



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Estudio de la Inactivación del canal de K^+ Mecanosensible del Eritrocito Humano
(HEMKCA: Human Erythrocyte Mechano-Activated K^+ Channel): Efecto del
Potencial, la concentración del ion Ca^{2+} y el ion Rb^+

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Diana Isturiz Tovar como requisito parcial
para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dr. Jesús G. Romero

Caracas- Venezuela

Diciembre, 2017

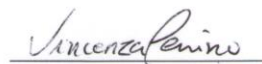
DEL EXÁMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

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. Diana Isturiz Tovar C.I.:23.695.481, titulado "ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DEL CANAL DE K⁺ MECANOSENSIBLE DEL ERITROCITO HUMANO (HEMKCA: HUMAN ERYTHROCYTE MECHANO-ACTIVATED K⁺ CHANNEL): EFECTO DEL POTENCIAL, LA CONCENTRACIÓN DEL ION Ca²⁺ Y EL ION Rb⁺" para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

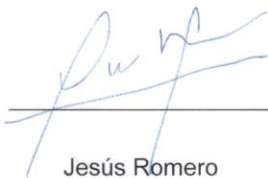
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 5 días del mes de diciembre del año 2017, dejando constar que el Prof. Jesús Romero actuó como coordinador del jurado examinador.



Fernando González



Vicenza Cervino



Jesús Romero

Resumen

Los eritrocitos son células anucleadas, por lo que no sufren apoptosis como el resto de las células. Sin embargo, cada glóbulo rojo vive alrededor de 120 días, lo cual evidencia que existe un proceso que “mide” el tiempo. En nuestro laboratorio tenemos una hipótesis sobre cómo se desarrolla este proceso, e involucra dos mecanismos novedosos: un intercambiador K^+/Ca^{2+} que se activa en respuesta al voltaje; y un canal de K^+ mecanosensible, nombrado HEMKCA por sus siglas en inglés. Este canal presenta un proceso de inactivación que se evidencia como una caída exponencial de la probabilidad de apertura en el tiempo. Pusimos a prueba el efecto de diversos factores físico-químicos sobre esta inactivación, de manera que pudiéramos identificarla como una de las inactivaciones previamente descritas en la bibliografía: inactivación tipo N, tipo C o tipo U. Encontramos que el Rb^+ retrasa la inactivación en un factor de 3,4 con respecto al K^+ . También encontramos que esta inactivación posee una dependencia del potencial en forma de U. Cambios en la concentración de Ca^{2+} no afectaron la cinética de la inactivación. Concluimos que la inactivación del HEMKCA es de tipo C, puesto que sus características corresponden con las ya reportadas para este tipo de inactivación.

Palabras clave: patch clamp, eritrocitos, canales iónicos, inactivación.

Agradecimientos

A Berta Tovar y Guillermo Isturiz.

A Jesús Romero.

A Alejandro Mata, Fernando González, Antonio Gutiérrez, Ángeles Zambrano y Christian Calderón.

A Naileth González, Yeimar Portillo, Luis O. Romero y Daniel Landi.

A todos mis profesores.

A la Universidad Central de Venezuela.

A la Facultad de Ciencias.

Al Instituto de Biología Experimental.

Índice de Contenido

Introducción.....	1
Canales Iónicos.....	1
Canales Mecanosensibles.....	1
Estructura y Clasificación de los Canales de K ⁺	3
Conducción para Rb ⁺ en los canales de K ⁺	8
Los Eritrocitos Humanos	9
Canales Descritos en la Membrana del Eritrocito Humano	10
Conductancias Catiónicas.....	10
El Canal Gardos	10
Canal Catiónico no Selectivo dependiente de voltaje	11
Canal Catiónico no-selectivo no-dependiente de voltaje	12
P _{sicke}	13
Conductancias Aniónicas.....	13
Canal Aniónico Mecanosensible y Canal Aniónico Rectificador hacia Afuera.....	13
El Canal Aniónico Voltaje Dependiente	15
Canal de Cloruro de Baja Conductancia.....	15
Antecedentes	16
Inactivación.....	16
Inactivación Tipo N.....	17
Inactivación Tipo C.....	19
Inactivación Tipo U.....	24
Senescencia del Eritrocito.....	27
La Hipótesis del K ⁺	28
El Canal HEMCKA.....	29
Objetivos	32
Objetivo General:.....	32

Objetivos Específicos:.....	32
Materiales y Métodos	33
Material Biológico	33
Soluciones	33
Medidas Electrofisiológicas	33
T.U.G.O. Patch Clamp	33
Elaboración de las Pipetas	34
Visualización de las Células	35
Formación del Sello	35
Protocolos de Estimulación	35
Adquisición de Datos	36
Análisis de Datos	36
Resultados.....	38
Efecto del Potencial.....	41
Efecto del Rb ⁺	45
Efecto del Ca ²⁺	49
Discusión	52
Constante de Tiempo	52
Efecto del Potencial.....	53
Efecto del Ca ²⁺	60
Efecto del Rb ⁺	60
Relevancia Fisiológica de la Inactivación del HEMKCA	62
Inactivación del HEMKCA	63
Conclusiones	64
Bibliografía	65

Índice de Figuras

FIGURA 1. (A) MODELO DE CINTAS REPRESENTANDO LAS CUATRO SUBUNIDADES DEL KCSA. CADA SUBUNIDAD SE ENCUENTRA EN UN TONO DISTINTO. (B) REPRESENTACIÓN DEL KCSA SIN LAS SUBUNIDADES DEL FRENTE Y DE ATRÁS. SE MUESTRAN LAS HÉLICES DEL PORO EN ROJO, Y EL FILTRO DE SELECTIVIDAD EN AMARILLO. EN EL MEDIO SE MUESTRAN LOS PUNTOS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA QUE CORRESPONDERÍA A LOS SITIOS EN LOS QUE PUEDE ESTAR EL K ⁺ (MODIFICADO DE MACKINNON, 2004).	5
FIGURA 2 FAMILIAS DE CANALES DE K ⁺ DE ACUERDO A LA ESTRUCTURA DE SUS SUBUNIDADES SEGÚN GONZÁLEZ Y COL. (2012) (MODIFICADO DE GONZÁLEZ Y COL., 2012).	6
FIGURA 3. CURVA IV OBTENIDA EN CONDICIONES SIMÉTRICAS CON K ⁺ , NH ₄ ⁺ Ó Rb ⁺ . EN LA IMAGEN SE OBSERVA CÓMO EL CANAL GARDOS PRESENTA RECTIFICACIÓN HACIA ADENTRO (OBTENIDO DE CHRISTOPHERSEN, 1991)	11
FIGURA 4. RECUPERACIÓN DE LA INACTIVACIÓN A 2MM DE K ⁺ INTRACELULAR (IZQ.) Y A 160MM DE K ⁺ EXTRACELULAR (DER.). NÓTESE LA DIFERENCIA EN ESCALAS ENTRE LAS IMÁGENES, QUE PONE AÚN MÁS EN EVIDENCIA LA DRÁSTICA DIFERENCIA ENTRE LAS TASAS DE RECUPERACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE K ⁺ EXTRACELULAR.	18
FIGURA 5. CURSO TEMPORAL DE LA INACTIVACIÓN TIPO C EN DIFERENTES MUTANTES T449.	22
FIGURA 6. CORRIENTES PRODUCIDAS POR DEPOLARIZACIONES CON INCREMENTOS DE 30MV P1 Y P3 SON IGUALES. P2 SON 60MV. B. CORRIENTE MEDIDA DONDE SEÑALA EL ASTERISCO, EN FUNCIÓN DEL VOLTAJE APLICADO EN P1. (KLEMIC Y COL., 1998)	24
FIGURA 7. (A) PROTOCOLO DE RECUPERACIÓN A -90MV. (B) CURSO TEMPORAL DE LA INACTIVACIÓN CALCULADO COMO LA CORRIENTE EN P3 ENTRE LA CORRIENTE EN P1 EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UNA ESCALA LOGARÍTMICA.	26
FIGURA 8. CURVAS I-V DEL HEMKCA (PROMEDIO ± SD) CONSTRUIDAS A PARTIR DE REGISTROS DE PARCHES DE MEMBRANA EXPUESTOS A CONDICIONES SIMÉTRICAS DE K ⁺ (NEGRO) O Rb ⁺ (ROJO). (EXTRAÍDO DE ROMERO L.O., 2016)	30
FIGURA 9. POSIBLE ESQUEMA DE CÓMO ES LA FORMACIÓN DEL SELLO. EN LA IMAGEN SE PUEDE OBSERVAR QUE LA FORMA DE LA PIPETA CONSISTE EN PAREDES CASI PARALELAS. LA ÚLTIMA IMAGEN MUESTRA EL PATCH YA EN LA CONFIGURACIÓN “INSIDE-OUT”, DESPUÉS DE FORMADO EL SELLO.	34
FIGURA 10. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD DEL CANAL HEMKCA EN SOLUCIÓN NORMAL A -60 mV. SE PUEDE APRECIAR COMO LA ACTIVIDAD DISMINUYE CON EL TIEMPO. EN ESTE REGISTRO TENEMOS AL MENOS 5 CANALES.	39
FIGURA 11. PROBABILIDAD DE APERTURA EN INTERVALOS DE 10 S DEL HEMKCA EN SOLUCIÓN NORMAL A -60 mV. SE PUEDE APRECIAR COMO LA PO DISMINUYE EN EL TIEMPO. ESTE HISTOGRAMA CORRESPONDE AL REGISTRO DE LA FIGURA 10.	40
FIGURA 12. CADA PUNTO REPRESENTA LA PO NORMALIZADA PROMEDIO EN CADA MINUTO DE TODOS LOS REGISTROS OBTENIDOS A 80 mV (ROMBOS), 60 mV (CUADROS), -60 mV (TRIÁNGULOS) Y -80 mV (EQUIS).	43
FIGURA 13. GRÁFICO DE CAJA Y BIGOTES DEL PORCENTAJE DE LA PO EN LOS ÚLTIMOS DOS MINUTOS DE REGISTRO, RESPECTO A LOS DOS PRIMEROS MINUTOS.	44
FIGURA 14. EN LA FIGURA A SE OBSERVA EL CURSO TEMPORAL DE LA CORRIENTE ESTANDARIZADA EN GRIS OSCURO PARA LA CONDICIÓN K ⁺ , Y EN GRIS CLARO PARA Rb ⁺ . LAS CURVAS FUERON CONSTRUIDAS A PARTIR DEL AJUSTE EXPONENCIAL DE LAS CORRIENTES TOTALES QUE SE OBTIENEN AL SUMAR TODOS LOS REGISTROS QUE SE TOMARON EN CUENTA PARA CADA CONDICIÓN (PANELES B Y C) Y LUEGO CADA VALOR SE ESTANDARIZÓ CON AQUEL A TIEMPO CERO. EN LA FIGURA B VEMOS LA CORRIENTE TOTAL PARA K ⁺ , Y EN C LA DE Rb ⁺	47
FIGURA 15. CADA PUNTO REPRESENTA LA PO PROMEDIO NORMALIZADA DE CADA MINUTO DE TODOS LOS REGISTROS OBTENIDOS CON SOLUCIÓN DE Rb ⁺ (CUADROS) Y K ⁺ (ROMBOS).	48
FIGURA 16. (IZQUIERDA) EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DEL Ca ²⁺ INTRACELULAR DESDE 1 mM HASTA 100 nM. (DERECHA) RELACIÓN ENTRE LA NPO NORMALIZADA DEL CANAL, Y EL LOGARITMO DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺ INTRACELULAR. (TOMADO DE ROMERO Y ZAMBRANO, 2008)	50
FIGURA 17. CADA PUNTO REPRESENTA LA PO PROMEDIO NORMALIZADA EN CADA MINUTO DE TODOS LOS REGISTROS OBTENIDOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 0,1 mM (ROMBOS), 1 mM (CUADROS), Y 10 mM DE Ca ²⁺ (TRIÁNGULOS)	51

Índice de Tablas

TABLA 1. COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES EXPERIMENTALES. LA SOLUCIÓN NORMAL QUE SE DESCRIBE SE UTILIZÓ TANTO PARA ESTUDIAR EL EFECTO DEL POTENCIAL, COMO PARA EL DE CONCENTRACIÓN MEDIA DE Ca^{2+}	33
TABLA 2. NÚMERO DE REGISTROS TOMADOS A CADA POTENCIAL.	42
TABLA 3. CONDUCTANCIA DEL HEMKCA EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL EN SOLUCIÓN NORMAL (CONDICIONES SIMÉTRICAS). EL VALOR G_x FUE CALCULADO A PARTIR DE LA CORRIENTE OBTENIDA PARA CADA POTENCIAL.....	42
TABLA 4. DATOS SOBRE LA MEDIANA Y LA DISPERSIÓN DEL PORCENTAJE DE LA P_o ENTRE 8-10 MINUTOS, RESPECTO A LA P_o ENTRE 0-2 MINUTOS.	45
TABLA 5. NÚMERO DE REGISTROS TOMADOS EN SOLUCIÓN DE K^+ Y Rb^+	46
TABLA 6. NÚMERO DE REGISTROS TOMADOS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Ca^{2+}	50

Introducción

Canales Iónicos

Los canales son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo iónico a favor de su gradiente electroquímico. Estas proteínas exhiben tres características esenciales: (i) su tasa de conducción es muy rápida (10^7 - 10^8 iones/segundo) (ii) Muchos canales iónicos son altamente selectivos y (iii) su función es regulada por estímulos ambientales específicos que los abren o cierran (MacKinnon re., 2004).

Canales Mecanosensibles

Los canales mecanosensibles son aquellos que a presión atmosférica, su probabilidad de apertura es baja, mientras que al incrementar la presión mecánica aplicada a la membrana, se produce la actividad (Chemin y col. , 2005).

Este tipo de canales cumplen un importante rol en los organismos vivos al responder a estímulos mecánicos y, en respuesta a estos, permitir el paso de solutos a través de la membrana. Los canales mecanosensibles funcionan como interruptores en diversos procesos fisiológicos como en el sentido del tacto, en la audición, propiocepción, el control de turgor en las células vegetales y la osmoregulación en bacterias (Sukharev y col., 1997; Wood, 1999; Martinac, 2001) (Perozo y col., 2002).

El canal mecanosensible más estudiado es el MscL de *Escherichia coli*. Su estructura en el estado cerrado muestra un pentámero cuyas subunidades son iguales, y cada una posee dos segmentos transmembrana (Chang y col., 1998).

Experimentos de Patch Clamp muestran que el MscL se abre en respuesta a un incremento en la presión transmembrana (Martinac, 1987), generando una conductancia no selectiva grande de aproximadamente 3nS.

La apertura de canales como el MscL y el MscS por fuerzas mecánicas protege a las células bacterianas de explotar cuando se enfrentan a choques hiposmóticos.

La transmisión de la fuerza en los canales bacterianos ocurre directamente a través de la bicapa lipídica. A este tipo de activación de los canales mecanosensibles se refieren como “mecanismo de la bicapa” (Martinac, 2011).

Otros tipos de canales mecanosensibles requieren además, enlaces al citoesqueleto para funcionar correctamente (p.e. TRP o Piezo) (Martinac, 2014).

En otras palabras la mecanotransducción en células animales puede involucrar una variedad de mecanismos mecanosensores basados en el citoesqueleto y la matriz extracelular como componentes celulares transductores de fuerza (Hudspeth, 1989; citado por Martinac, 2014).

TRAAK y TREK-1 son ejemplos de canales de K⁺ mecanoactivados. Fueron los primeros canales de K⁺ de doble poro clonados, presentes en mamíferos. Estos canales de K⁺ se activan por estiramiento de la membrana o por ácido araquidónico (Maingre and col., 1999). TREK-1 fue el primer canal de K⁺ mecanoactivado en ser reconocido, y se sabe que su actividad incrementa unas 20 veces al subir la temperatura desde 22° hasta 42°C (Noël and col., 2009).

TREK-1 es activado también por ácidos grasos poliinsaturados y se encuentra activo a temperatura fisiológica (Maingret y col., 2000).

Se dice que TREK-1 y TRAAK son una familia de canales de K^+ polimodales ya que pueden ser regulados por diversos estímulos como los antes mencionados, así como también por osmolaridad, fosforilación provocada por receptores acoplados a proteínas G (Chemin y col., 2005), cationes anfipáticos, anestésicos volátiles y agentes neuroprotectores (Lesage y Lazdunski, 2000).

