



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

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL CANAL DE
K⁺ MECANO-ACTIVADO DEL ERITROCITO
HUMANO (HEMKCA): SELECTIVIDAD,
CONDUCTANCIA Y PROBABILIDAD DE
APERTURA.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller **Luis Octavio Romero García** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: **Dr. Antonio M. Gutiérrez**

CARACAS, VENEZUELA

MAYO - 2016

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes suscribimos, los miembros del Jurado Evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Luis Octavio Romero García. C. I. 22.712.753, titulado "CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL CANAL DE K+ MECANO-ACTIVADO DEL ERITROCITO HUMANO (HEMKCA): SELECTIVIDAD, CONDUCTANCIA Y PROBABILIDAD DE APERTURA" 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 27 días del mes de mayo del año 2016, dejando constar que el Prof. Antonio Gutiérrez actuó como coordinador del jurado examinador.



Dr. Pedro Romero



Dra. Cecilia Castillo



Dr. Antonio Gutiérrez

Resumen

Los eritrocitos humanos presentan un riguroso mecanismo de control sobre los procesos que conllevan su retiro del torrente sanguíneo, teniendo una vida media de 120 días. Al ser carentes de núcleo y organelos, su tiempo de vida no está directamente determinado o controlado por fenómenos relacionados a la apoptosis clásica, por lo que hoy en día, no está claro cómo se produce dicho control. Es aceptado que las membranas de estas células se encuentran sometidas a estrés mecánico durante la microcirculación, generándose cambios periódicos que conllevan al proceso de senescencia. En nuestro laboratorio estudiamos los procesos moleculares subyacentes a este reloj biológico y se ha propuesto la existencia de un canal de K^+ , cuya probabilidad de apertura depende de la presión aplicada sobre la membrana, como el mecanismo molecular detrás de dicho reloj (Hipótesis del K^+). A este canal se le denominó HEMKCA (del inglés: human erythrocyte mechano-activated K^+ channel A); el cual presenta una conductancia media de 24 pS y es modulado por $[Ca^{2+}]_i$.

Con la técnica del T.U.G.O. Patch clamp se demostró que el HEMKCA es un canal rectificador hacia adentro débil y se evidenció que al reemplazar el K^+ por Rb^+ este comportamiento rectificador disminuye. Se realizaron estudios de selectividad en condiciones simétricas y no fue posible detectar conductancias de Na^+ , Li^+ o Cs^+ a través del canal en estas condiciones, sin embargo, se determinó que la conductancia del HEMKCA a Rb^+ es 1,7 veces menor que a K^+ . También se determinó la secuencia de selectividad para estos iones en condiciones bi-iónicas (P_k/P_x) con el ion de prueba en la pipeta: K^+ (1) > Rb^+ (1,49) > Cs^+ (16,36) > Li^+ (22,53) > Na^+ (34,95); y con el ion de prueba en la cámara experimental es: K^+ (1) > Rb^+ (2,05)

> Cs⁺ (5,14) > Na⁺ (11,89) > Li⁺ (25,39). Finalmente, se diseñó un protocolo con el que fue posible estudiar el efecto del potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura. Demostrándose que esta última presenta una dependencia del potencial de membrana, siendo esta mayor a potenciales de membrana negativos con respecto a positivos en condiciones simétricas.

Palabras clave: Eritrocito humano, senescencia, HEMKCA, conductancia, rectificación, selectividad, bi-iónica

Dedicado a Francisco, Luis, Juana y María

Agradecimientos

A mi familia.

A Antonio Gutiérrez.

A Alejandro Mata, Ángeles Zambrano, Christian Calderón, Daniel Landi, Diana Isturiz, Fernando González, Naileth González y Yeimar Portillo.

A mis amigos.

A mis profesores.

A los donantes de sangre.

A la Universidad Central de Venezuela.

Al Instituto de Biología Experimental.

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

Y a la Aldea.

Gracias.

Índice general

Introducción	1
Membranas biológicas	1
Canales iónicos	2
Canales de Potasio	4
Familia de canales rectificadores hacia adentro: Kir	10
Familia de canales de dos-poros: K_{2p}	11
Familia de los canales voltaje dependientes: Kv	12
Familia de canales Slo: KCa	13
Familia de canales de K⁺ de baja conductancia: SKCa, IKCa1	13
Canales mecano-sensibles	14
El eritrocito humano	15
Mecanismos transportadores involucrados en la homeóstasis de cationes	17
Canales iónicos descritos en la membrana del eritrocito humano	18
Canales catiónicos	18
Canal Gardós	18
Canal catiónico no selectivo voltaje dependiente	19
Canal catiónico no selectivo	20
NMDAr	20
Canal TRPC6	20
P_{sickle}	21
Conductancias de Ca²⁺	21
Canales aniónicos	22
Canal de cloruro de baja conductancia (ClC-2)	22
Canal aniónico voltaje dependiente (VDAC)	22
Antecedentes	23
Corrientes del HEMKCA en la membrana del eritrocito humano	23
Senescencia del eritrocito humano	28
Objetivos	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
Materiales y métodos	33

Obtención del material biológico	33
Medidas Electrofisiológicas.....	33
Patch clamp	34
El T.U.G.O. Patch clamp (del inglés: The U-Shape Giga Ohm Patch clamp)	35
Elaboración de pipetas	37
Manipulación y visualización de las células	37
Formación del giga sello.....	38
Soluciones experimentales	38
Adquisición de los datos	40
Convenciones.....	41
Protocolos de estimulación.....	41
Cálculos y análisis de los datos	42
Resultados	47
Conductancia	47
Selectividad	50
Condiciones simétricas.....	50
Condiciones bi-iónicas.....	56
Probabilidad de apertura	63
Discusión.....	70
Efecto del potencial de membrana sobre la conductancia.....	70
Selectividad	73
Efecto del potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura	76
Conclusiones	79
Bibliografía.....	81

Índice de figuras

Figura 1. Representación del canal de K^+ (KcsA) con sus cuatro subunidades coloreadas diferentemente .	5
Figura 2. Estructura del filtro de selectividad de KcsA.....	6
Figura 3. Configuraciones específicas en el filtro de selectividad y conformaciones del mismo	8
Figura 4. Clasificación de los canales de K^+ acorde a la estructura de sus subunidades.	10
Figura 5. A: Curva I-V característica de un rectificador hacia adentro “débil” y uno “fuerte”	11
Figura 6. Algunos mecanismos de transporte en la membrana del eritrocito humano.	18
Figura 7. Efecto de la presión sobre la actividad de tipo canal en un parche de membrana de eritrocito.	23
Figura 8. Reversibilidad del efecto de la presión.	25
Figura 9. Relación corriente vs voltaje para el canal de presión en condiciones no simétricas.	26
Figura 10. Esquema comparativo entre las formas de la punta de una pipeta de T.U.G.O. Patch clamp y una pipeta para Patch clamp clásico.	36
Figura 11. Esquema de la forma que adopta un eritrocito en el interior de una pipeta de T.U.G.O. Patch clamp.....	37
Figura 12. Esquema del posible proceso de formación del giga sello en la pipeta del T.U.G.O. Patch clamp.....	38
Figura 13. Protocolo utilizado para estudiar el efecto del potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura.	42
Figura 14. Trazo de corrientes iónicas fluyendo a través de un parche de membrana en función del tiempo.	42
Figura 15. Histograma de amplitud.....	43
Figura 16. Segmentos de un registro del HEMKCA expuesto a condiciones simétricas a potenciales de membrana de -120 a +120 mV.	48
Figura 17. Curva I-V del HEMKCA construida a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+	49

Figura 18. Verificación de la presencia del HEMKCA en un parche de membrana “silente” bajo condiciones simétricas de Na^+	52
Figura 19. Verificación de la presencia del HEMKCA en un parche de membrana “silente” bajo condiciones simétricas de Li^+	53
Figura 20. Segmentos de un registro del HEMKCA expuesto a condiciones simétricas de Rb^+ a potenciales de membrana de -120 a +120 mV.....	54
Figura 21. Curvas I-V del HEMKCA construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+ y Rb^+	55
Figura 22. Segmentos de dos registros del HEMKCA expuestos a condiciones bi-iónicas con Rb^+ como el ion de prueba a potenciales de -120 a 120 mV.....	57
Figura 23. Segmentos de tres registros del HEMKCA expuestos a condiciones bi-iónicas A para su respectivo ion de prueba (Na^+ , Li^+ o Cs^+ en la pipeta) a potenciales de membrana de -80 a 120 mV.	58
Figura 24. Segmentos de tres registros del HEMKCA expuestos a condiciones bi-iónicas B para su respectivo ion de prueba (Na^+ , Li^+ o Cs^+ en la cámara experimental) a potenciales de membrana de -120 a 40 mV.	59
Figura 25. Curvas I-V del HEMKCA construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones bi-iónicas A.	60
Figura 26. Curvas I-V del HEMKCA construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones bi-iónicas B.	61
Figura 27. Activación del HEMKCA por efecto de la presión.	64
Figura 28. Gráfico de barras de la P_o inicial del HEMKCA en parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+ a -60 mV de 10 experimentos diferentes.	65
Figura 29. Decaimiento de la P_o del HEMKCA en el tiempo.	66
Figura 30. Histograma de la probabilidad de apertura determinada en periodos de 5 s, del HEMKCA a -60 mV en el tiempo.	67
Figura 31. Registro típico del estudio del efecto del V_m sobre la P_o del HEMKCA.....	68
Figura 32. Gráfico P_o -V del HEMKCA.	69

Índice de tablas

Tabla 1. Concentraciones aproximadas de las especies iónicas más importantes dentro y fuera del eritrocito humano en condiciones fisiológicas normales.	17
Tabla 2. Lista de los compuestos químicos utilizados en las soluciones experimentales.	39
Tabla 3. Composición de la soluciones que se utilizaron para estudiar como el potencial transmembrana afecta a la conductancia y la probabilidad de apertura del canal.....	39
Tabla 4. Composición de las soluciones que se utilizaron en los estudios de selectividad en condiciones simétricas.....	39
Tabla 5. Composición de las soluciones que se utilizaron en los estudios de selectividad en condiciones bi-iónicas A.....	40
Tabla 6. Composición de las soluciones que se utilizaron en los estudios de selectividad en condiciones bi-iónicas B.....	40
Tabla 7. Conductancias de canal unitario en función del potencial de membrana fijado del HEMKCA expuesto a condiciones simétricas de K^+	50
Tabla 8. Resumen de los potenciales de cero corriente estimados a partir de los ajustes polinómicos y manuales realizados sobre los gráficos I-V del HEMKCA expuesto a condiciones bi-iónicas A.	62
Tabla 9. Resumen de los potenciales de cero corriente estimados a partir de los ajustes polinómicos y manuales realizados sobre los gráficos I-V del HEMKCA expuesto a condiciones bi-iónicas B.....	62

Introducción

El eritrocito humano es una de las células más estudiadas a lo largo de la historia de la biología. Sin embargo, hoy en día aún se discuten que mecanismos están involucrados con su senescencia. Se han propuesto varias hipótesis, donde mecanismos que regulan el flujo de cationes a través de la membrana del eritrocito causan la génesis del envejecimiento de esta célula (Romero, 2004; Romero y Hernández, 2008). El objeto de estudio en este trabajo es el canal de K^+ mecano-activado del eritrocito humano o HEMKCA (del inglés *Human Erythrocyte Mechano-Activated K^+ Channel*) (Romero, 2004). Este canal, como se discutirá más adelante, parece tener un rol fundamental en el control de la vida media de los eritrocitos humanos.

Membranas biológicas

Las células están rodeadas por una estructura compleja denominada membrana plasmática, la cual separa el medio interno de la célula o citoplasma del medio externo actuando como una barrera relativamente permeable a iones y moléculas orgánicas. “El modelo del mosaico fluido de la estructura de las membranas celulares” (Singer y Nicolson, 1972) es el más aceptado hoy en día. Ellos propusieron que la estructura general de las membranas es una matriz fluida lipídica donde las cadenas no polares de fosfolípidos interactúan mediante fuerzas de Van der Waals lejos del medio hidrofílico, mientras que los extremos polares de estos lípidos se encuentran orientados hacia el medio acuoso.

Asociadas a dicha membrana se encuentran proteínas integrales de membrana, proteínas periféricas y proteínas de anclaje. Las proteínas integrales atraviesan la membrana teniendo de

esta manera dominios hidrofóbicos que interactúan extensamente con el centro hidrofóbico de la membrana, y dominios hidrofílicos hacia las caras de la misma. Las proteínas periféricas interactúan con regiones externas de la membrana mediante fuerzas electrostáticas o puentes de hidrogeno; y las proteínas de anclaje interactúan con la membrana mediante enlaces covalentes asociando otras proteínas a dicha membrana. En general, las membranas presentan acoplamientos entre proteínas integrales de membrana y el citoesqueleto, heterogeneidades lipídicas como microdominios fosfolípidicos anulares alrededor de proteínas integrales de membrana, asimetría fosfolípida transmembrana, separaciones de fases lipídicas y microdominios laterales de conjuntos ricos o pobres en colesterol (Freedman, 2012; Nicolson, 2014).

Canales iónicos

Las proteínas integrales de membrana incluyen transportadores y canales iónicos que actúan como poros de baja resistencia (Freedman, 2012). Los canales iónicos son proteínas altamente especializadas, las cuales proveen vías de paso a los iones a través de la membrana. Los canales exhiben las siguientes propiedades esenciales: i) permiten el paso rápido de iones en algunos casos llegando a tasas de transporte de 10^8 iones/s (MacKinnon, 2003); ii) son capaces de selectivamente “permitir” el paso de un tipo específico de ion, esta propiedad es denominada selectividad iónica (Eisenman y Horn, 1983); y iii) La actividad de los canales iónicos está gobernada por mecanismos que controlan el comienzo y la duración de su estado conductivo, los procesos involucrados con este control se denominan “procesos de activación” (del inglés:

gating) (Cordero-Morales y col, 2006). Estos procesos de activación resultan en la apertura o cierre del poro en regiones denominadas “compuertas” (Cuello y col, 2010).

Según su proceso de *gating*, los canales iónicos se pueden clasificar en tres grupos (Hille, 2001; MacKinnon, 2003): i) Los canales activados por ligando, cuya apertura del poro esta energéticamente acoplada con la unión a un ion (Marty, 1981), una molécula orgánica o una proteína (Wickman y Clapham, 1995). ii) Los canales activados por voltaje o “voltaje-dependientes”, en los cuales la apertura del poro esta energéticamente acoplada al movimiento de un sensor de voltaje dentro del campo eléctrico de la membrana (Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000); y iii) los canales mecano activados, cuya apertura del poro esta energéticamente acoplada a la deformación mecánica de la membrana celular (Brohawn y col, 2014). Al controlar la duración del estado conductivo de un canal, estos procesos a su vez controlan la probabilidad de apertura (P_o) del mismo. Esta se define como la fracción de tiempo que ha permanecido un canal en su estado conductivo con respecto a un tiempo determinado (Colquhoun y Sigworth, 1995).

La actividad de los canales iónicos genera cambios en la conductancia de las membranas biológicas resultando en el flujo de corrientes iónicas a través de las mismas. La conductancia eléctrica es la medida de cuan “fácil” fluye la corriente eléctrica entre dos puntos y su cantidad inversa se denomina resistencia. La ley de Ohm establece que la corriente eléctrica que fluye entre dos puntos a través de un conductor es directamente proporcional a la diferencia de potencial entre dichos puntos. Esta relación puede ser expresada en función de la conductancia o la resistencia eléctrica:

$$R = \frac{V}{I} \quad (1) \quad ; \quad G = \frac{I}{V} = \frac{1}{R} \quad (2)$$

Donde R representa la resistencia en ohmios (Ω), I la corriente eléctrica en amperios (A), V la diferencia de potencial medida entre dos puntos en voltios (V) y G la conductancia en siemens (S).

Canales de Potasio

Los canales de potasio conducen iones K^+ a través de la membrana celular a favor del gradiente electroquímico para dicho ion (Hille, 2001; MacKinnon, 2003). Su secuencia de aminoácidos es fácil de reconocer debido a que estos canales tienen un segmento llamado “la secuencia firma” de los canales de K^+ (Heginbotham y col, 1994). Esta secuencia se repite (con pequeñas variaciones) en todos los canales de K^+ conocidos y codifica un elemento estructural llamado filtro de selectividad, cuya función es prevenir el paso de otros iones pero permitir la conducción específica de K^+ a través del canal.

