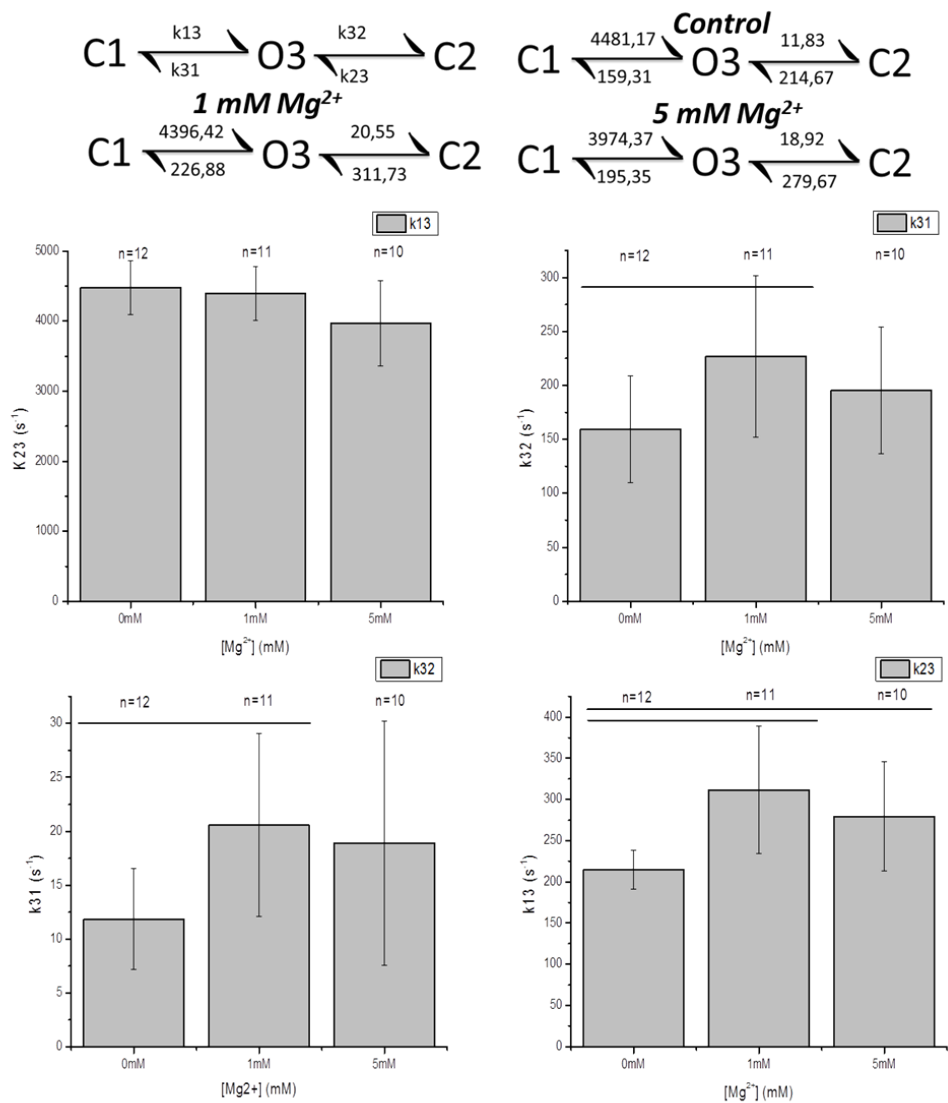
En canales de potasio se han reportado múltiples efectos debido a la presencia de  $Mg^{2+}$  en la solución experimental (Ferguson, 1991; Vandenberg, 1987; Stoneking y Mason, 2013). En el caso del HEMKCA, aumentos en la concentración intracelular de  $Mg^{2+}$ , de 1 a 5 mM, generan una disminución de la probabilidad de apertura como puede apreciarse en la Figura 22 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 22.** Efecto del aumento en la  $[Mg^{2+}]_i$  sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. La barra horizontal en la parte superior indica diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.

La presencia de  $Mg^{2+}$  en la solución experimental afecta las constantes de velocidad del modelo ( $k_{31}$ ,  $k_{32}$ ,  $k_{23}$ ) como se observa en la Figura 23. Las constantes ( $k_{31}$ ) y ( $k_{32}$ ) aumentan en magnitud al exponer al canal a 1 mM de  $Mg^{2+}$  intracelular, aumentando de esta manera la frecuencia de entrada a los cerrados corto y largo, respectivamente. En cuanto a las constantes de salida de los cerrados, sólo cambia la constante de cerrado largo ( $k_{23}$ ) registrando un aumento significativo en su frecuencia de salida a ambas

concentraciones. En la Tabla 6 se resumen los valores de los parámetros para las constantes de velocidad del modelo que se muestran gráficamente en la Figura 23.



**Figura 23.** Efecto de la presencia de  $[Mg^{2+}]_i$  sobre las constantes de velocidad del modelo cinético propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.

**Tabla 6.** Efecto de  $Mg^{2+}$  sobre las constantes de velocidad del modelo del HEMKCA. El símbolo (\*) señala las constantes que reflejaron cambios significativos respecto a la condición control.

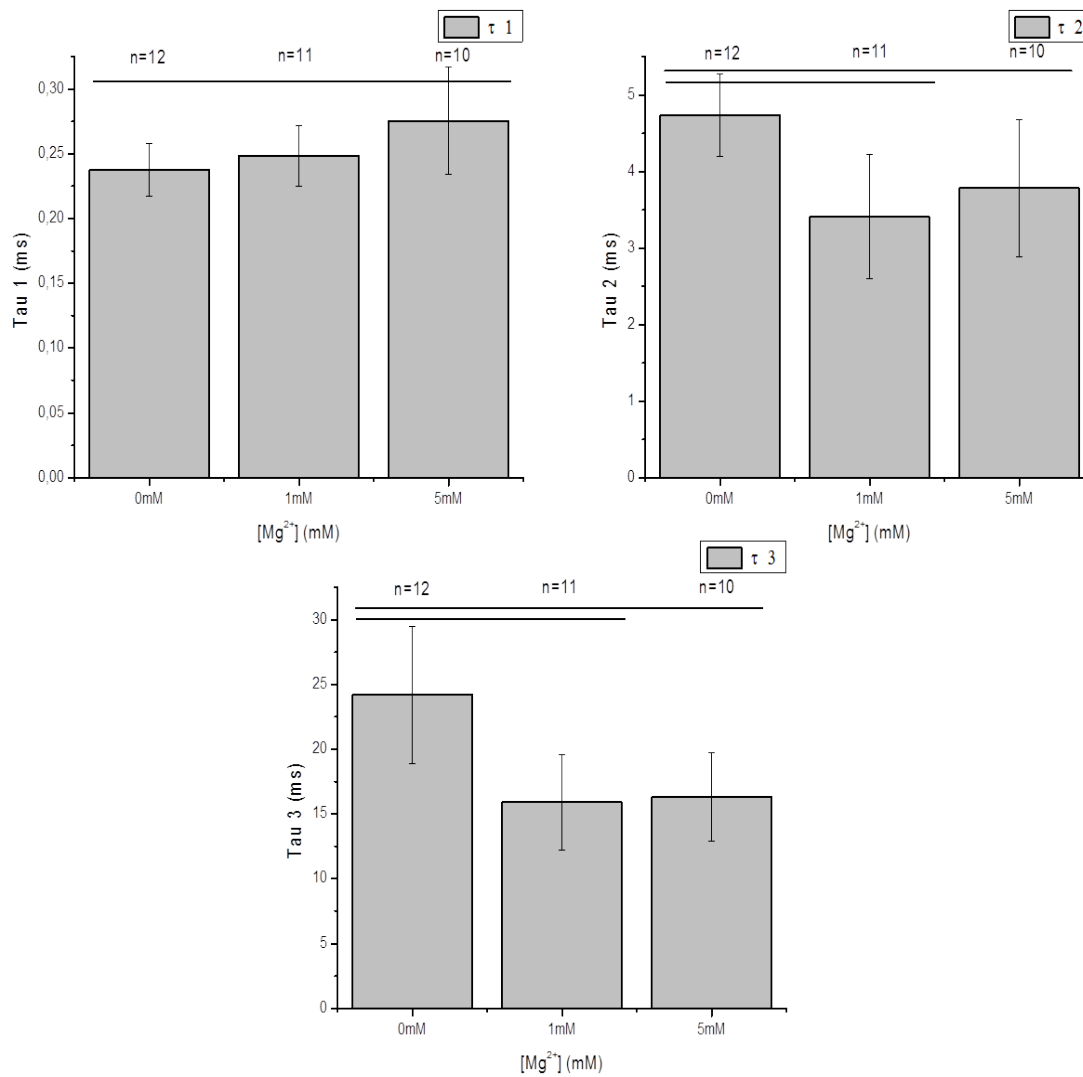
	$[Mg^{2+}]_i$ (mM)					
	0		1		5	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
k13 ( $s^{-1}$ )	4481,17	385,52	4396,42	386,53	3974,37	607,44
k31 ( $s^{-1}$ )	159,31	49,30	226,88*	74,90	195,35	58,97
k32 ( $s^{-1}$ )	11,83	4,68	20,55*	8,47	18,92	11,33
k23 ( $s^{-1}$ )	214,67	23,85	311,73*	77,41	279,67*	66,23

Las constantes de tiempo también se modifican por la presencia de  $Mg^{2+}$  (Figura 24). La duración promedio del cerrado corto ( $\tau_1$ ) aumenta de  $(0,24 \pm 0,02)$  ms en ausencia del ion, hasta  $(0,28 \pm 0,04)$  ms a 5 mM de  $Mg^{2+}$ . Por otro lado, la duración del cerrado largo ( $\tau_2$ ) y el abierto ( $\tau_3$ ) disminuyen en presencia de  $Mg^{2+}$  a ambas concentraciones. El cerrado largo disminuye en aproximadamente una unidad, mientras que la duración del abierto cambia desde  $(24,19 \pm 5,31)$  ms hasta  $(15,91 \pm 3,66)$  ms a 1mM  $Mg^{2+}$  y hasta  $(16,31 \pm 3,44)$  ms a 5 mM  $Mg^{2+}$ , como se puede observar en la Tabla 7. Estos resultados indican que la cinética de las ráfagas cambia en presencia de  $Mg^{2+}$ , modificando la duración promedio de los estados propuestos en el modelo de la actividad tipo ráfaga del HEMKCA.

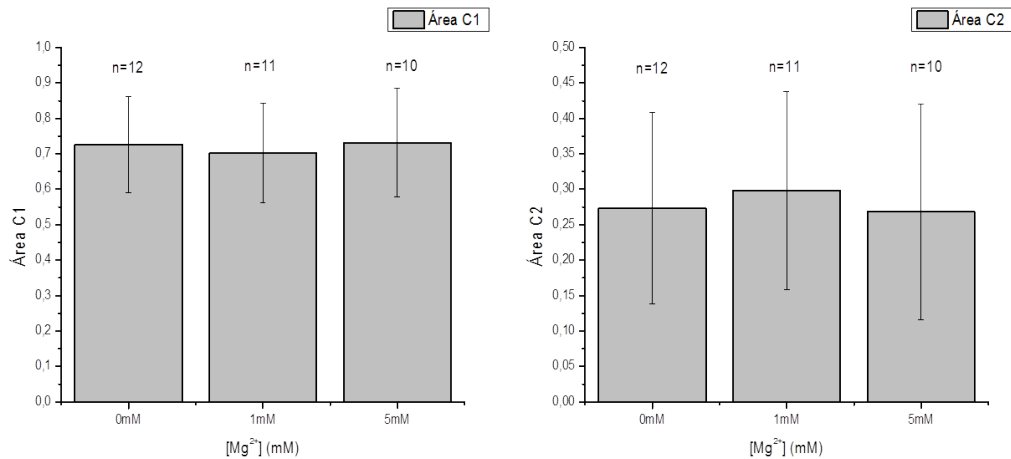
En la Figura 25 se muestra gráficamente el efecto de  $Mg^{2+}$  sobre el área de la fdp para el estado cerrado. En este caso, la presencia de  $Mg^{2+}$  no modifica el área de las fdp tanto para cerrado corto como para cerrado largo.

**Tabla 7.** Efecto de  $Mg^{2+}$  sobre las constantes de tiempo del modelo del HEMKCA. El símbolo (\*) señala las constantes que reflejaron cambios significativos respecto a la condición control.