Estructura y Clasificación de los Canales de K^+

Para dilucidar la estructura de los canales de K^+ , Doyle y col., en 1998 usaron como modelo el canal de potasio de *Streptomyces lividans* (KcsA), reportado por Schempf y col. (1995), el cual es una proteína integral transmembrana similar a todos los canales de potasio, en particular, en la región del poro. Usando cristalografía de rayos X, se evidenciaron cuatro subunidades idénticas que creaban un cono invertido que contenía el filtro de selectividad del poro en el extremo terminal externo (Doyle y col., 1998). Este filtro de selectividad se encontró que mide 12Å de largo y es más estrecho que el resto del poro, el cual está revestido por grupos hidrófobos que tienen mínima interacción con los iones que difunden. Estas propiedades favorecen el paso de K^+ al minimizar la distancia a través de la cual el K^+ interactúa fuertemente con el canal (Doyle y col., 1998).

En el centro del poro, existe una gran cavidad que le permite al ión superar la gran barrera energética que representa atravesar la membrana lipídica. Esta barrera es máxima en el centro de la membrana, pero la presencia de esta cavidad reduce esta desestabilización rodeando al ion con moléculas de agua polarizables (Doyle y col., 1998).

Aunque el canal de K^+ KcsA sea de dos segmentos transmembrana, su secuencia aminoacídica es cercana a los de seis segmentos transmembrana de los eucariotas, particularmente la secuencia en la región del poro (Doyle y col., 1998).

La estructura del KcsA vista usando la técnica de cristalografía de rayos X con una resolución de 2,0 Å, a una concentración de 200 mM K^+ , revela además múltiples sitios de unión en la vía de permeación: dos cerca del extremo extracelular, una en el centro de la membrana en la cavidad y cuatro en el filtro de selectividad de 12Å (Zhou y col., 2001). Además, MacKinnon propuso que en el filtro de selectividad, los iones K^+ se encontraban principalmente en dos configuraciones: K^+ -agua- K^+ -agua (configuración 1,3), y agua- K^+ -agua- K^+ (configuración 2,4). Esto se debe a que existen fuerzas electrostáticas entre los iones K^+ que impiden la interacción entre éstos.

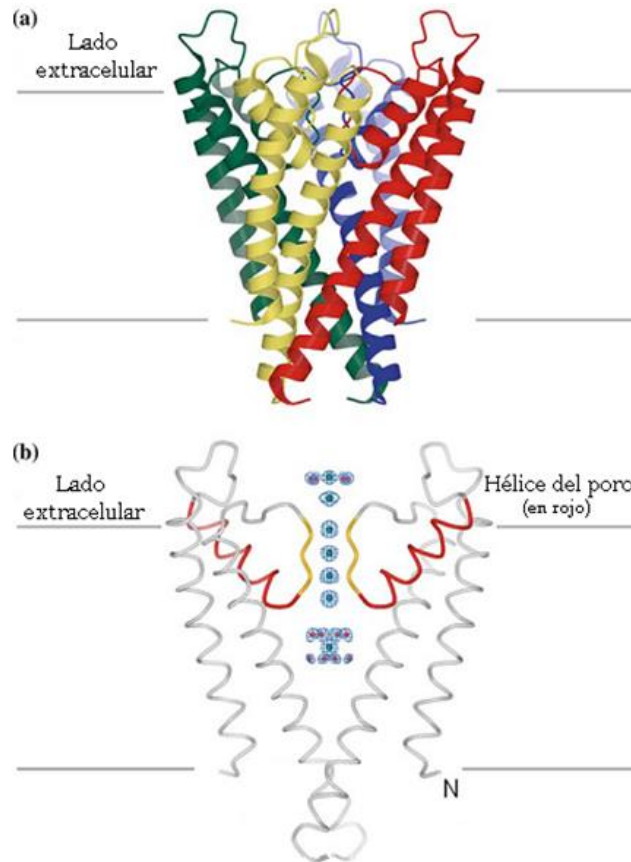


Figura 1. (a) Modelo de cintas representando las cuatro subunidades del KcsA. Cada subunidad se encuentra en un tono distinto. (b) Representación del KcsA sin las subunidades del frente y de atrás. Se muestran las hélices del poro en rojo, y el filtro de selectividad en amarillo. En el medio se muestran los puntos de densidad electrónica que correspondería a los sitios en los que puede estar el K⁺ (Modificado de MacKinnon, 2004).

Los canales de K⁺ en general pueden ser clasificados de distintas maneras, pero la más sencilla es la clasificación estructural: La secuenciación casi completa del genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans*, permitió identificar más de 80 genes de canales de K⁺ (Bargmann, 1998), que se dividieron en tres grandes clases estructurales: (i) los rectificadores hacia adentro con dos segmentos transmembrana, y un solo dominio P (dominio del poro); (ii) Los de tipo *Shaker*, con seis segmentos transmembrana y un solo dominio P y (iii) los de dos dominios

P con cuatro segmentos transmembrana (Wei y col, 1996;), siendo estos últimos la clase estructural más grande (cerca de 50 genes) (Maingred y col., 1999).

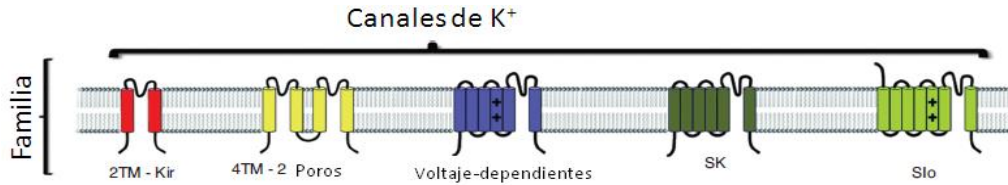


Figura 2 Familias de canales de K⁺ de acuerdo a la estructura de sus subunidades según González y col. (2012) (Modificado de González y col., 2012).

Además, a medida que se fue dilucidando la secuencia genética de los diferentes tipos de canales de K⁺, se evidenció que éstos comparten una característica en común a pesar de las diferencias estructurales, y es que la secuencia aminoacídica involucrada en la selectividad de estos canales se conserva. Esta secuencia firma de los canales de K⁺ es la responsable de que a través del canal fluyan primordialmente iones K⁺ y no otros iones. Esta secuencia (TVGYG) forma el filtro de selectividad que se ubica en el tercio extracelular del canal.

Esta secuencia de aminoácidos se arregla de manera que las subunidades se unen formando un conducto estrecho que consiste en cuatro sitios de unión a K⁺ igualmente espaciados entre sí, enumerados del uno al cuatro desde el lado extracelular. Cada sitio de unión es una caja formada por ocho oxígenos ubicados en los vértices de un cubo. (MacKinnon re., 2004).

Los oxígenos que rodean al K^+ en el filtro de selectividad se encuentran justamente a la distancia en la que se ubicarían los oxígenos de las moléculas de agua que, de estar hidratado, formarían la capa de solvatación del K^+ . Por tanto el costo energético de deshidratarlo es relativamente bajo (MacKinnon re., 2004)

Los iones K^+ solo pueden estar en las posiciones 1 y 3, o en 2 y 4 como se mencionó anteriormente; ya que las fuerzas electrostáticas entre ellos presentan un impedimento estérico que evita que cuatro iones K^+ ocupen el canal al mismo tiempo. Al unirse el segundo K^+ a su sitio de unión, parte de su energía de enlace se gasta en efectuar un cambio conformacional, que trae como resultado que ambos iones pierdan afinidad, favoreciendo altas tasas de conducción.

Una evidencia clave sobre este tema fue presentada en 2004 por Zhou y MaKinnon. Ellos mostraron que una mutación en la "posición 4" del filtro de selectividad, influenciaba la estadía del ión K^+ en la posición 2. Si los iones K^+ tendieran a estar en configuraciones específicas, esto explicaría por qué una mutación en la posición 4 afectaría la ocupación en la posición dos. De hecho, cuando tenemos la mutación presente, el ión K^+ conduce de manera similar a cómo lo hace el Rb^+ en el *KcsA* silvestre. El ión Rb^+ también es capaz de pasar a través de los canales de K^+ , pero para la mayoría de éstos, conduce menos corriente. Por ello se estudió también como la mutación afectaría su conducción,

sin embargo se observó que la mutación en la posición 4 no afectaba la conducción para el Rb⁺

Conducción para Rb⁺ en los canales de K⁺

Los canales de K⁺ excluyen a los cationes metálicos alcalinos más pequeños como el Li⁺ (radio iónico 0,60Å) y el Na⁺ (radio iónico 0,95Å) gracias a su filtro de selectividad. Sin embargo, el Rb⁺ (radio iónico 1,48Å) si puede permear a través de ellos ya que de hecho el Rb⁺ es casi un perfecto análogo de K⁺ (radio iónico 1,33Å), debido a que su tamaño y sus características de permeabilidad son muy similares a las del K⁺ (Doyle y col., 1998).

Mapas de densidad electrónica en un plano, realizados a lo largo del filtro de selectividad de *KcsA*, con 5 mM de Rb⁺, muestran un máximo en las posiciones 1 y 4 del filtro. Al aumentar la concentración de Rb⁺, el perfil cambia: el máximo cercano a la posición 1 casi dobla su tamaño. Además un máximo aparece en la posición 3, mientras que el de la posición 4 disminuye en tamaño. No se observó máximo alguno en la posición 2 (João y col., 2001). Esto contrasta con los sitios de unión de K⁺ en donde este ion se encuentra ya sea en las posiciones 1 y 3, o en las posiciones 2 y 4, como se había mencionado. João y col. encuentra que ambas configuraciones están balanceadas energéticamente, es decir, que se dan con igual frecuencia. Ellos proponen que esto podría ser el resultado de la optimización evolutiva de la tasa a la cual difunden los iones K⁺ a través del poro.

Así mismo, este mecanismo no está adaptado a la conducción de Rb^+ , así que la pequeña diferencia energética entre las configuraciones 1-3, y 1-4 al parecer crea un desbalance con sus respectivas consecuencias cinéticas: el Rb^+ no conduce tan eficientemente como el K^+ (João y col., 2001).

La conducción del Rb^+ a través de los canales de K^+ ha sido estudiada extensivamente. En la mayoría de los canales de K^+ , incluyendo KcsA, el Rb^+ no conduce corriente tan eficientemente como lo hace el K^+ , especialmente a altas concentraciones del ion respectivo.

En experimentos hechos usando cristalografía, se muestra que el Rb^+ se une solo a tres posiciones en el filtro de selectividad (Zhou y Mackinnon, 2003), correspondientes a las posiciones 1, 3 y 4; tal como observaron João y col. Esto es consistente con una combinación de configuraciones 1-3 y 1-4 (Zhou y MacKinnon, 2004).

Los Eritrocitos Humanos

Los eritrocitos humanos son células bicóncavas con una vida media de 120 días. Son células anucleadas, por lo cual no pueden ir a un proceso de apoptosis clásica. En esta célula, así como en muchas otras eucariotas, los fosfolípidos de la membrana están distribuidos de manera asimétrica. La membrana de los eritrocitos está compuesta por tres estructuras principales: (i) la bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos y colesterol no esterificado, (ii) proteínas

transmembranas integrales que abarcan la membrana y están embebidas en la bicapa lipídica y (iii) el esqueleto de la membrana. Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelular, tal como ocurre durante la senescencia de los eritrocitos, causa la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos.

Canales Descritos en la Membrana del Eritrocito Humano

Conductancias Catiónicas

El Canal Gardos

El canal Gardos fue el primero en ser descrito en la membrana de eritrocitos. Su actividad fue evidenciada por primera vez en 1958 cuando Gardos encontró que existía un eflujo de K^+ dependiente del Ca^{2+} intracelular; este efecto es conocido como "Efecto Gardos". (Gardos, 1958). Finalmente en 1983 se logra registrar el canal responsable de este efecto a nivel de canal unitario, requiriéndose para su activación al menos $0,5 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} en la cara intracelular de la membrana y K^+ en la cara extracelular de ésta (Grygorczyk y Schwarz, 1983).

Grygorczyk y Schwarz (1985) encontraron que la sustitución de todo el K^+ por Rb^+ en la solución de la pipeta, reduce la conductancia del canal en aproximadamente un 50%. Además se encontró que mientras más grande era la fuerza motriz de la corriente hacia el interior celular, mayor era la reducción de la corriente comparada con la corriente producida cuando se usó una solución únicamente con K^+ en la pipeta, sugiriendo una inhibición ligeramente dependiente de voltaje. Los

resultados obtenidos en este estudio permitieron calcular un límite inferior para la relación de permeabilidad entre ambos iones ($P_{Rb}:P_K$) de 1:1,3 (Grygorczyk y Schwarz, 1985).

Este canal ha sido caracterizado con respecto a la rectificación y la selectividad usando la técnica Patch Clamp en su configuración inside-out, en condiciones simétricas de K^+ , Rb^+ y NH_4^+ . La curva i-V (figura 3) muestra que el canal presenta una **rectificación hacia adentro** muy pronunciada en condiciones simétricas de K^+ , pero que es apenas detectable en Rb^+ (Christophersen, 1991)

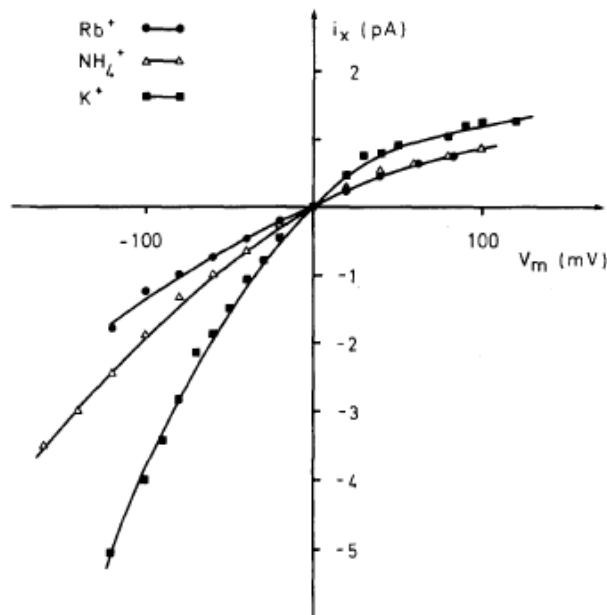


Figura 3. Curva IV obtenida en condiciones simétricas con K^+ , NH_4^+ ó Rb^+ . En la imagen se observa cómo el canal Gardos presenta rectificación hacia adentro (Obtenido de Christophersen, 1991)

Canal Catiónico no Selectivo dependiente de voltaje

Halperin y col., en 1989 proponen un canal cationico activado por voltaje en la membrana de eritrocitos humanos, basados en experimentos de flujo en

soluciones de baja fuerza iónica, causando la depolarización de la membrana de los glóbulos rojos. Pero la primera evidencia de éste fue encontrada hasta 1991 por Christophersen y Bennekou, quienes identificaron un canal catiónico no selectivo en la membrana del eritrocito humano, usando la técnica “patch clamp”.

En el año 2000, Kaestner y col. demostraron que la dependencia de voltaje de la probabilidad de apertura de este canal se modifica de manera crítica por el protocolo experimental. Sus resultados muestran una activación dependiente de potencial tipo histéresis (Kaestner y col., 2000).

Este canal es permeable tanto a cationes monovalentes, como a cationes divalentes que incluyen el Ca^{2+} , el Ba^{2+} y el Mg^{2+} (Christophersen y Bennekou, 1991), y puede ser activado por agonistas de los receptores de acetilcolina, como acetilcolina (ACh), carbacol y nicotina, por lo cual se propone que éste canal está acoplado a un receptor de Ach de tipo nicotínico (Bennekou, 1993).

Canal Catiónico no-selectivo no-dependiente de voltaje

En 2001, Huber y col. reportan la existencia de un canal catiónico no selectivo, independiente de voltaje, que se activa en respuesta a la disminución de volumen de la célula, y es inhibido por incrementos de volumen, y por el aumento de Cl^- citosólico.

Por otro lado, en 2002, Durantón y col. estudian los cambios en la permeabilidad de la membrana de eritrocitos, en respuesta al estrés oxidativo. Ellos encontraron

que la población de eritrocitos control presentaba cierta conductancia a cationes, y que ésta se incrementaba al doble en eritrocitos oxidados. Esta conductancia mostró ser sensible a la concentración extracelular de Cl^- .

P_{sickle}

Es una permeabilidad catiónica anormal denominada P_{sickle} por ser encontrada en eritrocitos de personas que sufren anemia falciforme (Sickle cell disease). Ha sido descrita desde un punto de vista funcional, pero nunca a un nivel molecular. P_{sickle} es una vía de permeabilidad poco selectiva para pequeños cationes inorgánicos tanto monovalentes, como divalentes (Bouyer y col. re., 2012)

Conductancias Aniónicas

Canal Aniónico Mecanosensible y Canal Aniónico Rectificador hacia Afuera

En el año 2000, Desay y col., estudiaron la permeabilidad de eritrocitos infectados con el parásito de la malaria, usando la técnica de patch-clamp en su configuración “whole-cell” (célula entera). Encontraron que los eritrocitos sanos tenían conductancias óhmicas en “whole-cell” de menos de 100 pS. En contraste, los eritrocitos infectados con trofozoitos exhibían corrientes 150 veces más grandes, **dependientes de voltaje y no saturables**.