Estos canales funcionan con una exquisita selectividad al K^+ sin comprometer las tasas de conducción, las cuales se aproximan al límite de difusión ($10^7 - 10^8$ iones por segundo con gradientes electroquímicos típicos de una célula) (MacKinnon, 2003). Las estructuras de las subunidades que conforman al canal permiten entender estos aspectos. El poro de los canales de K^+ está compuesto por cuatro subunidades idénticas que rodean simétricamente una vía central de conducción iónica (Figura 1 A) (Sigworth, 1994; Doyle y col, 1998). Cada subunidad contiene dos α -hélices transmembrana denominadas: hélice “interna” (más cercana a la vía de conducción) y “externa” (más lejana a la vía de conducción), además de una hélice inclinada denominada “hélice del poro” (Figura 1 B en rojo) que recorre hasta la mitad de la bicapa lipídica

apuntando su carga negativa del extremo C-terminal hacia la vía de conducción. Cerca del punto medio de la membrana, donde la barrera energética al paso de iones es mayor debido a la hidrofobicidad del medio, la vía de conducción presenta un diámetro cercano a los 10 ångström (Å) formando una cavidad llena de agua. La presencia de esta cavidad permite que un ion K^+ se hidrate en el centro de la membrana, esto en conjunto a la presencia de las cargas negativas C-terminal de las hélices de poro orientadas hacia la vía de conducción, permite que se establezca un ion K^+ en el centro de dicha membrana. De esta manera los canales de potasio superan la repulsión electrostática que experimentarían los iones K^+ al moverse desde una masa de agua hacia un ambiente con una baja constante dieléctrica como es el interior de una membrana (Roux y MacKinnon, 1999; MacKinnon 2003), haciendo posible las altas tasas de conducción (MacKinnon, 2004).

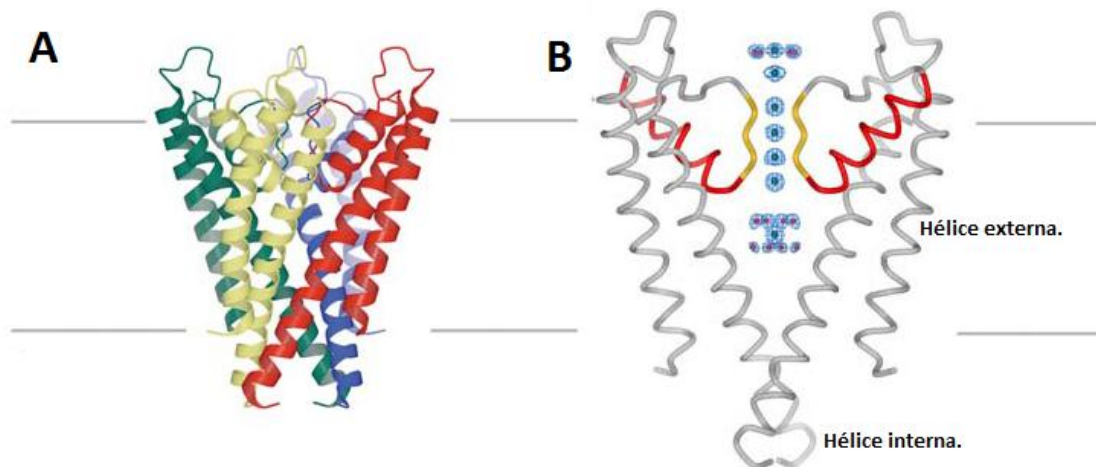


Figura 1. A: Representación del canal de K^+ (KcsA) con sus cuatro subunidades coloreadas diferentemente (el canal se encuentra orientado con su lado extracelular hacia arriba); **B:** El canal de K^+ (KcsA) con solo dos de sus subunidades. Las "hélices de poro" son mostradas en rojo y el filtro de selectividad en amarillo; la densidad electrónica a lo largo de la vía de conducción es mostrada en azul. Modificado de MacKinnon, (2004).

La selectividad a potasio ocurre en el filtro de selectividad (Figura 1 B en amarillo). Aquí, los iones de K^+ se encuentran con cuatro capas igualmente espaciadas de átomos de oxígeno los cuales crean cuatro sitios de unión numerados del S1 al S4 desde el lado extracelular hacia el intracelular (MacKinnon, 2003). En estos sitios los iones K^+ se unen en un estado deshidratado rodeados por ocho átomos de oxígeno de la proteína. El arreglo de los átomos de oxígeno que rodean cada sitio de unión en el filtro de selectividad es muy similar al arreglo de las moléculas de agua del ion de K^+ hidratado en la cavidad central. Adicionalmente se ha identificado otro sitio de unión en la estructura, numerado S0. Este se encuentra localizado en la apertura extracelular del filtro, donde el ion se encuentra parcialmente hidratado y parcialmente coordinado por los átomos de oxígeno de la proteína (Figura 2). De esta forma el filtro de selectividad crea una “fila” de sitios de unión de iones K^+ que imitan la capa de solvatación de un ion K^+ hidratado (MacKinnon, 2003). Así los iones K^+ son capaces de difundir del agua hacia el filtro de selectividad donde el costo energético de la deshidratación es compensado (MacKinnon, 2003; 2004).

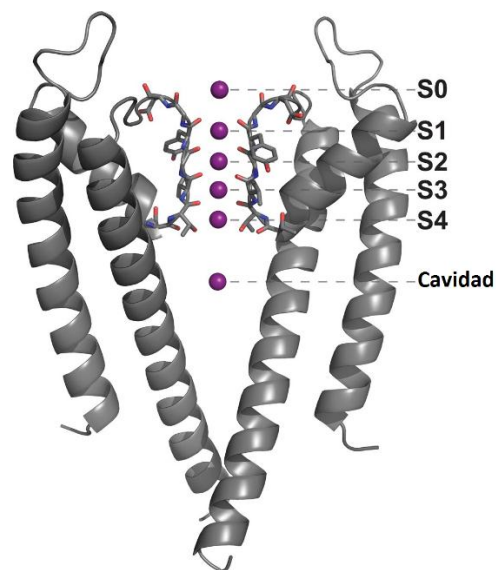


Figura 2. Estructura del filtro de selectividad de KcsA (dos subunidades). Los átomos de oxígeno (rojo) “coordinan” iones K^+ (esferas moradas) en los sitios (S0—S4). Adaptado de (Zhou y col, 2001).

Entendemos dos razones para las tasas altas de conducción en el marco de alta selectividad: (i) el filtro de selectividad contiene más de un ion en el de manera que la repulsión entre iones “estrechamente espaciados” ayuda a superar la afinidad intrínseca que cada ion tiene por su sitio de unión (Morais-Cabral y col, 2001; Zhou y col, 2001). A lo largo del filtro de selectividad hay, en promedio, dos iones K^+ presentes en un momento dado y estos residen predominantemente en dos configuraciones (1,3 y 2,4) (Figura 3 A). En cada configuración, dos iones K^+ se encuentran separados por una molécula de agua y mientras un ion entra la “fila” desde un lado del filtro, genera que otro salga por el otro lado. La dirección del flujo está determinada por el gradiente electroquímico para K^+ ; y (ii) la estructura del filtro de selectividad depende de la presencia de iones K^+ (Zhou y col, 2001). El estado conformacional conductivo del filtro requiere de la presencia de dos iones K^+ y es la entrada del segundo ion que induce el cambio conformacional (Figura 3 B). Una fracción de la energía de unión trae como consecuencia el cambio de estructural del filtro y como resultado los iones se unen con una fuerza menor. Uniones “débiles” son un prerequisite de las tasas altas de conducción (MacKinnon, 2004).

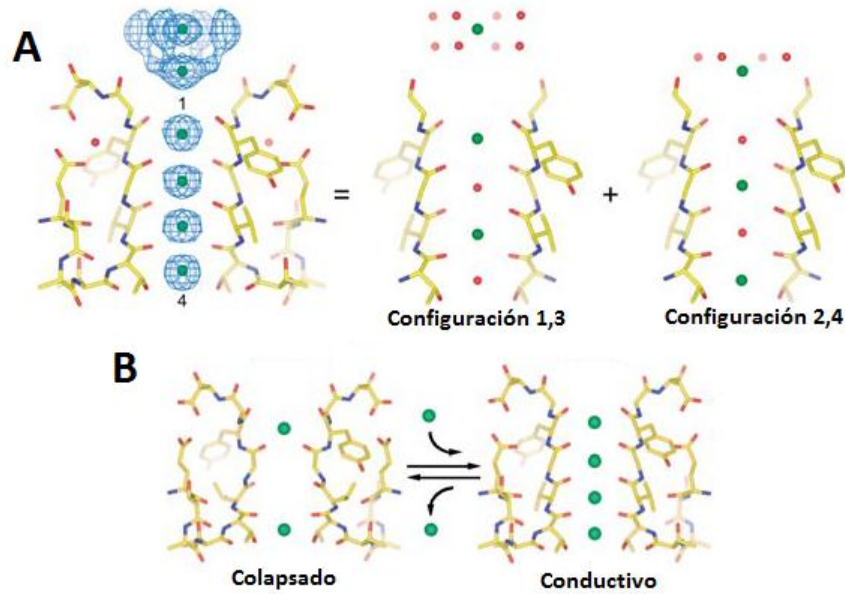


Figura 3. A: Configuraciones específicas en el filtro de selectividad: 1,3 y 2,4; **B:** Conformaciones del filtro de selectividad. A bajas concentraciones de iones K^+ , un solo ion de K^+ reside en cualquiera de los dos sitios de unión cercanos a los extremos del filtro, el cual se encuentra colapsado en el medio. En altas concentraciones de iones K^+ , un segundo ion entra el filtro a medida que genera el cambio conformacional del filtro al estado conductivo. Modificado de MacKinnon (2004).

En resumen, los canales de potasio conducen iones K^+ específicamente ya que su filtro de selectividad contiene múltiples centros de unión que mimetizan la capa de solvatación de un ion K^+ hidratado y logran tasas altas de conducción explotando la repulsión electrostática entre iones “estrechamente espaciados” y el acoplamiento de la conformación del filtro de selectividad con las interacciones electrostáticas dentro de dicho filtro (MacKinnon, 2004).

La diversidad entre los diferentes miembros de la familia de los canales de K^+ está relacionada con su estructura y las formas en las que estos son activados. La activación de los canales de K^+ esta mediada por la apertura del poro en su compuerta de activación (Cuello y col, 2010). Esta apertura, a su vez se encuentra regulada por partes especializadas de los canales, dominios estructurales, que actúan como transductores de la energía contenida en un estímulo

dado. Entonces, los diferentes tipos de canales de K^+ se activan en respuesta a diferentes estímulos.

Ejemplos típicos son: un cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} , el nivel de una determinada subunidad de alguna proteína G, el valor del potencial de membrana o algún estímulo mecánico (MacKinnon, 2003). Los canales de K^+ activados por ligando típicamente presentan un dominio citoplasmático o extracelular en el cual se une el ligando, los activados por voltaje tienen dominios integrales de membrana en los cuales se detectan diferencias de voltaje y los mecano-sensibles se discutirán en la siguiente sección.

Si bien la secuencia que codifica al filtro de selectividad se mantiene en todos los canales de K^+ conocidos, sus otras partes presentan una considerable diversidad estructural (MacKinnon, 2004; González y col, 2012). Los canales de K^+ pueden ser divididos en cuatro clases estructurales (Figura 4): i) La familia de rectificadores hacia adentro (Kir), cuyas subunidades contienen dos segmentos transmembrana que flanquean el dominio formador del poro y se ensamblan en tetrámeros; ii) la familia de canales de K^+ de dos poros con cuatro segmentos transmembrana cuyas subunidades se ensamblan en dímeros; iii) la familia de canales de un poro con seis segmentos transmembrana que incluye la subfamilia de los canales voltaje dependientes, los canales de K^+ - activados por Ca^{2+} de baja conductancia; y iv) la subfamilia de canales Slo con miembros que presentan 6 o 7 segmentos transmembrana (González y col, 2012).

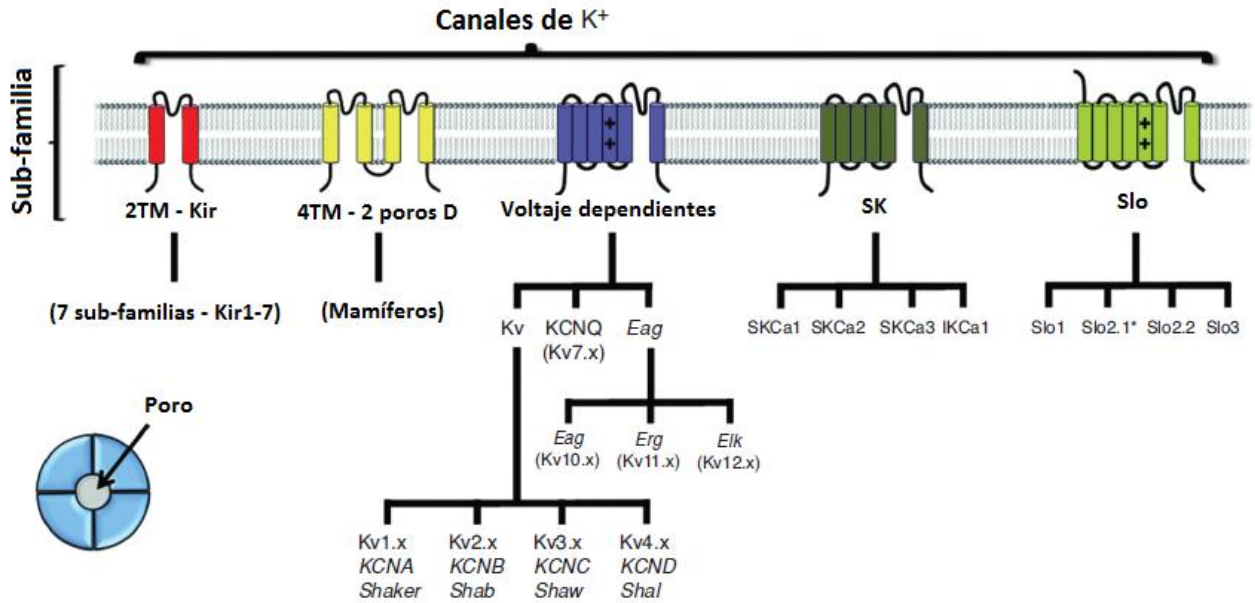


Figura 4. Clasificación de los canales de K^+ acorde a la estructura de sus subunidades. Estos canales pueden ser agrupados en familias de dos segmentos transmembrana (2TM; Kir), 4TM (dominio de dos poros), 6TM (voltaje dependientes y SK) y 7TM (Slo). Modificado de González y colaboradores (2012).

Familia de canales rectificadores hacia adentro: Kir

Un canal “rectifica hacia adentro” cuando media el flujo de corriente (carga positiva) hacia el interior de la célula con mayor “facilidad” que hacia afuera (González y col, 2012). En los canales Kir, es aceptado que la rectificación hacia adentro surge de un bloqueo voltaje-dependiente inducido por Mg^{2+} o poliaminas (Matsuda y col, 1987; Lopatin y col, 1994; Lopatin y col, 1995; Mathur y col, 1997). No todos muestran el mismo grado de rectificación hacia adentro, hay rectificadores (Kir) “débiles” y “fuertes” (Figura 5) (González y col, 2012).

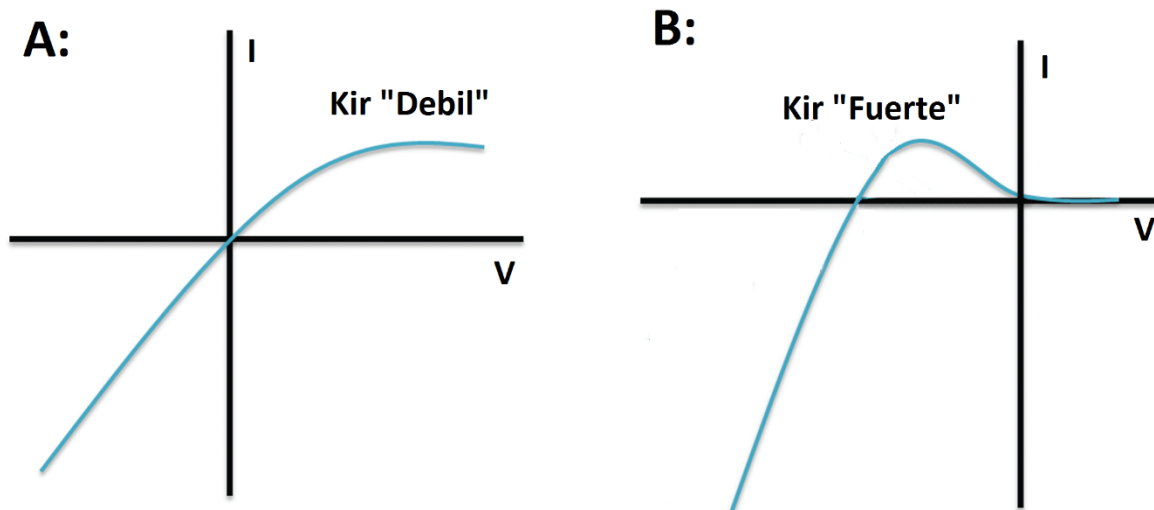


Figura 5. A: Curva I-V (corriente en función del voltaje) característica de un rectificador hacia adentro “débil”; B: Curva I-V característica de un rectificador hacia adentro “fuerte”. Modificado de González y colaboradores (2012).