	$[Mg^{2+}]_i$ (mM)					
	0		1		5	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
$\tau_1$ (ms)	0,24	0,02	0,25	0,02	0,28*	0,04
$\tau_2$ (ms)	4,73	0,54	3,41*	0,81	3,78*	0,89
$\tau_3$ (ms)	24,20	5,31	15,91*	3,67	16,31*	3,44
Área C1	0,73	0,14	0,70	0,14	0,73	0,15
Área C2	0,27	0,14	0,30	0,14	0,27	0,15



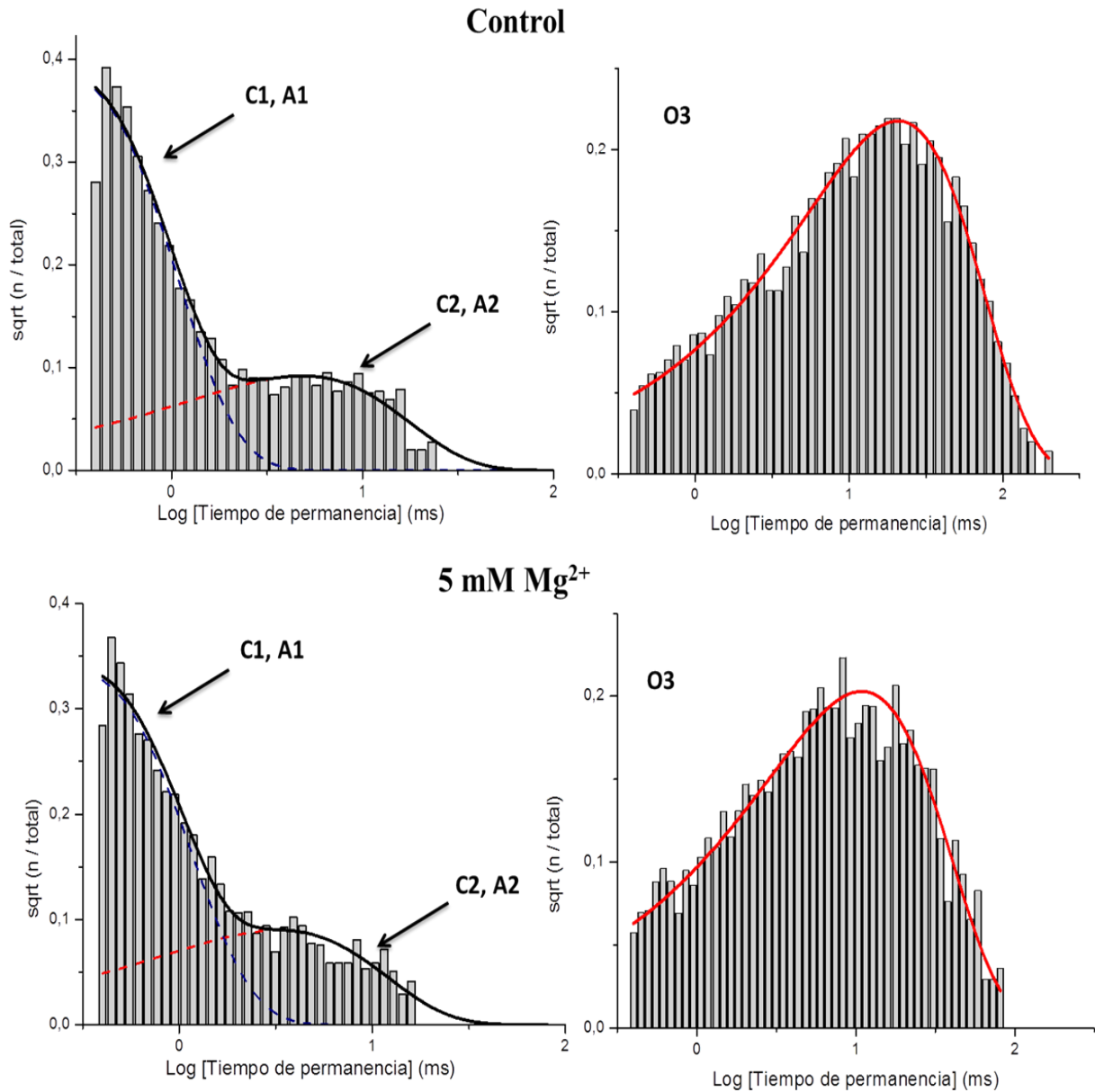
**Figura 24.** Efecto de la presencia de  $[Mg^{2+}]_i$  sobre las constantes de tiempo del modelo cinético propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.



**Figura 25.** Efecto de la presencia de  $[Mg^{2+}]$ , sobre el área bajo la curva del cerrado de corto (C1) y largo (C2) del modelo cinético propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.

Por otro lado, la Figura 26 muestra las funciones de densidad de probabilidad ajustadas a los histogramas para los estados abierto y cerrado en ausencia y presencia de  $Mg^{2+}$ . Las funciones de densidad de probabilidad tanto para el estado abierto como para el cerrado, muestran un comportamiento similar en ausencia y presencia de  $Mg^{2+}$  de las soluciones experimentales.

Se ha reportado que la presencia de magnesio intracelular produce una reducción en las corrientes unitarias en canales de  $K^+$  (Vandenberg, 1987; Ferguson, 1991; Stoneking y Mason, 2013). En este sentido, se planteó estudiar la relación corriente/voltaje (I/V) del HEMKCA bajo distintas concentraciones del ion. La Figura 27 muestra una representación gráfica del efecto de la  $[Mg^{2+}]$  sobre las corrientes del canal a diferentes potenciales.



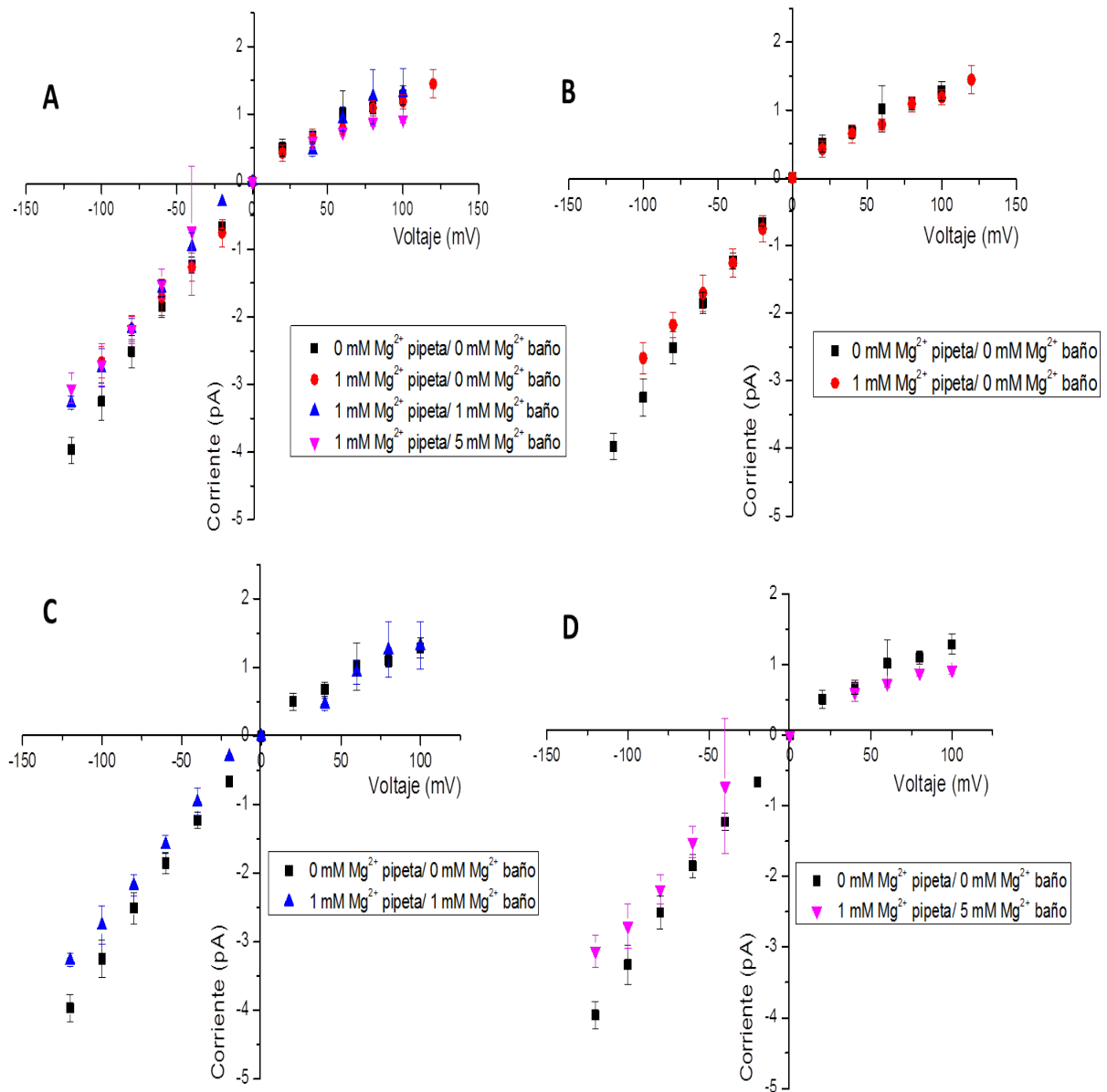
**Figura 26.** Funciones de densidad de probabilidad (fdp) ajustadas a los histogramas de cada estado en ausencia y presencia de 5 mM de Mg<sup>2+</sup>. Las figuras de la izquierda (de línea negra) corresponden al ajuste para el estado cerrado, mientras que las figuras de la derecha (de línea roja) corresponden al estado abierto. Se muestran las componentes para cada uno de los estados. Se muestran los registros 160622e para la condición control y 160610d para el tratamiento con 5 mM Mg<sup>2+</sup>.

La relación I/V del HEMKCA en ausencia de  $Mg^{2+}$  muestra un comportamiento rectificador hacia adentro como ha sido reportado para este canal (Romero, 2004; Romero, 2016). La presencia de  $Mg^{2+}$ , tanto intracelular como extracelular, disminuye la corriente que fluye a través del canal en los distintos potenciales evaluados. A potenciales negativos, la presencia de 1 mM  $Mg^{2+}$  en la solución de la pipeta disminuye la magnitud de las corrientes de entrada de  $K^+$  al interior celular. A potenciales positivos, la presencia de 5 mM  $Mg^{2+}$  produce una disminución en la magnitud de las corrientes de salida del HEMKCA. Esta disminución no es evidente a 1 mM  $Mg^{2+}$  o en ausencia del ion. En la Tabla 8 se muestra el efecto de la presencia de  $Mg^{2+}$  sobre las corrientes del HEMKCA a diferentes potenciales.

**Tabla 8.** Efecto de la presencia y concentración de  $Mg^{2+}$  sobre la relación I/V del HEMKCA. La concentración de  $Mg^{2+}$  se reporta como: pipeta/ baño

V (mV)	0mM $Mg^{2+}$ / 0 mM $Mg^{2+}$		1mM $Mg^{2+}$ / 0mM $Mg^{2+}$		1mM $Mg^{2+}$ / 1mM $Mg^{2+}$		1mM $Mg^{2+}$ / 5mM $Mg^{2+}$	
	I (pA)	DE	I (pA)	DE	I (pA)	DE	I (pA)	DE
120	--	--	1,45	0,21	--	--	--	--
100	1,28	0,14	1,18	0,11	1,32	0,35	0,92	0,05
80	1,10	0,09	1,09	0,11	1,26	0,40	0,88	0,05
60	1,01	0,34	0,79	0,08	0,93	0,18	0,73	0,06
40	0,68	0,10	0,65	0,13	0,47	0,09	0,61	0,12
20	0,51	0,12	0,42	0,12	--	--	--	--
0	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
-20	-0,67	0,05	-0,76	0,20	-0,30	--	-	--
-40	-1,23	0,12	-1,27	0,21	-0,96	0,20	-0,73	0,96
-60	-1,85	0,16	-1,71	0,26	-1,58	0,13	-1,51	0,22
-80	-2,51	0,23	-2,18	0,19	-2,18	0,16	-2,18	0,20
-100	-3,25	0,27	-2,67	0,23	-2,76	0,28	-2,71	0,32
-120	-3,97	0,19	--	--	-3,27	0,10	-3,06	0,22



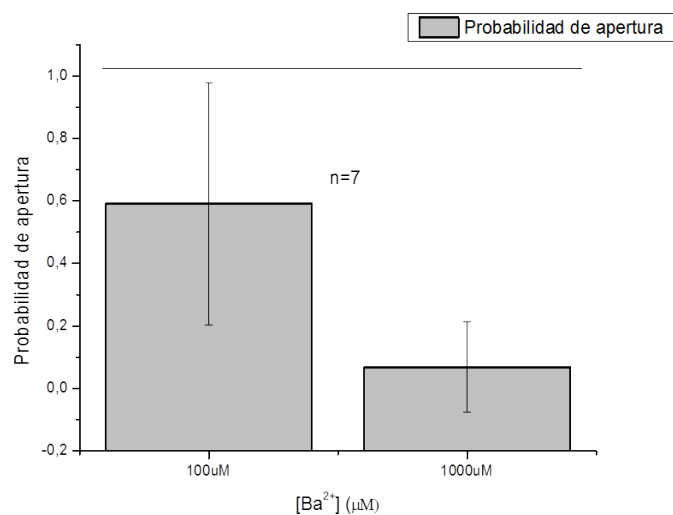


**Figura 27.** Relación corriente vs. voltaje (I/V) a distintas concentraciones de Mg<sup>2+</sup> intracelular para el HEMKCA. A) Comparación de la relación I/V en ausencia y presencia de Mg<sup>2+</sup> en la solución experimental; B) I/V control vs. 0 mM Mg<sup>2+</sup>; C) I/V control vs. 1 mM Mg<sup>2+</sup>; D) I/V control vs. 5 mM Mg<sup>2+</sup>. Se reporta el promedio y la desviación estándar. El “n” para cada punto de potencial evaluado fue variable y oscilo entre 3-8 muestras por punto por concentración ensayada.