Estas corrientes eran llevadas predominantemente por aniones y abolidas por bloqueadores de canales. También notaron que exhibían **rectificación hacia adentro**, aún en medios simétricos, indicando voltaje-dependencia o rectificación

de una o más vías de transporte en la membrana. Ellos encontraron que las corrientes eran abolidas al añadir 125 μM de furosemida en el baño.

Examinando la selectividad iónica de esta vía aplicando un gradiente de NaCl a través de la membrana, encontraron que el potencial de reversión era cercano al Potencial de Nernst para el Cl^- en ese experimento. Esto les indicó gran selectividad del Cl^- sobre Na^+ .

Entonces la pregunta que faltaba responder era si estos canales eran endógenos del eritrocito o si derivaban del parásito. En 2011 Thomas y col., usaron la técnica de Patch Clamp para estudiar glóbulos rojos de aves infectados con *P. gallinaceum* y encontraron que este parásito regulaba las vías ya existentes en la membrana del eritrocito hospedador. Esto los llevó a pensar que las pequeñas conductancias aniónicas reportadas por Desay en el año 2000, también eran componentes endógenos de la membrana de eritrocitos. Así que en 2002, Egée y colaboradores compararon canales aniónicos inducidos por *P. falciparum* y canales endógenos del eritrocito usando la técnica de Patch Clamp y encontraron que los eritrocitos no infectados poseían dos canales aniónicos inactivos (**uno de baja conductancia, activado por estiramiento de la membrana y otro rectificador hacia fuera**). Los datos obtenidos son consistentes con la hipótesis de que el canal de conductancia linear (el primero mencionado) es activado por el *P. falciparum* (Egée y col., 2002). Ese mismo año, Huber y col. encuentran que la manera en

que *P. falciparum* activa canales endógenos del eritrocito, es aplicando estrés oxidativo a la membrana de la célula hospedadora.

El Canal Aniónico Voltaje Dependiente

El canal aniónico voltaje-dependiente, llamado también VDAC por sus siglas en inglés; es una proteína con propiedades estructurales y funcionales bien conservadas, a pesar de la gran variación que presenta en su secuencia (Shoshan-Barmatz y col., 2010).

Mucha de la información que se maneja del VDAC ha sido obtenida de proteínas mitocondriales usando reconstrucción artificial en membranas o en liposomas. En éstas condiciones, la proteína es estable y se mantiene abierta a bajos voltajes, como entre ± 10 mV (Thomas y col. re, 2011).

Canal de Cloruro de Baja Conductancia

Un canal de cloruro de 5pS de conductancia ha sido encontrado en reportes electrofisiológicos. Este canal exhibe largos períodos de apertura separados por largos períodos de cierre (Bouyer y col., 2006), mostrando las características del canal aniónico encontrado en estudios previos con células infectadas con *Plasmodium falciparum*. Se cree que este canal de pequeña conductancia podría contribuir a la conductancia aniónica basal de los eritrocitos y estar involucrado en la regulación de su volumen (Bouyer y col., 2007).

Antecedentes

Inactivación

Para hacer referencia a los canales iónicos, hablamos de 4 procesos fundamentales: la activación y desactivación, que se relacionan con la apertura del canal en presencia de un estímulo específico, y su cierre en la ausencia de éste, respectivamente. También hablamos de la inactivación, definida como un estado no conductor del canal; y de la recuperación de la inactivación, precisamente cómo la salida de este estado.

La inactivación se diferencia de la desactivación, en que puede mantener al canal en un estado no conductor, aún en presencia del estímulo activador (Jamieson, 2014).

Muchos canales de K^+ voltaje-dependientes se abren en respuesta a la depolarización y entran en un estado no conductor de larga duración (estado inactivado), del cual, como ya se definió, no pueden salir aun si se despolariza. Las tasas de inactivación varían desde milisegundos a segundos entre los diferentes miembros de esta clase de canales. Estas variaciones afectan la generación, propagación e integración de señales eléctricas entre las células (Demo y Yellen, 1991).

Hasta la fecha han sido descritas 3 tipos de inactivación: La tipo N, la tipo C, y la tipo U. Todas han sido estudiadas hasta la fecha en canales voltaje-dependientes.

Inactivación Tipo N

El canal de K⁺ *Shaker* se activa en respuesta a la depolarización de la membrana. Luego de que esto ocurre entra en un estado no conductor, es decir, se inactiva. En 1990, Hoshi usa mutagénesis sitiodirigida y obtiene registros tipo canal unitario del canal *Shaker* expresado en oocitos de *Xenopus sp.*, utilizando la técnica Patch-Clamp. De esta forma, estudia las transiciones moleculares que se dan detrás de esta inactivación y encuentra que existe un dominio citoplasmático implicado en el proceso.

Se propone que la inactivación del *Shaker* ocurre por un mecanismo tipo “bola y cadena”, planteado por primera vez por Bezanilla y Armstrong (1977), quienes estudiaron canales de Na⁺. Según este modelo, el extremo N-terminal del canal, se comporta como un bloqueador unido al lado citoplasmático, que ocluye directamente el poro, causando la inactivación.

En 1991, Demo y Yellen encuentran evidencia de que efectivamente el extremo N-terminal del *Shaker* funciona como un bloqueador Interno. Esto lo logran empleando un protocolo que consistió en aplicar dos pulsos de voltaje de 20 ms cada uno, desde -80 mV hasta +60 mV separados por un período hiperpolarizante de recuperación (-80mV). La duración del paso hiperpolarizante variaba desde 4 a 116ms, en paso de 8 ms. Durante el primer pulso, los canales se abrían y se inactivaban. Durante el segundo pulso se determinaba la fracción de los canales

que se habían recuperado de la inactivación. Encontraron que la recuperación se da más rápidamente en altas concentraciones de K^+ extracelular como se observa en la figura 4. Ellos interpretan que los iones K^+ entran profundamente en el canal, expulsando la partícula que lo bloquea. Esta teoría es consistente con el hecho de que la recuperación es voltaje-dependiente: la hiperpolarización acelera el proceso.

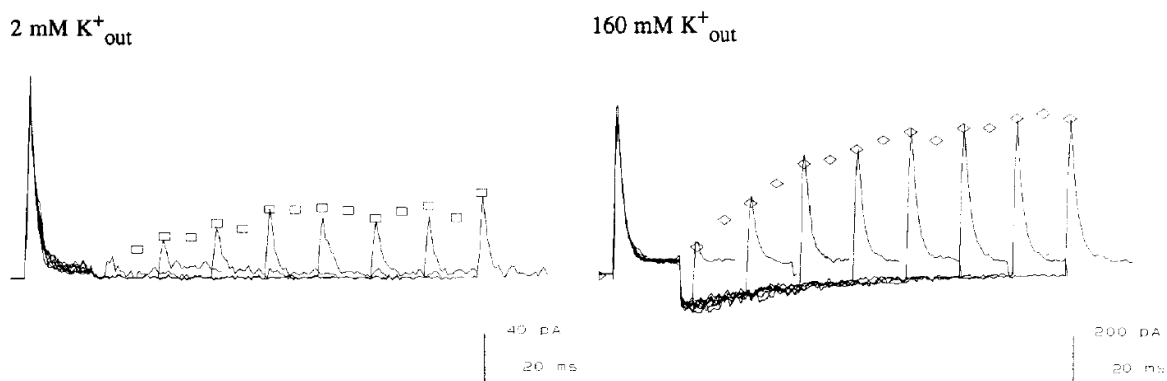


Figura 4. Recuperación de la inactivación a 2mM de K^+ intracelular (izq.) y a 160mM de K^+ extracelular (der.). Nótese la diferencia en escalas entre las imágenes, que pone aún más en evidencia la drástica diferencia entre las tasas de recuperación a distintas concentraciones de K^+ extracelular.

La recuperación a bajas concentraciones de K^+ extracelular es más complicada puesto que sigue un curso temporal con una doble exponencial, ya que posee una fase rápida, que podría deberse a la salida de la partícula bloqueante del poro; y una fase lenta. Se cree que esta fase lenta tiene que ver con una inactivación lenta, exhibida por este canal. Ésta es distinta al mecanismo rápido que hemos estado discutiendo, el cual es conocido como inactivación tipo N, por relacionarse con el extremo N-terminal del canal.

Inactivación Tipo C

En 1993, López-Barneo y col., evalúan este otro tipo de inactivación del *Shaker*, llamado inactivación tipo C, y encuentra que al incrementar las concentraciones de K^+ extracelular, ocurre más lentamente. Los resultados obtenidos son consistentes con un modelo tipo “pie en la puerta”, en el cual la ocupación por un catión monovalente en un sitio en el poro, impide la inactivación.

Este tipo de modelo fue propuesto por primera vez para canales de K^+ en 1981 por Swenson y Armstrong, quienes experimentaron con axón gigante de calamar perfundidos internamente. La solución externa estaba compuesta en principio por 440 mM NaCl, 50 mM $CaCl_2$ y 10 mM Tris-Cl, luego se reemplazó 100 mM de NaCl por 100 mM de KCl, posteriormente se reemplazó por 100 mM de RbCl, y finalmente se retornó a la solución original, de manera de evaluar la reversibilidad. Encontraron que tanto el K^+ como el Rb^+ retardaban el cierre de los canales, ya que actuaban como “el pie”. La sustitución equimolar por K^+ retardaba el cierre de los canales por un factor de 1,7 comparado con un medio solo con Na^+ ; mientras que el Rb^+ retardaba el cierre por un factor de 2,9. Esto lo atribuyeron al hecho de que el Rb^+ permanecía más tiempo en el interior del canal. El efecto del medio externo fue siempre reversible.

Swenson y Armstrong especulan que el sitio donde el K^+ y el Rb^+ actúan como “estorbos” al cierre del canal podría encontrarse cerca del extremo interno del

canal, ya que en este lugar se encuentran los sitios de unión para algunos cationes bloqueantes que impiden el cierre del canal, como el tetraetilamonio (TEA). Así mismo, el Ba^{2+} ocupa un sitio cerca del extremo externo del canal y parece tener el efecto contrario: estabiliza la configuración cerrada. Además, el lugar donde se retarda el cierre en canales de acetilcolina se piensa que está cerca del extremo interno (Swenson y Armstrong, 1981).

López-Barneo y col., (1993) estudiaron los efectos de distintos cationes monovalentes en el lado externo del canal, sobre el curso temporal de la inactivación tipo C usando el canal ShB Δ 6-46 (una mutación del canal *Shaker*), en el cual el extremo N-terminal ha sido eliminado, por lo que permite estudiar la inactivación C de manera aislada de la inactivación tipo N. Encontraron que el K^+ y el Rb^+ , ambos fácilmente permeables, retardan más la inactivación que otros iones menos permeables como el NH_4^+ , Cs^+ o Na^+ . Sin embargo, estos cationes sí tienen un efecto sobre la inactivación tipo C, ya que al reemplazar todos los cationes monovalentes por N-metilglutamina (NMG), que es un ion grande e impermeable, se produce una aceleración en la cinética de inactivación. El curso temporal de la inactivación no se vio alterado por el reemplazo de Ca^{2+} por Mg^{2+} o por la breve eliminación de todos los cationes divalentes externos (López-Barneo y col. 1993).

Tal como se muestra en la figura 5, este estudio también se encontró que la sustitución de aminoácidos en la posición 449 de la región del poro, resultaba en canales mutantes cuyas cinéticas durante la inactivación tipo C diferían en más de tres órdenes de magnitud y exhibían una sensibilidad variable a cationes externos (López-Barneo y col., 1993). Los experimentos consistieron en reemplazar la treonina en la posición 449, por tirosina, valina, histidina o lisina, que se encuentran naturalmente en la locación equivalente en los canales de potasio Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 y Kv1.4 (Stümer y col 1989, citado por López-Barneo y col. 1993). También se estudiaron mutantes con ácido glutámico y alanina, de manera de evaluar los efectos de aminoácidos cargados negativamente y con cadenas laterales pequeñas.

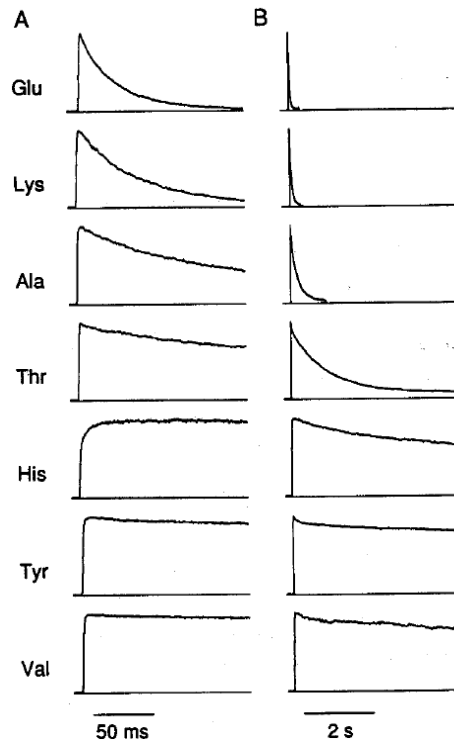


Figura 5. Curso temporal de la inactivación tipo C en diferentes mutantes T449.

Cuando la sustitución era por aa cargados (glutamato o lisina), el curso temporal de la inactivación era cerca de 100 veces más rápido en comparación con el tipo silvestre (Thr en la figura 5). En términos generales, la hidrofiliicidad en esta locación aparentemente favorece la inactivación. El mutante T449A es una clara excepción ya que se inactiva más rápidamente que T449 (silvestre) y T449H, a pesar de que el aminoácido alanina es menos hidrofílico que la histidina o la treonina. Los autores atribuyen este hecho al pequeño tamaño del aa alanina (López-Barneo y col., 1993).

La inactivación tipo C es crucial en el control de los patrones de disparo en células excitables y es fundamental en la determinación de la duración y frecuencia de los

potenciales de acción cardiacos (Bean B.P., 2007; citado por Raghuraman y col., 2014).

Además, esta inactivación es independiente del voltaje en un intervalo de -25-+50mV, y no requiere que la inactivación tipo N se mantenga intacta, aunque parece estar parcialmente acoplada a ella (Hoshi y col., 1991).

En 2006, Ray y Deutsch estudian el efecto de cationes intracelulares sobre la inactivación tipo C usando un protocolo de dos pulsos similar al usado por Demo y Yellen (1991). Al analizar sus resultados cuantificaron la fracción de la corriente generada durante el primer pulso que se observaba durante el segundo pulso. Encontraron que el Cs⁺ intracelular retrasa la recuperación, pero el grado en que la recuperación es retrasada depende de la identidad del aminoácido en la posición 449.

Ray y Deutsch sugieren que cuando la compuerta de activación de un canal inactivado se cierra, un catión intracelular queda atrapado entre el final citosólico del filtro de selectividad y la compuerta de activación. Este catión interactúa con un sitio de regulación en el filtro, gobernando la tasa de recuperación, la cual depende de la identidad del catión, y se correlaciona con la conductancia de éste a través del canal abierto ya que esto es una expresión de su habilidad para saltar de un sitio a otro en el filtro de selectividad (Ray y Deutsch, 2006).

Inactivación Tipo U

Es otro tipo de inactivación lenta y fue descrita por primera vez por Klemic y colaboradores en 1998 en el canal Kv2.1, en el cual observaron que incluso depolarizaciones leves, a las cuales la corriente no mostraba inactivación, producen una disminución en la corriente en respuesta a depolarizaciones posteriores.

En aquel estudio, que comenzó como un interés en la cinética de activación del canal kv2.1, se observó que la corriente producida tendía a variar a lo largo de depolarizaciones consecutivas, reflejando una posible inactivación (o run-down). Este fenómeno se evidenció aún más al aplicar un protocolo de tres pulsos. El primer pulso (P1) variaba entre -90 mV hasta 90 mV en pasos de 30 mV. El segundo pulso (P2) era a 60 mV; y el tercero (P3) era idéntico al primero.