El gating de los canales Kir puede ser modulado por nucleótidos como ATP y ADP, fosfoliración, proteínas-G y PIP₂. Estos canales pueden ser bloqueados por Ba²⁺ y Cs⁺ (Hibino y col, 2010b). Sin embargo, la sensibilidad al [Ba²⁺]_o depende del tipo de canal Kir, se pueden encontrar grandes diferencias entre una subfamilia y entre diferentes subfamilias de canales Kir (Shieh y col, 1999; Hibino y col, 2010a). Las siete subfamilias de canales Kir pueden ser clasificadas en cuatro grupos funcionales (Hibino y col, 2010): i) Kir clásicos; ii) canales activados por proteínas-G; iii) Canales de K⁺ ATP-sensibles; y iv) canales transportadores de K⁺.

Familia de canales de dos-poros: K_{2p}

Estos canales de potasio son formados por dos homo-dímeros, cada uno formando un poro haciendo un dímero de dos sub-unidades (González y col, 2012). Son regulados por una

extensa variedad de estímulos, por ejemplo: pH, temperatura y estrés mecánico (Talley y col, 2001; Plant y col, 2005). Debido a esta diversidad de respuestas al ser confrontados a distintos estímulos, los miembros de la familia K_{2p} fueron divididos en seis subfamilias (Honore, 2007): i) mecano-activados; ii) activados por condiciones alcalinas; iii) activados por Ca^{2+} ; iv) rectificadores hacia adentro débiles; v) inhibidos por condiciones ácidas; e vi) inhibidos por Halotano.

Familia de los canales voltaje dependientes: Kv

Estos canales de potasio pasan del estado cerrado al estado conductivo o viceversa dependiendo de cambios en el potencial transmembrana. La estructura tetramérica de los canales Kv está conformada por dos dominios funcional y estructuralmente independientes: el poro y el sensor de voltaje. El dominio del poro está conformado por cuatro subunidades las cuales están organizadas simétricamente rodeando la vía de conducción (Doyle y col, 1998). Los dominios del sensor de voltaje están posicionados en la periferia del canal y consisten en cuatro segmentos transmembrana (denominados de S1 a S4) (Li-Smerin y col, 2000; Jiang y col, 2003; Ruta y MacKinnon, 2004). Re-arreglos estructurales en el sensor de voltaje en respuesta a cambios en el potencial transmembrana, particularmente en S4 que incluye aminoácidos positivamente cargados en su estructura, resultan en cambios conformacionales en el poro. Estos cambios pueden generar transiciones entre el estado conductivo y el cerrado del canal mediante acoplamientos entre los dominios funcionales mencionados (González y col, 2012).

Familia de canales Slo: KCa

Esta familia es caracterizada por canales de K^+ que presentan valores de conductancia altos (Salkoff y col, 2006). En particular Slo1 (BK), con una conductancia de canal unitario de 250 pS (en condiciones simétricas de 100mM de K^+) (González y col, 2012). Esta familia está conformada por cuatro miembros (González y col, 2012): i) Slo1, el cual es activado por Ca^{2+} y voltaje; ii) Slo2 (KCa4) activado por $[Ca^{2+}]_i$ y $[Cl^-]_i$ (Yuan y col, 2000); iii) Slo2.1 y Slo2.2 (en mamíferos) activados por $[Na^+]_i$ y $[Cl^-]_i$ (Yuan y col, 2000; Bhattacharjee y col, 2003); y iv) Slo3, el cual es activado por voltaje y condiciones internas de alcalinización. Esta familia establece un enlace entre el metabolismo iónico de la célula y la conductancia de membrana gracias a su habilidad de “sentir” cambios en las concentraciones intracelulares de iones (H^+ , Na^+ y Ca^{2+}) (González y col, 2012).

Familia de canales de K^+ de baja conductancia: SKCa, IKCa1

Los canales SK (del inglés: *small conductance*) presentan una conductancia entre los 10 y 14 pS (Blatz y Magleby, 1986; Park, 1994). Los canales SK son canales de potasio activados por incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ y se dividen en tres sub-tipos (González y col, 2012): KCa2.1 (SKCa1), KCa2.2 (SKCa2) y KCa2.3 (SKCa3). Esta familia también incluye un canal de conductancia intermedia (20 – 80 pS): KCa3.1 (IKCa1). Este último es el único miembro de esta familia no sensible a la apamina (González y col, 2012). Los canales KCa2 tienen seis segmentos transmembrana y una región de tipo “P-loop”. Estos son altamente sensibles al calcio, siendo activados por debajo del nivel μM (Park, 1994; Kohler y col, 1996; Xia y col, 1998) y bajas $[Ca^{2+}]_i$ (EC_{50} de 300 – 700 nM) inducen una rápida activación (Stocker y col, 2004).

Los canales KCa₂ forman un complejo estable con calmodulina (CaM), la cual es una proteína que actúa como un “sensor” de calcio (Maylie y col, 2004). En el caso de estos canales, es la unión del Ca²⁺ con CAM que conlleva a la apertura del canal. Una vez activado, las corrientes fluyendo a través de canales KCa₂ presentan rectificación hacia adentro (Kohler y col, 1996), la cual ha sido atribuida al bloqueo voltaje-dependiente del filtro de selectividad por cationes divalentes (Soh y Park, 2001; 2002).

Canales mecano-sensibles

Los canales mecano-sensibles son proteínas integrales de membrana capaces de detectar y responder ante una variedad amplia de estímulos mecánicos. Estos canales reflejan un acoplamiento entre los estados conformacionales de la proteína con la mecánica de la membrana que la rodea (Haswell y col, 2011). La propiedad funcional de estos canales es la habilidad de mediar el flujo de iones a través de la membrana en una manera dependiente de la tensión (Haswell y col, 2011). De la manera más simple, los canales mecano-sensibles pueden ser descritos como un equilibrio dependiente de tensión entre dos estados, cerrado y abierto, que difieren en conductancia (Sukharev y col, 1997). Desde el punto de vista estructural de estos canales, los parámetros importantes son la sensibilidad del equilibrio conformacional a la tensión y las diferencias entre las propiedades funcionales entre estos estados conformacionales.

La bicapa lipídica es un medio dinámico que afecta directamente la función y la distribución espacial de las proteínas de membrana (Engenlan, 2005; Andersen y Koeppe, 2007). El gating de canales iónicos dependientes de fuerzas mecánicas puede en principio ocurrir: i) directamente a través de la bicapa lipídica o ii) a través de proteínas accesorias formadoras de

ataduras (Kung, 2005). El gating mediado por la bicapa lipídica puede ocurrir si una fuerza induce tensión en la membrana celular resultando en cambios que alteren el balance energético entre las conformaciones de las proteínas de membrana esto, por ejemplo, puede conllevar a la estabilización del estado abierto de un canal (Phillips y col, 2009). Cambios locales en la curvatura de la membrana han sido sugeridos experimentalmente como una forma de modular numerosos canales mecanosensibles (Perozo y col, 2002; Chemin y col, 2007). También se ha demostrado que el canal mecanosensible MscL es más sensible a la tensión en membranas más delgadas debido al desacoplamiento hidrofóbico (del inglés: *hydrophobic mismatch*) (Perozo y col, 2002; Bavi y col, 2014). El desacoplamiento hidrofóbico la diferencia de la longitud de la región hidrofóbica de la proteína integral respecto al ancho de la región hidrofóbica de la membrana en la que se encuentra dicha proteína (Duque y col, 2002). El gating mediado por ataduras puede ocurrir si un estímulo mecánico es transmitido a lo largo de proteínas accesorias u otras estructuras macromoleculares (citoesqueleto o matriz extracelular) a las cuales se encuentre unido el canal (Kung, 2005; Hamill, 2006); el valor crítico de tensión que genera el gating de un canal mecano-sensible depende de las propiedades de la membrana como su grosor y composición, incluyendo la presencia o ausencia de lípidos que induzcan curvatura (Haswell y col, 2011).

El eritrocito humano

Los eritrocitos humanos son células altamente diferenciadas y especializadas en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre. Estas células permiten el intercambio

de estos gases entre el medio y las células que componen los tejidos. Son carentes de núcleo como de otros organelos celulares (Freedman, 2001). Los eritrocitos son capaces de transportar oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos donde es liberado y se enlaza dióxido de carbono. Dado este intercambio, los eritrocitos regresan a través del sistema circulatorio a los pulmones donde se libera el dióxido de carbono al ambiente y se repite el ciclo. Se puede afirmar entonces que estas células se enfrentan a diversos cambios internos como condiciones ambientales cíclicamente durante su vida. Entre estos destacan: Los cambios en las condiciones oxidativas del citoplasma al tomar y liberar O_2 y CO_2 en los pulmones y tejidos; y el estrés mecánico al que son sometidos al pasar por el lecho capilar.

Los eritrocitos humanos tienen una forma discoidal bicóncava la cual le permite a la célula someterse a deformaciones manteniendo un área de superficie constante (Tse y Lux, 2001). Presentan un diámetro promedio de $8\ \mu m$, un grosor de $2\ \mu m$ en el anillo exterior y $1\ \mu m$ en el interior (Dao y col, 2006; Freund 2013). Su volumen está alrededor de $90\ \mu m^3$ y su área de superficie de $140\ \mu m^2$ (Yawata, 2003). Son extraordinariamente flexibles, siendo capaces de atravesar capilares con diámetros de 2 a $4\ \mu m$ y lo suficientemente deformables de manera que recuperan su forma original una vez cesado el estrés mecánico al que son sometidos (Mohandas y Morrow, 2000; Li y col, 2007).

Con respecto al tiempo de vida, cada uno de los 25 trillones de eritrocitos en un humano adulto promedio vive 120 ± 4 días (Arese y col, 2005) con una tasa de reemplazo correspondiente a la liberación de 3 millones de células por segundo. 1 eritrocito recorre el sistema circulatorio en un promedio de 20 segundos (Pierigè y col, 2008). Esto significa que en 120 días circula dicho sistema más de 500.000 veces. Como consecuencias de la repetida circulación ocurren cambios

en la membrana de los eritrocitos que hacen a la célula susceptible al reconocimiento selectivo por macrófagos y la subsecuente fagocitosis (bazo, hígado y ganglios linfáticos). Este proceso normalmente se encuentra en equilibrio con la formación de nuevos eritrocitos (o eritropoyesis).

Mecanismos transportadores involucrados en la homeóstasis de cationes

En la Tabla 1 se resumen las concentraciones de las especies iónicas más importantes dentro y fuera del eritrocito en condiciones fisiológicas normales. El estado estacionario de estas concentraciones representa un balance entre el transporte activo y la fuga pasiva de estos iones. En el eritrocito humano, la permeabilidad de la membrana al Cl^- es cien veces mayor que al K^+ o al Na^+ . En consecuencia el potencial de membrana es consistente con el potencial de equilibrio del Cl^- (alrededor de -11 mV) (Freedman, 2001). El mantenimiento de estas concentraciones depende de varios mecanismos como lo son las bombas dependientes de la hidrólisis de ATP, transportadores pasivos impulsados por gradientes y diferentes canales (Gallagher y col, 1998). En la Figura 6 se observa un esquema de los más destacados en el eritrocito.

Tabla 1. Concentraciones aproximadas de las especies iónicas más importantes dentro y fuera del eritrocito humano en condiciones fisiológicas normales.

Ion	Concentración intracelular (mM)	Concentración extracelular (mM)
K^+	143	5
Na^+	7	145
Ca^{2+}	5 – 70 nM*	1,8
Cl^-	105	150

Adaptado de Lew y col. (1982), Freedman (2001) y Minetti y col. (2013).

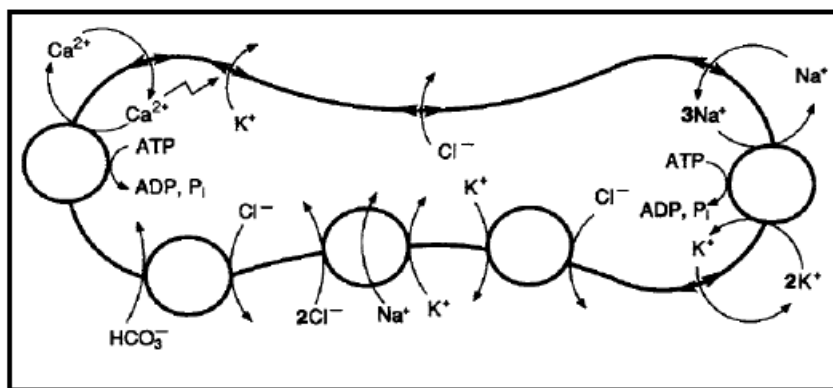


Figura 6. Algunos mecanismos de transporte en la membrana del eritrocito humano. Empezando por la Na^+/K^+ -ATPasa y las vías pasivas de Na^+ y K^+ a la derecha y procediendo en sentido de las agujas del reloj, están: el cotransportador K^+/Cl^- , el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (banda 3), la Ca^{2+} -ATPasa con una vía pasiva de Ca^{2+} , el canal de K^+ activado por Ca^{2+} y la conductancia de Cl^- . Modificado de Freedman (2001).

Canales iónicos descritos en la membrana del eritrocito humano

Canales catiónicos

Canal Gardós

El canal Gardós (hSK4) es un canal de K^+ activado por Ca^{2+} (Gardós, 1956; Hamill, 1981), perteneciente a la familia de canales de potasio activados por calcio de baja conductancia (canales SK) (Hoffman y col, 2003). Este presenta una rectificación débil hacia adentro y una conductancia alrededor de los 20 pS (corriente cero) (Grygorczyk y col, 1984; Maher y Kuchel, 2003). Su probabilidad de apertura no parece ser voltaje-dependiente y presenta una clara selectividad por el K^+ con una relación de permeabilidades $p\text{K}^+/p\text{Na}^+ \sim 15$ (Grygorczyk y Schwarz, 1983); la secuencia de selectividad reportada para este canal a distintos cationes monovalentes es (Christophersen, 1991): $\text{K}^+ \geq \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Li}^+; \text{Na}^+; \text{Cs}^+$.

Se ha reportado la inhibición del canal por aplicación extracelular de clotrimazol y caribdotoxina (IC_{50} s de 50 nM y 5 nM respectivamente) (Brugnara y col, 1995; 1996); y del lado

intracelular, se ha reportado que la aplicación de Ba^{2+} y tetraetilamonio ejercen una inhibición voltaje dependiente al unirse con dominios citoplasmáticos del canal con Kds de 150 nM y 20 mM respectivamente (Dunn, 1998).

Este canal es activado por Ca^{2+} interactuando con calmodulina, asociada constitutivamente al canal (Del Carlo y col, 2002), cuando la concentración intracelular de este sobrepasa un nivel umbral de 150 nM (Simons, 1976; Tiffert y col, 1988), es decir, no se encuentra activo en condiciones fisiológicas “normales” (ver tabla 1), por lo cual, su rol fisiológico *in vivo* sigue en discusión. La activación máxima es obtenida con una concentración intracelular de 2 μ M (Thomas y col, 2011) y la activación experimental del canal de Gardós en condiciones fisiológicas produce indirectamente la deshidratación de la célula (efecto Gardós) (Gardós, 1956; Lew y col, 2005), la tasa de deshidratación está determinada por la magnitud de la entrada de Ca^{2+} a la célula y la capacidad de las vías conductivas a facilitar el flujo hacia afuera de aniones (Thomas y col, 2011). Además, Dyrda y colaboradores (2010) demostraron que deformaciones en la membrana pueden activar este canal indirectamente. Ellos proponen que se activa una permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} debido a dichas deformaciones y el aumento de la concentración interna de este ion causa la activación del canal Gardós.

Canal catiónico no selectivo voltaje dependiente

Este canal presenta una dependencia de voltaje con un comportamiento de tipo histéresis (Kaestner y col, 2000). Está acoplado a un receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (Bennekou, 1993) y puede ser activado por prostaglandina E2 (Kaestner y Bernhardt, 2002) y clotrimazol (Barksmann y col, 2004). Presenta una conductancia con valores alrededor de 20 pS

(Christophersen y Bennekou, 1991) y es permeable a cationes mono- y divalentes, incluyendo Ca^{2+} , Ba^{2+} y Mg^{2+} . Es inhibido por La^{3+} e iodoacetamida (Bennekou y col, 2004).