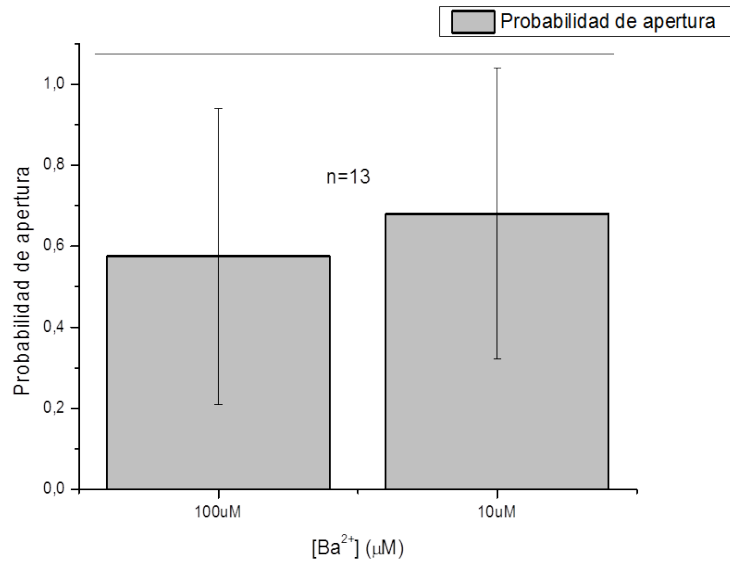
## Efecto del ion $Ba^{2+}$ sobre la actividad tipo ráfaga del HEMKCA

El ion  $Ba^{2+}$  ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la estructura y función de los canales de  $K^+$  (Amstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick, 1980; Vergara y Latorre; Jiang y Mackinnon, 2000). En esta oportunidad se ensayó el efecto del ion  $Ba^{2+}$  sobre la actividad del HEMKCA, a través del análisis de la probabilidad de apertura y las variables cinéticas del canal. Este ion se encontraba presente a ambos lados de la membrana y su concentración fue manipulada desde la solución de la cámara experimental a través de intercambio de soluciones.

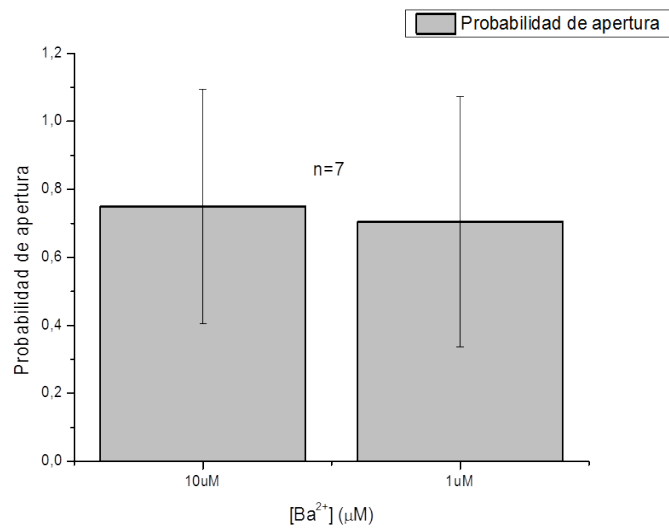
La Figura 28 muestra que aumentos en la concentración intracelular de  $Ba^{2+}$  desde 100  $\mu M$  hasta 1 mM, generan una disminución marcada de la probabilidad de apertura del HEMKCA. Por su parte, se observa el efecto contrario al disminuir la concentración de  $Ba^{2+}$ . La Figura 29 y Figura 30 muestran que disminuir la concentración intracelular de  $Ba^{2+}$  desde 100  $\mu M$  a 10  $\mu M$ , produce un aumento significativo en la probabilidad de apertura del canal ( $p < 0,05$ ) (Figura 29), mientras que disminuir la concentración desde 10  $\mu M$  hasta 1  $\mu M$   $Ba^{2+}$  no cambia significativamente la probabilidad de apertura del canal ( $p > 0,05$ ) (Figura 30).



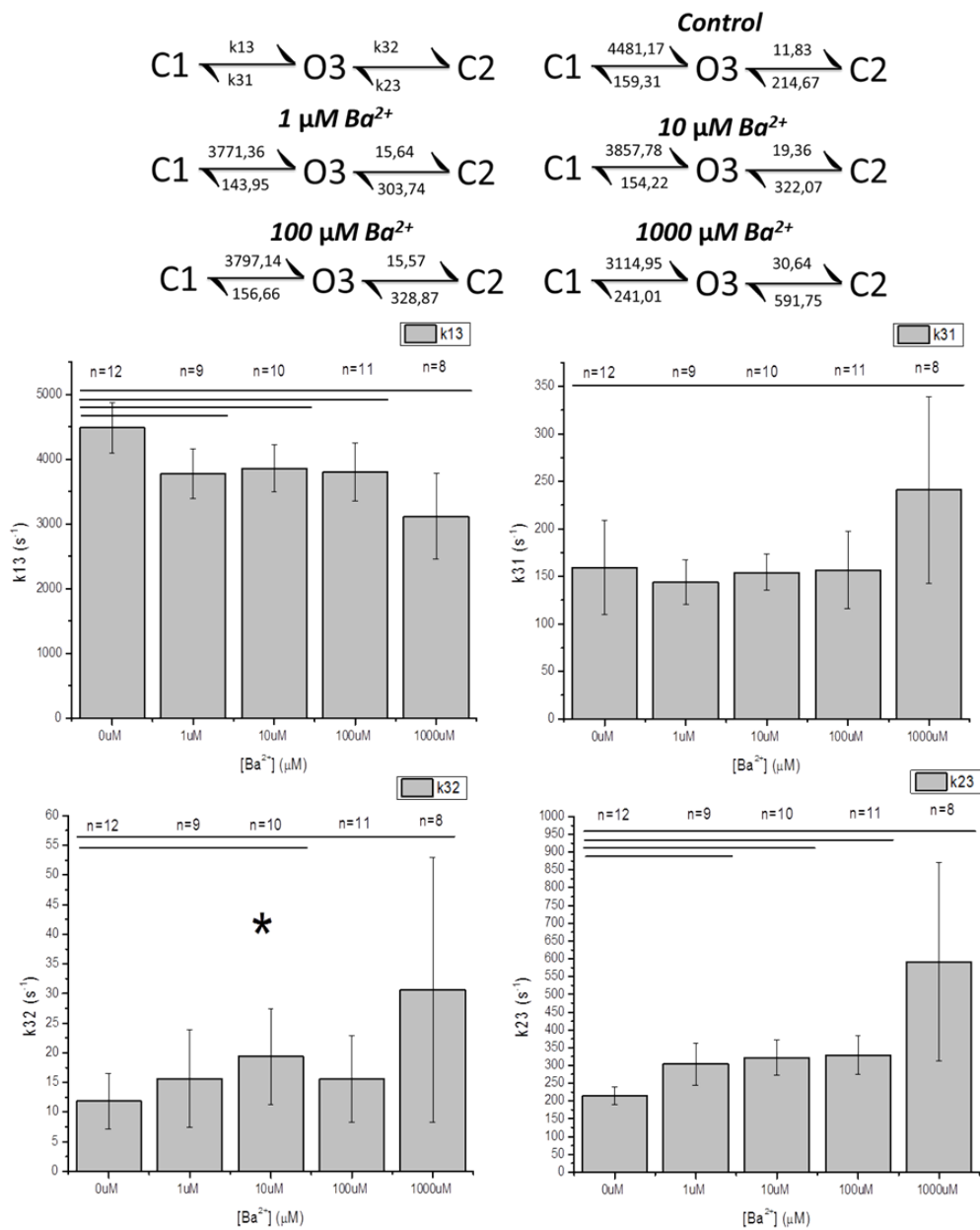
**Figura 28.** Efecto del aumento en la  $[Ba^{2+}]_i$  de 100  $\mu M$  a 1 mM, sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.



**Figura 29.** Efecto de la disminución en la  $[Ba^{2+}]_i$ , de 100 a 10  $\mu M$ , sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.



**Figura 30.** Efecto de la disminución en la  $[Ba^{2+}]_i$ , de 10 a 1  $\mu M$ , sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.



**Figura 31.** Efecto de la presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  sobre las constantes de velocidad del modelo propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra. En la constante  $k_{32}$ , el símbolo \* indica diferencias significativas entre los tratamientos con 1, 10 y 100  $\mu\text{M Ba}^{2+}$ , en las demás constantes el efecto es similar.

La presencia de  $Ba^{2+}$  afecta todas las constantes de velocidad del modelo (k13, k31, k23, k32). En la Tabla 9 se resume el efecto de  $Ba^{2+}$  sobre las constantes de velocidad, que se muestra gráficamente en la Figura 31. En presencia de las cuatro concentraciones de  $Ba^{2+}$  ensayadas, la constante de salida del cerrado corto (k13) disminuye, mientras que la del cerrado largo (k23) aumenta. Respecto a la frecuencia de entrada a los estados cerrados, se obtuvo que la constante de cerrado largo (k32) aumenta en presencia de 10  $\mu M$  y 1mM de  $Ba^{2+}$ , mientras que la constante de cerrado corto también aumenta pero sólo en presencia de 1 mM  $Ba^{2+}$ .

**Tabla 9.** Efecto de  $Ba^{2+}$  sobre las constantes de velocidad del modelo cinético del HEMKCA. El símbolo (\*) señala las constantes que reflejaron cambios significativos respecto a la condición control.

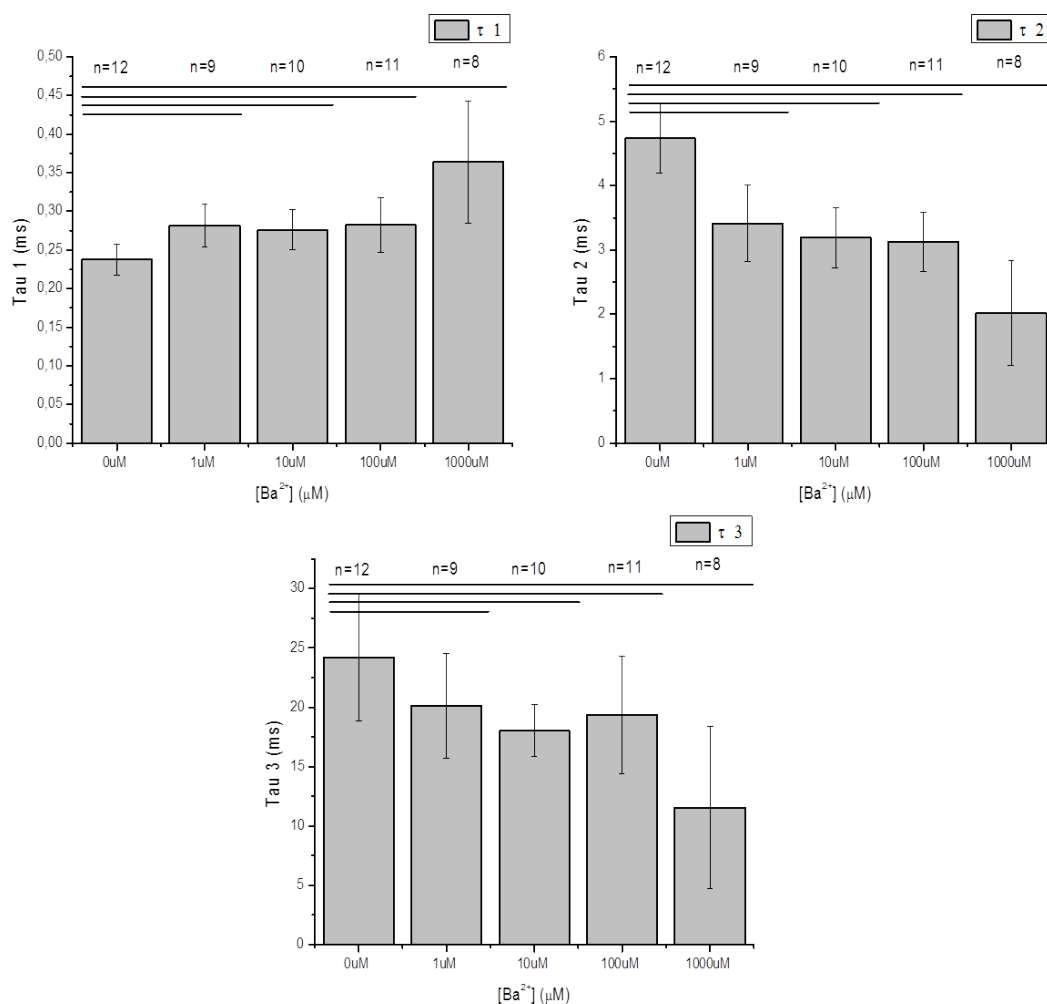
	$[Ba^{2+}]_i$ ( $\mu M$ )									
	0		1		10		100		1000	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
k13 ( $s^{-1}$ )	4481,17	385,52	3771,36*	386,16	3857,78*	358,25	3797,14*	449,48	3114,95*	658,79
k31 ( $s^{-1}$ )	159,31	49,30	143,95	23,74	154,22	19,06	156,66	40,64	241,01*	98,29
k32 ( $s^{-1}$ )	11,83	4,68	15,64	8,19	19,36*	8,09	15,57	7,27	30,64*	22,35
k23 ( $s^{-1}$ )	214,67	23,85	303,74*	59,50	322,07*	50,34	328,87*	54,51	591,75*	278,85

La Figura 32 muestra el efecto de  $Ba^{2+}$  sobre las constantes de tiempo, cuyos valores se resumen en la Tabla 10. Para todas las concentraciones ensayadas, el tiempo de permanencia en el cerrado corto ( $\tau_1$ ) aumenta, mientras que la permanencia en el cerrado largo ( $\tau_2$ ) y el abierto ( $\tau_3$ ) disminuyen. Las tres constantes de tiempo registran un efecto similar al enfrentar el parche de membrana a 1, 10 y 100  $\mu M$  de  $Ba^{2+}$ , mientras que a 1 mM el cambio es mayor (ver Figura 32).