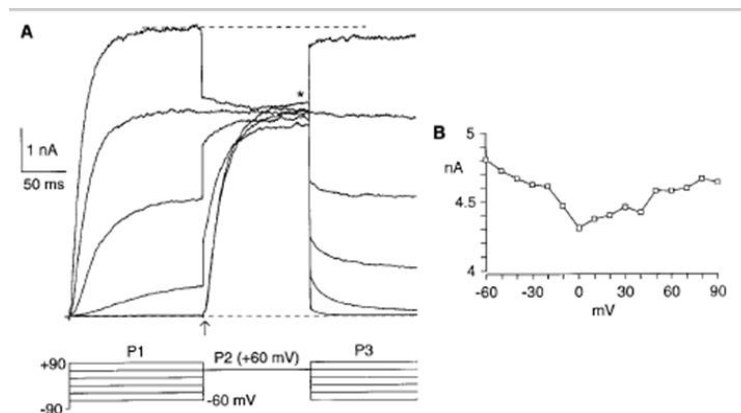


Figura 6. Corrientes producidas por depolarizaciones con incrementos de 30mV P1 y P3 son iguales. P2 son 60mV. B. Corriente medida donde señala el asterisco, en función del voltaje aplicado en P1. (Klemic y col., 1998)

Lo que muestra la figura 6, es que al final del segundo pulso, las corrientes son distintas pese a que en todos los casos el valor de P2 fue de 60 mV; no solo eso, sino que al graficar el valor de la corriente en ese instante (al final del segundo pulso como señala el asterisco), contra el voltaje durante P1, se encuentra que la corriente fue menor después de pulsos a voltajes intermedios, mostrando una dependencia de voltaje en forma de “U” (Fig 6. B).

Este tipo de inactivación ocurre en escala de segundos, y al contrario de la inactivación tipo C, la cual ocurre a altas depolarizaciones, se observa que la tipo U es más bien favorecida a depolarizaciones a voltajes intermedios, e incluso a voltajes que no son suficientes como para activar el canal.

Klemic y col. usaron de nuevo un protocolo de tres pulsos para estudiar la recuperación de la inactivación del canal Kv2.1. Partiendo desde el voltaje de prueba (desde -140 hasta -90 mV), se daba un primer pulso de 80 mV, un segundo pulso a 0 mV, y el tercero idéntico al primero, tal y como se observa en la figura 7 para el valor de -90mV.

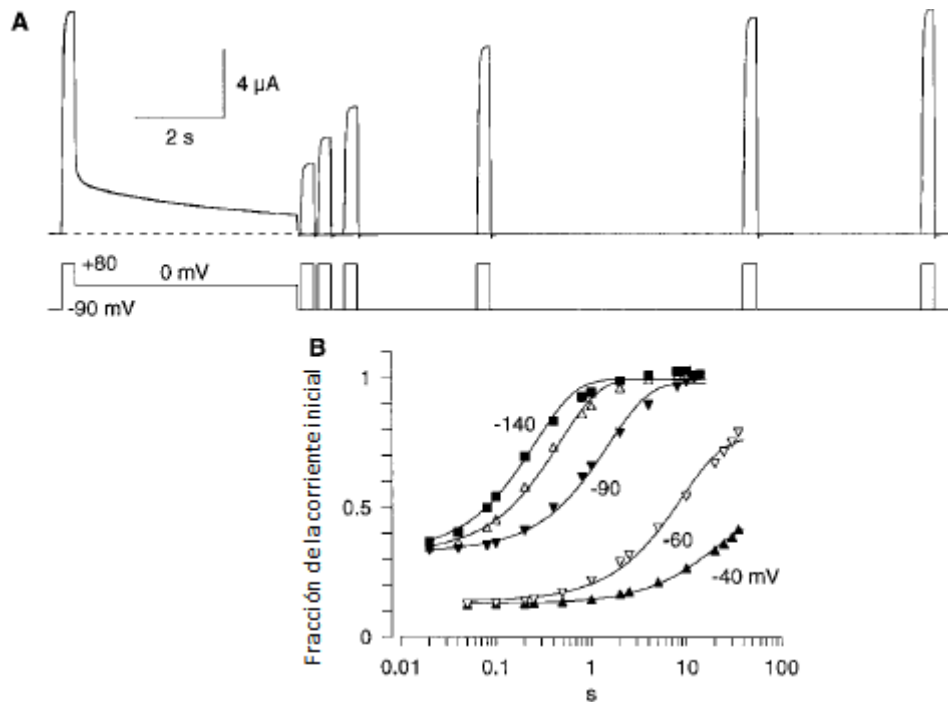


Figura 7. (A) Protocolo de recuperación a -90mV. (B) Curso temporal de la inactivación calculado como la corriente en P3 entre la corriente en P1 en función del tiempo en una escala logarítmica.

Con esto se observó que su recuperación puede ser rápida y que depende fuertemente del voltaje.

En contraste con la inactivación tipo C, las altas concentraciones de K^+ extracelular acelera ligeramente la inactivación tipo U; además TEA tiene poco efecto sobre ésta. (Klemic y col., 1998).

Un aspecto curioso es que un ciclo de pulsos depolarizantes causa más inactivación que un solo pulso de la misma duración. Se propone que este tipo de inactivación ocurre preferencialmente en un estado intermedio cerrado del canal (Klemic y col., 1998).

Senescencia del Eritrocito

Los eritrocitos humanos al no poseer núcleo, no pueden pasar por un proceso de muerte celular programada como el resto de las células; y sin embargo cada eritrocito vive alrededor de 120 días. Esto evidencia que existe un mecanismo que “cuenta” el tiempo, permitiendo que se dé el proceso de senescencia de esta célula.

Se ha observado que la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta a medida que el eritrocito envejece (Romero y Whittan, 1971), y este aumento progresivo se le ha visto asociado al proceso de senescencia.

Se piensa que llegado un punto, el nivel de Ca^{2+} intracelular activa al canal Gardos (el canal de K^+ activado por Ca^{2+}); y éste permite la fuga del K^+ intracelular, el cuál saldría acompañado por Cl^- , y esto a su vez traería como consecuencia la pérdida de agua como mecanismo para mantener el balance osmótico. Todo esto deriva en un aumento de la densidad de la célula. Una célula más densa se traduce en una célula más sensible al estrés mecánico.

Sin embargo, aún permanece la incógnita de cómo es que el Ca^{2+} aumenta en un principio. Actualmente existen varias hipótesis que intentan explicar este hecho. Una de ellas sugiere la existencia de un canal de Ca^{2+} mecanosensible, el cual sería activado por el estrés mecánico al cual el eritrocito está sometido regularmente durante toda su vida al pasar por los capilares sanguíneos (Romero

y Romero, 1999). La activación periódica de este canal provocaría un aumento transitorio en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, el cuál produciría la activación de calpaínas y protein-kinasas, que haría de las bombas de Ca^{2+} un sistema menos eficiente en extraer el Ca^{2+} intracelular. Al salir del capilar, el eritrocito recuperaría sus niveles normales de Ca^{2+} gracias a la acción de la bomba de Ca^{2+} (Romero, 2004).

Sin embargo, hasta la fecha aún no hay evidencia electrofisiológica de tal canal de Ca^{2+} mecanosensible en los eritrocitos.

La Hipótesis del K^+

En nuestro laboratorio se propuso una hipótesis para explicar este aumento de Ca^{2+} intracelular, basada en dos mecanismos novedosos en el eritrocito: En 2004, Romero reporta la existencia de un canal de K^+ mecanosensible, modulado por Ca^{2+} , al cual llama HEMKCA (HEMKCA: Human Erythrocyte Mechano-Active K^+ Channel), y de un intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Romero propone que el HEMKCA se activa cuando el eritrocito pasa a través del lecho capilar, dejando salir el K^+ . Esto produciría que la célula se hiperpolarizara, activando al intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$; el cuál es voltaje-dependiente. Este intercambiador permitiría la entrada de Ca^{2+} , y contribuiría con la salida de K^+ .

Cada vez que el Ca^{2+} aumenta en el eritrocito las bombas de Ca^{2+} se ven afectadas por efecto de la activación de las calpaínas. Así, en cada ciclo la actividad de las bombas es menos eficiente manteniendo los niveles de Ca^{2+} intracelular normales, por lo que podemos pensar que el tiempo que éstas demoran en devolver el Ca^{2+} a sus concentraciones normales es mayor, y por tanto, éste causa más estragos cada vez.

Lo descrito anteriormente supone un mecanismo de cómo ocurre la senescencia en los eritrocitos. El aumento de Ca^{2+} se presume como un proceso que va en aumento y que, alrededor del día 120 en promedio, dispara la señal para el retiro de la célula del torrente sanguíneo.

El Canal HEMCKA

El canal mecano-activado de K^+ , o HEMCKA por sus siglas en inglés, es un canal del eritrocito humano reportado por Romero en el 2004. Su probabilidad de apertura muestra una dependencia sigmoideal con la presión. Así, su conductancia media es de 17pS (Romero, 2004) y es modulado por Ca^{2+} (Romero y Zambrano, 2008).

Respecto a la modulación por parte del Ca^{2+} de la actividad de HEMCKA, se encontró que un incremento desde 10 μM hasta 100 μM , incrementa la probabilidad de apertura unas 20-30 veces. Este efecto muestra saturación a altas concentraciones de Ca^{2+} (100 μM aprox.) y no es dependiente del potencial de

membrana. Por otro lado, el incremento de probabilidad de apertura parece no estar relacionada con cambios en el tiempo medio en que el canal permanece abierto (Romero y Zambrano, 2008).

Respecto a la permeabilidad del canal HEMKCA se determinó que éste es permeable a Rb^+ , e impermeable a Na^+ , Li^+ o Cs^+ (Romero, L. O., 2016).

Se ha reportado también que existe una ligera dependencia de la P_o del HEMKCA con la polaridad del potencial de membrana (Romero L.O., 2016)

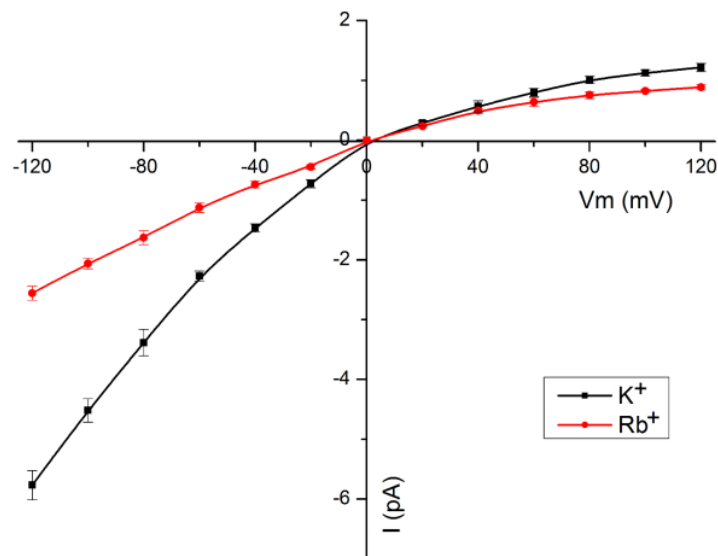


Figura 8. Curvas I-V del HEMKCA (Promedio \pm SD) construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+ (negro) o Rb^+ (rojo). (Extraído de Romero L.O., 2016)

La selectividad del HEMKCA fue estudiada bajo condiciones bi-iónicas con 150mM de la sal de prueba en la pipeta, consiguiéndose una secuencia de selectividad de

: K^+ (1) > Rb^+ (1,49) > Cs^+ (16,36) > Li^+ (22,53) > Na^+ (34,95); y para la condición en la cual la sal de prueba fue colocada en la cámara experimental se obtuvo una secuencia de selectividad de K^+ (1) > Rb^+ (2,05) > Cs^+ (5,14) > Na^+ (11,89) > Li^+ (25,39) (Romero, L. O., 2016).

Se ha reportado una disminución de la actividad del HEMKCA caracterizada por la disminución exponencial de la probabilidad de apertura (P_0) en el tiempo ($t=4,55\pm 1,95$ min). Este proceso parece empezar cuando se aplica un pulso de voltaje y empieza a pasar corriente a través del canal, sugiriendo que la activación del mismo es necesaria, más no suficiente para que se desarrolle la inactivación (Romero y Zambrano, 2010)

Se estudió cómo la inactivación afectaba la actividad tipo ráfaga del HEMKCA. En condiciones normales se encontró que se dan uno $17,43 \pm 17,15$ eventos/ráfaga, que cada ráfaga dura unos $264,27 \pm 291,3$ ms y el intervalo entre ráfagas unos $15,67 \pm 7,1$ ms. La inactivación parece disminuir el número de eventos por ráfaga, pero no parece afectar las variables intraráfagas, los intervalos intraráfagas, ni la duración de los eventos (Romero y Zambrano, 2010).

Objetivos

Objetivo General:

- Caracterizar la dependencia del proceso de inactivación con variables biofísicas y químicas

Objetivos Específicos:

- Caracterizar el efecto del potencial sobre la inactivación del canal de K^+ mecanoactivado del eritrocito humano.
- Caracterizar el efecto de la concentración interna de Rb^+ sobre el proceso de inactivación del canal de K^+ mecanoactivado del eritrocito humano.
- Caracterizar el efecto de la concentración interna de Ca^{2+} sobre el proceso de inactivación del canal de K^+ mecanoactivado del eritrocito humano.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Para desarrollar los experimentos, se utilizaron muestras de sangre obtenidas por punción epidérmica, inmediatamente después de ser extraídas y sin ningún tipo de tratamiento previo.

Soluciones

Tabla 1. Composición de las soluciones experimentales. La solución normal que se describe se utilizó tanto para estudiar el efecto del potencial, como para el de concentración media de Ca^{2+} .

	Solución	KCl (mM)	NaCl (mM)	CaCl ₂ (mM)	Tris (mM)	RbCl (mM)
1	Normal	140	10	1	10	0
2	Efecto bajo Ca^{2+}	140	10	0,1	10	0
3	Efecto alto de Ca^{2+}	140	10	10	10	0
4	Efecto del Rb^{+}	0	10	1	10	140

Medidas Electrofisiológicas

T.U.G.O. Patch Clamp

En el Patch Clamp clásico, las pipetas, una vez haladas, son pulidas con una microforja, de manera que el diámetro de la apertura se reduzca y así garantizar que el área de la membrana aislada sea muy pequeña y contenga solo uno, o unos pocos canales.

En el caso del T.U.G.O. Patch Clamp (*The U-Shape Giga Ohm Patch Clamp*), se usan pipetas con una abertura interna que permite que el eritrocito ingrese a su interior, sin ser succionado completamente. De esta manera se simulan las condiciones de estrés mecánicos que éste sufre al pasar por el lecho capilar durante la microcirculación (Romero, 2004).

Elaboración de las Pipetas

Las pipetas se constituyeron a partir de capilares de borosilicato de 10cm de largo, cuyo diámetro externo mide 1,5, y su diámetro interno mide 0,86 (Sutter Instruments COL., Novato CA, USA). Éstos fueron halados en dos pasos por un “puller” vertical modelo 700C (David Kopf Instruments, USA). Al halarlos de esta manera se obtienen unas pipetas cuyas paredes internas son casi paralelas, imitando así la forma de un capilar.

Las pipetas que fueron utilizadas son aquellas que presenten una resistencia 7-11M Ω en la solución normal, y fueron manipuladas en la cámara experimental con micromanipuladores hidraulicos Narishige modelo MO-203 (Narishige CO, LTD, Tokio, Japón).

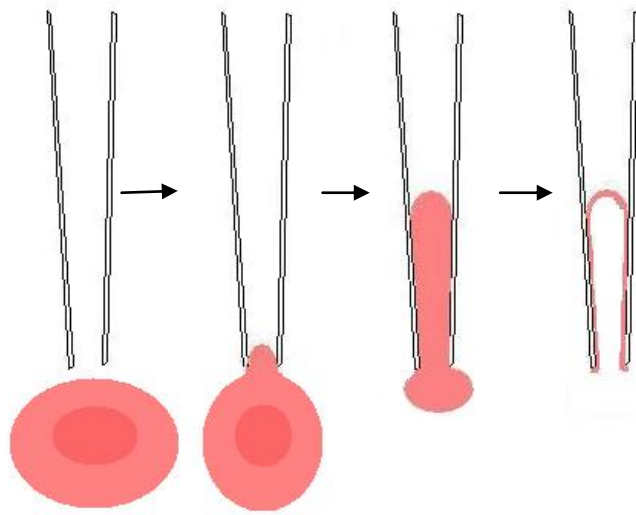


Figura 9. Posible esquema de cómo es la formación del sello. En la imagen se puede observar que la forma de la pipeta consiste en paredes casi paralelas. La última imagen muestra el Patch ya en la configuración “inside-out”, después de formado el sello.

Visualización de las Células

Las células fueron observadas a través de un microscopio invertido Nikon Diaphot (Nikon CO, LTD, Tokio, Japón) con oculares de 10X CFW y objetivos 20 y 40 DL.

Formación del Sello

Para formar el sello, primero se dejaron asentar los eritrocitos en el fondo de la cámara y se escogió uno de ellos. En esta técnica, al aplicar una presión negativa sobre el eritrocito, éste entra en la pipeta típicamente entre 3 y 8 μ m, y queda “atascado”. La gran cantidad de membrana dentro de la pipeta tiene interacciones débiles con el vidrio, sin embargo, el giga sello parece formarse en una región más bien profunda en la pipeta según observaciones realizadas por Romero en 2004. La resistencia de los sellos formados está entre 1-6G Ω .