Canal catiónico no selectivo

Este canal es independiente del voltaje y puede ser activado con estrés oxidativo (Duranton y col, 2002), encogimiento hiperosmótico (Huber y col, 2001) y mediante el reemplazo del Cl^- extracelular por gluconato, NO_3^- , Br^- o SCN^- (Duranton y col, 2002; Lang y col, 2003); es muy poco selectivo presentando la siguiente secuencia de selectividad (Duranton y col, 2002): $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ = \text{Li}^+ \gg \gg \text{NMDG}^+$; el canal también es permeable al Ca^{2+} y puede ser inhibido por amilorida o etilisopropilamilorida (Duranton y col, 2002).

NMDAr

Se demostró la presencia del receptor N-metil-d-aspartato (NMDAr) en la membrana de eritrocitos humanos usando PCR cuantitativo y citometria de flujo. Esta proteína permite el flujo no selectivo de cationes a través de la membrana, la actividad de este receptor es controlada por glutamato y glicina extracelular. Su activación resulta en el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , encogimiento celular y alteración del pH intracelular (Makhro y col, 2013).

Canal TRPC6

Mediante el uso de “western blots” se ha demostrado la expresión de la proteína TRPC6 (del inglés: Transient receptor potential cation channel 6) en la membrana de los eritrocitos

humanos (Föller y col, 2008). Es permeable a cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) y presenta una conductancia unitaria de 28 a 37 pS (Dietrich y Gudermann, 2007).

P_{sickle}

Es una permeabilidad catiónica no selectiva registrada en eritrocitos de humanos enfermos con anemia falciforme (del inglés: *sickle cell disease*). Presenta una conductancia unitaria de 27 pS y sensibilidad a dipiridamol (100 μM) y a GsMTx (mecanotoxina IV de *Grammastola spatula*) (1 μM) (Vandorpe y col, 2010). Es igualmente selectiva a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y es inhibida por DIDS (100 μM), Zn^{2+} (100 μM) y Gd^{3+} (2 μM) (Browning y col, 2007). Su actividad puede ser inducida mediante la desoxigenación (Vandorpe y col, 2010).

Conductancias de Ca^{2+}

Los canales catiónicos no selectivos mencionados hasta ahora son permeables a Ca^{2+} . Sin embargo, algunos estudios han dado evidencias de que canales de Ca^{2+} también se encuentran presentes en la membrana del eritrocito. La presencia de subunidades de canales de Ca^{2+} de tipo L y R ha sido detectada utilizando técnicas inmunológicas y la de los canales funcionales estudiada con bloqueadores y cinéticas de flujo (Romero y col, 2006). Este grupo también ha demostrado que los tipos de canal parecen ser diferentes acorde a la “edad” del eritrocito. Experimentos farmacológicos sugieren efectos de activación del vanadato (Romero y Romero, 2003) y la cafeína (Cordero y Romero, 2002) sobre estos canales de Ca^{2+} . No obstante, hasta ahora estos canales nunca han sido caracterizados electrofisiológicamente y solo han sido estudiados con flujos

marcados utilizando $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Otros estudios a su vez sugieren que la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana del eritrocito humano puede comportarse como un canal de Ca^{2+} de tipo B (Pinet y col, 2002).

Canales aniónicos

Canal de cloruro de baja conductancia (CIC-2)

Este es un canal de Cl^- endógeno de la membrana de los eritrocitos humanos el cual presenta actividad espontanea en eritrocitos infectados con malaria y presenta una conductancia alrededor a los 5 pS (Bouyer y col, 2006; 2007). Fue identificado como un canal CIC-2, el cual puede ser activado con hinchamiento o tert-butil hidroperóxido (Huber y col, 2004) e inhibido con Zn^{2+} con una IC_{50} alrededor de 100 μM (Shumilina y Huber, 2011).

Canal aniónico voltaje dependiente (VDAC)

Este canal fue identificado en la membrana del eritrocito humano como un VDAC (del inglés: voltage dependent anion channel) (Bouyer y col, 2011). Los VDAC son componentes de los receptores benzodiazepínicos periféricos compuestos por (Veenman y col, 2008): i) VDAC; ii) transportador de nucleótidos de adenina (ANT); y iii) una proteína que posiciona (del inglés: translocator protein (TSPO)). La conductancia y selectividad de este canal es voltaje dependiente y presenta múltiples sub-estados con permeabilidad a aniones de distinto tamaño (SCN^- , Cl^- , glutamato) (Gincel y col, 2000; Glogowska y col, 2010). Este canal puede ser activado o modulado de distintas maneras incluyendo con componentes de suero sanguíneo (Glogowska y col, 2010).

Antecedentes

Corrientes del HEMKCA en la membrana del eritrocito humano

En nuestro laboratorio, Romero (2004) caracterizó electrofisiológicamente un canal mecano-sensible en la membrana del eritrocito humano haciendo uso de la técnica de T.U.G.O. Patch clamp (del inglés: *The U-Shape Giga Ohm Patch Clamp*) (ver página 35) en la configuración de inside-out. Este canal presentó una conductancia entre 22 y 29 pS, y que la probabilidad de apertura (P_o) aumentó al incrementar gradualmente la presión negativa sobre el parche de membrana.

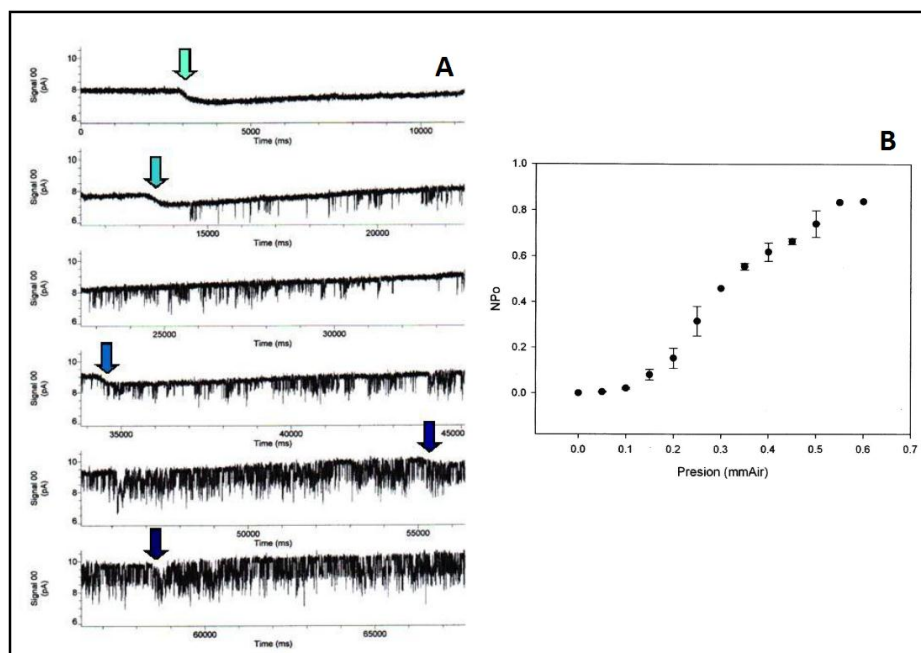


Figura 7. Efecto de la presión sobre la actividad de tipo canal en un parche de membrana de eritrocito. **A:** Trazos de corriente en función del tiempo a -60 mV de potencial de membrana en un T.U.G.O. Patch clamp sobre un eritrocito humano. Las flechas indican el momento en que se aplicaron pasos de presión consecutivos de 0.05 mmAire, de manera creciente hacia la más oscura. **B:** Relación NP_o vs. Presión negativa aplicada sobre el parche de membrana en la configuración T.U.G.O. Patch clamp. Modificado de Romero (2004).

La Figura 7 fue presentada por Romero (2004) como la primera evidencia directa de la existencia de un canal iónico dependiente de presión en el eritrocito humano. Se puede observar que cuando la membrana del eritrocito es sometida a un estrés mecánico, por la aplicación de una presión negativa sobre un parche de membrana se activa una conductancia iónica, cuyo comportamiento está constituido por cambios discretos y estereotipados en la corriente de membrana cuando se encuentra bajo control de potencial, lo cual es característico de la actividad de un canal iónico.

Para estudiar la reversibilidad del efecto de los cambios de presión, Romero (2004) aplicó una diferencia de presión positiva sobre los parches de membrana una vez conseguido el efecto de la presión negativa, encontrando que la aplicación de dicha diferencia de presión positiva genera una pérdida de la integridad y estabilidad del giga sello, la cual es mucho más rápida que en la aplicación de diferencias de presión negativa. En la Figura 8 se puede observar los resultados de un experimento realizado por Romero (2004) en el que fue posible comprobar la reversibilidad de los efectos de la presión negativa sobre la membrana del eritrocito humano mediante la aplicación de diferencias de presión positiva.

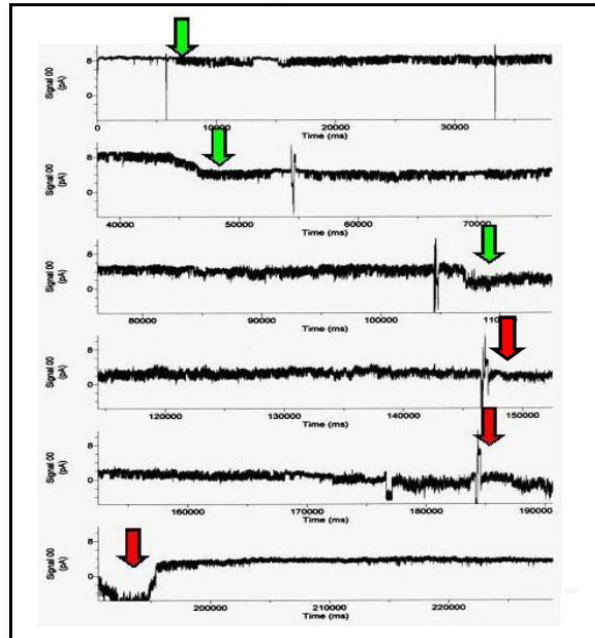


Figura 8. Reversibilidad del efecto de la presión. Las flechas verdes señalan la aplicación de presión negativa y las rojas presión positiva (cada aplicación de presión equivale a 0.05 mmAire). Tomado de Romero (2004).

A fin de conocer la relación de permeabilidades de los iones monovalentes fisiológicamente más importantes, Na^+ y K^+ , a través del canal. Romero (2004) diseñó ensayos de corriente en función del potencial de membrana fijado, los cuales se realizaron con soluciones asimétricas de Na^+ y K^+ a cada lado de la membrana. Los ensayos se diseñaron de manera que aun cuando las concentraciones fueron diferentes, la fuerza iónica total de ambas soluciones se mantuvo constante e igual a la de la solución utilizada en los experimentos anteriores. En la Figura 9 se pueden observar los resultados de estos experimentos.

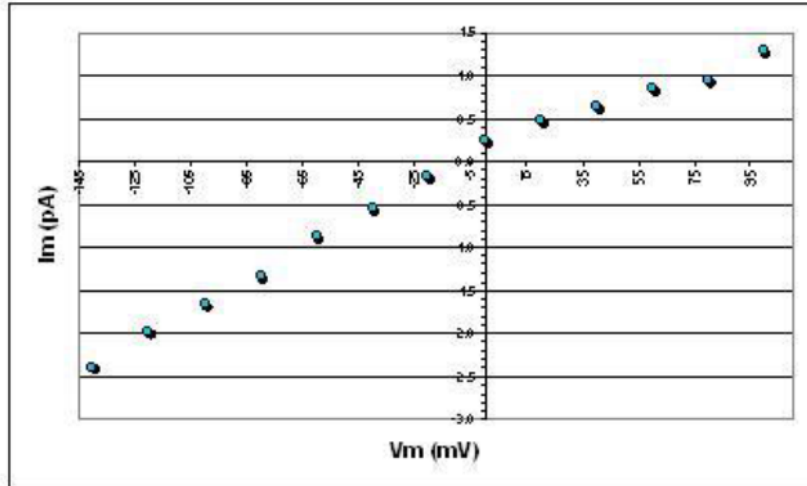


Figura 9. Relación corriente vs voltaje para el canal de presión en condiciones no simétricas. Cámara experimental: 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ y 20 mM Buffer tris pH 7.0; y pipeta por: 100 mM KCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ y 20 mM Buffer tris pH 7.0. Los puntos son el promedio de tres experimentos diferentes. Tomado de Romero (2004).

Esta gráfica demuestra que la conductancia del canal presenta una sutil dependencia con el potencial, poseyendo un comportamiento rectificador a valores de potencial de membrana positivo. Un análisis cuidadoso de los datos afirma que la intersección con el eje X, es decir, el potencial de reversión para este canal en estas condiciones es igual a -8,5 mV. Los potenciales de Nernst fueron para el Na⁺ = 41,35 mV, para el K⁺ = -8,64 mV, para el Ca²⁺ = 0 mV y para el Cl⁻ = 0 mV.

Con estos datos Romero (2004) calculó que este canal es aproximadamente 100 veces más permeable al ion K⁺ que al ion Na⁺. Por lo tanto, concluyó que el canal mecanosensible de la membrana del eritrocito humano, es un canal de K⁺ evidenciado directamente por primera vez en ese estudio. A este canal, como se menciona en la introducción, se le asignaron posteriormente las siglas HEMKCA (del inglés: *Human Erythrocyte Mechano-Activated K⁺ Channel A*) (Romero, 2004).

En el mismo trabajo se estudiaron los efectos de los cambios en la geometría de la membrana y su efecto sobre la actividad del HEMKCA. Para generar dichos cambios se utilizó lisofosfatidilcolina (LPC) y clorpromazina (CPZ). Al utilizar LPC se obtuvo que la probabilidad de apertura del canal disminuye exponencialmente al aumentar la concentración de dicho compuesto desde 0 a 6 μM ; y al utilizar CPZ (con carga positiva), obtuvo que al aumentar la concentración de dicho compuestos en pasos de 10 en 10 μM la probabilidad de apertura también aumenta.

Romero y Zambrano (2008) estudiaron el efecto del Ca^{2+} interno sobre la actividad del HEMKCA. Ellos observaron que la actividad del canal disminuía dramáticamente cuando la concentración de Ca^{2+} es reducida desde 1 mM hasta 100 nM dentro de la cámara experimental una vez obtenido el giga sello. Además la relación entre la probabilidad de apertura (P_o) y el logaritmo de la concentración de Ca^{2+} es sigmoidea y que el efecto sobre la P_o no es debido al efecto sobre el canal abierto sino más bien sobre la frecuencia apertura del canal. La abrupta relación sigmoidea que se presenta a concentraciones entre los nM y los mM es una clara evidencia de que la actividad del HEMKCA se encuentra fuertemente regulada por la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo cual los autores concluyeron que el HEMKCA es modulado por Ca^{2+} .

Adicionalmente, Romero y Zambrano (2010) realizaron una caracterización cinética parcial del HEMKCA en donde evidenciaron un decaimiento de la P_o de varios de estos canales en el tiempo ($\tau=4,55\pm1.95\text{min}$). Ellos atribuyeron este decaimiento a un proceso de inactivación que no depende de la presión aplicada, pero sí de la aplicación de una diferencia de potencial y/o del desarrollo del flujo de corrientes iónicas a través del canal.

También probaron el efecto del pH intracelular sobre la actividad del HEMKCA en un rango de 7,3 a 6,5 (Romero y Zambrano, 2011). La disminución del pH intracelular resulto en la disminución de la probabilidad de apertura y esta última se hace 0 a valores de pH menores a 6.5. En este trabajo, ellos reportan que La probabilidad de apertura presenta una dependencia sigmoidea con respecto al pH y que la conductancia del canal es independiente a este.

En experimentos posteriores, Romero y Zambrano (2012) estudiaron los efectos del agente oxidante *ter*-Butil Hidroperóxido en la actividad del HEMKCA. Ellos obtuvieron que la probabilidad de apertura del canal se redujo drásticamente y que dicho efecto es dependiente de la concentración del agente oxidante al utilizar concentraciones desde 0 a 25 μM .

Mata (2016) realizo un estudio cinético de la actividad del HEMKCA. En este, se estudió el efecto del Ba^{2+} , el cual es un conocido modulador de la actividad de canales de K^+ , sobre la actividad del canal. Encontrando que al establecer una concentración de 1 mM de Ba^{2+} en la cámara experimental (lado intracelular), se produce una inhibición de la actividad del canal de un 83%; Adicionalmente demostró que establecer una concentración de 1 μM de TRAM-34, un inhibidor con alta selectividad para canales KCa3.1 , en la cámara experimental disminuye casi totalmente la actividad del canal. Al establecer 100 nM de dicho compuesto, el HEMKCA presento una inhibición del 92%. En base a este resultado, Mata (2016) propone que el HEMKCA tiene una relación funcional con la familia de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia intermedia.