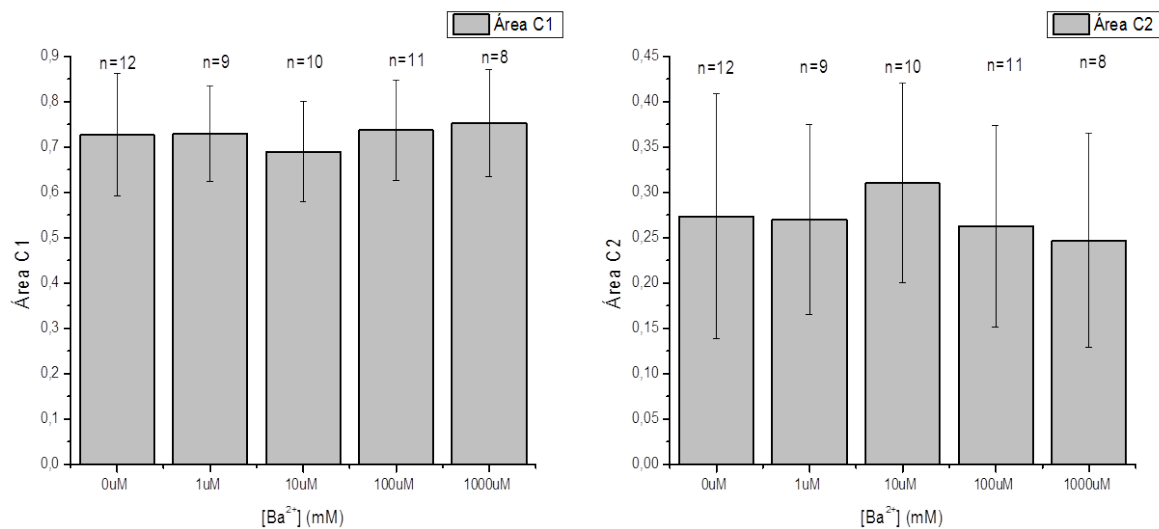
La presencia de  $Ba^{2+}$  afecta las constantes cinéticas del modelo, pero es interesante notar la diferencia en el efecto que generan las diferentes concentraciones ensayadas. Los tratamientos con 1, 10 y 100  $\mu M$   $Ba^{2+}$  muestran un efecto similar sobre las constantes de tiempo y velocidad, pero al enfrentar a los parches de membrana a 1 mM  $Ba^{2+}$  el efecto sobre las constantes es mayor, mostrando ser significativamente diferente al efecto generado por las otras tres concentraciones. La excepción en este caso es la constante de velocidad de k32, en la cual las diferencias observadas entre el tratamiento con 1 mM  $Ba^{2+}$

y las demás concentraciones, no son significativas. Este hecho se resalta con un asterisco (\*) en la Figura 31.

La Figura 33 muestra una representación gráfica del efecto de  $Ba^{2+}$  sobre el área de la fdp del estado cerrado. En este caso, la presencia de  $Ba^{2+}$  no modifica el área asociada a cerrado corto o largo.



**Figura 32.** Efecto de la presencia de  $Ba^{2+}$  sobre las constantes de tiempo del modelo propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar. Las barras horizontales en la parte superior indican diferencias significativas entre los tratamientos que se encuentran en los extremos de cada barra.

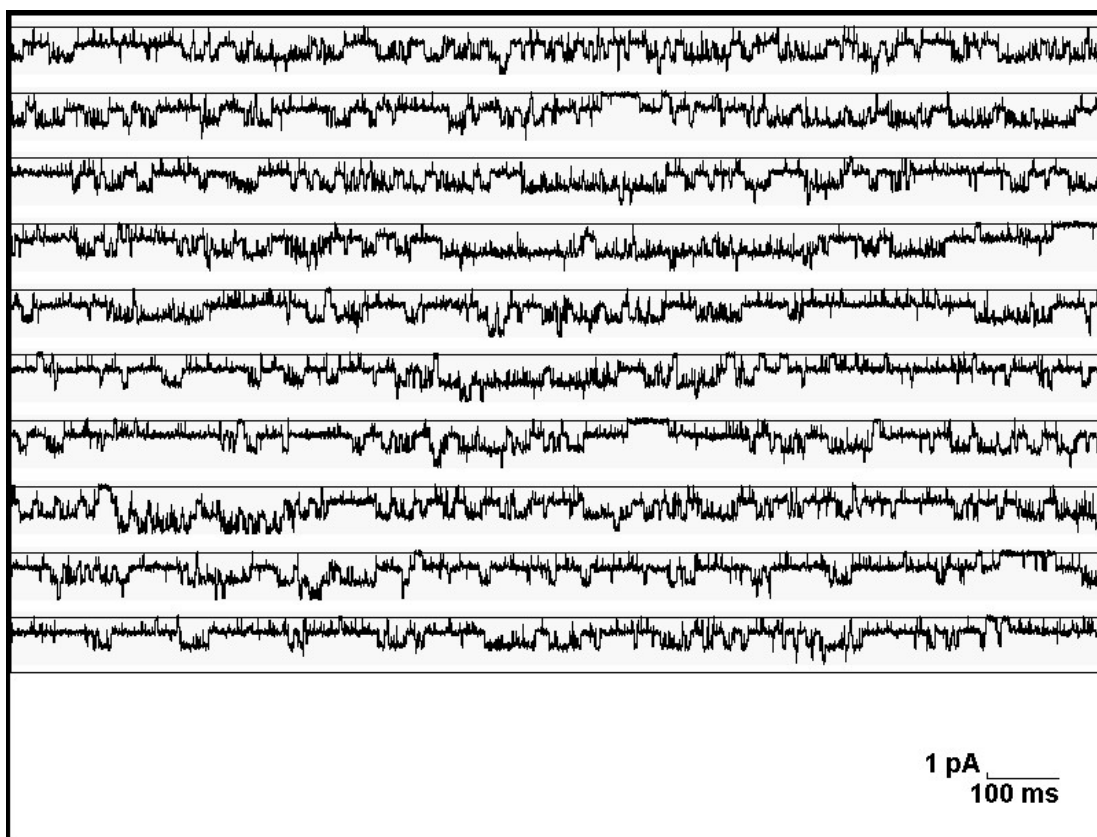


**Figura 33.** Efecto de la presencia de Ba<sup>2+</sup> sobre el área de cerrado corto y largo del modelo propuesto para el HEMKCA. Se reportan el promedio y la desviación estándar.

**Tabla 10.** Efecto de Ba<sup>2+</sup> sobre las constantes de tiempo del modelo cinético del HEMKCA. El símbolo (\*) señala las constantes que reflejaron cambios significativos respecto a la condición control.

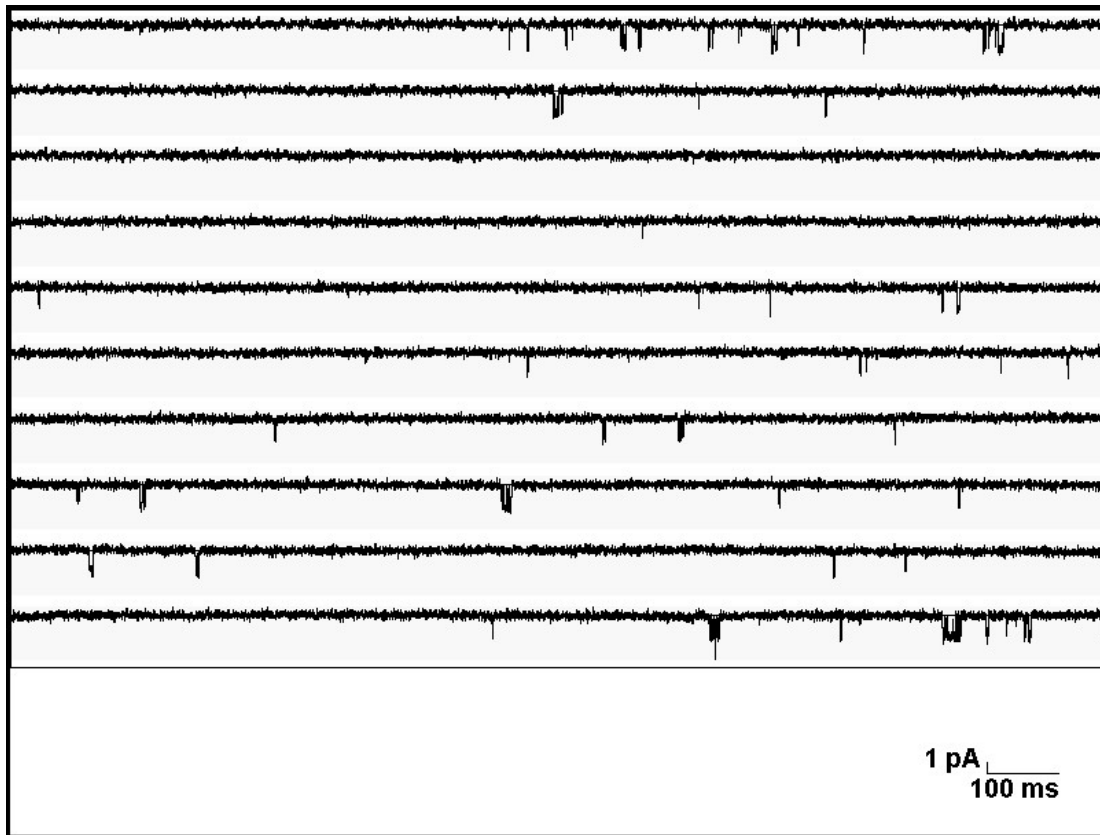
	[Ba <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (μM)									
	0		1		10		100		1000	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
τ 1 (ms)	0,24	0,02	0,28*	0,03	0,28*	0,03	0,28*	0,04	0,36*	0,08
τ 2 (ms)	4,73	0,54	3,41*	0,60	3,19*	0,47	3,13*	0,46	2,02*	0,82
τ 3 (ms)	24,20	5,31	20,15*	4,42	18,02*	2,19	19,36*	4,97	11,55*	6,81
Área C1	0,73	0,14	0,73	0,10	0,69	0,11	0,74	0,11	0,75	0,12
Área C2	0,27	0,14	0,27	0,10	0,31	0,11	0,26	0,11	0,25	0,12

La Figura 34 muestra un segmento de 15s de actividad del HEMKCA en presencia de 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ba}^{2+}$  justo antes de realizar el intercambio de soluciones. En presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ba}^{2+}$  se observan al menos tres niveles de corriente, cuya actividad disminuye drásticamente al aumentar la concentración hasta 1 mM  $\text{Ba}^{2+}$ , como se observa en la Figura 35. En presencia de 1 mM de  $\text{Ba}^{2+}$ , el tiempo de permanencia en el estado no conductivo aumentó considerablemente requiriéndose de un mayor tiempo de registro para garantizar la presencia de actividad de canal en los parches y poder realizar los análisis respectivos. Por esta razón, este ensayo requirió de un mayor número de intentos para la obtención de registros que pudieran emplearse para el análisis cinético.