Luego de formado el sello, se desprendió la parte del eritrocito que quedará fuera de la pipeta, arrastrándola suavemente contra el fondo de la cámara, quedando así en la configuración “inside-out”.

Protocolos de Estimulación

Para registrar la actividad del canal HEMKCA se aplicó una diferencia de potencial de -60 mV (para todas las condiciones experimentales, excepto aquellas donde se pretendía evaluar el efecto de otro potencial). La razón para elegir -60mV es que, al ser el HEMKCA un canal rectificador hacia adentro, conduce más corriente a potenciales negativos. Cada registro duró por lo menos 600 s, y máximo 1000 s. La razón para detener los registros cumplidos los 1000 segundos, fue que para

comparar los registros entre sí, era necesario que tuvieran la misma duración. Muy pocos registros duraron tanto tiempo. Así, si un registro duraba más de 1000 s, no podíamos compararlo los otros, por ser registros más cortos.

Para evaluar el efecto del potencial, se procedió de la misma manera, excepto que se registró a ± 60 mV y a ± 80 mV.

Adquisición de Datos

Las corrientes fueron medidas en modo *voltage-clamp* con una ganancia de 50 mV/pA con un filtro pasa-bajos a 2 KHz, para lo que se utilizó un amplificador AXOPATCH-1C (Axon Instrument, Burlingame, CA, USA). Así mismo, se utilizó también un filtro de línea Hum Bug (50/60Hz Noise eliminator) (Quest Scientific, North Vancouver, BC, Canada), para eliminar el ruido de 60Hz proveniente de la línea.

Se utilizó además, una interfase IT16 (Instructech, Port Washington, NY, USA) y se usó el programa de control y adquisición PULSE (Heka, Lambrecht, Alemania) para digitalizar los datos. Los registros obtenidos se guardaron en una computadora Pavilion XE743 (Hewlett Packard, USA).

Análisis de Datos

Los datos fueron analizados usando el programa Clampfit versión 10.3.2,1 (Copyright © 2013 Molecular Devices, LLC.).

Para caracterizar la inactivación del canal HEMKCA, se obtuvo un promedio de todos los registros por condición hasta sumar al menos 20 canales. De esta manera se obtiene un registro tipo “célula completa” (whole-cell), lo cual permite analizar directamente la caída

de la corriente en el tiempo. Esto se hace editando todos los archivos a sumar hasta que tengan exactamente la misma duración. Luego con el comando "Average Files" En la ventana "Analyze" de P-Clamp, se obtiene el registro tipo célula completa. Esto permite posteriormente hacer un ajuste directamente con la "corriente macroscópica" obtenida. Este fue el procedimiento que se llevó acabo para caracterizar el efecto del ion Rb^+ en la inactivación del HEMKCA.

Para estudiar la inactivación en cada condición, se tomó la probabilidad de apertura (P_o) de los canales de cada parche en cada minuto. Luego se comparó esta P_o en los dos primeros minutos de registro, contra la P_o entre los minutos 8 y 10. Si hubiera inactivación, se espera que la P_o en la segunda ventana de tiempo sea menor que en la primera. Esto se corroboró usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon ya que ésta es adecuada para evaluar datos pareados. Para comparar entre tratamientos se usó la prueba de Mann-Whitney, por tratarse de conjuntos de datos independientes. Estas pruebas fueron realizadas a través del programa estadístico Past (versión 1.0.0.0).

Ambas pruebas no paramétricas fueron escogidas por la falta de evidencia de que nuestros datos presentan una distribución normal.

Fue importante obtener datos de un gran número de canales ya que, debido a la naturaleza estocástica de la actividad de los canales iónicos, no todos éstos se inactivan, sino que todos como una población, en promedio, se inactivan. Así, para evaluar cada condición, era preciso conseguir una muestra representativa y así observar el fenómeno de estudio.

Resultados

Como se mencionó anteriormente en los antecedentes, en el año 2010 Romero y Zambrano reportaron por primera vez una inactivación del canal HEMKCA, la cual causa un descenso exponencial en la P_o del mismo con una τ de $4,55 \pm 1,95$ min. El presente trabajo tiene por objeto ahondar más en las características de esta inactivación para compararlas con las descritas en la bibliografía. Por ellos hemos diseñado una serie de experimentos a fin de encontrar qué factores afectan la inactivación e inferir qué parte de la proteína estaría involucrada en ésta. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

En primer lugar se confirmó que el canal HEMKCA entra en un proceso de inactivación que nosotros observamos como una disminución de la probabilidad de apertura (P_o) en el tiempo. Esta caída de la P_o , que es exponencial, se encontró que tiene una $\tau = 2,4$ min en solución normal, a un potencial de -60 mV, es decir en las mismas condiciones usadas por Romero y Zambrano en 2010.

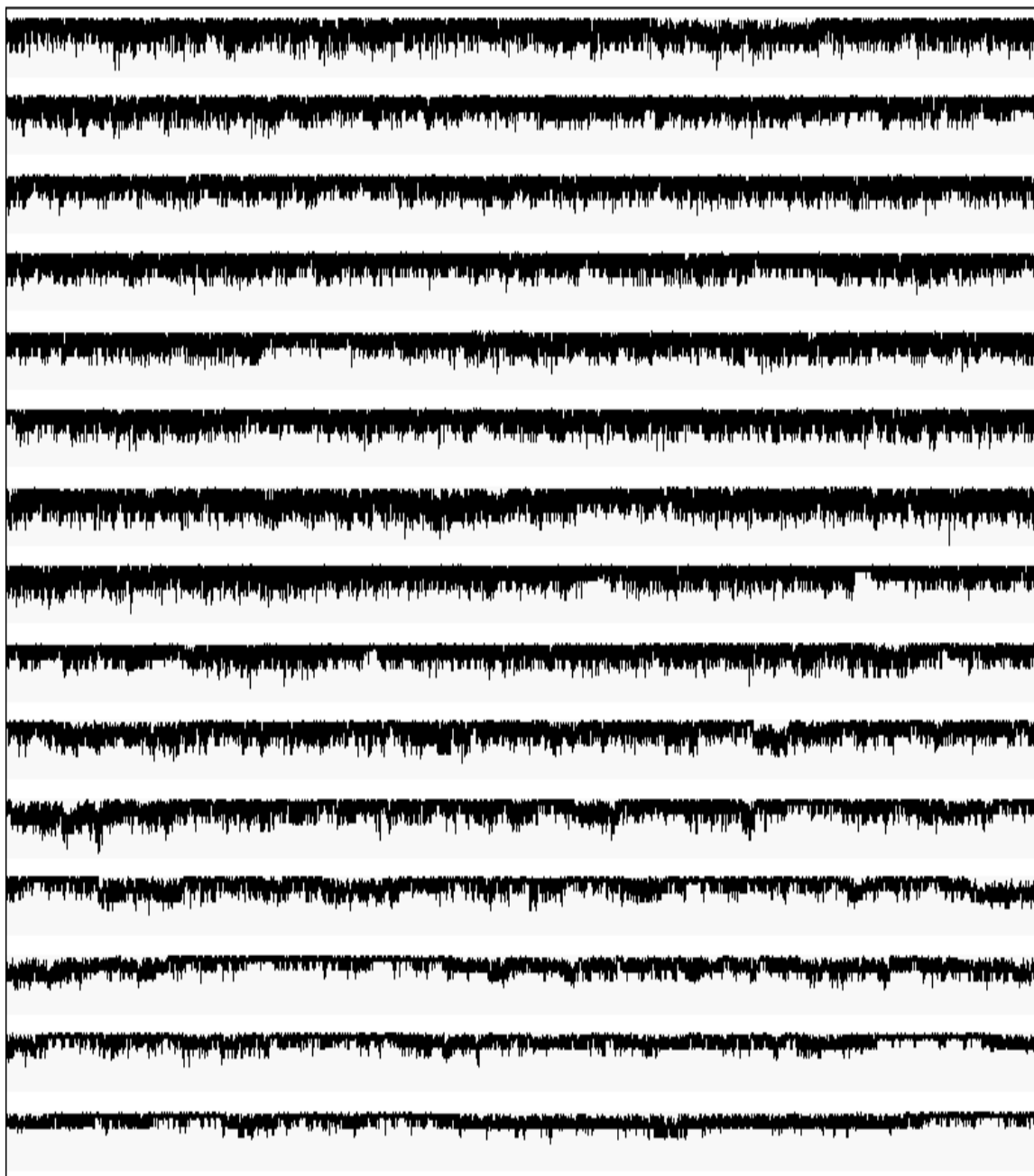
10 pA
1 s

Figura 10. Registro de la actividad del canal HEMKCA en solución normal a -60 mV. Se puede apreciar como la actividad disminuye con el tiempo. En este registro tenemos al menos 5 canales.

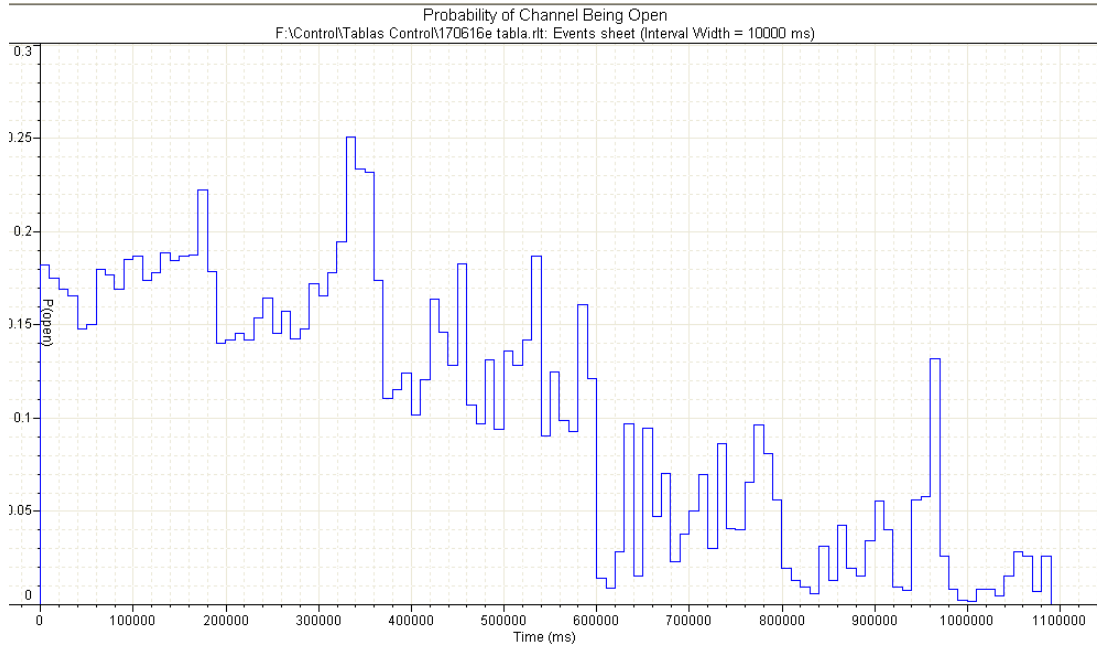


Figura 11. Probabilidad de apertura en intervalos de 10 s del HEMKCA en solución normal a -60 mV. Se puede apreciar como la Po disminuye en el tiempo. Este histograma corresponde al registro de la figura 10.

Para realizar todos los experimentos en cada condición se tomaron en cuenta aquellos que cumplieran con lo siguiente: (i) los registros debían tener una duración mínima de 10 minutos, que era más de dos veces la τ reportada anteriormente ($4,55\text{min} \pm 1,95\text{min}$) (Zambrano y Romero, 2010), (ii) además se escogieron los registros con mayor cantidad de canales de manera tal que nos proveyeran los datos más fiables.

No siempre fue posible conseguir registros con un número elevado de canales debido a que la metodología no nos permite controlar completamente este factor. Utilizar una pipeta de mayor tamaño incrementa la probabilidad de obtener un registro con múltiples canales, pero también aumenta la dificultad de obtener un sello estable en el tiempo. Por lo cual se incluyeron sellos con 1 o 2 canales de manera que pudiéramos alcanzar un

mínimo de 20 canales por condición (se usó 1 registro con un canal y 13 registros con dos canales de los 63 registros totales utilizados en este estudio).

Efecto del Potencial

En la introducción describimos un tipo de inactivación dependiente de potencial, denominada “tipo U”. Este nombre se debe a que esta inactivación está más favorecida a voltajes cercanos a cero, por lo cual al graficar corriente versus voltaje obtenemos la forma característica de una letra “U”.

Por esta razón se diseñó un protocolo experimental con el cual probamos el efecto del potencial en la inactivación de HEMKCA.

Para estudiar este efecto, se realizaron registros a ± 60 mV y ± 80 mV. El número de registros para cada condición se observa en la tabla 2, así como la sumatoria del número de niveles de todos los registros utilizados en cada condición. A este número nos referimos como número de canales (número mínimo de canales), acotando de nuevo que la cantidad de canales puede ser mayor, ya que si no se abren todos los canales presentes en un parche al mismo tiempo, este valor es una subestimación.

A partir de la amplitud de las corrientes iónicas obtenidas, se calculó la conductancia (g_k) del HEMKCA en cada potencial probado. Se obtuvo que para potenciales negativos la g_k es mayor que para potenciales positivos de la misma magnitud. Esto es consistente con que el HEMKCA presenta una rectificación hacia adentro.

Tabla 2. Número de registros tomados a cada potencial.

Potencial (mV)	Número de registros	Cantidad de canales	Promedio de canales por registro
80	6	≥26	≥4,33
60	8	≥29	≥3,63
-60	13	≥50	≥3,85
-80	7	≥27	≥3,85

Tabla 3. Conductancia del HEMKCA en función del potencial en solución normal (condiciones simétricas). El valor g_k fue calculado a partir de la corriente obtenida para cada potencial.

Potencial (mV)	g_k (pS)
80	9,6
60	10
-60	33
-80	37,5

Usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, se comparó la probabilidad de apertura en dos ventanas de tiempo (de 0 a 2 min., y de 8 a 10 min.) para determinar si existía una disminución estadísticamente significativa de la P_o del HEMKCA entre las ventanas de tiempo escogidas. Esto se hizo para cada potencial y se obtuvo que a ± 60 mV si hay una disminución significativa de la P_o del canal, mientras que a ± 80 mV no la hay. En otras palabras, se encontró evidencia de inactivación a ± 60 mV, y no a ± 80 mV.

En la figura 12, se muestra el promedio de la P_o minuto a minuto de todos los registros por condición, normalizados respecto a la P_o en el primer minuto. Hasta el minuto 10 se cuentan con los datos de todos los registros obtenidos en cada condición. Sin embargo, como no todos los registros se mantuvieron estables por tanto tiempo, los últimos minutos no tienen datos del 100% de los canales. No obstante, en el minuto 15 se cuentan aún

con el 53% de los datos obtenidos a +80 mV (16 canales), el 70,4% de los datos a -80 mV (20 canales), el 60% de los datos a -60 mV (30 canales) y el 74% de los datos a +60 mV (26 canales). Se observa que a ± 60 mV, la probabilidad de apertura cae exponencialmente. Mientras, a ± 80 mV la probabilidad de apertura no sigue un curso temporal claro.

Debemos acotar que los resultados mostrados en la figura 12 son puramente descriptivos y por ello no tienen una medida de dispersión asociada, in embargo ilustra claramente cómo es el comportamiento de la P_o que queremos describir.

No podemos decir que nuestros datos provienen de una población normal, ni contamos con una cantidad de datos suficientes como para tratarla como tal. Por lo tanto, en este trabajo hacemos uso de pruebas no paramétricas.

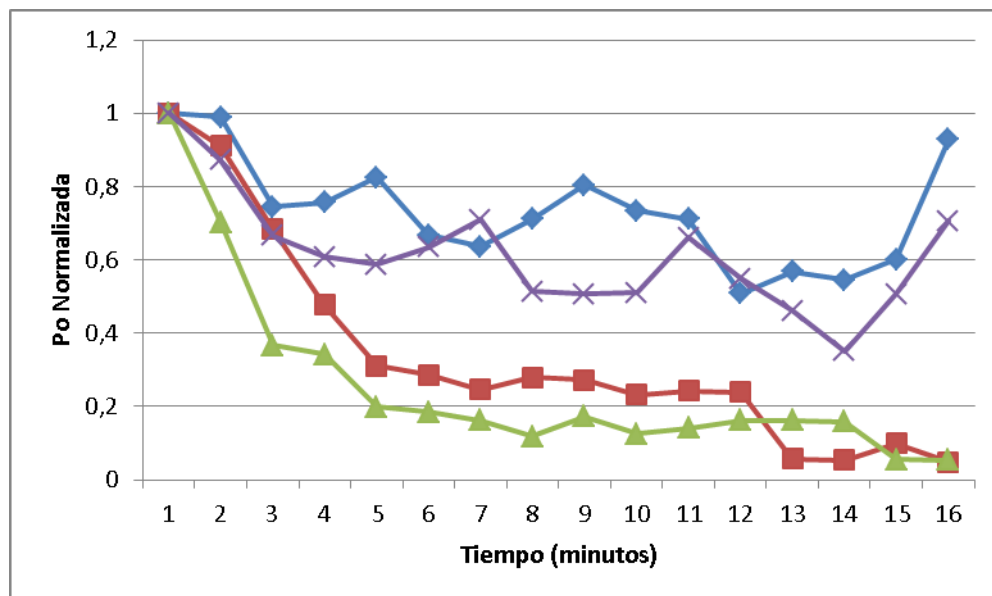


Figura 12. Cada punto representa la P_o normalizada promedio en cada minuto de todos los registros obtenidos a 80 mV (rombos), 60 mV (cuadros), -60 mV (triángulos) y -80 mV (equis).