Senescencia del eritrocito humano

La hipótesis clásica de la senescencia de los eritrocitos humanos propone al control de los flujos de Ca^{2+} como el disparador del envejecimiento celular. Esta se fundamenta en que la

concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta con la edad del eritrocito y que dicho aumento es monotónico (Romero y col, 1997), por lo que tendría que existir algún tipo de retroalimentación positiva que haga pasar dicho aumento de gradual a abrupto alrededor del día 120, lo que resultaría en la muerte del eritrocito (Romero y Romero, 2005). Este cambio estaría mediado por el canal de K^+ activado por Ca^{2+} (Canal Gárdos). El aumento progresivo de Ca^{2+} produciría una activación continua del canal Gárdos que a su vez produciría una hiperpolarización de la membrana que aumentaría el gradiente electroquímico del Ca^{2+} , que resultaría en la entrada del mismo a la célula y la salida de K^+ , produciéndose un desequilibrio eléctrico en el eritrocito forzando la salida Cl^- . Esta pérdida de sal del interior celular traería como consecuencia la salida obligatoria de agua, resultando en una disminución del volumen celular y por ende un aumento de su densidad. Así una vez alcanzado el “umbral” del proceso de retroalimentación positiva gracias a la acumulación progresiva del Ca^{2+} y al efecto de este sobre diversos componentes de la membrana de la célula, dispararía el retiro de los eritrocitos viejos de la sangre (Romero y Romero 2005).

La hipótesis del K^+ presentada por nuestro laboratorio se basa en la existencia de dos mecanismos, el canal de K^+ activado por presión (HEMKCA) y el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ el cual es voltaje dependiente (Romero, 2004). La hipótesis propone que estos mecanismos se relacionan entre sí de la siguiente manera: Durante el paso del eritrocito por el capilar sanguíneo, la célula está sometida a estrés mecánico, el cual activa al HEMKCA aumentando la permeabilidad de la membrana al K^+ . Como consecuencia de esto, en condiciones fisiológicas, la membrana se hiperpolariza y a potenciales de membrana mayores a ± 40 mV se activa el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ permitiendo la entrada de Ca^{2+} al eritrocito y la salida de K^+ , generando un proceso de

retroalimentación positiva; así estos dos mecanismos generan la entrada de Ca^{2+} , salida de K^+ y en conjunto con esta última, la salida de Cl^- con una consecuente salida de agua generando una mayor densidad en los eritrocitos (Romero, 2004; Romero y Romero, 2005).

Al salir del lecho capilar desaparece el estrés mecánico, los mecanismos mencionados vuelven a su estado inicial ya que la activación del HEMKCA disminuye, y con él, la hiperpolarización y consecuente actividad del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo, los efectos producidos por el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , como la disminución de la capacidad de bombeo de la Ca^{2+} -ATPasa a través de la interacción con proteasas calcio-dependientes (calpainas), se acumularan cada vez que un eritrocito atraviesa un capilar sanguíneo y la concentración intracelular de Ca^{2+} aumente transitoriamente (Romero, 2004). Resultando en una disminución cada vez mayor de la capacidad de la bomba de Ca^{2+} a retirar dicho ion (Romero y Romero, 1997). Al no haber síntesis de proteínas dentro del eritrocito, se acumulan en el tiempo los efectos del aumento transitorio del Ca^{2+} dentro de la célula.

Todo esto quiere decir que a medida que la concentración interna de Ca^{2+} aumenta transitoriamente, el sistema como un todo está cambiando irreversiblemente. La consecuencia fisiológica es que el eritrocito se hace cada vez más denso y rígido. Por lo cual el sistema no puede reaccionar con la misma celeridad a los cambios de estrés mecánico. De esta manera, ahora los cambios que se dan en la célula cuando pasa por los capilares son cada vez de mayor magnitud y duración, hasta que llegue un momento en que es imposible que se compense la entrada de Ca^{2+} . Como consecuencia las vías de salida de K^+ no se desactivarán, por lo que la membrana se mantendrá más tiempo hiperpolarizada incluso cuando el eritrocito se encuentre fuera del capilar. Por lo que fluirá aún más Ca^{2+} hacia adentro de la célula a través del intercambiador

K^+/Ca^{2+} . Consecuentemente la membrana del eritrocito estará más rígida por lo que no se dará la reversión de los cambios producidos por el estrés mecánico, el HEMCKA seguirá activo incluso cuando la célula no esté en un capilar. Es decir, el sistema perdió el equilibrio, y en un proceso de retroalimentación ascendente la célula se hará cada vez más y más rígida, facilitando su reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear. Conllevando a su retención y retirada del torrente sanguíneo (Romero, 2004; Freund 2013).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la selectividad y la dependencia del potencial de membrana de la conductancia y de la probabilidad de apertura del canal de K^+ mecano-activado del eritrocito humano.

Objetivos específicos

- Estudiar como el potencial de membrana afecta a la conductancia del canal.
- Determinar la secuencia de selectividad del canal a algunos cationes monovalentes en condiciones simétricas.
- Determinar la secuencia de selectividad del canal a algunos cationes monovalentes en condiciones bi-iónicas.
- Estudiar como el potencial de membrana afecta a la probabilidad de apertura (P_o) del canal.

Materiales y métodos

Obtención del material biológico

Para todos los experimentos se utilizaron eritrocitos humanos obtenidos de donantes (previo consentimiento informado) por punción cutánea. La muestra de sangre fue tomada con una micropipeta con 5 μL de solución experimental previamente filtrada con filtros de poros de 0,22 μm y colocada inmediatamente en una cámara experimental conteniendo 1 mL de la misma solución. La muestra no fue previamente tratada de manera de minimizar los cambios que pudieran suceder durante su manipulación. Luego se esperaron 10 minutos a que la mayoría de las células descendieran al fondo de la cámara para proceder con las manipulaciones experimentales.

Medidas Electrofisiológicas

A consecuencia de la actividad de canales o transportadores iónicos, el potencial de membrana y la corriente a través de la misma varían al mismo tiempo. Para facilitar el análisis de lo que está ocurriendo en la membrana, utilizando la técnica denominada *Voltage clamp* (Hodgkin y Huxley, 1952) es posible fijar el potencial transmembrana a un valor predeterminado y medir el flujo de corriente resultante. El principio del *voltage clamp* es fijar el potencial transmembrana a un nivel constante mediante la inyección de corriente a través de un sistema de retroalimentación negativa que al mismo tiempo mide la corriente de retroalimentación requerida para mantener dicho potencial (Hodgkin y col, 1952). Esta corriente es equivalente a la corriente iónica fluyendo a través de la membrana pero de signo contrario. De esta manera, fijando el potencial transmembrana y midiendo la corriente que fluye a través de la misma,

utilizando la ley de Ohm (ecuaciones 1 y 2) se pueden cuantificar variaciones en la conductancia (G) o resistencia (R) de la membrana bajo distintas condiciones experimentales.

Patch clamp

La técnica del *patch clamp* es una especialización del *voltage clamp* donde se puede controlar y manipular el voltaje a un área muy pequeña de membrana, permitiendo medir directamente el flujo de corriente a través de canales unitarios (Neher y Sakmann, 1976; Sakmann y Neher, 1984). Básicamente la punta de una micropipeta de vidrio es presionada contra la membrana celular formando un sello eléctrico. La resistencia alta de este sello asegura que las corrientes que se originan en un parche de membrana fluyan hacia la pipeta y de ahí al circuito de medición de corriente (Neher y col, 1978). Cuando se aplica succión al interior de la pipeta pueden ser obtenidos sellos eléctricos entre la pipeta y membrana con resistencias del orden de 1-100 giga Ω (Neher, 1981). La alta resistencia del “giga-sello” reduce el ruido de fondo del registro, permitiendo registrar las corrientes que fluyen a través de la membrana (Hamill y col, 1981).

Todas las diferentes configuraciones de la técnica de *patch clamp* empiezan con la formación del giga sello (Hamill y col, 1981). La configuración en la cual un parche de membrana es aislado solamente por la formación de dicho sello es llamada *Cell-attached* (Hamill y col, 1981). A partir de este punto, se puede separar un parche de membrana del resto de la célula. Esto usualmente mantiene la integridad del giga sello permitiendo el estudio del parche de membrana de manera aislada (Penner, 1995). Cuando la cara citoplasmática de la membrana se encuentra

expuesta a la solución del baño y la cara extracelular a la solución de la pipeta, la configuración del parche es llamada *Inside-out* (Hamill y col, 1981).

El T.U.G.O. Patch clamp (del inglés: The U-Shape Giga Ohm Patch clamp)

Las corrientes del HEMKCA fueron medidas con la técnica de *Patch clamp*, en la configuración *inside-out* (Hamill y col, 1981), en la modalidad de *T.U.G.O. Patch clamp* (Romero, 2004). Esta última se desarrolló especialmente en nuestro laboratorio con la finalidad de simular en un parche de membrana los procesos de estrés mecánico que suceden en la membrana de los eritrocitos al pasar por los capilares sanguíneos (Romero, 2004). Entre las principales diferencias de esta modalidad con el Patch clamp clásico tenemos:

1. *La forma de la pipeta que simula el paso de los eritrocitos por un capilar sanguíneo desde el punto de vista mecánico.*

En las pipetas utilizadas para el Patch clamp clásico se utiliza una microforja para reducir el diámetro de la punta de manera que el área de la membrana aislada dentro de la pipeta sea lo suficientemente pequeña como para tener uno o pocos canales. En el caso del T.U.G.O. Patch clamp las pipetas presentan una abertura interna en la boca lo suficientemente grande como para permitir que el eritrocito entre sin ser succionado completamente al aplicar presión negativa; por esta razón las pipetas son construidas de forma que las paredes de la punta sean lo más paralelas posibles. Esto permite que una parte importante de la célula quede dentro de la pipeta y por lo tanto una gran área de la membrana este en contacto con las paredes del capilar.

En la Figura 10 se observa un esquema comparativo entre las formas de la punta de una pipeta para Patch clamp clásico y una de T.U.G.O. Patch clamp.

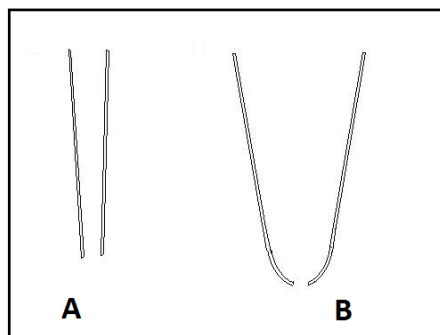


Figura 10. Esquema comparativo entre las formas de la punta de **A)** una pipeta de T.U.G.O. Patch clamp y **B)** una pipeta para Patch clamp clásico. Modificado de Romero (2004).

2. *La cantidad de membrana aislada en la pipeta y la forma que esta adopta al formarse el giga sello.*

En contraste a la técnica de Patch clamp clásico donde se busca que el área de la membrana aislada dentro de la pipeta sea lo más pequeña posible. En la técnica de T.U.G.O. Patch clamp gracias a la forma de la pipeta, al aplicar una diferencia de presión negativa, el eritrocito entra entre 3 y 8 μm de distancia medidos desde la punta, aislándose de esta forma una mayor cantidad de membrana en comparación con el Patch clamp clásico (Romero, 2004). Con respecto a la forma que adopta la membrana al formarse el sello, en el Patch clamp clásico esta adopta una forma de “ Ω ” a consecuencia de que el ángulo de las paredes de la pipeta es más agudo al acercarse a la punta. En el caso del T.U.G.O. Patch clamp como se observa en la Figura 11, la membrana toma forma de “U” invertida debido a que las paredes de la pipetas son lo más paralelas posibles. Hay una región: A) que está en contacto con la pipeta, se supone es cónica y

mide entre 3 y 8 μm ; y una región B) más distal, no asociada al vidrio y se supone tiene una forma semiesférica (Figura 11).

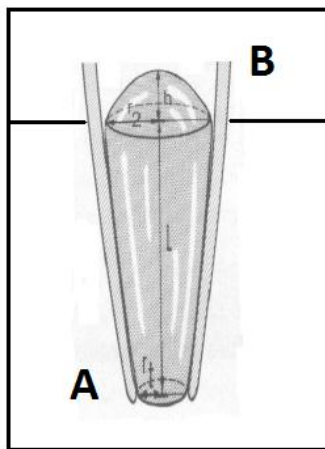


Figura 11. Esquema de la forma que adopta un eritrocito en el interior de una pipeta de T.U.G.O. Patch clamp. **A)** Región cónica; **B)** Región semiesférica. Modificado de Romero (2004).

Elaboración de pipetas

Las pipetas se construyeron a partir de capilares de Borosilicato con un diámetro externo de 1,5 mm, interno de 0,86 mm y 10 cm de largo (Sutter instrument Co., USA), las cuales fueron haladas en dos pasos con un halador vertical modelo 700C (David Kopf Instruments, USA). Se utilizaron pipetas con una resistencia eléctrica de 9 a 15 M Ω .

Manipulación y visualización de las células

Para la manipulación de las pipetas en la cámara experimental, se utilizaron micromanipuladores hidráulicos Narishigue modelo MO-203 (Narishigue CO, LTD, Japón.) Para la observación de las células y la manipulación de las mismas se utilizó un microscopio invertido Nikon Diaphot (Nikon CO, LTD, Japón), utilizando oculares 10X CFW y objetivos 20 y 40 DL.

Formación del giga sello

Se seleccionaron eritrocitos ubicados en el fondo de la cámara para realizar cada experimento, se utilizó el micromanipulador para posicionar la pipeta próxima a este y se procedió a aplicar una diferencia de presión negativa a través del *Holder* con ayuda de una jeringa. En todos los experimentos se aplicó una diferencia de presión inicial generada por el desplazamiento de 0,05 cc de aire en la jeringa. Luego se esperó hasta que se obtuvo un sello de resistencia alta ($> 1 \text{ G}\Omega$). Finalmente se pasó de la configuración de *cell-attached* a la de *inside-out* “arrastrando” la punta de la pipeta por el fondo de la cámara experimental. En la Figura 12 se observa un esquema del posible proceso de formación del giga sello en las condiciones descritas.

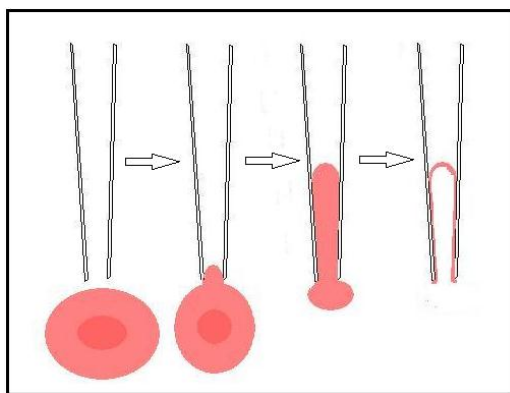


Figura 12. Esquema del posible proceso de formación del giga sello en la pipeta del T.U.G.O. Patch clamp. Modificado de Romero (2004).

Soluciones experimentales

Todas las soluciones fueron preparadas en agua ultra pura o “MiliQ” (resistividad eléctrica a $25^{\circ}\text{C} \sim 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) y con reactivos de calidad analítica. En la Tabla 2 se muestra una lista de los utilizados.

Tabla 2. Lista de los compuestos químicos utilizados en las soluciones experimentales.

Compuesto	Casa comercial
KCl (99,8%)	AnalaR
NaCl (99,8%),	Riedel-de Haën
LiCl (99,8%),	SIGMA-ALDRICH
RbCl (99,8%)	SIGMA-ALDRICH
*CsOH monohidratado (95%)	SIGMA-ALDRICH
CaCl ₂ (99%)	SIGMA-ALDRICH
Buffer TRIS (99,8%)	BioRad

*La solución madre de CsCl se preparó a partir de la reacción entre CsOH y HCl.

Para estudiar cómo la diferencia de potencial afecta a la conductancia y a la probabilidad de apertura del canal se utilizaron soluciones con la siguiente composición en condiciones simétricas (con respecto a la membrana) (Tabla 3):

Tabla 3. Composición de la soluciones que se utilizaron para estudiar como el potencial transmembrana afecta a la conductancia y la probabilidad de apertura del canal (Osmolaridad: 313 mOsm; pH = 7,3).

Compuesto	Concentración en la cámara experimental (mM)	Concentración en la pipeta (mM)
KCl	150	150
Buffer TRIS	10	10
CaCl ₂	1	1

Para determinar la secuencia de selectividad del canal a K⁺, Na⁺, Li⁺, Rb⁺ y Cs⁺ en condiciones simétricas se utilizaron soluciones con la siguiente composición (Tabla 4):

Tabla 4. Composición de las soluciones que se utilizaron en los estudios de selectividad en condiciones simétricas (Osmolaridad: 313 mOsm; pH = 7,3).