**Figura 34.** Actividad del HEMKCA en presencia de 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ba}^{2+}$  en la solución del baño, antes de aumentar a 1 mM  $\text{Ba}^{2+}$ . Se muestran 15 segundos de la actividad justo antes de realizar el intercambio de solución. La línea negra horizontal indica el nivel cero de corriente y las deflexiones hacia abajo representan la apertura del HEMKCA a -60 mV. Registro 160714a

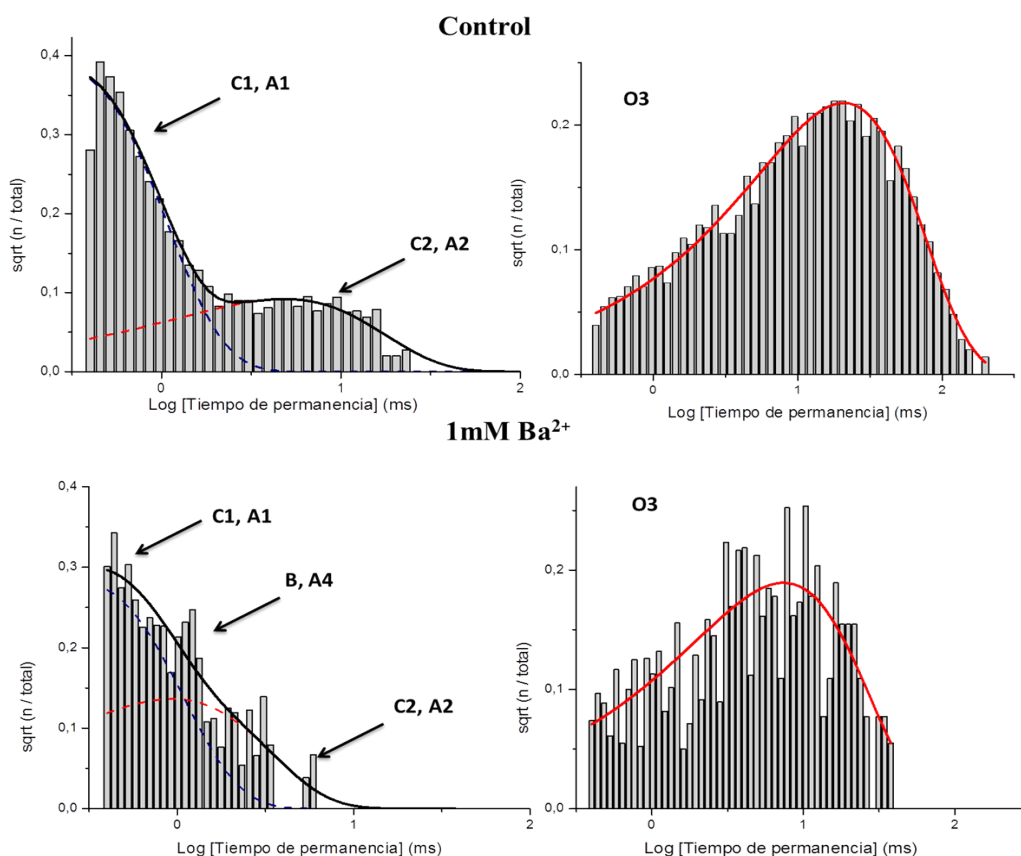




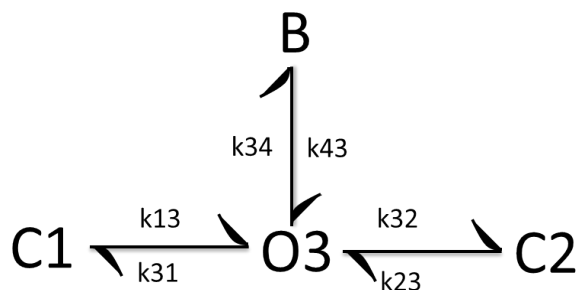
**Figura 35.** Actividad del HEMKCA en presencia de 1 mM  $Ba^{2+}$  en la solución del baño. Se muestran 15 segundos de la actividad justo después de realizar el intercambio de solución para llegar a 1 mM  $Ba^{2+}$ . La línea negra horizontal indica el nivel cero de corriente y las deflexiones hacia abajo representan la apertura del HEMKCA a -60 mV. Registro 160714a

En la Figura 36 se muestran los histogramas obtenidos en ausencia y presencia de  $Ba^{2+}$  a ambos lados de la membrana. En presencia de 1 mM  $Ba^{2+}$  el número de eventos en el estado abierto se ve afectado, presentando un patrón de distribución variable en el tiempo de permanencia de dicho estado. Para el caso del estado cerrado, se registra una disminución en el número de eventos cerrados de larga duración, mientras que un aumento considerable en el número de eventos para el cerrado corto. Interesantemente, se observa la aparición de un conjunto de eventos cerrados con duración intermedia, entre  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , que parecen surgir debido a la presencia de  $Ba^{2+}$ . De esta manera, el ajuste de las fdp obtenidos para los histogramas con 1 mM  $Ba^{2+}$  no fue un buen ajuste, posiblemente debido a la clasificación errónea de cerrados de duración intermedia como cerrados largos para lograr

los ajustes matemáticos de la función de acuerdo con el modelo cinético. Con base en estas evidencias, se modificó el modelo cinético del HEMKCA que se venía empleando para el análisis cinético de las ráfagas en el presente trabajo. La modificación del modelo cinético consistió en agregar un nuevo estado no conductivo, denominado estado *bloqueado* (B), correspondiente a los eventos de duración intermedia observados en los histogramas. En la Figura 37 se puede observar la modificación del modelo cinético del HEMKCA que presenta ahora cuatro estados, uno conductivo (el abierto) y tres no conductivos (el cerrado corto, el cerrado largo y el bloqueado).



**Figura 36.** Funciones de densidad de probabilidad ajustadas a los histogramas de cada estado en ausencia y presencia de 1 mM Ba<sup>2+</sup>. Las figuras de la izquierda (línea negra) corresponden a los histogramas para el estado cerrado, mientras que las figuras de la derecha (línea roja) al del estado abierto. Se muestran los registros 160622e para la condición control y 160714a para el tratamiento con 1 mM Ba<sup>2+</sup>.



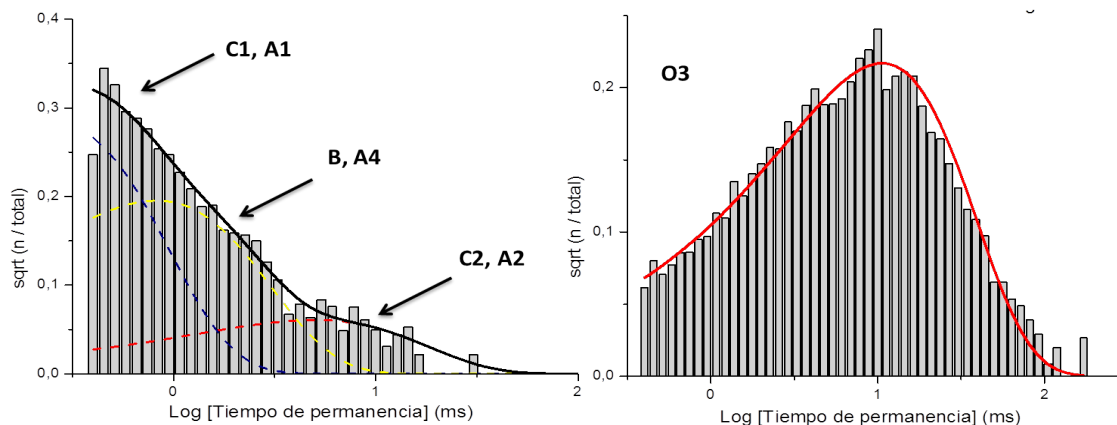
**Figura 37.** Modificación del modelo cinético del HEMKCA. El modelo presenta cuatro estados: tres cerrados (C1, C2, B) y un abierto (O3), descritos por sus respectivas constantes de velocidad.

Para el análisis de los datos con la modificación del modelo cinético fue preciso fijar las constantes de salida de los cerrados corto ( $k_{13}$ ) y largo ( $k_{23}$ ), para evaluar el comportamiento del nuevo estado, el bloqueo, que aparece debido a la presencia de  $Ba^{2+}$ .

En la Figura 38 se muestran los histogramas obtenidos a partir del análisis cinético con la modificación del modelo del HEMKCA, en el que se observa un buen ajuste para las tres componentes del estado no conductivo y una clara definición de los eventos en el cerrado corto, bloqueado, y cerrado largo. De esta manera, se obtuvo un buen ajuste para 6 de los 8 registros analizados inicialmente debido a la insuficiencia en el número de eventos que se registró para el cerrado de larga duración, lo que dificultó los ajustes para la fdp en la mayoría de los casos.

En la Tabla 11 se muestran los valores obtenidos del ajuste de las fdp bajo el supuesto del nuevo modelo cinético, donde se puede apreciar que la duración del cerrado intermedio es de  $(0,86 \pm 0,07)$  ms. Es importante notar que bajo estas condiciones, se observa una disminución en la variabilidad registrada para las constantes del modelo, principalmente la variabilidad asociada a la constante de cerrado largo ( $\tau_{12}$ ) y el área de dicha componente.

**Modificación  
modelo: 1mM Ba<sup>2+</sup>**



**Figura 38.** Ajuste de las funciones de densidad de probabilidad para los histogramas de cada estado, obtenidos bajo modificación del modelo cinético propuesto para el HEMKCA. Registro 160713g

**Tabla 11.** Constantes cinéticas del HEMKCA en presencia de 1mM Ba<sup>2+</sup>, evaluadas con la modificación del modelo del canal (n=6). [Las constantes marcadas con un asterisco (\*) son aquellas que se fijaron para poder realizar los respectivos análisis]

Constantes	1 mM Ba <sup>2+</sup>	
	Promedio	DE
k13 (s <sup>-1</sup> )	*4480,00	0,00
k31 (s <sup>-1</sup> )	266,57	99,15
k32 (s <sup>-1</sup> )	4,45	3,47
k23 (s <sup>-1</sup> )	*215,00	0,00
k34 (s <sup>-1</sup> )	75,79	22,10
k43 (s <sup>-1</sup> )	1198,85	89,99
t 1 (ms)	0,25	0,01
t 4 (ms)	0,86	0,07
t 2 (ms)	4,66	0,01
t 3 (ms)	9,76	2,42

## **DISCUSIÓN**

### **El modelo cinético**

Para nuestra investigación centrada en la caracterización del nuevo canal HEMKCA, la importancia del modelo cinético propuesto radica en que permite realizar comparaciones cuantitativas de los parámetros cinéticos de la ráfaga entre diferentes parches de membrana expuestos a distintos tratamientos. En el análisis cinético, las variables inter-ráfaga afectan grandemente la  $P_o$ , mientras que manipulaciones que afectan las variables intra-ráfaga presentan poco efecto sobre la  $P_o$  del canal. Nuestras observaciones indican que los parámetros intra-ráfaga e inter-ráfaga se comportan de manera independiente, por lo menos para las condiciones experimentales ensayadas. Es importante resaltar que el tipo de información que arrojan el análisis de las variables intra-ráfaga y de la  $P_o$ , es diferente y en el intento por caracterizar la actividad del HEMKCA, como para cualquier canal, se complementan. En el presente trabajo, la independencia de las variables intra-ráfaga e inter-ráfaga se hace evidente a través del análisis y comparación del tipo de bloqueo generado para el HEMKCA por acción de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ .

### **Efecto del ion $\text{Na}^+$ sobre la actividad del HEMKCA**

Es sabido que los canales de  $\text{K}^+$  son poco permeables a  $\text{Na}^+$  (Hille, 2001), tanto si se agrega desde el lado extracelular como desde el lado intracelular (Christophersen, 1991; Romero, 2016). En canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , la presencia intracelular de  $\text{Na}^+$  ha sido reportada como bloqueadora de las corrientes de canal en células cromafines bovinas (Marty, 1983; Yellen, 1984 a, b), células ventriculares de bovino (Matsuda, 1993) y eritrocitos humanos (Christophersen, 1991). La presencia intracelular de este ion genera una disminución de la magnitud de las corrientes y un aumento en el ruido del estado abierto (o flickering), en un proceso dependiente de voltaje (Marty, 1983; Yellen, 1984a, b; Christophersen, 1991; Matsuda, 1993). Además, se ha reportado que la presencia intracelular de 20 mM  $\text{Na}^+$  en células cromafines genera una disminución en la probabilidad de apertura del canal a potenciales positivos (Marty, 1983).

El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  del eritrocito humano (también llamado canal Gárdos) pertenece a la familia de canales de conductancia intermedia (IK), la misma familia a la que se ha propuesto pertenece el HEMKCA. En el presente trabajo se caracterizó el efecto del ion  $Na^+$  a 1 y 10 mM sobre la actividad del HEMKCA. Muy interesantemente encontramos que para el HEMKCA, al contrario que para el canal Gárdos, no hay diferencias significativas en cuanto a: 1) la amplitud de las corrientes del canal, que se mantuvieron en  $(1,86 \pm 0,27)$  pA a un potencial de -60 mV, b) el ruido del estado abierto y c) cambios en la probabilidad de apertura. La ausencia de estos efectos en el HEMKCA debido a la presencia de  $Na^+$  sugiere que existen diferencias fundamentales en las estructuras del canal Gárdos y del HEMKCA.

En cuanto a la cinética de ráfagas del HEMKCA, la presencia de  $Na^+$  afecta sólo la duración del cerrado corto ( $\tau_1$ ) y el abierto ( $\tau_3$ ) y las áreas asociadas tanto al cerrado corto como al largo. El tiempo de permanencia en el cerrado corto aumenta, mientras que la permanencia en el estado abierto disminuye. Estos resultados se pueden interpretar de dos maneras: 1) la presencia de  $Na^+$  estabiliza la permanencia en el cerrado de corta duración de la ráfaga, o 2) la presencia de  $Na^+$  bloquea la vía de permeación de  $K^+$  afectando actividad intra-ráfaga del canal. En el primer caso, se esperaría que la presencia de  $Na^+$  aumente la duración del cerrado corto haciendo que el tiempo de permanencia en este cerrado se alargue, lo cual es consistente con los resultados, pero en este caso se esperaría no observar efecto alguno sobre los demás parámetros cinéticos del modelo, lo cual no es el caso, invalidando esta posibilidad. La segunda hipótesis supone que el ion  $Na^+$  interactúa con la vía de permeación del canal, actuando como un bloqueador rápido de la actividad del HEMKCA. En este caso, se esperaría que la presencia de  $Na^+$  disminuya el tiempo de permanencia en el estado abierto además de afectar la duración del cerrado corto. Los resultados indican que además de afectar las  $\tau_1$  y  $\tau_3$ , la presencia de este ion también afecta las áreas asociadas a las componentes del estado cerrado, disminuyendo el número de eventos de larga duración y aumentando los de corta duración. Estos cambios pueden interpretarse en función de la aparición de un nuevo estado cinético para el HEMKCA en presencia de  $Na^+$ , cuya constante de tiempo ( $\tau$ ) es similar a la constante de cerrado corto ( $\tau_1$ ), lo que dificulta su disección matemática como un estado cinético independiente de los eventos cerrados de corta duración. De esta manera, la segunda hipótesis parece ser la más plausible para explicar el efecto del ion  $Na^+$  sobre el

HEMKCA, sugiriendo un bloqueo rápido como mecanismo de acción del ion sobre la actividad del canal.