Entonces, como no tenemos evidencia de que nuestros datos tengan una distribución normal, usamos un gráfico de “caja y bigotes” que muestra el porcentaje de actividad observado al final de cada potencial (figura 13).

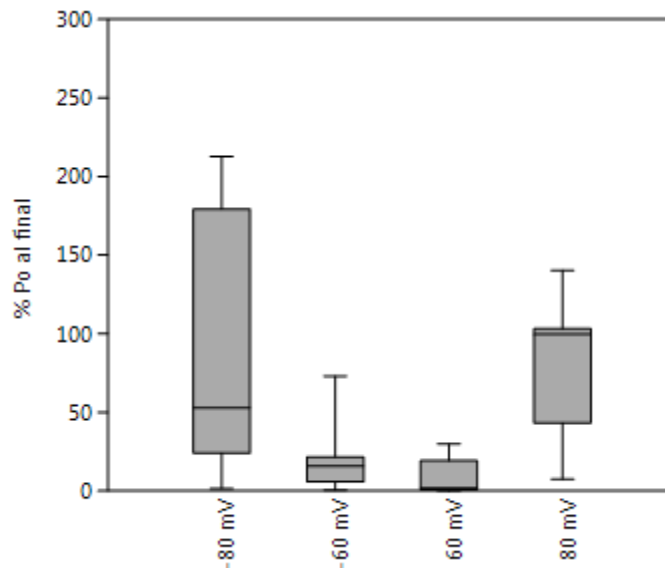


Figura 13. Gráfico de caja y bigotes del porcentaje de la Po en los últimos dos minutos de registro, respecto a los dos primeros minutos.

En la figura 13 se observa para cada potencial estudiado, el porcentaje de la Po final respecto a la inicial. Esto se obtuvo evaluando la diferencia entre la Po al principio de cada registro (0-2 minutos) y la Po al final (8-10 minutos). Se obtuvo el porcentaje que representa la Po final respecto a la inicial. En la tabla 4 se resumen algunos datos respecto a la figura 13. Observemos que tanto a ± 60 mV, la Po en los últimos dos minutos siempre fue menor al 100%, es decir, en todos los parches observados, se evidenció inactivación. Mientras que a ± 80 mV los datos son más variables, y se encontraron parches que no mostraron ningún signo de inactivación. Este resultado plantea la pregunta al respecto del origen de los resultados a estos potenciales. Esta pregunta no

puede ser respondida con los datos presentados en este trabajo. En nuestro laboratorio se está trabajando en este momento para conseguir datos que nos permitan dilucidar la variabilidad planteada.

Tabla 4. Datos sobre la mediana y la dispersión del porcentaje de la P_o entre 8-10 minutos, respecto a la P_o entre 0-2 minutos.

	-80 mV	-60 mV	60 mV	80 mV
Percentil 25	24,08362	4,768356	1,018976	34,27045
Mediana	52,83995	15,70105	5,068832	81,09706
Percentil 75	179,3374	21,84797	18,78035	112,4512

Efecto del Rb^+

En 1981 se propuso el modelo tipo “pie en la puerta” descrito en la introducción, para explicar cómo algunos cationes eran más capaces que otros de retardar el cierre de canales en el axón gigante de calamar (Swenson y Armstrong, 1981). En aquel entonces, se encontró que el Rb^+ retardaba el cierre 1,7 veces más que el K^+ . Este modelo fue tomado posteriormente en 1993 para describir la inactivación tipo C (López-Barneo y col., 1993).

El efecto del Rb^+ sobre el cierre de canales se le atribuye a su relativamente prolongada estadía en el interior del filtro de selectividad, en comparación con el K^+ . Por ello, si nuestro canal presentara inactivación tipo C, esperaríamos que al reemplazar el K^+ de la solución por Rb^+ , ésta se vería inhibida en algún grado.

Entonces, se comparó el efecto del Rb^+ respecto al K^+ a partir de registros realizados en solución normal, así como en una solución normal alternativa en la cual se reemplazó

todo el K⁺ por Rb⁺. El número de registros usados en cada condición se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Número de registros tomados en solución de K⁺ y Rb⁺.

Ion de Prueba	Número de registros	Cantidad de canales	Promedio de canales por registro
K ⁺	13	≥50	≥3,85
Rb ⁺	10	≥32	≥3,20

En la figura 14 podemos observar el curso temporal de la corriente en el tiempo. Para obtener las exponenciales se sumaron todos los registros de una misma condición (previamente editados para que tuvieran la misma duración). Así, el resultado es comparable con un registro tipo “célula-completa” (whole-cell), en donde ya no percibimos la inactivación como un descenso en la Po del canal, sino que directamente vemos disminuir la corriente total (Figuras 14 B y C). Posteriormente se realizó un ajuste de la corriente (reconstruida) a una exponencial. Las exponenciales derivadas de este ajuste es lo que observamos en la figura 14 A. En esta gráfica se puede observar claramente como el desarrollo temporal de la inactivación es completamente diferente para condición en presencia de Rb⁺ que con K⁺, así tenemos que en la condición control, con K⁺, el desarrollo es tres veces más rápido ($\tau_{K^+} = 2,4 \text{ min}$) que con respecto a la de Rb⁺ ($\tau_{Rb^+} = 7,99 \text{ min}$). No obstante se puede observar que el nivel de inactivación que se consigue al final de los registros es el mismo para ambas condiciones (presentando una relación de τ_{K^+}/τ_{Rb^+} de 3.3).

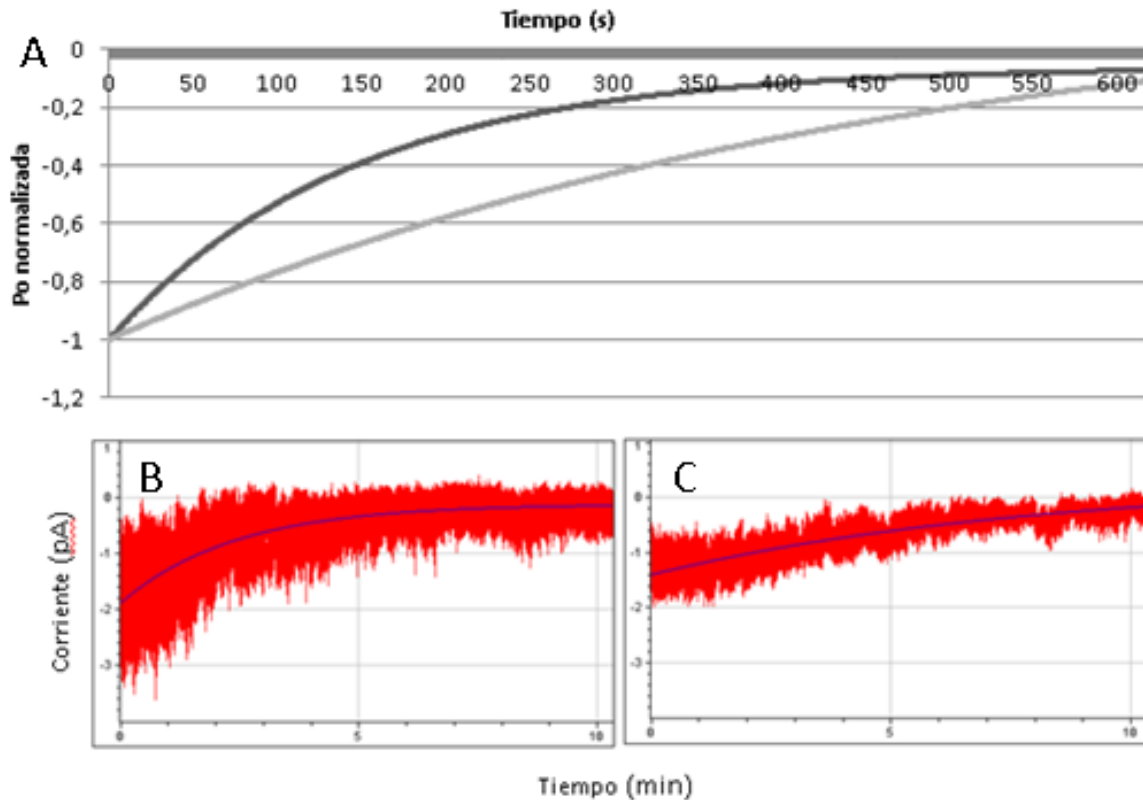


Figura 14. En la figura A se observa el curso temporal de la corriente estandarizada en gris oscuro para la condición K^+ , y en gris claro para Rb^+ . Las curvas fueron construidas a partir del ajuste exponencial de las corrientes totales que se obtienen al sumar todos los registros que se tomaron en cuenta para cada condición (paneles b y c) y luego cada valor se estandarizó con aquel a tiempo cero. En la figura B vemos la corriente total para K^+ , y en C la de Rb^+ .

En la figura 15 se observa cómo cambia la probabilidad de apertura del canal a medida que pasa el tiempo. Cada curva se normalizó con respecto a la P_o del primer minuto de cada condición, de manera que podemos comparar su trayectoria. Es claro en este resultado que en todos los puntos los valores en presencia de Rb^+ están por encima que los valores en K^+ . Se debe acotar que la curva para rubidio fue construida a partir de datos de 10 registros independientes que sumaban al menos 34 canales en total, sin embargo, esto solo es cierto hasta el minuto número diez. A partir de este punto, la curva fue construida solo con los registros que duraron lo suficiente. Para el minuto 16 se cuentan con los datos de 7 de los diez registros originales, y suman al menos 23 canales.

Así mismo la curva para K^+ , los últimos cinco minutos no contienen datos de todos los registros originales debido al tiempo en el que se logró mantener la integridad del sello.

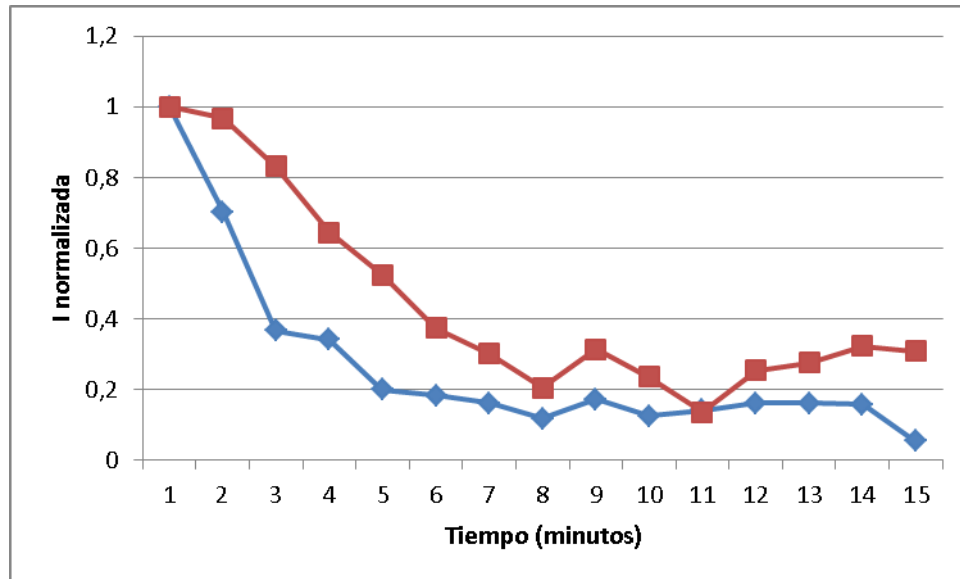


Figura 15. Cada punto representa la P_o promedio normalizada de cada minuto de todos los registros obtenidos con solución de Rb^+ (cuadros) y K^+ (rombos).

Al contrastar el porcentaje de inactivación entre distintas ventanas de tiempo, y haciendo posteriormente una comparación entre condiciones (usando la prueba de Mann-Whitney), se obtuvo que no habían diferencias significativas entre tratamientos. Esto puede deberse a que cada punto individualmente posee una alta variabilidad asociada al comportamiento estocástico del canal. También contribuye con este resultado, que la diferencia del efecto del Rb^+ se da sobre el desarrollo temporal de la inactivación, y no sobre el valor propio de la inactivación alcanzada al final del experimento, no obstante el efecto sobre el desarrollo temporal de la misma es evidente.

A pesar del esfuerzo puesto en conseguir la mayor cantidad de datos y así obtener resultados con una mayor significancia estadística, diversas situaciones ajenas a nuestro control se presentaron. El tiempo también fue un factor importante que limitó el número de experimentos por condición realizados. Sin embargo, el efecto parece claro al observar la reconstrucción de las corrientes macroscópicas. Se propone realizar al menos cinco reconstrucciones de este tipo, de modo de comparar estadísticamente las τ entre sí, y así conseguir un resultado que se acerque lo más posible a la realidad.

Efecto del Ca^{2+}

El canal HEMKCA es modulado por el ion Ca^{2+} , cuya concentración intracelular en los eritrocitos se encuentra entre 10 y 70 nmol (Romero y Zambrano, 2008), y se acepta que esta concentración aumenta con la edad. Tal y como se observa en la figura 16, la P_o del canal tiene una relación sigmoidea con la concentración de Ca^{2+} intracelular. En la figura 16 se observa el dramático efecto de disminuir la concentración de Ca^{2+} desde 1 mM, hasta 100 nM, que evidencia una fuerte regulación por parte del Ca^{2+} sobre la actividad del canal. Se ha observado además que este efecto se da sobre la frecuencia de apertura del canal, y no se trata de ningún efecto sobre el canal abierto (Romero y Zambrano, 2008)

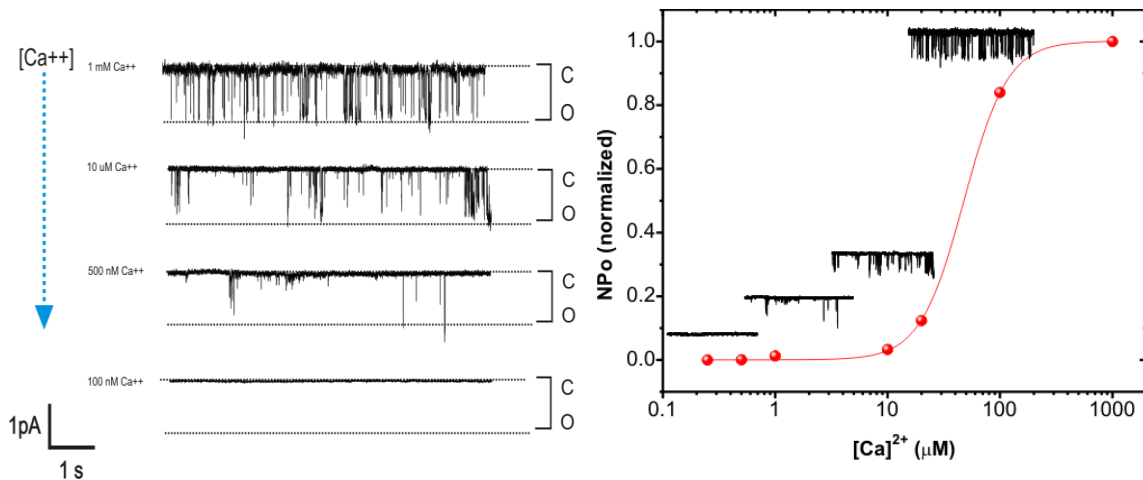


Figura 16. (Izquierda) Efecto de la disminución del Ca^{2+} intracelular desde 1 mM hasta 100 nM. (Derecha) Relación entre la NPo normalizada del canal, y el logaritmo de la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Tomado de Romero y Zambrano, 2008)

Esta regulación, se infiere que mantiene muy baja la actividad del canal mientras el eritrocito aún es joven, ya que la mínima concentración de Ca^{2+} en la cual se ha reportado actividad del HEMKCA es 100 nM (Romero, 2004). Entonces la actividad del canal solo se dispararía cuando el eritrocito alcanzara unos niveles críticos de Ca^{2+} intracelular.