Compuesto	Concentración en la cámara experimental (mM)	Concentración en la pipeta (mM)
KCl, NaCl, LiCl, RbCl o CsCl	150	150
Buffer TRIS	10	10
CaCl ₂	1	1

Para determinar la secuencia de selectividad del canal a K^+ , Na^+ , Li^+ , Rb^+ y Cs^+ en condiciones bi-iónicas se establecieron dichas condiciones con: A) K^+ en la cámara y el ion de prueba (Na^+ , Li^+ , Rb^+ o Cs^+) en la pipeta (de ahora en adelante llamadas “Bi-iónicas A”) y B) K^+ en la pipeta y el respectivo ion de prueba en la cámara (de ahora en adelante llamadas “bi-iónicas B”). La composición de las soluciones utilizadas se resume en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Composición de las soluciones que se utilizaron en los estudios de selectividad en condiciones bi-iónicas A (asimétricas) (Osmolaridad: 313 mOsm; pH = 7,3).

Compuesto en la solución de la cámara	Concentración (mM)	Compuesto en la solución de la pipeta	Concentración (mM)
KCl	150	KCl, NaCl, LiCl, RbCl o CsCl	150
Buffer TRIS	10	Buffer TRIS	10
CaCl ₂	1	CaCl ₂	1

Tabla 6. Composición de las soluciones que se utilizaron en los estudios de selectividad en condiciones bi-iónicas B (asimétricas) (Osmolaridad: 313 mOsm; pH = 7,3).

Compuesto en la solución de la cámara	Concentración (mM)	Compuesto en la solución de la pipeta	Concentración (mM)
KCl, NaCl, LiCl, RbCl o CsCl	150	KCl	150
Buffer TRIS	10	Buffer TRIS	10
CaCl ₂	1	CaCl ₂	1

Adquisición de los datos

Las corrientes fueron adquiridas con un intervalo de muestreo (del inglés: “*sampling*”) de 50 μs (20 KHz) en modo de *voltage clamp* con una ganancia de 100 mV/pA utilizando un amplificador AXOPATCH-1C (Axon instruments, USA), un filtro pasa-bajos de 2 KHz y un filtro de línea “Hum Bug” para eliminar el ruido de línea de 60 Hz (Quest Scientific, Canadá). Para el

proceso de digitalización de los datos experimentales se utilizó una interface IT-16 (Instructech, USA) usando el programa de control y adquisición de datos PULSE (Heka, Alemania). Estos fueron almacenados en un computador compatible y su análisis se llevó a cabo haciendo uso del software Clampfit (versión 9.0) (Axon Instruments, USA).

Convenciones

El signo del voltaje fijado (de ahora en adelante llamado potencial de membrana o V_m) hace referencia a la solución de la pipeta con respecto a la solución de la cámara experimental. Corrientes hacia afuera (cargas positivas fluyendo a través del parche de membrana hacia la pipeta) son mostradas como deflexiones hacia arriba (con respecto a la línea base) en los trazos de corriente.

Protocolos de estimulación

Para los estudios de conductancia y selectividad, la estimulación del parche de membrana una vez obtenido el giga sello se realizó en la modalidad de *voltage clamp* (Hodgkin y col, 1952) en pasos de 20 mV en un intervalo de -120 a +120 mV. Para los estudios de probabilidad de apertura se utilizó el protocolo esquematizado en la Figura 13. Este protocolo, como se discute más adelante, está diseñado para minimizar el efecto: de la variabilidad de la probabilidad de apertura inicial entre distintos parches de membrana, del comportamiento estocástico de la probabilidad de apertura del canal y su decaimiento en el tiempo, sobre el análisis.

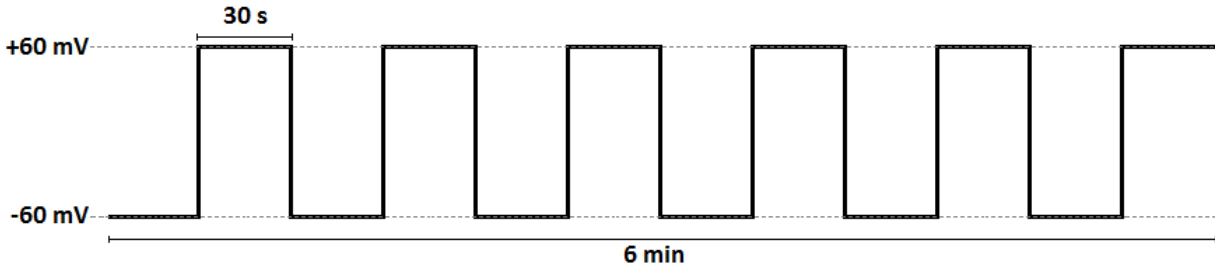


Figura 13. Protocolo utilizado para estudiar el efecto del potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura. Este consiste en doce pulsos cuadrados de 30 s, alternados de -60 a +60 mV.

Cálculos y análisis de los datos

En un principio, se asume que la corriente que fluye a través de un canal iónico alcanza niveles relativamente discretos con tiempos de transición entre los estados conductivo y no conductivo infinitamente cortos. Para el análisis solo se usaron parches de membrana en los cuales se registró un solo nivel de corriente con respecto a la línea base. En la Figura 14 se muestra un segmento de un registro como ejemplo representativo.

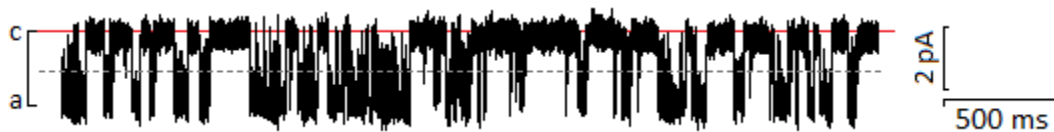


Figura 14. Trazo de corrientes iónicas fluyendo a través de un parche de membrana en función del tiempo. El parche fue aislado de un eritrocito humano, en la configuración de inside-out a un $V_m = -60$ mV. La línea roja representa la línea base. Las letras “c” y “a” representan los niveles de canal cerrado y abierto respectivamente. La línea discontinua representa la mitad de la amplitud de la corriente del estado conductivo que fue considerada como el umbral para la detección de transiciones entre los estados conductivos y no conductivos.

Identificación del canal

El HEMKCA fue reconocido por su conductancia (Tabla 7) y la dependencia de su actividad a la presión (Figuras 7 y 28).

Conductancia

La amplitud de la corriente que fluye a través del canal (I_c) fue estimada a partir de distribuciones gaussianas ajustadas a histogramas de todos los puntos de valores de las corrientes adquiridas (llamados de ahora en adelante histogramas de amplitud) (Figura 15) (Heinemann, 1995). Estos ajustes nos indican los valores de corriente que ocurren con mayor frecuencia. En registros con un solo nivel de corriente distinto de cero, presentan dos picos: i) centrado en cero, representando el estado no conductivo y ii) centrado en el valor de la amplitud de la corriente correspondiente al estado conductivo del canal. Las curvas de corriente en función del V_m fijado (I-V) fueron construidas graficando los promedios de los valores de corriente estimados, para cada V_m fijado, en la condición experimental correspondiente.

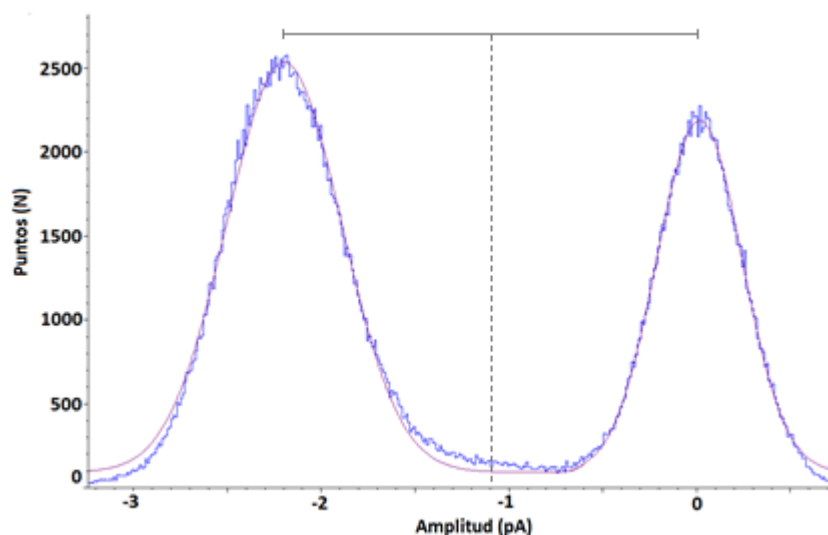


Figura 15. Histograma de amplitud. En morado se muestra la función gaussiana de dos componentes ajustada al histograma. Dicho ajuste presenta un pico centrado en el valor de -2,15 pA (representando el estado conductivo a esta condición) y otro centrado en 0,05 pA (representando el estado no conductivo o línea base). La línea discontinua indica el valor medio entre ambos picos que se usó para establecer el umbral de detección de transiciones entre los estados conductivo y no conductivo (en este ejemplo el valor es -1,1 pA).

Utilizando la ley de Ohm (ecuación 2) y los promedios usados para la construcción de las curvas I-V obtenidos a partir de experimentos en condiciones simétricas, se calcularon las conductancias de canal unitario (g_c) (Hodgkin y Huxley, 1952).

Selectividad

Las relaciones de selectividad entre el K^+ y el ion de prueba X^+ (Na^+ , Li^+ , Rb^+ o Cs^+) en condiciones simétricas y bi-iónicas (A y B) fueron expresadas como relaciones de conductancia (g_k/g_x) y de permeabilidad (P_k/P_x) respectivamente. Las secuencias de selectividad fueron determinadas comparando la magnitud de estas relaciones.

Las relaciones de permeabilidad fueron calculadas a partir de potenciales de cero corriente (Eisenman y Horn, 1983) en condiciones bi-iónicas (Tablas 5 y 6). Para condiciones bi-iónicas A y B, la relación de permeabilidades se derivó de la ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), definida como:

$$\text{Para condiciones bi-iónicas A: } \frac{P_k}{P_x} = e^{\left[-\frac{E_m \cdot F}{R \cdot T}\right]} \quad (3)$$

$$\text{Para condiciones bi-iónicas B: } \frac{P_k}{P_x} = e^{\left[\frac{E_m \cdot F}{R \cdot T}\right]} \quad (4)$$

Donde F, R y T tendrán sus valores usuales, E_m es el potencial de cero corriente y P es el coeficiente de permeabilidad (P_k para el K^+ y P_x para el ion de prueba X^+ , en este caso: Na^+ , Li^+ , Rb^+ o Cs^+). Los potenciales de cero corriente fueron estimados a partir de gráficos I-V mediante

la inter o extrapolación de ajustes: i) manuales y ii) polinómicos realizados usando el software Microsoft Office: Excel (Microsoft, USA).

Probabilidad de apertura

La probabilidad de apertura (P_o) fue determinada como la fracción de puntos digitalizados sobre un umbral establecido en el punto medio entre los dos picos de los histogramas de amplitud correspondientes a cada registro (línea discontinua en la Figura 15) (Colquhoun y Sigworth, 1995). En estas condiciones, la P_o está definida como la proporción del tiempo que el canal permaneció en el estado conductivo con respecto al tiempo total del segmento de registro analizado.

Se registró la actividad del HEMKCA utilizando el protocolo de estimulación esquematizado en la Figura 13. Se determinaron los valores de P_o para cada uno de los segmentos (de 30 s) del registro y se agruparon en función del V_m al cual se obtuvieron (-60 o 60 mV). Luego se promediaron para obtener una pareja de datos directamente comparables o pareados. Se obtuvo una pareja de datos por experimento con los que se construyó un gráfico P_o -V para estudiar el efecto del V_m sobre la P_o del HEMKCA.

Este efecto fue evaluado estadísticamente con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945). Esta es una prueba no paramétrica que compara la mediana de dos grupos de data pareada y determina si existe una diferencia significativa entre ambos. La data obtenida cumple con sus supuestos:

- Los valores pareados son tomados aleatoria e independientemente.
- La variable dependiente es continua dentro del intervalo de medida.
- La data tiene un nivel de medida ordinal.

Utilizando esta prueba se establecen dos hipótesis, la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1). H_0 plantea que la mediana de la diferencia entre los pares de datos es cero y H_1 plantea que esta es distinta de cero. H_0 se mantiene como cierta mientras que los datos no indiquen su falsedad. Como criterio para aceptar o rechazar la H_0 se utilizaron los valores W (junto a W_{crit}) y Z (junto al valor p) para una prueba de dos colas. Se escogió un nivel de significancia de 0,01. Estableciendo que hay un 1% de probabilidad de rechazar una hipótesis incorrectamente.

Resultados

Durante la realización de estos experimentos el nivel de ruido se mantuvo en un intervalo de $\pm 0,17$ pA. Asegurando una relación señal ruido lo suficientemente buena como para detectar y medir corrientes iónicas por encima de este valor.

Conductancia

Se registró actividad estable del canal en condiciones simétricas de K^+ (Tabla 3). En la Figura 16 se muestran segmentos de un registro representativo a potenciales de membrana de -120 a 120 mV. En todos los experimentos bajo estas condiciones, la amplitud de la corriente fue mayor a medida que el valor del V_m fijado se alejó de 0 mV. Para conocer el comportamiento de la corriente en función del V_m se construyó una curva I-V con los promedios de los valores de amplitud estimados ($n=7$) (Figura 17). En esta se observa que la amplitud de las corrientes iónicas (y por lo tanto la conductancia del canal) fue mayor en la dirección de entrada de K^+ (a potenciales negativos) que en la de salida (potenciales positivos).

Se reportan las conductancias de canal unitario en la Tabla 7. En estas condiciones experimentales la conductancia del HEMKCA vario desde 48 pS (-120 mV) hasta 10 pS (120 mV) y presento una conductancia media de 24 pS.

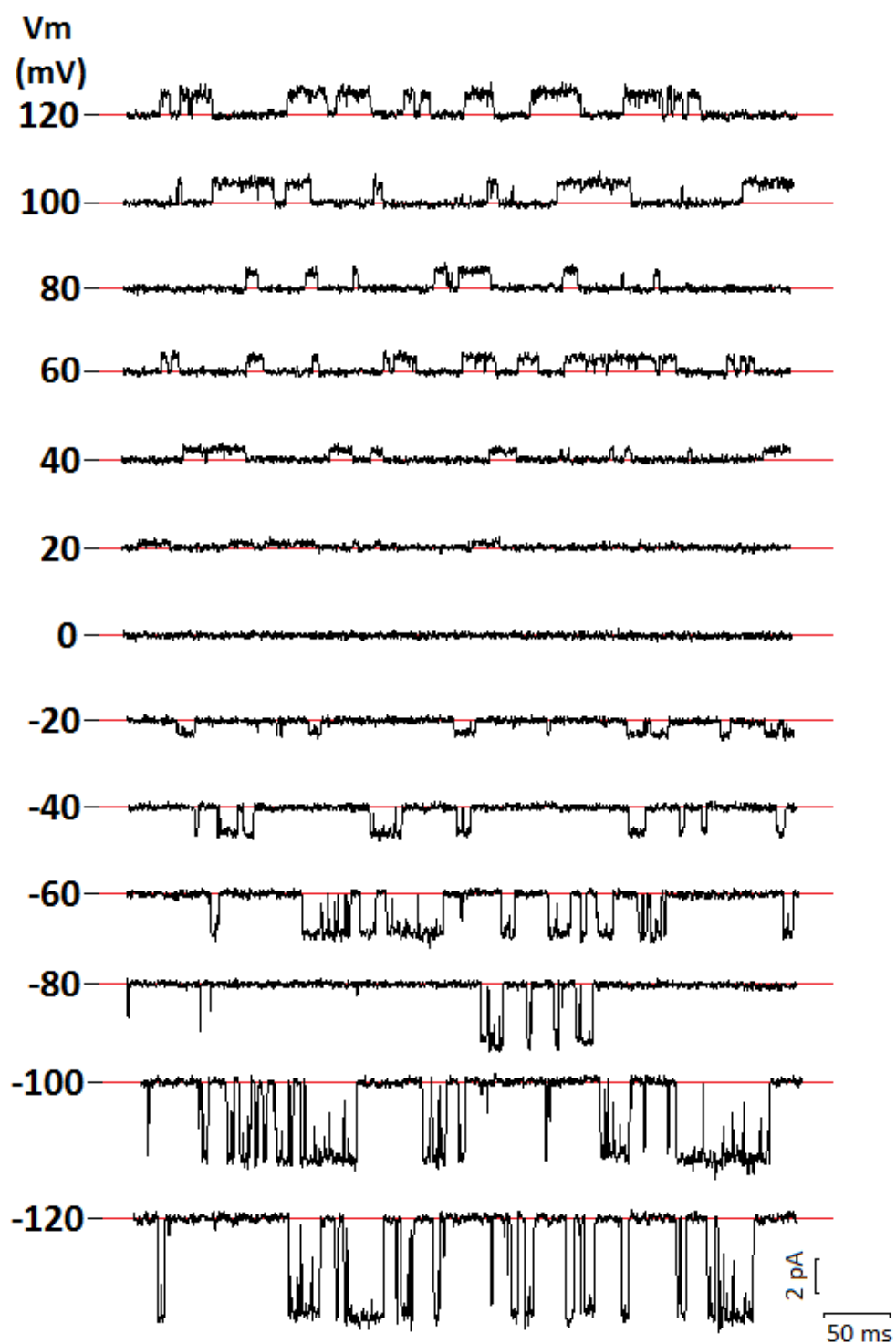


Figura 16. Segmentos de un registro (trazos de corriente en función del tiempo) del HEMKCA expuesto a condiciones simétricas a potenciales de membrana de -120 a +120 mV. Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM KCl, 10 mM Buffer TRIS y 1 mM CaCl_2 (pH = 7,3 y osmolaridad = 313 mOsm). Frecuencia de filtrado: 1 KHz.