### **Efecto del ion $Mg^{2+}$ sobre la actividad del HEMKCA**

Magnesio ha sido clasificado como un bloqueador de las corrientes de canales de  $K^+$ , entre ellos los canales que presentan rectificación hacia adentro (Kir) (Vandenberg, 1987) y canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de células cardíacas bovinas (Matsuda, 1987; 1988; 1993), células humanas de eritroleucemia (HEL) (Stoneking y Mason, 2013) y eritrocitos humanos (Grygorzyk y Schwarz, 1985). La presencia de  $Mg^{2+}$  intracelular disminuye la magnitud de las corrientes que fluyen a través de los canales de  $K^+$ , en un bloqueo dependiente de la concentración del ion y del voltaje, que en algunos casos genera fluctuaciones en la corriente del canal abierto (Vandenberg, 1987; Matsuda, 1987; 1988, 1993) y en otros no (Ferguson, 1991; Stoneking y Mason, 2013).

En ausencia de  $Mg^{2+}$ , el HEMKCA muestra una relación I/V con un comportamiento rectificador hacia adentro, como ya ha sido reportado para este canal (Romero, 2004; Romero, 2016). La presencia de  $Mg^{2+}$ , tanto intracelular como extracelular, disminuye la corriente que fluye a través del canal a los distintos potenciales evaluados. A potenciales negativos, la presencia de 1 mM  $Mg^{2+}$  en la solución extracelular disminuye la magnitud de las corrientes de entrada de  $K^+$  al interior celular; mientras que a potenciales positivos, la presencia de 5 mM  $Mg^{2+}$  en la solución intracelular produce una disminución en la magnitud de las corrientes de salida de  $K^+$  del HEMKCA. Estos resultados presentan un efecto inhibitorio de las corrientes del HEMKCA debido a la presencia de  $Mg^{2+}$  al agregarlo desde ambos lados de la membrana, en un proceso dependiente de la concentración y del potencial, de acuerdo con lo reportado en canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  en células musculares de rata (Ferguson, 1991) y en el canal  $K_{Ca3.1}$  de células HEL (Stoneking y Mason, 2013). Adicionalmente, con nuestros resultados podemos afirmar que es evidente que el comportamiento rectificador del HEMKCA no se debe al efecto inhibitorio generado por la presencia de  $Mg^{2+}$  en la solución intracelular, como ha sido propuesto para otros canales de  $K^+$  (Vandenberg, 1987; Yang y col., 2012). Los experimentos en ausencia y presencia de  $Mg^{2+}$  a ambos lados de la membrana, muestran que el canal presenta un comportamiento rectificador a pesar de los cambios en la

composición iónica de las soluciones. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el comportamiento rectificador del canal se debe a la asimetría estructural de la proteína, que se traduce en un flujo asimétrico de las corrientes como ha sido propuesto antes para el HEMKCA (Romero, 2004).

La presencia de  $Mg^{2+}$  en la solución experimental afecta la probabilidad de apertura del HEMKCA, generando una disminución de la  $P_o$  de 0,59 a 1 mM hasta 0,39 a 5 mM de  $Mg^{2+}$ . De manera similar, Stoneking y Mason (2013) reportan una disminución en el número de canales abiertos en un intervalo de tiempo y una disminución en la probabilidad de apertura del canal, conforme la concentración del ion aumenta de 0 a 1 y 5 mM, proponiendo que la disminución en el tiempo promedio de abierto surge de la interacción competitiva de  $Mg^{2+}$  por el sitio de activación de  $Ca^{2+}$  tal como se reporta para el canal Gárdos (Grygorzyk y Schwarz, 1985). El diseño de los experimentos para el estudio del efecto del ion  $Mg^{2+}$  sobre la actividad del HEMKCA no permite soportar este planteamiento, pero debido a que el HEMKCA es modulado por la presencia intracelular de  $Ca^{2+}$  no se descarta dicha posibilidad.

En el HEMKCA la cinética de ráfagas cambia debido a la presencia de  $Mg^{2+}$ , aumentando la duración del cerrado corto ( $\tau_1$ ) y disminuyendo el tiempo de permanencia en el cerrado largo ( $\tau_2$ ) y el abierto ( $\tau_3$ ). Un efecto similar se reportó en el canal  $K_{Ca3.1}$ , en el cual los eventos del estado abierto fueron descritos por dos componentes exponenciales, una de corta duración y otra de larga duración. En este sentido, la presencia de  $Mg^{2+}$  intracelular produjo un aumento en la duración de abierto corto  $\tau_1$  de 0,7 ms a 1 mM hasta 0,9 ms a 5 mM  $Mg^{2+}$ , mientras que produjo una disminución en la duración del abierto largo  $\tau_2$  de 7,1 ms a 1 mM hasta 5,6 ms a 5 mM  $Mg^{2+}$  (Stoneking y Mason, 2013).

Por otro lado, el efecto sobre las constantes de velocidad del HEMKCA muestra que la frecuencia de entrada a los cerrados corto  $k_{31}$  y largo  $k_{23}$  aumenta, mientras que sólo se modifica la frecuencia de salida del cerrado largo, registrando un aumento que sugiere una disminución en la probabilidad de permanecer en dicho estado. Ahora, estos efectos sobre la cinética de las ráfagas pueden explicarse de acuerdo con dos posibilidades: 1) Magnesio compite por el sitio de unión a  $Ca^{2+}$  afectando la modulación de la actividad del HEMKCA, lo que se traduciría en una disminución de la probabilidad de apertura del canal y 2) el ion  $Mg^{2+}$  interactúa con la vía de permeación de  $K^+$  actuando como



bloqueador de la actividad del HEMKCA. En este caso, de acuerdo con los resultados obtenidos la opción más plausible parece ser la del bloqueo generado por la presencia de  $Mg^{2+}$ . El efecto de  $Mg^{2+}$  sobre las constantes de tiempo del estado cerrado indica que la presencia del ion está actuando como bloqueador de la actividad del canal, disminuyendo la duración del cerrado largo y aumentando la del cerrado corto, de manera que podrían estar generándose eventos cuya constante de tiempo se encuentre entre la  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , cuyas diferencias no son claramente discernibles. Sin embargo, no es descartable la posibilidad de competencia entre  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  por el sitio de activación debido al efecto observado que genera dicho ion sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA, por lo cual sería interesante realizar experimentos para caracterizar el efecto de la posible competencia entre  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  y su efecto sobre la actividad del canal. De esta manera, estos resultados permiten realizar inferencias acerca de las variables intra-ráfaga del canal por lo cual se propone al ion  $Mg^{2+}$  como un bloqueador rápido de la actividad del HEMKCA que afecta tanto las variables intra-ráfaga como la probabilidad de apertura del canal, demostrándose que inhibe las corrientes del HEMKCA al aplicarlo desde ambos lados de la membrana, en un efecto dependiente de la concentración del ion y del potencial.

### **Efecto del ion $Ba^{2+}$ sobre la actividad del HEMKCA**

Bario es un bloqueador de canales de  $K^+$  ampliamente utilizado en el estudio de la estructura y función de este tipo de canales (Amstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick, 1980; Vergara y Latorre, 1983; Neyton y Miller, 1988 a y b; Jiang y Mackinnon, 2000; Guo y col., 2014). La presencia de  $Ba^{2+}$ , tanto intracelular como extracelular, produce la aparición de estados no conductivos cuya duración es mayor a la de los eventos cerrados, en un proceso dependiente del potencial (Amstrong y Taylor, 1980; Vergara y Latorre, 1983). La naturaleza del bloqueo por  $Ba^{2+}$  se debe a la similitud del radio iónico entre  $K^+$  y  $Ba^{2+}$  (1,33 y 1,35 Å, respectivamente) que le permite encajar e interactuar a nivel del filtro de selectividad, en la que su doble carga positiva genera una unión de alta afinidad que produce los eventos no conductivos de larga duración característicos de este tipo de bloqueo (Jiang y Mackinnon, 2000; Piasta y col., 2011; Guo y col., 2014).

En el HEMKCA, ha sido estudiado el efecto del ion  $Ba^{2+}$  sobre la actividad del canal al agregarlo desde el lado intracelular (Romero, 2004; Mata, 2016) y desde ambos lados de la membrana simultáneamente (Mata, 2016), encontrándose que la adición de  $Ba^{2+}$  al lado intracelular produce una disminución marcada de la  $P_o$  del canal. En este trabajo se encontró que la presencia de 1 mM  $Ba^{2+}$  genera una inhibición marcada de la actividad del HEMKCA, aumentando el tiempo de permanencia en el estado no conductivo en un efecto similar al descrito por Vergara y Latorre (1983). Este aumento en la duración del estado no conductivo disminuye notablemente la probabilidad de apertura del HEMKCA, lo que permite inferir que los cerrados inter-ráfaga ocurren con mayor frecuencia o aumentan su duración en presencia de  $Ba^{2+}$  (Mata, 2016). En un ensayo similar en el canal Gárdos, Dunn (1998) reporta una dramática disminución de la probabilidad de apertura del canal al añadir 200  $\mu M$   $Ba^{2+}$  al lado intracelular. Por otro lado, se ensayó el efecto de la disminución de la concentración de  $Ba^{2+}$  sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA, registrándose un aumento en la  $P_o$  al disminuir la concentración intracelular de  $Ba^{2+}$  desde 100  $\mu M$  hasta 10  $\mu M$ , dejando en evidencia que el bloqueo generado es dependiente de la concentración del ion.

En este trabajo, el análisis del aumento en la duración de los eventos cerrados entre ráfagas es meramente cualitativo, dado que no se encuentra incluido en el modelo cinético (de ráfaga) del HEMKCA y bajo el sistema experimental empleado, no es posible sacar conclusiones acerca de ese estado. Sin embargo, en otros canales de  $K^+$  el aumento en la duración del cerrado inter-ráfaga es evidente (Guo y col., 2014; Lam y col., 2014). En el canal MthK, la presencia intracelular de 200  $\mu M$   $Ba^{2+}$  induce la aparición de cerrados inter-ráfaga con dos componentes, uno en el orden de las decenas de milisegundos y otro en el orden de los cientos de milisegundos (Gou y col., 2014). De manera similar, una forma mutante del canal catiónico NaK selectivo a  $K^+$  (NaK2K) muestra que la cinética del estado cerrado es descrito por dos componentes, de corta y larga duración, pero la presencia de  $Ba^{2+}$  genera la aparición de un tercer componente con una duración en el orden de los segundos (Lam y col., 2014). El sistema experimental empleado para estudiar la actividad del HEMKCA dificulta el análisis cinético de los eventos cerrados de larga duración que ocurren entre las ráfagas debido a la incertidumbre del número de canales presentes en un parche de membrana y a la dificultad en la obtención de parches que garanticen la presencia de una única proteína. Sin embargo, los resultados de la presencia

de 1 mM  $Ba^{2+}$  sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA, permiten inferir que este ion modifica el tiempo de permanencia de los eventos cerrados inter-ráfaga, que pudiesen ser descritos por al menos dos componentes, un cerrado largo intrínseco de la actividad de canal y un bloqueo debido a la interacción de  $Ba^{2+}$  con el canal. El aumento en la duración de los eventos cerrados inter-ráfaga generados por la presencia de  $Ba^{2+}$  se debe a la similitud en su radio iónico con  $K^+$  y su doble carga positiva que genera una unión de alta afinidad con los sitios de unión de  $K^+$  a nivel del filtro de selectividad, lo que se traduce en una disminución de la  $P_o$  y aumento de la duración de los eventos no conductivos (Jiang y Mackinnon, 2000; Piasta y col., 2011; Guo y col., 2014).

Nuestros resultados indican que la presencia de  $Ba^{2+}$  afecta tanto la  $P_o$  como la cinética de las ráfagas del HEMKCA, de acuerdo con lo reportado por Mata (2016) para el mismo canal. La presencia de  $Ba^{2+}$  afecta todas las constantes cinéticas del modelo, generando un aumento en la duración del cerrado corto ( $\tau_1$ ) y una disminución en la duración tanto del abierto ( $\tau_3$ ) como del cerrado largo ( $\tau_2$ ). Este efecto indica que la presencia del ion  $Ba^{2+}$  está actuando como bloqueador de la actividad del HEMKCA, de manera que surgen eventos cuya duración se encuentra entre la constante de cerrado corto ( $\tau_1$ ) y cerrado largo ( $\tau_2$ ), lo cual es consistente con lo obtenido del análisis de los histogramas para el estado cerrado. Adicionalmente, el aumento en la frecuencia de entrada al cerrado corto  $k_{31}$  y la disminución en su frecuencia de salida  $k_{13}$  sugieren que la presencia de  $Ba^{2+}$  aumenta la probabilidad de encontrar al canal en dicho estado. De forma similar, el aumento en la frecuencia de entrada  $k_{32}$  y salida  $k_{23}$  del cerrado largo sugieren que la probabilidad de permanecer en dicho estado disminuye. Estos resultados representan una evidencia de que el cambio en los cerrados intra-ráfaga se debe a un bloqueo rápido generado por la interacción de  $Ba^{2+}$  con el canal. En el canal Gárdos, la presencia de  $Ba^{2+}$  parece afectar la duración de los eventos de manera similar a lo que estamos reportando para el HEMKCA en este trabajo, en el cual la  $\tau$  de cerrado corto aumenta de 0,8 ms hasta 2,4 ms y la  $\tau$  de abierto disminuye de 8,5 ms hasta 4,5 ms (Grygorzyk y Schwarz, 1985).