Debido a la importancia fisiológica del Ca^{2+} en el eritrocito, decidimos estudiar si este ion tendría algún efecto sobre la inactivación del HEMKCA. Para ello se usaron 3 concentraciones distintas de Ca^{2+} . El número de parches de cada experimento se encuentra en la tabla 6.

Tabla 6. Número de registros tomados a distintas concentraciones de Ca^{2+} .

Concentración de Ca^{2+} (mM)	Número de registros	Cantidad de canales	Promedio de canales por registro
0,1	6	≥ 21	$\geq 3,50$
1	13	≥ 50	$\geq 3,85$
10	12	≥ 39	$\geq 3,25$

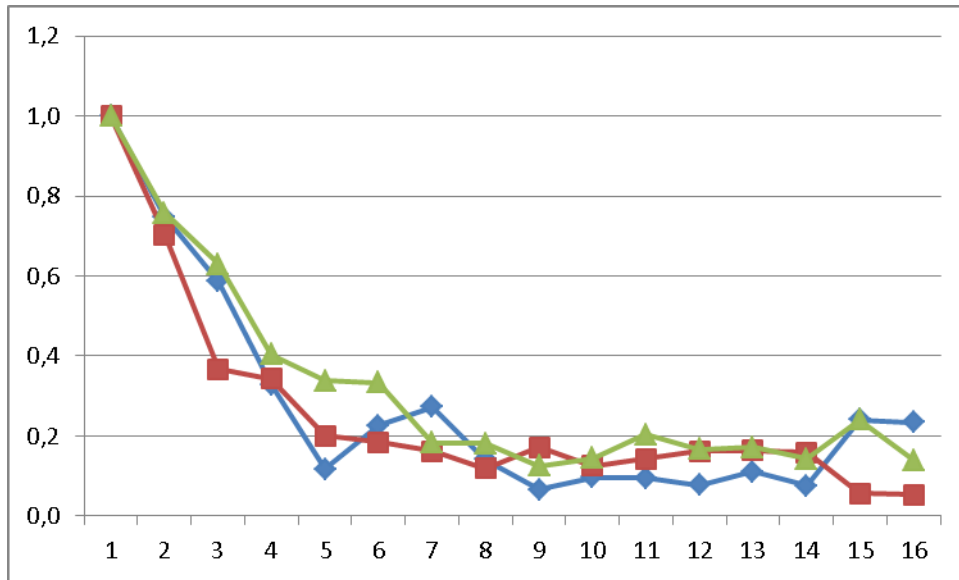


Figura 17. Cada punto representa la P_o promedio normalizada en cada minuto de todos los registros obtenidos a una concentración de 0,1 mM (rombos), 1 mM (cuadros), y 10 mM de Ca^{2+} (triángulos)

No se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la caída de la probabilidad de apertura entre las distintas condiciones. En la figura 17 se muestra la P_o promedio normalizada cada minuto para cada concentración, así como muestra la superposición de las tres curvas. De nuevo, el objetivo de imagen es ilustrativo y por ello no se muestran medidas de dispersión.

Discusión

Constante de Tiempo

Se encontró que la P_o cae exponencialmente en el tiempo con una τ de 2,39 min. 1,9 veces más pequeña que la reportada por Romero y Zambrano en 2010. Esta diferencia puede entrar dentro la variabilidad propia de los canales iónicos o bien estar relacionada con la variabilidad entre individuos. En todo caso, estos valores están claramente en el mismo orden de magnitudes y es menos de dos veces una con respecto a la otra.

Esta constante de tiempo es relativamente alta si la comparamos con otras reportadas en la literatura para la inactivación tipo C. Por ejemplo, la constante de tiempo de la inactivación para el canal ShB Δ 6-46 es de 3,25 s (López-Barneo col. 1993), y para el KcsA es de 1 a 3 s (Perozo, y col. 2007). Sin embargo, también ha sido reportado que esta constante de tiempo puede cambiar de acuerdo a ciertos factores: (i) el primero es la identidad de los iones en la solución externa, y su permeabilidad. Y (ii) la identidad de los aminoácidos en ciertas posiciones específicas del poro, como la posición 449 en el *Shaker*, que puede afectar la cinética de la inactivación en más de tres órdenes de magnitud, e incluso modificar la sensibilidad de ésta a cationes externos (Aldrich y col. 1993); la posición análoga en el canal HERG (posición 631) tiene grandes efectos sobre la inactivación tipo C de éste (Smith y col., 1996); mientras que mutaciones en la posición 103 del KcsA afecta la cinética de activación, pudiendo eliminar la inactivación (Cuello y col., 2010).

Efecto del Potencial

La inactivación tipo U es dependiente de la magnitud de potencial aplicado (Klemic y col., 1998), a diferencia de la inactivación tipo N la cual no presenta dependencia con el potencial de membrana. En el caso de la inactivación tipo C, existen reportes específicos de que puede tener dependencia de voltaje. Este punto será discutido más adelante en esta sección.

Usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon comparamos la actividad observada en los dos primeros minutos de registro, contra la actividad entre los minutos 8 a 10; y obtuvimos que a ± 60 mV se observa una disminución significativa de la P_o , pero a ± 80 mV, no. Esto podría ser interpretado como que a este potencial no se desarrolla el proceso de inactivación, no obstante este no es el caso, pues si se observa el gráfico en la figura 12, se ve claramente el por qué no se encontró diferencia entre las ventanas de tiempo usadas en el caso de ± 80 mV. Así tenemos que claramente se va desarrollando un proceso de inactivación a medida que se desarrolla el experimento en el tiempo, aun cuando este desarrollo de la inactivación es menor que con respecto al desarrollado a potenciales menores (± 60 mV). Tenemos entonces que al final de los experimentos, entre los minutos 12 y 14, la inactivación comienza a perderse. A potenciales de mayor magnitud, la inactivación parece “relajarse”, y esta pérdida de la inactivación se produce con una cinética más rápida que la presentada en el desarrollo de la misma.

Es claro que independientemente del signo, la P_o normalizada es mayor a potenciales mayores al final de los experimentos, es decir que efectivamente, aunque el proceso de

inactivación si se dio a estos potenciales mayores, en esta ventana de tiempo pudimos observar la relajación del proceso de inactivación.

Lo que se acaba de describir de ninguna manera es el mismo comportamiento de la inactivación a potenciales menores, a estos potenciales la P_o normalizada disminuye a todo lo largo del experimento, obteniendo siempre valores inferiores a los potenciales a los obtenidos a potenciales mayores y además no se puede observar la relajación de la inactivación a estos. Por otro lado en el gráfico de caja y bigote (figura 13), se puede observar esencialmente el mismo comportamiento.

Entonces, al graficar el porcentaje de actividad final respecto a la inicial y comparándolo entre diferentes potenciales obtenemos una forma de U similar a la encontrada por Klemec en 1998. (Figura 13). Esta forma característica de la inactivación tipo U en nuestro canal no tiene una explicación evidente. Podemos pensar que la razón por la cual el canal se inactiva menos a pulsos de mayor magnitud está relacionada con la magnitud de la fuerza motriz que atrae a los electrones hacia uno u otro lado de la membrana; con la velocidad a la cual los iones atraviesan el canal, y por tanto, con el tiempo de residencia de éstos en su interior.

En contraste con nuestros resultados, Klemic y colaboradores (1998) realizaron un protocolo de tres pasos para determinar cómo era la dependencia de voltaje de la inactivación que observaba en el canal Kv2.1. Empezaba con un pulso que variaba desde -90 hasta +90 mV, en pasos de 30 mV. Le seguía un pulso de +60 mV y terminaba con un pulso del mismo valor que el primero. De esta manera obtienen la corriente generada al final del segundo pulso, respecto al valor del primero. **Fue así como se obtuvo una curva**

en forma de U (Figura 6). La corriente observada era menor cuando el valor del primer pulso era cercano a cero; lo cual coincide con los voltajes a los cuales el canal estaba parcialmente abierto.

Además se observa (más claramente con el pulso a 90 mV), que la corriente generada por el tercer pulso era menor que para el primero. Esta disminución entre pulsos estrechamente espaciados sugieren una inactivación acumulativa, que fue corroborada en experimentos subsiguientes (Klemic y col., 1998).

En el caso de nuestros experimentos, el protocolo experimental no fue diseñado para evaluar si existía algún tipo de inactivación acumulativa, lo cual para nosotros es imposible, puesto que no podemos activar y desactivar el canal a voluntad. No solo porque no controlamos con precisión la succión aplicada al eritrocito, sino porque al intentar aplicar un paso de presión positiva, el sello suele arruinarse.

Esta misma razón nos lleva a la conclusión de que el “modelo” propuesto por Klemic y col. (1998), en el cual la inactivación se da desde un estado parcialmente activado del canal, no es aplicable al HEMKCA bajo nuestro sistema experimental. Esto es, porque al permitir la entrada del eritrocito al interior de la pipeta, activamos el canal y lo mantenemos en este estado durante todo el registro. Para ello fue necesario comprobar que nuestro sistema no permite la pérdida de presión. Por lo tanto, descartamos que la inactivación del HEMKCA se dé mediante este modelo.

Entonces, ¿qué mecanismo puede explicar esta dependencia de potencial en forma de U?

Existen **dos alternativas** para explicar el comportamiento de la inactivación a los potenciales usados. La primera sería proponer un modelo que explique cómo la inactivación depende de la **magnitud del potencial aplicado**. Esto sería consecuente con lo descrito anteriormente.

La segunda alternativa sería explicar que existen **dos mecanismos** distintos que eliminan la inactivación tanto a +80 como a -80 mV.

Debemos recordar que la inactivación tipo C se relaciona con el colapso del filtro de selectividad del canal (Cuello y col., 2010), y que las condiciones a las cuales esté expuestos, pueden influir en su estabilidad.

A -80 mV la conductancia es mayor, esto quiere decir que más iones por unidad de tiempo atraviesan el canal. Este flujo de iones podría ser clave para mantener el filtro de selectividad en un estado relativamente estable con respecto a -60 mV (tal como se explicó anteriormente).

Por otro lado, el comportamiento rectificador del HEMKCA resulta en una conductancia menor a voltajes positivos de la misma magnitud aun teniendo la misma fuerza electromotriz, entonces podemos pensar que los iones atraviesan el canal más lentamente cuando lo hacen en dirección al exterior de la membrana. Se ha propuesto que esto es debido a la asimetría de la proteína (Romero, 2004). Así, al igual que el Rb^+ , la relativamente prolongada estancia de los iones en el interior del filtro, lo estabilizaría.

A simple vista, ambas ideas parecen contradecirse, pero no necesariamente es así. En el caso de -80 mV, estaríamos hablando de un **mayor flujo** de iones, mientras que a +80 mV

hablamos de un menor flujo de iones, pero con un **mayor tiempo de permanencia** en el interior del canal. Así, ambos procesos estarían relacionados con el tiempo que pasa el canal “ocupado” con al menos un ion en su interior.

Inactivación tipo C y su dependencia del Voltaje

En 1993 se reportó que la inactivación tipo C evidenciada por el canal *Shaker*, era independiente de voltaje en un intervalo de -25 a +50 mV (López-Barneo, 1993). Sin embargo, existen reportes de que este tipo de inactivación si puede tener una dependencia de voltaje, que parece variar según el canal.

Un ejemplo es el canal KcsA, cuya constante temporal de inactivación es fuertemente dependiente de voltaje (Cordero-Morales y col., 2006). A voltajes negativos la inactivación es más completa y se desarrolla con una cinética más rápida. Se sugiere que la P_o del KcsA en el estado estacionario surge de la dependencia de voltaje de la tasa de inactivación (Cordero-Morales y col., 2006).

Otro ejemplo de esto se reporta para el canal HERG.

El canal HERG es una canal de K^+ que se abre en respuesta a la depolarización, pero conduce relativamente poca corriente al exterior. Al repolarizar la conductancia aumenta a un gran valor en cuestión de milisegundos, antes de volver lentamente a su estado cerrado. En otras palabras, es un canal rectificador hacia adentro (Smith y col., 1996).

Ha sido propuesto que esta rectificación es consecuencia de un mecanismo de inactivación que cierra el canal a potenciales positivos, pero que se recupera a potenciales negativos. Para distinguir si esta inactivación era de tipo N o de tipo C se

utilizó tetraetilamonio (TEA), que se sabe que inhibe la inactivación tipo N si se coloca en el lado intracelular, mientras que del lado extracelular inhibe la inactivación tipo C (Choi y col., 1991). Se obtuvo que TEA al aplicarlo al lado extracelular, reducía el pico de corriente generado por un pulso de prueba, así como reducía el curso temporal de la inactivación. Ante esta evidencia, se concluye que el HERG posee inactivación tipo C (Smith y col., 1996).

Gracias a un protocolo diseñado para eliminar la inactivación, se encontró que la rectificación hacia adentro del HERG es consecuencia de este mecanismo de inactivación (Smith y col., 1996).

En 1996 Baukrowitz y Yellen trabajan con el canal *Shaker* bajo la hipótesis de que la inactivación tipo C es gobernada por la unión de un ión en un sitio cercano a la boca exterior del poro. Y, lógicamente, por su estadía en este sitio. Ellos usaron diferentes bloqueadores que impidieron el flujo de potasio a un sitio en el poro, promoviendo la inactivación tipo C. Aunque la constante de disociación de estos bloqueadores es grande, su efecto es duradero gracias a que promueven la inactivación. Así, estos resultados proveyeron información sobre la cinética del movimiento iónico a través de los canales de K⁺.

Ellos proponen que el sitio que gobierna la inactivación es uno de los sitios de unión a K⁺ involucrados en la permeación. En promedio, cualquiera de estos sitios de unión debe desligar los iones a una tasa de $\sim 10^7$ s⁻¹. Sabemos que los iones se mueven a través del canal en fila (Hille y Schwarz, 1978), con interacciones repulsivas entre ellos. Así en

teoría, un canal con solo un ión de K^+ uniría a éste con más fuerza que un canal con dos K^+ . De esta manera, este último ion tendría un tiempo de permanencia mayor, de unos $150\mu s$ (correspondiente a una tasa de salida de $6700 s^{-1}$).

Ellos encontraron que la tasa de inactivación en presencia los bloqueadores surgiría de una carrera entre la disociación de la molécula bloqueante y este último ion de K^+ . Consecuentemente con esta idea, se encontró que existe una dependencia de voltaje sustancial de la unión de K^+ externo con el canal bloqueado, con un tiempo de estadía menor y una inactivación más rápida a voltajes positivos (Baukowitz y Yellen, 1996).

Como podemos darnos cuenta, son diversos los reportes de inactivación tipo C dependiente de voltaje. Incluso en el caso del HERG los autores del estudio, aunque admiten que la inactivación de éste canal parece ser más rápida y más voltaje-dependiente que la inactivación C del *Shaker*, también aclaran que la tasa y voltaje-dependencia puede variar mucho según las condiciones del experimentos (mutaciones y condiciones iónicas). Aún así proponen que la diferencia entre ambas sería más cuantitativa que cualitativa (Smith y col., 1996).

Esta diversidad de efectos que tiene el voltaje sobre la inactivación tipo C, nos permite ver que la dependencia de voltaje de la inactivación del HEMKCA no es incompatible con la hipótesis de que ésta sea de tipo C, sino que contribuye a una mejor comprensión de este tipo de inactivación

Efecto del Ca²⁺

Para estudiar el efecto del Ca²⁺ utilizamos tres concentraciones distintas de Ca²⁺: 0,1 mM, 1 mM, y 10 mM de Ca²⁺. 1 mM de Ca²⁺ corresponde a la concentración de Ca²⁺ en la solución normal usada para llevar a cabo todos los demás experimentos en este estudio. A esta concentración esperábamos encontrar inactivación puesto que es la concentración de Ca²⁺ a la cual se había observado previamente este fenómeno, aunque no fuera el objeto de estudio.

Utilizamos una concentración mayor, que, aunque el canal ya estuviera saturado de Ca²⁺, podía existir algún efecto sobre la inactivación que sea independiente del efecto que tiene sobre la Po.

También utilizamos una concentración menor en la cual la curva log[Ca²⁺] vs. Po aún no está saturada (Figura 16).

Como no se observó ninguna diferencia entre los experimentos realizados, concluimos que la inactivación del canal HEMKCA no depende del Ca²⁺ entre las concentraciones 0,1 hasta 10 mM Ca²⁺.

Sin embargo, se propone realizar más experimentos con concentraciones inferiores de Ca²⁺ en donde sí se observe un cambio apreciable en la Po.

Efecto del Rb⁺

Encontramos que el Rb⁺ retarda la inactivación del canal HEMKCA en un factor de 3,3 según los resultados obtenidos del ajuste de la corriente en los registros tipo “célula completa”. Debemos tomar en cuenta que es necesario hacer más registros tipo “célula

completa” para obtener un resultado más exacto, pero sin duda el Rb^+ causa un efecto notable en el curso temporal de la inactivación. Esto coincide con la hipótesis de que el canal HEMKCA presenta inactivación tipo C.