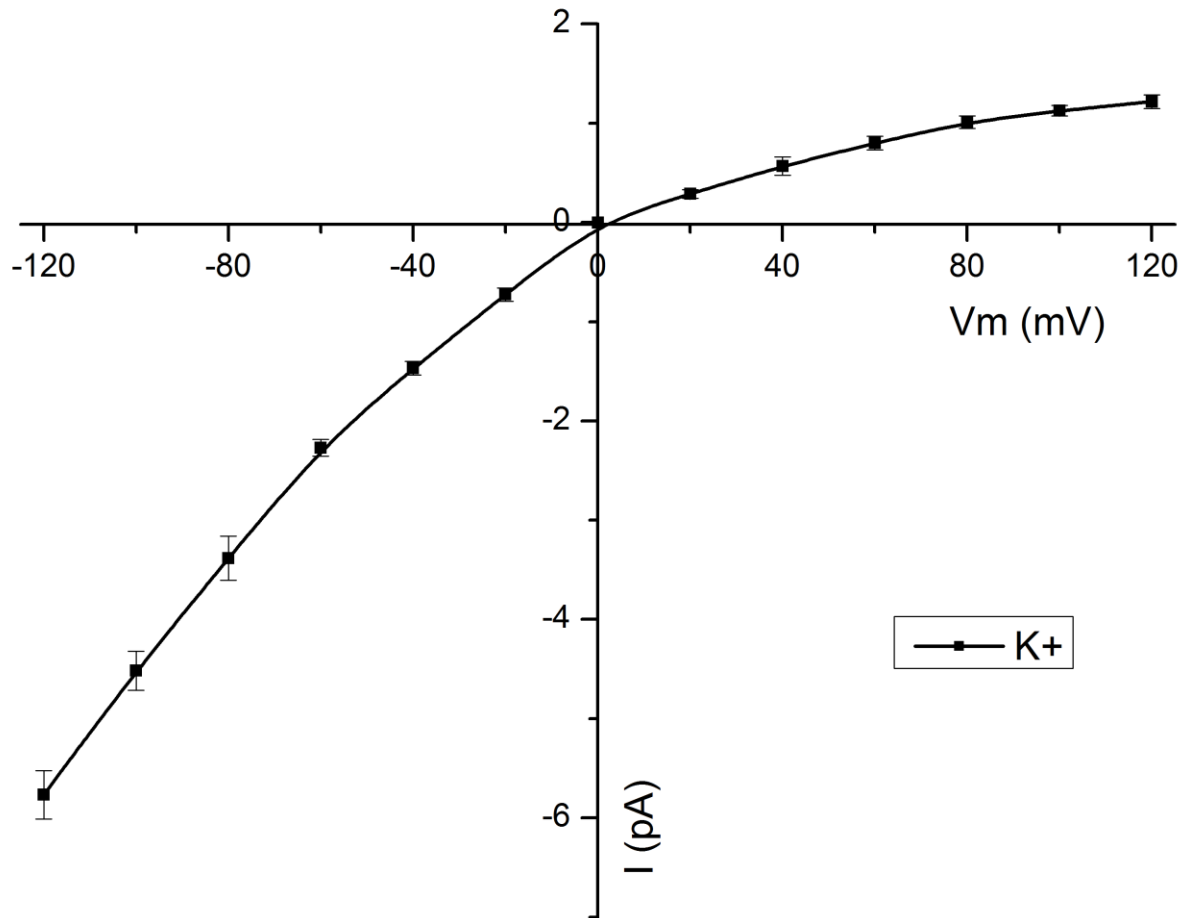


Figura 17. Curva I-V del HEMKCA (corriente en función del potencial de membrana fijado; las corrientes se reportan como Promedio $\pm$ SD) construida a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+ . Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM KCl, 10 mM Buffer TRIS y 1 mM $CaCl_2$ (pH = 7,3; osmolaridad = 313 mOsm) (n=7).

Tabla 7. Conductancias de canal unitario en función del potencial de membrana fijado del HEMKCA expuesto a condiciones simétricas de K^+ . Los valores de g_k fueron calculados a partir de los promedios de las I_c obtenidas a cada V_m en condiciones simétricas de 150 mM KCl, 10 mM Buffer TRIS y 1 mM $CaCl_2$ (pH = 7,3; osmolaridad 313 mOsm).

V_m (mV)	g_k (pS)
-120	48.1
-100	45.2
-80	42.3
-60	37.8
-40	36.7
-20	36.3
0	0
20	14.4
40	14.2
60	13.3
80	12.6
100	11.3
120	10.1

Selectividad

Condiciones simétricas

Se realizaron experimentos con Na^+ , Li^+ , Cs^+ y Rb^+ en condiciones simétricas utilizando soluciones cuya composición esta resumida en la Tabla 4. En los experimentos con Na^+ , Li^+ y Cs^+ como ion de prueba, no se evidenciaron flujos de corriente a través del canal. En estos parches de membrana, se verificó la presencia del HEMKCA intercambiando la solución de la cámara por una con la misma concentración de KCl (Figuras 18 y 19). Con el Cs^+ esto no fue posible ya que este ion afecta negativamente la integridad del giga sello y este último, en ninguno de los intentos, soporto el intercambio de solución de la cámara experimental. Utilizando estos iones de prueba, solo se registraron flujos de corriente a través del canal en los experimentos realizados con Rb^+ (Figura 20).

Se construyeron curvas I-V a partir de las corrientes registradas en los experimentos utilizando Rb^+ y K^+ en condiciones simétricas (Figura 21). La comparación de estas nos indica que la relación I-V correspondiente al Rb^+ es más lineal que la correspondiente al K^+ . Las corrientes atribuidas al flujo del Rb^+ a través del HEMKCA fueron menores a sus análogas en los experimentos realizados con K^+ . Por lo que en estas condiciones $g_{\text{K}}/g_{\text{Rb}}$ siempre es mayor a 1. La conductancia del HEMKCA en condiciones simétricas de Rb^+ vario desde 21 pS (-120 mV) hasta 7 pS (120 mV) y presento una conductancia media de 14 pS. Finalmente juzgando por los valores de conductancia media del canal, con 150 mM del ion de prueba en condiciones simétricas, se calculó la relación de conductancias entre el Rb^+ y el K^+ ($g_{\text{K}}/g_{\text{Rb}}$).

A partir de: $g_{\text{K}} = 24 \text{ pS}$ y $g_{\text{Rb}} = 14 \text{ pS}$. Entonces: $g_{\text{K}}/g_{\text{Rb}} = 1,71$.

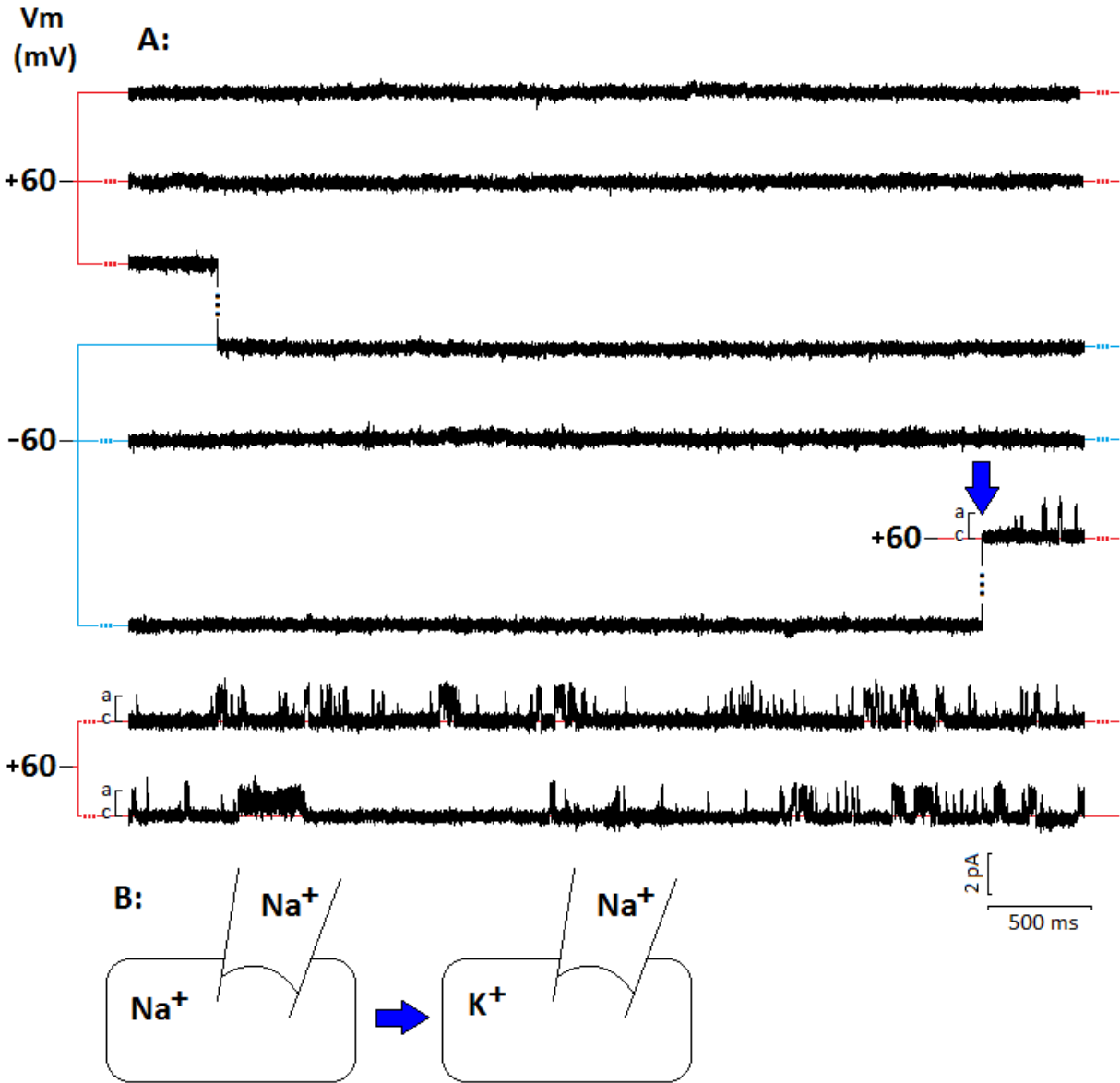


Figura 18. Verificación de la presencia del HEMKCA en un parche de membrana “silente” bajo condiciones simétricas de Na^+ . **A:** Se comenzó a registrar la corriente y no se evidenció actividad de canal iónico a -60 o 60 mV. La flecha azul indica el intercambio de la solución de 150 mM NaCl de la cámara por una con 150 mM KCl. A partir de este punto se observó actividad del canal en el registro (las líneas rojas y azul representan la línea base a -60 y 60 mV respectivamente; la letra “c” representa el estado no conductivo y la “a” al conductivo del canal). **B:** Esquema del cambio de las condiciones que ocurre a partir del momento que indica la flecha azul. Frecuencia de filtrado: 1 KHz.

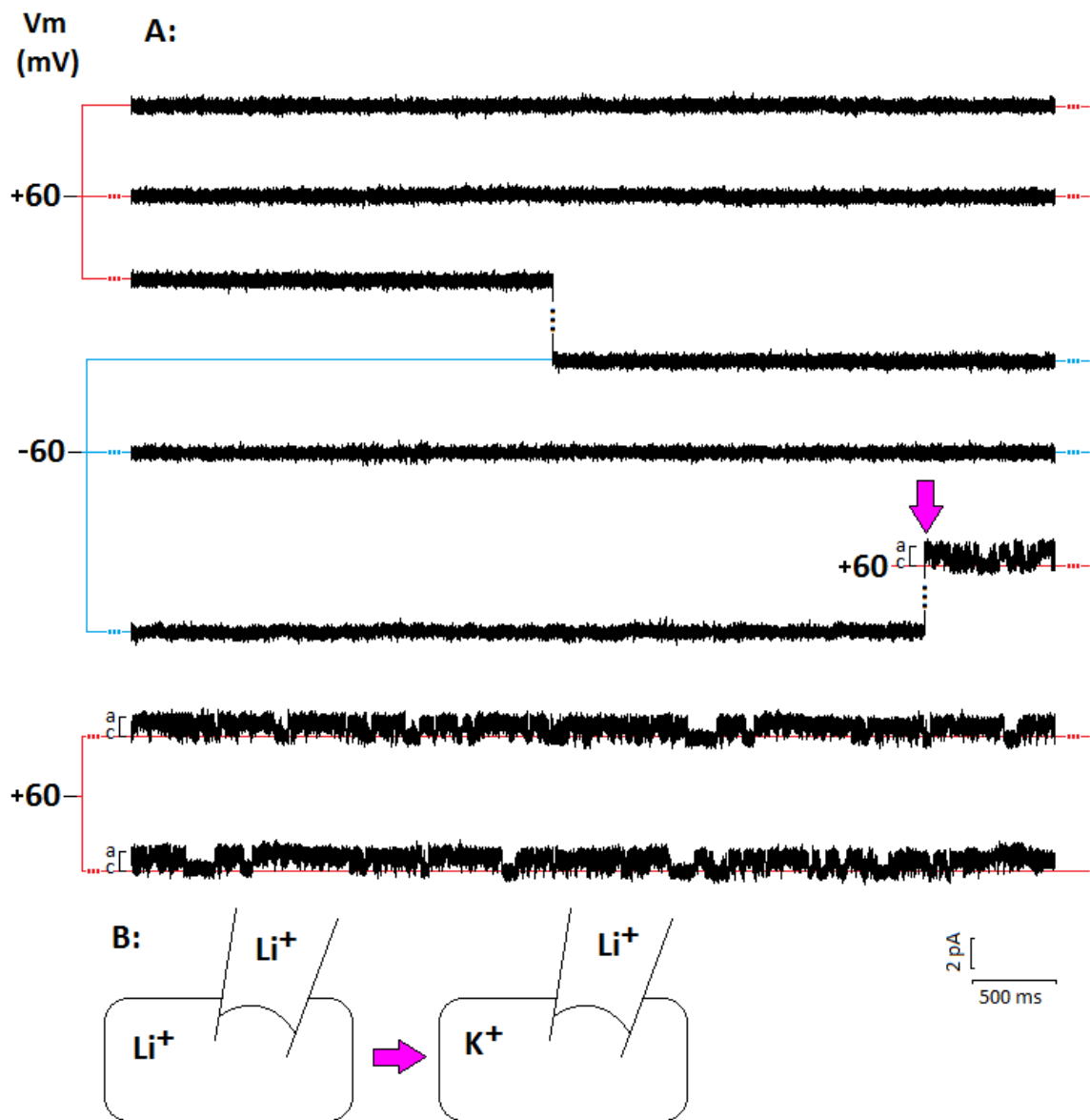


Figura 19. Verificación de la presencia del HEMKCA en un parche de membrana “silente” bajo condiciones simétricas de Li^+ . **A:** Se comenzó a registrar la corriente y no se evidencio actividad de canal iónico a -60 o 60 mV. La flecha morada indica el intercambio de la solución de 150 mM LiCl de la cámara por una con 150 mM KCl. A partir de este punto se observó actividad del canal en el registro (las líneas rojas y azul representan la línea base a -60 y 60 mV respectivamente; la letra “c” representa el estado no conductivo y la “a” al conductivo del canal). **B:** Esquema del cambio de las condiciones que ocurre a partir del momento que indica la flecha morada. Frecuencia de filtrado: 1 KHz.