La comparación de los histogramas en ausencia y presencia de  $Ba^{2+}$  a ambos lados de la membrana, revela un conjunto de eventos de duración intermedia cuya constante de tiempo se encuentra entre  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , que surge debido a la presencia de  $Ba^{2+}$ . Estos cambios en las características cinéticas de las ráfagas, no pudieron ser ajustados adecuadamente con los

parámetros del modelo cinético del HEMKCA empleado hasta ahora en el presente trabajo, por lo cual con base en estos resultados, se realizó una modificación del modelo cinético agregando un nuevo estado no conductivo, el cual se denominó estado bloqueado (B). Este nuevo modelo presenta 4 estados: uno conductivo y tres no conductivos (dos cerrados y un bloqueado) que describen la actividad tipo ráfaga del HEMKCA en presencia de  $Ba^{2+}$  y coinciden con los modelos previamente propuestos para canales de  $K^+$  en presencia de  $Ba^{2+}$  (Vergara y Latorre, 1983; Miller y col., 1987). Este nuevo estado cinético para el HEMKCA permite describir una interacción rápida del ion  $Ba^{2+}$  con el canal, que es responsable de la disminución en el tiempo de permanencia del cerrado largo intra-ráfaga  $\tau_2$  y aumento del cerrado corto  $\tau_1$ , lo que apoya el planteamiento de un bloqueo rápido generado en el canal por la presencia de  $Ba^{2+}$ . El planteamiento y desarrollo del nuevo modelo cinético, se realizó con base en el promedio de los parámetros de la actividad tipo ráfaga del HEMKCA en ausencia de  $Ba^{2+}$ . Además, fue preciso fijar la frecuencia de salida promedio de los cerrados corto y largo con el objetivo de evaluar el comportamiento de este nuevo estado cinético para el HEMKCA. Es importante destacar que la disminución marcada de la actividad de canal en presencia de  $Ba^{2+}$  representó una dificultad en la obtención de registros con suficientes eventos que permitieran realizar los ajustes respectivos para las componentes de los estados del modelo, por lo cual se sugiere aumentar la duración de registro de la actividad de canal para garantizar la presencia de suficientes eventos que puedan ser empleados en el ajuste del nuevo modelo y caracterización de este nuevo estado cinético.

En presencia de  $Ba^{2+}$ , el análisis de todas constantes cinéticas del modelo refleja que existe una diferencia en el efecto que genera la exposición de los parches de membrana a 0 y 1 mM de  $Ba^{2+}$  como se observa en las Figuras 31 y 32. Este efecto se mantiene constante al aumentar la concentración de  $Ba^{2+}$  hasta dos órdenes de magnitud, indicando un proceso de saturación, lo que nos lleva a sugerir la existencia de un sitio de unión para  $Ba^{2+}$  con una  $K_d$  en el orden submicromolar. Interesantemente, al aumentar aún más la concentración de  $Ba^{2+}$ , de 100  $\mu$ M a 1 mM, se obtiene un efecto mayor respecto al reportado para las demás concentraciones. Este efecto nos permite sugerir la existencia de un segundo sitio de unión para  $Ba^{2+}$  con una  $K_d$  en el orden submilimolar. Estos resultados apoyan la propuesta de la existencia de dos sitios de unión a  $Ba^{2+}$  en el poro del HEMKCA, uno de alta y otro de baja afinidad, como ha sido sugerido (Mata, 2016). Así se

propone que el sitio de unión de alta afinidad es alcanzado a bajas concentraciones del ion, mientras que el sitio de baja afinidad que es alcanzado a altas concentraciones de  $Ba^{2+}$ . Este planteamiento podría sustentarse con los resultados de estudios cristalográficos en los que se localizan los sitios de unión de  $Ba^{2+}$  en canales de  $K^+$ . En el canal KcsA, el ion  $Ba^{2+}$  interactúa predominantemente con dos sitios de unión a  $K^+$  en el filtro de selectividad, uno en la posición 2 y otro en la posición 4 cercano a la cavidad del canal (Piasta y col., 2011). De forma similar, en el canal MthK se reportan dos sitios de unión a  $Ba^{2+}$  en el filtro de selectividad, uno en la posición 2 y otro en la posición 3 o 4 con mayor probabilidad (Guo y col., 2014). En este sentido, los dos sitios de unión a  $Ba^{2+}$  en el poro del HEMKCA podrían coincidir con lo propuesto en los estudios estructurales de los canales de  $K^+$ , encontrándose al sitio de unión de alta afinidad cercano a la cavidad del canal, mientras que el sitio de baja afinidad en una posición en el filtro de selectividad localizado hacia el lado extracelular; de esta manera podría explicarse la diferencia en el efecto inhibitorio que se genera al enfrentar a los parches de membrana a 1 mM de  $Ba^{2+}$  respecto a las demás concentraciones.

El efecto descrito sobre la Po, las constantes intra-ráfaga e incluso las inferencias sobre los eventos inter-ráfaga, dejan en evidencia que el bloqueo causado por  $Ba^{2+}$  es distinto al generado por  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  en el HEMKCA y otros iones en canales de  $K^+$  (Yellen, 1984a; Christophersen, 1991; Dunn, 1998). El equipo de Latorre propone que a bajas concentraciones de  $K^+$  durante el bloqueo por  $Ba^{2+}$ , dos opciones son posibles: a) el canal puede entrar en el estado largo no conductivo dejando al ion atrapado dentro, o b)  $Ba^{2+}$  puede desplazarse a través del canal hacia la solución externa, haciendo entrar al canal en una actividad tipo “ráfaga”, debido al bloqueo rápido generado por el ion (Vergara y col., 1999). Con base en estos reportes y los resultados aquí discutidos, se sugiere que  $Ba^{2+}$  genera dos tipos de bloqueos en el HEMKCA, uno rápido y otro lento, y que presenta dos sitios de unión en la vía de conducción de  $K^+$ , uno de alta y otro de baja afinidad.

### **Bloqueo iónico en el HEMKCA**

El análisis de bloqueo generado por los iones  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ba^{2+}$ , permite distinguir entre dos tipos de inhibición iónica que pueden suceder en el HEMKCA, un bloqueo rápido y otro lento. La presencia de los tres iones en solución produce un bloqueo rápido de la

actividad del HEMKCA que se hace evidente a través del análisis de los eventos definidos dentro de la ráfaga en el modelo cinético. Por otro lado, el bloqueo lento de la actividad del HEMKCA se hace evidente a través del análisis de la Po y del desarrollo temporal de la actividad de canal observada en los registros. Tal como plantea Mata (2016) el desarrollo del modelo cinético para estudiar la actividad del HEMKCA permite realizar comparaciones cuantitativas entre distintos tratamientos (Mata, 2016), de manera que tanto el análisis cinético de las ráfagas como de la Po complementan la información acerca de los mecanismos y funcionalidad del canal.

La diferencia en el bloqueo generado por  $Ba^{2+}$  en contraste con el bloqueo generado por los iones  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  se debe a la similitud en el radio iónico de  $Ba^{2+}$  con  $K^+$ , que le permite ingresar a la vía de conducción iónica y generar eventos no conductivos de larga duración. Se ha demostrado que la selectividad de los canales de  $K^+$  viene dada por el radio iónico y su forma de ajustarse a los sitios de coordinación de la estructura proteica (Lockless y col., 2007), por lo cual iones similares en tamaño a  $K^+$  pueden permear a través de la vía de conducción (y bloquearlo, dependiendo de la afinidad por los sitios de coordinación), mientras que los iones de menor tamaño no lo pueden hacer, como es el caso para  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  con un radio iónico de 0,95 Å y 0,65 Å, respectivamente. En el caso de los iones impermeables, se propone que pueden entrar al canal pero no permear a través de él, de manera que si se aplica un potencial de membrana que favorezca el flujo de corriente hacia el interior celular en presencia de un ion impermeable en la solución extracelular, el ion puede ingresar al canal hasta encontrarse con una barrera al flujo iónico, produciéndose de esta manera un bloqueo de las corrientes de entrada por efecto de dicho ion (Grygorzyk y Schwarz, 1985). Tal podría ser el caso para el bloqueo rápido generado por  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  en el HEMKCA cuando se encuentran presentes a ambos de la membrana.

## CONCLUSIONES

Se propone al ion  $\text{Na}^+$  como un bloqueador rápido de la actividad del HEMKCA.

El comportamiento rectificador del HEMKCA no se debe a la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en la solución intracelular.

El ion  $\text{Mg}^{2+}$  produce un bloqueo rápido sobre la actividad del HEMKCA. Se propone la posible existencia de un nuevo estado cinético debido al bloqueo por parte del ion.

La presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  afecta tanto las variables intra-ráfaga como la  $P_o$  del HEMKCA, de manera que genera dos tipos de bloqueo sobre la actividad del HEMKCA: uno rápido y otro lento.

La disminución de la  $P_o$  del HEMKCA debido a la presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  produce un aumento en la duración de los eventos en el estado no conductivo debido a la similitud en el radio iónico que comparte con el ion  $\text{K}^+$  y su doble carga positiva que genera una unión de alta afinidad con el canal y produce los eventos no conductivos de larga duración.

La presencia de 1 mM  $\text{Ba}^{2+}$  produce la aparición de un nuevo estado cinético para el HEMKCA con una  $\tau$  entre  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , un estado bloqueado, debido a la interacción rápida de  $\text{Ba}^{2+}$  con el canal

Los resultados apoyan la propuesta de que el HEMKCA presenta dos sitios de unión a  $\text{Ba}^{2+}$  en la vía de conducción de  $\text{K}^+$ , uno de alta y otro de baja afinidad.

Aun cuando se propone que el HEMKCA pertenece a la familia de canales de conductancia intermedia, en este trabajo se presentan evidencias de la existencia de diferencias estructurales importantes con el canal de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (el canal Gárdos)

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Armstrong, C., Taylor, S. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* 30: 473-488.
- Begenisich, T., Nakamoto, T., Ocitt, C., Nehrke, K., Brugnara, C., Alper, S., Melvin, J. 2004. Physiological Roles of the Intermediate Conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated Potassium Channel KCNN4. *Biol. Chem.* 279: 47681-47687.
- Bennekou, P. 1993. The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1147: 165-167
- Bennekou, P., Christophersen, P. 2003. Ion channels. Red cell membrane transport in health and disease. Springer. Berlin.
- Booth, I., Miller, S., Müller, A., Lehtovirta-Morley, L. 2015. The evolution of bacterial mechanosensitive channels. *Cell calcium.* 57: 140-150
- Brohawn, S., Zhenwei, S., Mackinnon, R. 2014. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 3614-3619
- Cahalan, S., Lukacs, V., Ranade, S., Chien, S., Bandell, M., patapoutian. 2015. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volumen. *eLife*, 4:1-12
- Caldwell, R., Clemo, H., Baumgarten, C. 1998. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol.* 275: 619-621
- Chemin, J., patel, A., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., Honé, E. 2005. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K channel TREK-1. *EMBO Journal.* 24: 44-53
- Christophersen, P. 1991. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from human erythrocyte membranes: Single channel rectification and selectivity. *J Membrane Biol.* 119: 75-83
- Christophersen, P., Bennekou, P. 1991. Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1065: 103-106



- Colquhoun, D. 1994. Practical analysis of single channel records. Págs: 101- 139. en: Microelectrode techniques, The Plymouth workshop handbook. Ogden, D. (eds). The company of Biologists. Cambridge
- Colquhoun, D., Hawkes, A. 1977. Relaxation and Fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 199:231-262
- Colquhoun, D., Hawkes, A. 1981. On the Stochastic properties of Single ion Channels. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 211: 2205-235
- Colquhoun, D., Hawkes, A. 1995. The Principles of the Stochastic interpretation of Ion-Channel Mechanism. Págs. 406-491 en: Sakmann, B., Neher, E. (eds.). Single Channel Recording. Segunda Edición. Springer, New York, USA.
- Coste, B., Methur, J., Schmidt, M., Earley, T., Ranade, S., Petrus, M., Dubin, A., Patapoutian, A. 2012. Piezo 1 and Piezo 2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science 330: 55-60
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J., Syeda, R., Gransl, J., Spencer, K., Kim, S., Schmidt, M., y colaboradores. 2012. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. Nature. 483: 176-182
- Cuello, L., Romero, J., Cortes, D., Perozo, E. 1998. pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> Channel. Biochemistry. 37: 3229-3236
- Decherf, G., Bouyer, G., Egée, S., Thomas, S. 2007. Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. Blood, cell, molecules and diseases. 39: 24-34
- Doyle, D., Morais, J., Pfuetzner, R., Kuo, A., Gulbis, J., Cohen, S., Chait, B., Mackinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. Science. 80: 69- 77
- Dunn, P. 1998. The action of blocking agents applied to the inner face of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from human erythrocytes. J. Membrane Biol. 165: 133-143
- Durantón, C., Huber, S., Lang, F. 2002. Oxidation induces a Cl<sup>-</sup> dependent cation conductance in human red blood cells. Journal of physiology. 593: 847-855