Este efecto ya había sido reportado anteriormente. Ya en 1981 se estaba describiendo el modelo por el cual sería descrita la inactivación tipo C, y ya entonces se observó que el Rb^+ desaceleraba la inactivación por un factor de 1,7 con respecto al K^+ (Swenson y Armstrong, 1981). Así como reemplazar todo el K^+ por Rb^+ reduce la tasa de inactivación por un factor de 10 en el KcsA (Chakrapani y col., 2007).

Tal y como propusieron Swenson y Armstrong (1981), el Rb^+ retrasa el cierre de los canales al tener un mayor tiempo de permanencia en el interior de estos. Así lo corroboraron João y colaboradores en 2001, usando mapas de densidad electrónica, al encontrar que la distribución de Rb^+ en las posiciones en el filtro de selectividad eran diferentes a la de K^+ . Mientras que el K^+ lo podemos conseguir en las configuraciones 1-3 o 2-4, el Rb^+ lo encontramos principalmente en las posiciones 1-3 y 1-4. En el caso de K^+ , ambas configuraciones están balanceadas energéticamente, lo cual permite que la tasa de conducción sea muy alta; pero para Rb^+ existe una pequeña desigualdad energética, siendo más frecuente la configuración 1-3 (en altas concentraciones de Rb^+). Es por ello que este ion no fluye con la misma rapidez con la que lo hace el K^+ (João y col., 2001).

Sumado a esto se encontró, usando resonancia paramétrica electrónica, que la estructura del KcsA en su conformación abierta (32 Å de diámetro) en presencia de Rb^+

(3,3 Å de resolución) muestra que el filtro no puede entrar completamente en el estado inactivado en presencia de este ion, en comparación con el poro ocupado por K^+ (Cuello y col. 2010).

Algo notable del efecto del Rb^+ es que al cabo de 10 minutos, la probabilidad de apertura para ambas condiciones (tanto K^+ como Rb^+) son prácticamente las mismas. No podemos saber con precisión que sucede después de este punto, sin embargo sería lógico pensar que existe un máximo de inactivación, que no depende del ión en solución. Esto se observa en la figura 15, donde la inactivación en la solución de K^+ parece alcanzar un platou. Esto nos conduce a pensar que mientras algunos canales siguen inactivándose, otros se están recuperando de la inactivación.

La idea de que esta recuperación es independiente de los iones en solución es consistente con el modelo que se tiene de inactivación tipo C. El filtro colapsa al no haber ningún ion en su interior, por tanto, la recuperación desde este estado no involucraría tales iones.

Relevancia Fisiológica de la Inactivación del HEMKCA

La cinética de la inactivación del HEMKCA es relativamente lenta, como ya hemos visto. Esto podría sugerir que esta inactivación es fisiológicamente irrelevante. Sin embargo, sería interesante realizar experimentos orientados a descubrir si la inactivación del HEMKCA es acumulativa. De serlo, si podría jugar un rol importante en la fisiología del eritrocito, como lo sería la regulación de la actividad de este canal en un eritrocito senescente, impidiendo que la salida de K^+ por parte de este canal, acelerara el proceso de envejecimiento.

Inactivación del HEMKCA

A través de esta investigación, concluyo que las características del mecanismo de inactivación del canal HEMKCA, son más similares a las de una inactivación tipo C, que a las de una tipo U o N.

En el planteamiento original de este problema se dedujo que a la luz de que éste no es un canal voltaje-dependiente, era poco factible que el canal poseyera inactivación tipo N, puesto que ésta es encontrada solo en canales de K^+ tipo A, y en canales de Na^+ . Además, esta inactivación se da en la escala de los milisegundos, mientras que la de nuestro canal tiene un curso temporal mucho más lento (Jamieson, 2014).

Ahora, tanto la inactivación tipo C, como la tipo U, son conocidas como inactivaciones lentas. Pueden distinguirse la una de la otra por diferentes criterios. El primero, lógicamente, es la dependencia de voltaje en forma de "U" que le da nombre a la inactivación tipo U; en segundo lugar, la recuperación de esta inactivación es rápida y fuertemente dependiente de voltaje. Por último, altas concentraciones de K^+ extracelular inhiben la inactivación tipo C, pero incrementa la tipo U (Klemic y col., 2001).

El segundo y tercer criterio no podemos usarlos para discernir entre ambos tipos de inactivación porque no estudiamos la recuperación del estado inactivado, ni cambiamos la concentración de K^+ extracelular. Solo nos queda el primer criterio: la dependencia de voltaje en forma de U que, como se discutió anteriormente, difícilmente se da a través del mismo mecanismo con que se da la inactivación tipo U encontrada en canales voltajedependientes.

Conclusiones

- El HEMKCA sufre un proceso de inactivación que, en solución normal y a -60 mV tiene una constante temporal de 2,4 min.
- El Rb⁺ retarda esta inactivación por un factor de 3,3.
- La inactivación del HEMKCA es independiente de la concentración de Ca²⁺ entre 0,1 hasta 10 mM.
- La inactivación del HEMKCA tiene una dependencia de voltaje en forma de “U”, que no es consistente con el modelo típico de inactivación tipo U, sino que parece deberse a que a mayores potenciales, la inactivación se pierde más rápido.
- Se propone que existe un mecanismo sensor de voltaje dependiente de la magnitud del pulso aplicado, pero no del signo, que puede inhibir la inactivación.
- Se propone que la inactivación del HEMKCA es de tipo C.

Bibliografía

- Armstrong C. M., Bezanilla F. 1977. Inactivation of the Sodium Channel. J. Gen. Physiol. Vol 70. Pág 567-590.
- Bargmann, C. I. re. 1998. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* Genome. SCIENCE Vol 282 Pág 2028-2033.
- Bennekou, P., 1993. The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. . Biochim. Biophys. Acta. Vol.1147. Pág 165-167.
- Bezanilla, F., Armstrong, C. M. 1977. Inactivation of the Sodium Channel. II. Gating Current Experiments. J. Gen. Physiol. Vol 70. Pág 567-590.
- Bouyer G., Thomas S., Egée S. 2012. Patch-Clamp Analysis of Membrane Transport in Erythrocytes. Doi: 10.5772/37279 Cap 9 Pág 171-202.
- Bouyer, G., Egée, S., Thomas, S. L. 2006. Three types of spontaneously active anion channels in malaria-infected human red blood cells. Blood Cells Mol. Dis. Vol. 36. Pág 248-254.
- Bouyer, G., Egée, S., Thomas, S. L. Y. 2007. Toward a unifying model of malaria-induced channel activity. PNAS Vol. 104. 11044-11049.
- Chang G., Spencer R. H., Lee A. T., Barclay M. T., Rees D. C. 1998 Structure of the MscL Homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A Gated Mechanosensitive Ion Channel. SCIENCE Vol 282 Pág 2220-2226.
- Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, D., Lauritzen, I., Lazdunski, M., Honoré, E. 2005. A phospholipids sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. EMBO J. Vol 24. Pág 44-53.
- Choi, K. L., Aldrich, R. W., Yellen, G. 1991. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 88. Pág 5092-5095.
- Christophersen, P. 1991. Ca²⁺-Activated K⁺ Channel from Human Erythrocyte membranes: Single Channel Rectification and Selectivity. J. Membrane Biol. Vol 119. Pág 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.* Vol 1065. pág 103-106.
- Cordero-Morales, J. F. Cuello, L.G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, M., Roux, B., Perozo, E. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol13 N4 Pág 311-318
- Del Carlo, B., Pellegrini, M., Pellegrino, M., 2003. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1612 Pág 107-116.
- Demo, S. D., yellen, G. 1991. The Inactivation of the *Shaker* K⁺ Channel Behaves Like an Open-Channel Blocker. *Neuron* Vol. 7 Pág 743-753.
- Desay, S. A., Bezrukov, S. M., Zimmerberg, J. 2000. A voltage-dependet channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature.* Vol. 406. Pág 1001-1005.
- Doyle, D. A., Cabral J. M. , Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M. Cohen, S. L. Schmidt, O., Kümmerlen, R., Hinnah, S., Müller, D., Betzler, M., Seinkamp, T., Wagner, R. 1995. A prokaryotic potassium ion channel with to predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividan*. *EMBO J.* Vol 14. Pág 5170-5178
- Doyle, D. A., Cabral J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., J. M. Cohen, Chait, B. T., MacKinnon, R. 1998. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *SCIENCE* Vol. 280 Pág. 69-77.
- Duranton C., Huber S. M., Lang F. 2002. Oxidation induces a Cl⁻ dependent cation conductance in human red blood cells. *J PHYSIOL* Vol 539.3 Pág 847-855.
- Egèe, S., Lapaix, F., Decherf, G., Stains, H. M., Ellory, J. E., Doering, C., Thomas, S. L. Y. 2002. A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *plasmodium falciparum*. *J. Physiol.* Vol 542. Pág 795-801.
- Friedman, M. H. 2008. Principles and Models of Biological Transport. Springer Science+Business Media. DOI: 10.1007/978-0-387-79240-8_4.

- Gardos G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. Vol 30 Pág 653-654.
- González, C., baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., naranjo, D., Latorre, R. re. 2012. K⁺ Channels: Function-structural Overview. *Compr. Physiol*. Vol 2. Pág 2087-2149.
- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., Larorre, R. 2012 K⁺ Channels: Function-Structural Overview. *Compr Physiol* Vol 2. Pág 2087-2149.
- Grygorczyk, R., Schwarz, W. 1983. Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* 4. Pág 499-510.
- Grygorczyk, R., Schwarz, W. 1985. Ca²⁺-activated K⁺ permeability in human erythrocytes: Modulation of single-channel events. *Eur. Biophys J*. Vol 12. Pág 57-65.
- Halperin, J. a., Brugnara, C., Nicholson-Weller. 1989. Ca²⁺-activated K⁺ Efflux Limits Complement-mediated Lysis of Human Erythrocytes. *J. Clin. Invest*. Vol 83 Pág 1466-1471.
- Hille, Bertil. 1991. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer. Segunda Edición.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W. 1991. Two Types of Inactivation in *Shaker* K⁺ Channels: Effects of Alterations in the Carboxy-Terminal region. *Neuron* Vol. 7. Pág. 547-556.
- Huber S. M., Uhlemann A.C., Gamper N. L., Durantón C., Kremsner P.G., Lang F. 2002. *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J*. Vol 21 Pág 22-30.
- Huber, S. M., Gamper, N., Lang, F. 2001. Chloride conductance and volume-regulatory non-selective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Eur. J. Physiol*. Vol 441. Pág 551-558.
- Huber, S. M., Uhlemann, A., Gamper, N. L., Durantón, C., Kremsner, P. G., Lang, F. 2002. *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J*. Vol 21. Pág 22-30.

- Jamieson Q. 2014. The inactivation Mechanisms of *Shaker* Ir and Kv2.1 Potassium Channels: Lessons from pore Mutation. Tesis Doctoral. Case Western Reserve University.
- Kaestner, L., Bollensdorff, C., Bernhardt, I. 1999. Non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1417 pág 9-15.
- Kaestner, L., Christophersen, 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 characterisation. *Bioelectrochemistry*. Vol. 52 pág 117-125.
- Klemic, K. G., Shieh, C., Kirsch, G. E., Jones, S. W. 1998, Inactivation of Kv2.1 Potassium Channels. *Biophys. J*. Vol. 74. Pág 1779-1789
- Lesage, F., Lazduski, M. 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. Vol. 279 Pág F793-F801.
- López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Aldrich, R W. 1993. Effects of External Cations and Mutations in the Pore Region on C-type Inactivation of *Shaker* Potassium Channels. *Receptor and Channels*, Vol. 1, pp. 61-71.
- MacKinnon, R., 2004. Potassium channels and the Atomic basis of selective Ion Conduction. *Biosci. Rep*. Vol. 24 Pág 75-100.
- MacKinnon, R., Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann S. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*. Vol 411. Pág 657-661.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazduski, M., Honoré, E. 1999. Mechano- or Acid stimulation, two Interactive modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel. *J. Cell. Biochem*. Vol 274 Pág 26691-26696.
- Maingret, F., Patel, A., Lesage, F., Lazduski, M., Honoré. 2000. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁺ channels TREK1 and TRAAK. *J. Biol. Chem*. Vol. 275 10128-10133

- Martinac B. 2011. Bacterial Mechanosensitive Channels as a Paradigm for Mechanosensory Transduction. *Cell Physiol Biochem* Vol 28:1051-1060.
- Martinac, B. 2001. Mechanosensitive Channels in Prokaryotes. *Cell Physiol Biochem*. Vol 11. 61-76.
- Martinac, B., Adler, J., Kung, C. 1992. Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *NATURE* Vol 348 pág 261-263.
- Martinac, B., Buechner, M.m Delcour, A. H. Adler, J., Kung, C. 1987. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 84. Pág 2297-2301
- Martinac, B., re. 2014 The ion cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1838 pág 682-691.
- Morais-Cabral J. H., Zhou Y., MacKinnon R. 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity Filter. *NATURE*. Vol 414 Pág 37-42
- Noël J., Zimmermann K., Busserolles J., Deval E., Alloui A., Diochot S. Guy N., y col. 2009. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* Vol 28 Pág 1308-1318.
- Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M., Martinac, B. 2002. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channels gating. *Nat. Struct. Biol.* Vol 9. Pág 696-703.
- Raghuraman, H., Isla., S. M., Mukherjee, S., Roux, B., Perozo, E. 2014 Dynamics transitions at the outer vestibule of the S.A. potassium channel during gating. *PNAS* Vol. 111 Pág 1831-1836.
- Ray E. C., Deutsch C. 2006. A Trapped Intracellular Cation Modulates K⁺ Channel Recovery From Slow Inactivation. *J. Gen. Physiol.* Vol 128.2 Pág 203-217.
- Romero J. G., Zambrano A. 2010 A Kinetic Characterization of the Human Erythrocyte Mechano-Activates K⁺ Channel Inactivation Process. *J. Biophys.* Vol 98 Pág 324a-325a.
- Romero P. J. Whittan R. 1971. The Control by Internal Calcium of Membrane Permeability to Sodium and Potassium. *J. Physiol.* Vol 214 Pág 481-507.

- Romero P. J., Romero E. A. 1999. Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells. *Cell Calcium* Vol. 26 131-137.
- Romero, J. G. 2004 Diseño y Aplicación de un símil físico de capilar sanguíneo para la caracterización biofísica de canales iónicos del eritrocito humano en condiciones fisiológicas. Tesis Doctoral. UCV.
- Romero, J.G. y Zambrano, A.R. 2008. Modulation of human erythrocyte mechano/activated K channel by intracellular Ca. *Biophys. J.* 84:A205.
- Romero, L. O. 2016. Caracterización Parcial del Canal de K⁺ Mecano-Activado del Eritrocito Humano (HEMKCA): Selectividad, Conductancia y Probabilidad de Apertura. Tesis de Grado. UCV.
- Schrempf H., Schmidt O., Rummerlen R., Hinnah S., Muller D., Betzler M., Steinkamp T., Wagner R. 1995. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* Vol 14. Pág 5170-5178.
- Shoshan-Barmantz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., Arbel, N. 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.* Col. 31 Pág 227-285.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Kung, C. 1997. Mechanosensitive Channels of *Escherichia coli*: The MscL gene, Protein, and Activities. *Annu. Rev. Physiol.* Vol 59 Pág 633-657
- Swenson, R. P. Jr., Armstrong, C. M. 1981. K⁺ channels close more slowly in the presence of external K⁺ and Rb⁺. *Nature* Vol. 291 Pág 427-429.
- Thomas, S. I. Y., Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., Gallagher, P. G. 2011. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood.* Vol 118. Pág 2305-2312.
- Thomas, S. LY., Bouyer, G., Cueff, A.k, Egée, S., Glogowska, E., ollivaux, C. 2011. Ion channels in human red blood cell membrane: Actors or relics? *Blood cells, Molecules, and Disises* Vol. 46. Pág 261-265.

- Voet, Donald; Voet, Judith G.; Pratt Charlotte W. 1999. Fundamentals of Biochemistry. Wiley, USA.
- Wood J. M. 1999 Osmosensing by Bacteria; Signals and Membrane-Based Sensors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol 63. Pág 230-262.
- Zhou, M., Cabral J. M., Mann, S., Mackinnon, R. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. NATURE Vol. 411 Pág 657-661.
- Zhou, M., Mackinnon, R., 2004 A Mutant KcsA K⁺ Channel with Altered Conduction properties and selectivity Filter Ion Distribution. J. Mol. Biol. 338 Pág 839-846
- Zhou, Y. MacKinnon, R., Morais-Cabral, J. H. 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity Filter. Nature Vol 414. Pág 37-42.