- Eaton, D. C., and M. S. Brodwick. 1980. Effect of barium on the potassium conductance of squid axons. *J. Gen. Physiol.* 75:727-750.
- Egée, S., Iapach, F., Decherf, G., Staines, H., Ellory, C., Doerig, C., Thomas, S. 2002. A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Physiology.* 542: 795-801
- Ferguson, W. 1991. Competitive  $Mg^{2+}$  block of a large-conductance,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel in rat skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 98: 163-181
- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., Lazdunski, M. 1998. A neuronal Two P domain  $K^{+}$  channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO Journal.* 17: 3297-3308
- Föllner, M., Huber, S., Lang, F. 2008b. Erythrocyte programmed cell death. Critical review. *IUBMB Life.* 60: 661-668
- Föllner, M., Kasinathan, R., Koka, S., Lang, C., Shumilina, E., Birnbaumer, L., Lang, F., Huber, S. 2008a. TRPC6 contributes to the  $Ca^{2+}$  leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 21: 183-192
- Freedman, J. 2001. Membrane Transport in red blood cells. Págs. 377-392. en: Sperelakis, N (eds.). *Cell Physiology. Sourcebook. Tercera edición. California, USA.*
- Friedman, M. 2008 *Principles and models of biological transport. Facilitated Diffusion: Channels and carriers. Segunda Edición. Springer. Durham, USA.*
- Gardos, G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 653-653
- Gibson, J., Stewart, G., Ellory, J. 2000. Effect of dimethyl adipimidate on  $K^{+}$  transport and shape change in red blood cells from sickle cell patients. *FEBS Letters.* 480: 179-183
- Glogowska, E., Dyrda, A., Cuff, A., Bouyer, G., Egée, S., Bennekou, P., Thomas, S. 2010. Anion conductance of the human red cell is carried by a maxi-anion channel. *Blood cells, molecules and diseases.* 44: 243-251

- Goldstein, S., Price, L., Rosenthal, D., Pausch, M. 1996. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 93: 13256-13261
- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., Latorre, R. 2012. K<sup>+</sup> Channels: Function-Structural Overview. *Comprehensive Physiology.* 2: 2087-2149
- Gottlieb, P., Suchyna, T., Ostrow, L., Sachs, F. 2004. Mechanosensitive ion channels as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3: 287-295
- Grygorczyk, R., Schwarz, W. 1985. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> permeability in human erythrocytes: Modulation of single-channel events. *Eur Biophys.* 12: 57-65
- Grygorczyk, R., Schwarz, W., Passow, H. 1984. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human red cells. *Biophys. J.* 45: 693-698
- Guharay, F., Sachs, F. 1984. Stretch-Activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.* 352: 685-701
- Guo, R., Zeng, W., Cui, H., Chen, L., Ye, S. 2014. Ionic interactions of Ba<sup>2+</sup> blockades in the MthK K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 144: 193-200
- Hamill, O. 2006. Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 453: 333-351
- Hamill, O., Martinac, B. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiological reviews.* 81: 685-728
- Haswell, E., Phillips, R., Rees, D. 2011. Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it?. *Structure.* 19:1356-1369
- Heginbothan, L., Zhe, L., Abramson, T., Mackinnon, R. 1994. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal,* 66: 1061-1067
- Hille, B. 2001. *Ion channels of Excitable Membranes.* Sinauer. Tercera edición. Sunderland, USA

- Huber, S., Gamper, N., Lang, F. 2001. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Eur. J. Physiol.* 441: 551-558
- Huber, S., Duranton, C., Henke, G., Van de Sand, C., Heussler, V., Shumilina, E., Sandu, C., y colaboradores. 2004. Plasmodium Induces swelling-activated ClC-2 Anion Channels in the Host Erythrocyte. *Journal of biological chemistry.* 279: 41444-41452
- Ishii, T., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C., Adelman, J., Maylie, J. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11651-11656.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B., Mackinnon, R. 2002a. The open pore conformation of potassium channels. *Nature.* 417: 523-526
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B., MacKinnon, R. 2002b. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* 417: 515 – 522.
- Jiang, Y., Mackinnon, R. 2000. The barium site in a potassium channel by X-ray crystallography. *J. Gen. Physiol.* 115: 269-272
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B., MacKinnon, R. 2001. Structure of the RCK domain from the E.coli K. channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 29: 593–601
- Kaestner, L., Bernhardt, I. 2002. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry.* 55: 71-74
- Kaestner, L., Chrsitophersen, P., Bernhardt, I., Bennekou, P. 2000. The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterization. *Biochemistry.* 52: 117-125
- Kucherenko, Y., Mörsdorf, D., Lang, F. 2009. Acid-sensitive outwardly rectifying anion channels in human erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 230: 1-10
- Kung, C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature.* 436: 647-654
- Kung, C., Martinac, B., Sukharev, S. 2010. Mechanosensitive channels in microbes. *Annu Rev Microbiol* 64: 313-29

- Lam, Ye., Zeng, W., Sauer, D., Jiang, Y. 2014. The conserved potassium channel filter can have distinct ion binding profiles: structural analysis of rubidium, cesium, and barium binding in NaK2K. *J. Gen. Physiol.* 144: 181-192
- Lang, E., Lang, F. 2015. The suicidal erythrocyte death. *Biomed Research International.* 2015: 16
- Lang, E., Qadri, S., Lang, F. 2012. Killing me softly- Suicidal erythrocyte death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 44: 1236-1243
- Lang, F., Gulbins, E., Lang, P., Zappulla, D., Föllner, M. 2010. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol. Biochem.* 26: 21-28
- Larsen, F., Katz, S., Roufogalis, B., Brooks, D. 1981. Physiological shear stresses enhance the Ca<sup>2+</sup> permeability of human erythrocytes. *Nature.* 294: 667-668
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., Alvarez, O. 1989. Varieties of Calcium-activated Potassium Channels. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 385-399
- Leinders, T., Van Kleef, R., Vijverberg, H. 1992. Single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocytes: Ca<sup>2+</sup> dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1112:67-74
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. 1996. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K channel with a novel structure. *EMBO J.* 15: 1004-1011
- Lockless, S., Zhou, M., Mackinnon, R. 2007. Structural and Thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *Plos Biology.* 5: 1079-1088
- Ma, Y-L., Rees, D., Gibson, J., Ellory, J. 2012. The conductance of red blood cells from sickle cell patients: ion selectivity and inhibitors. *J. Physiol.* 590: 2095-2105
- Mackinnon, R. 2003. Potassium Channels (Minireview). *FEBS Lett.* 555: 62-65
- MacKinnon, R. 2004. Potassium Channels and Atomic Basis of Selective Ion conduction (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 4265-4277

- Magleby, K., Pallota, B. 1983. Burst kinetics of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.* 344: 605-623
- Maingret, F., Patel, A., Lesage, F., Lazdunski, M., Honoré. 2000. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K<sup>+</sup> channels TREK1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* 275: 10128-10133
- Makhro, A., Hänggi, P., Goede, J., Wang, J., Brüggemann, A., Gassman, M., Schugge, M., Kaestner, L., Speer, O., Bogdanova. 2013. N-Methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 305: 1123-1138
- Makhro, A., Wang, J., Vogel, J., Boldyrev, A., Gassman, M., Kaestner, L., Bogdanova, A. 2010. Functional NMDA receptor in rat erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: 1315-1325
- Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A., Adler, J., Kung, C. 1987. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 2297-2301
- Marty, A. 1983. Blocking of large unitary calcium-dependent potassium currents by internal sodium ions. *Pflügers Arch.* 396: 179-181
- Mata, A. 2016. Caracterización Biofísica y Fisiológica del canal de K<sup>+</sup> dependiente de presión del eritrocito humano. Tesis doctoral. Instituto de Investigaciones Científicas. Miranda, Venezuela
- Matsuda, H. 1988. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in Guinea-pig heart cells. *Journal of Physiology.* 397: 237-258
- Matsuda, H. 1991. Effects of external and internal K<sup>+</sup> ions on magnesium block of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in Guinea-pig heart cells. *Journal of Physiology.* 435: 83-99
- Matsuda, H. 1993. Effects of the internal and external Na<sup>+</sup> ions on inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in Guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology.* 460: 311-326
- Matsuda, H., Saigusa, A., Irisawa, H. 1987. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature.* 325: 156-159

- Miller, C. 1987. Trapping single ions inside single ion channels. *Biophys. J.* 52: 123-126
- Miller, C., Latorre, R., Reisin, I. 1987 Coupling of voltage-dependent gating and Ba<sup>2+</sup> block in the -High-Conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 90: 427-449
- Morris, C. 1990. Mechanosensitive Ion Channels. *J. Membrane Biol.* 113: 93-107
- Morris, C. 2001. Mechanosensitive Ion Channels in Eukaryotic Cells. Pags. 745-760 en: Sperelakis, N (eds.). *Cell Physiology. Sourcebook. Tercera edición. California, USA.*
- Neyton, J., Miller, C. 1988a. Discrete Ba<sup>2+</sup> block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 92: 569-586
- Neyton, J., Miller, C. 1988b. Potassium blocks Barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 92: 549-567
- Patel, A., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M. 1998. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* 17: 4283-4290
- Perozo, E., Cortes, D., Sompornpisut, P., Kloda, A., Martinac, B. 2002. Open channels structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature.* 418: 942-948
- Piasta, K., Theobald, D., Miller, C. 2011. Potassium-selective block of barium permeation through single KcsA channels. *J. gen. Physiol.* 138: 421-436
- Rifkind, J., Nagababu, E. 2013. Hemoglobin Redox Reactions and Red blood cell aging. *Antioxidants & Redox signaling.* 18: 2274-2283
- Romero, J. 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. Postgrado en Biología Celular. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Romero, J., Zambrano, A. 2008. El canal de potasio del eritrocito humano (HEMKCA) es el disparador de la senescencia y su regulación por Ca<sup>2+</sup> es el mecanismo de seguridad. *Memorias del Instituto de Biología experimental.* 5: 93-96

- Romero, J., Zambrano, A. 2010. A kinetic Characterization of the human Erythrocyte Mechano-activated K<sup>+</sup> Channel Inactivation Process. *Biophys. J.* 98(3): 324a-325a
- Romero, J., Zambrano, A. 2011. Effect of Intracellular pH on the mechano-activated potassium Channel from Human Erythrocyte. *Biophys. J.* 100: 280a
- Romero, L. 2016. Caracterización parcial del canal de K<sup>+</sup> mecano-activado del eritrocito humano (HEMKCA): Selectividad, conductancia y probabilidad de apertura. Trabajo especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
- Romero, P., Romero, E. 1997. Differences in Ca<sup>2+</sup> pumping activity between sub-populations of human red cells. *Cell Calcium.* 21: 353-358
- Romero, P., Romero, E., Winkler, M. 1997. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim Biophys Acta.* 1323(1): 23-28.
- Romero, P., Romero, E. 1999. Effect of cell ageing on Ca<sup>2+</sup> influx into human red cells. *Cell Calcium.* 26:131-137
- Sachs, F. 2010. Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiol (Bethesda).* 25: 50-56
- Schwarz, R., Grygorczyk, D. 1989. Recording single-channel currents from human red cells. *Methods Enzymol.* 173: 112–121.
- Stoneking, C., Mason, M. 2013. Mg<sup>2+</sup> modulation of the single-channel properties of KCa<sub>3.1</sub> in human erythroleukemia cells. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.*
- Tempel, B., Papazian, D., Schwarz, T., Jan, Y., Jan, L. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237: 770–775
- Vandenberg, C. 1987. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc. Natl. Acad.* 84: 2560-2564
- Vergara, C., Alvarez, O., Latore, R. 1999. Localization of the K<sup>+</sup> lock-in and the Ba<sup>2+</sup> binding sites in a voltage-gated calcium-modulated channels. Implications for survival of K<sup>+</sup> permeability. *J. Gen. Physiol.* 114: 365-376



- Vergara, C., Latorre, R. 1983. Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  Channels from Rabbit Muscle Incorporated into planar lipid Bilayers. Evidence for a  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  blockage. *J. Gen. Physiol.* 82: 543-568
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C. 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. Wiley. USA
- Yang, L., Edvinsson, J., Sackin, H., Palmer, L. 2012. Ion selectivity and current saturation in inward-rectifier  $\text{K}^{+}$  channels. *J. Gen. Physiol.* 139: 145-157
- Yawata, Y. 2003. *Cell membrane. The red blood cell as a model*. Willey-vch. Kurashiki, Japón.
- Yellen, G. 1984a. Ionic permeation and blockade in  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *J. Gen. Physiol.* 84: 157-186
- Yellen, G. 1984b. Relief of  $\text{Na}^{+}$  block of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels by external cations. *J. Gen. Physiol.* 84: 187-199
- Yellen, G., Jurman, M., Abramson, T., MacKinnon, R. 1990. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a  $\text{K}^{+}$  channel. *Science.* 251: 939 – 942.
- Zarychanski, R., Schulz, V., Houston, B., Maksimova, Y., Houston, S., Smith, B., Rinehart, J., Gallagher, P. 2012. Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*, 21: 1908-1915