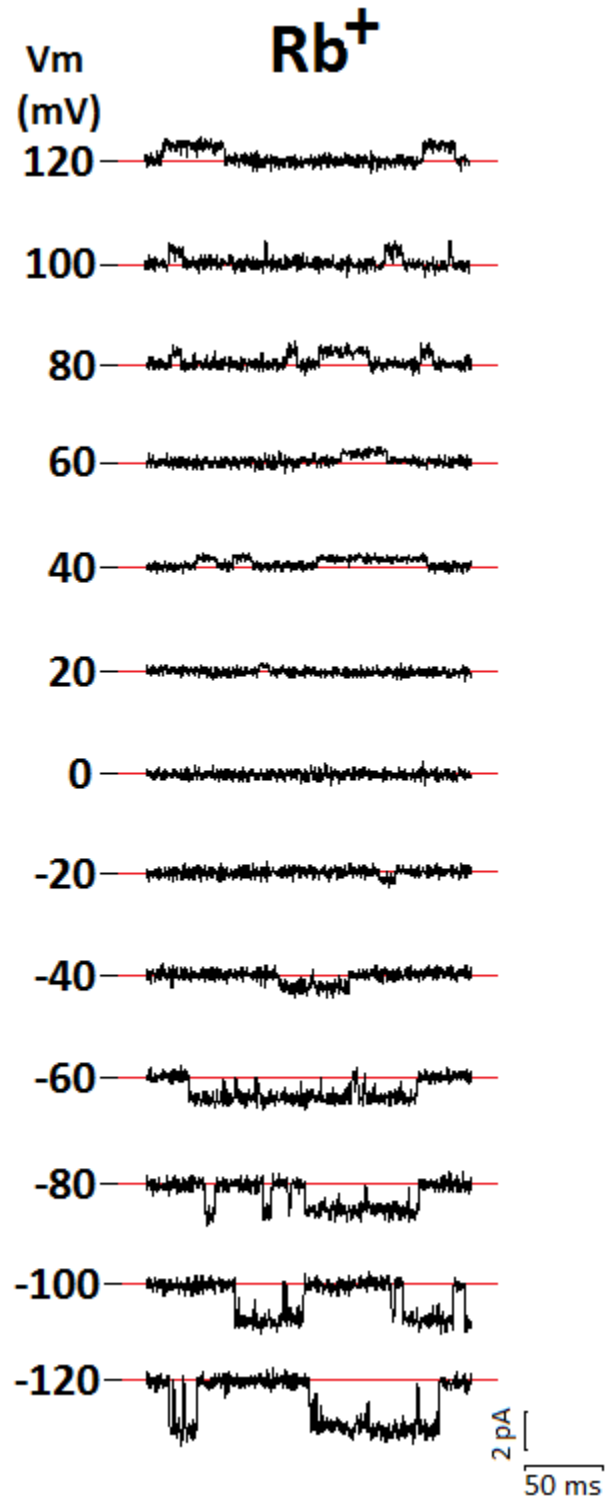


Figura 20. Segmentos de un registro del HEMKCA expuesto a condiciones simétricas de Rb⁺ a potenciales de membrana de -120 a +120 mV. Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM RbCl, 10 mM Buffer TRIS y 1 mM CaCl₂ (pH = 7,3 y osmolaridad = 313 mOsm). Frecuencia de filtrado: 1 KHz.

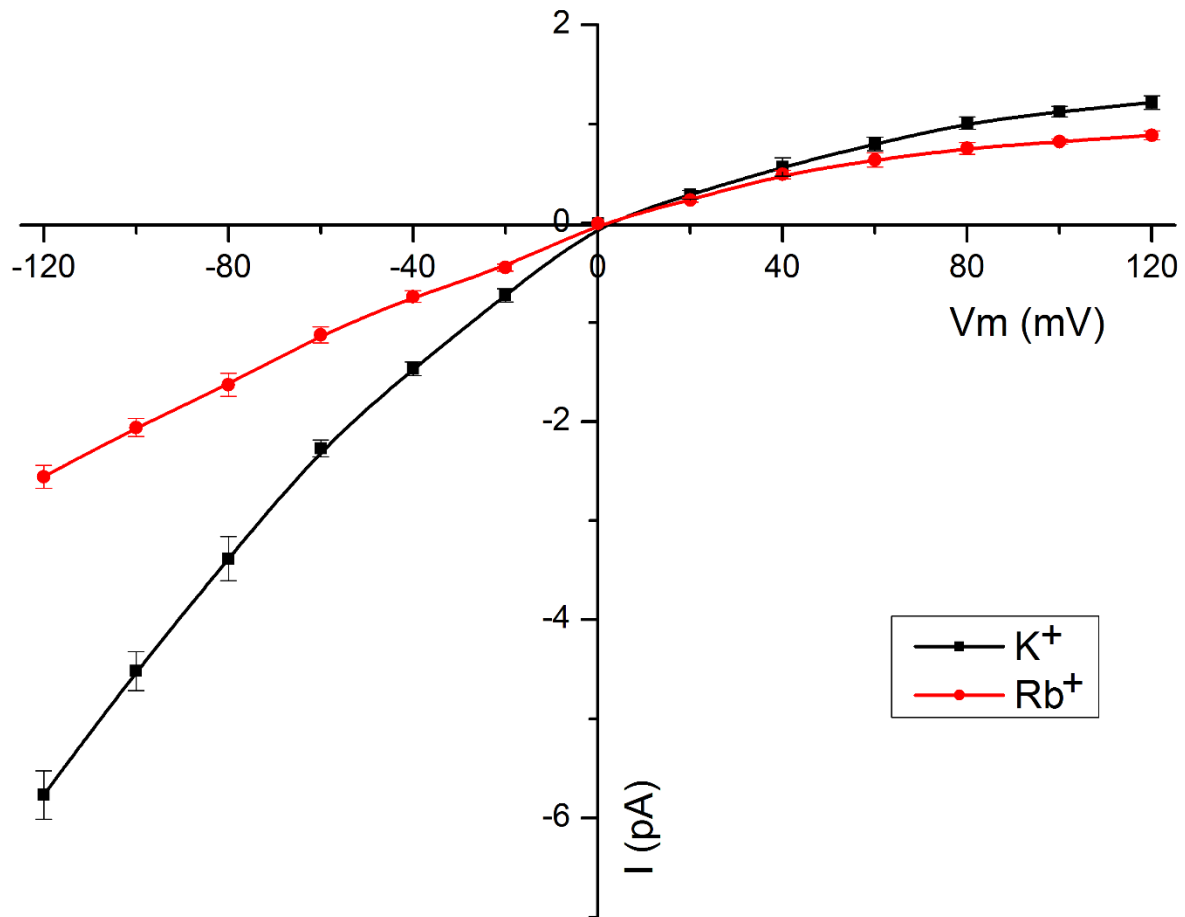


Figura 21. Curvas I-V del HEMKCA (Promedio $\pm$ SD) construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+ (curva y símbolos negros; $n = 7$) y Rb^+ (curva y símbolos rojos; $n = 5$). Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM KCl (o RbCl), 10 mM Buffer TRIS y 1 mM $CaCl_2$ ($pH = 7,3$; osmolaridad = 313 mOsm).

Condiciones bi-iónicas

Se realizaron experimentos con distintas distribuciones bi-iónicas: **A**: con K^+ en la cámara experimental y el ion de prueba (Rb^+ , Na^+ , Li^+ o Cs^+) en la pipeta (Figuras 22A y 23) y **B**: con el ion de prueba en la cámara y K^+ en la pipeta (Figuras 22B y 24). La composición de las soluciones y su distribución se resume en las tablas 5 y 6 respectivamente. En los experimentos con Rb^+ como ion de prueba fue posible determinar potenciales de reversión ya que se registraron corrientes iónicas de entrada y salida con respecto a la línea base (Figura 22A y B).

Con Na^+ , Li^+ y Cs^+ como ion de prueba no fue posible determinar potenciales de reversión. En estos experimentos solo se registraron corrientes correspondientes al flujo de K^+ a favor de su gradiente químico (Figuras 23 y 24; corrientes de salida en distribuciones bi-iónicas A y de entrada en bi-iónicas B). Se construyeron curvas I-V (Figuras 25 y 26) y se estimaron los potenciales de cero corriente a partir de la inter o extrapolación de i) ajustes manuales y ii) ajustes polinómicos realizados sobre los puntos correspondientes a cada distribución bi-iónica (Tablas 8 y 9).

En la Tabla 8 se reporta el polinomio que se ajustó a los datos correspondientes a cada condición bi-iónica A, su respectivo r^2 y el valor del potencial de cero corriente estimado a partir de este ajuste y el manual respectivamente. Los valores estimados a partir de ambos ajustes fueron muy parecidos entre sí. En la Tabla 9 se reportan los resultados correspondientes a las condiciones bi-iónicas B. En estas condiciones, no fue posible estimar potenciales de cero corriente a partir del ajuste polinómico utilizado previamente a los datos obtenidos con Na^+ , Li^+ y Cs^+ como ion de prueba. Debido a esto, se utilizaron los potenciales de cero corriente estimados a partir del ajuste manual para calcular las relaciones de permeabilidades (P_K/P_X) en todas las condiciones probadas.

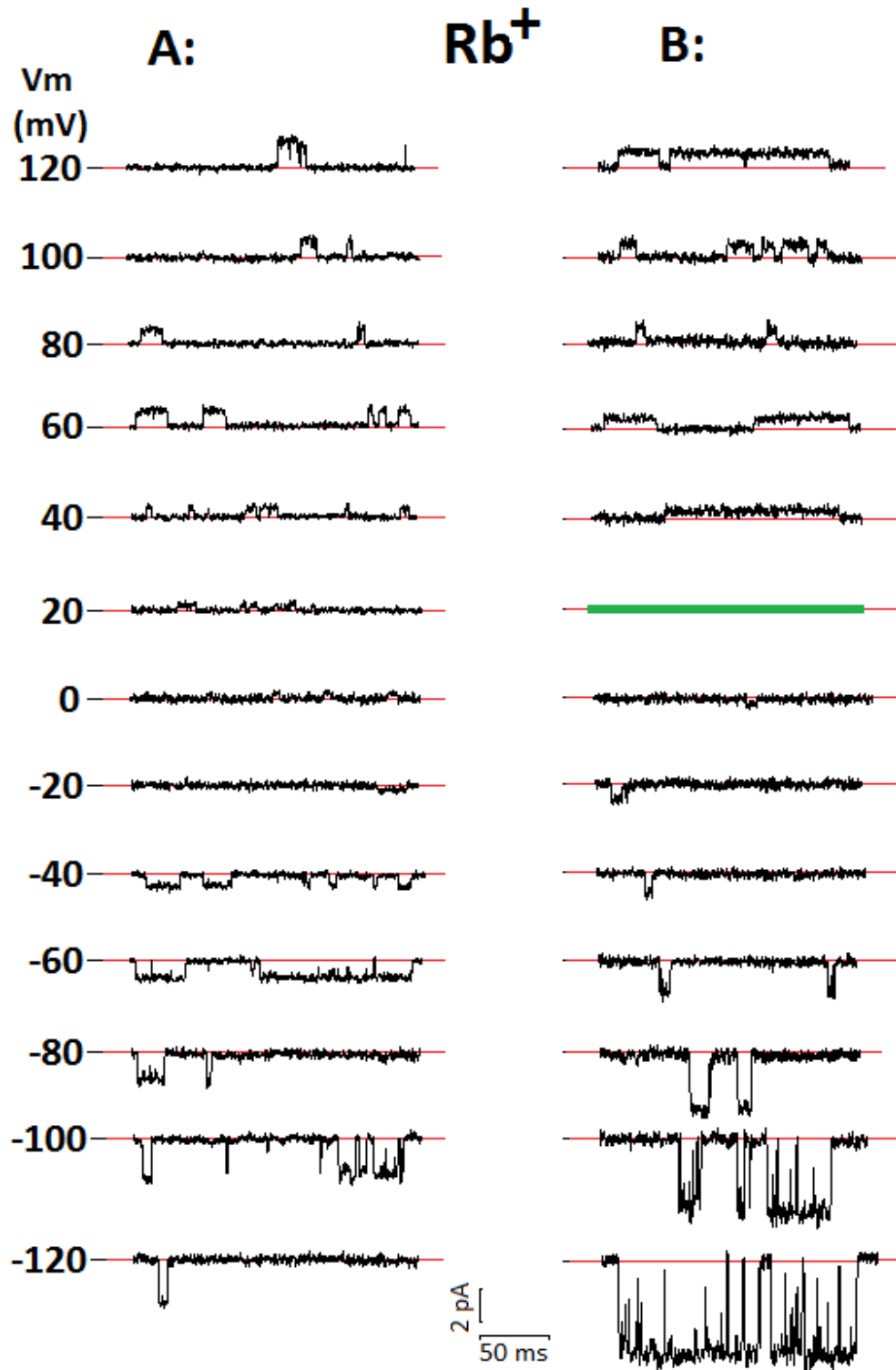


Figura 22. Segmentos de dos registros del HEMKCA expuestos a condiciones bi-iónicas con Rb^+ como el ion de prueba a potenciales de -120 a 120 mV. A: Condiciones bi-iónicas A (Rb^+ en la pipeta) y B: Condiciones bi-iónicas B (Rb^+ en la cámara experimental). La línea verde indica el potencial al que no se evidencio actividad del canal en el registro y la roja representa la línea base. Frecuencia de filtrado: 1 KHz.

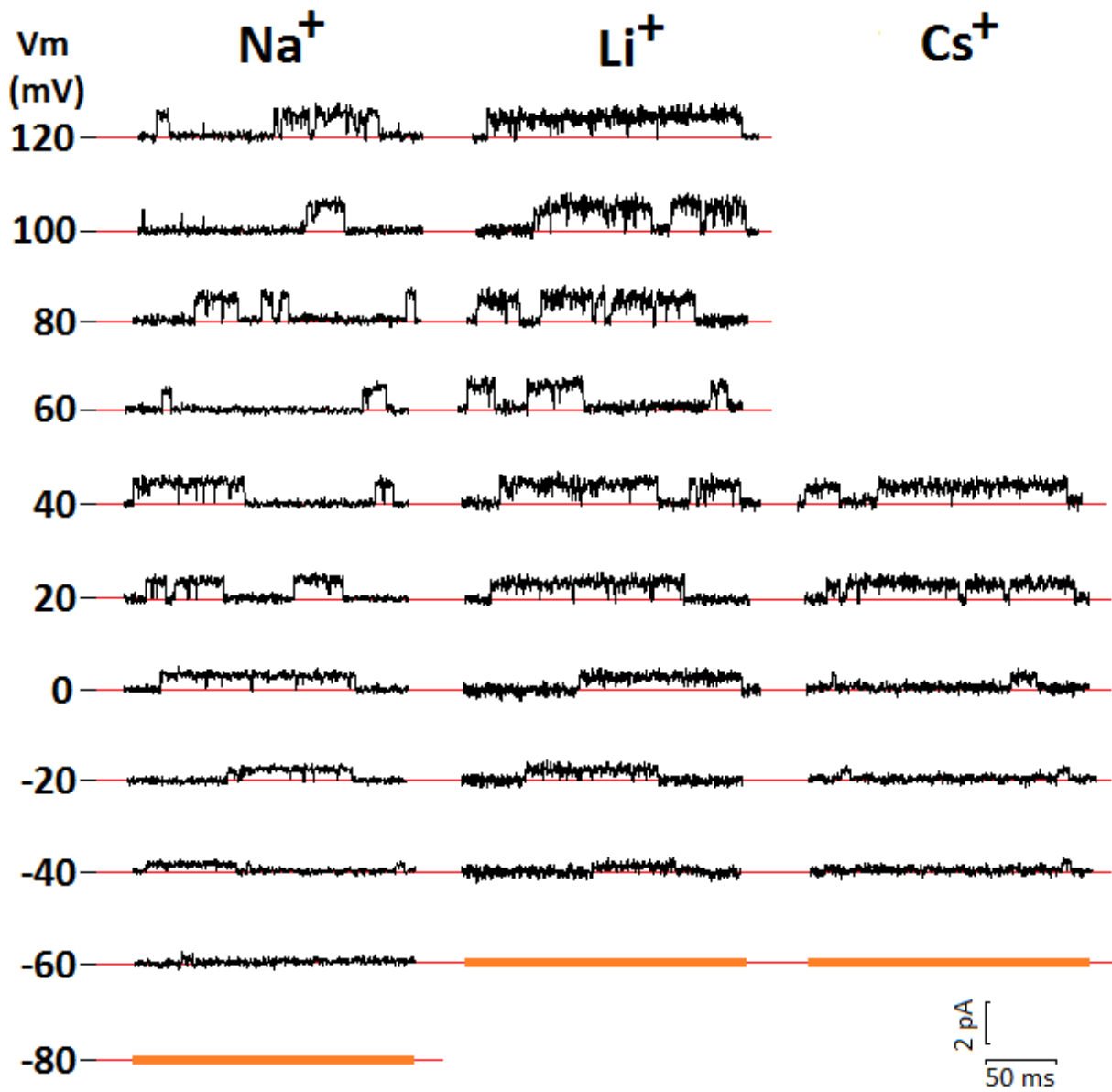


Figura 23. Segmentos de tres registros del HEMKCA expuestos a condiciones bi-iónicas A para su respectivo ion de prueba (Na^+ , Li^+ o Cs^+ en la pipeta) a potenciales de membrana de -80 a 120 mV. La línea roja representa la línea base y la línea naranja indica el potencial al cual no se evidencio actividad del canal en el registro. Frecuencia de filtrado 1 KHz.

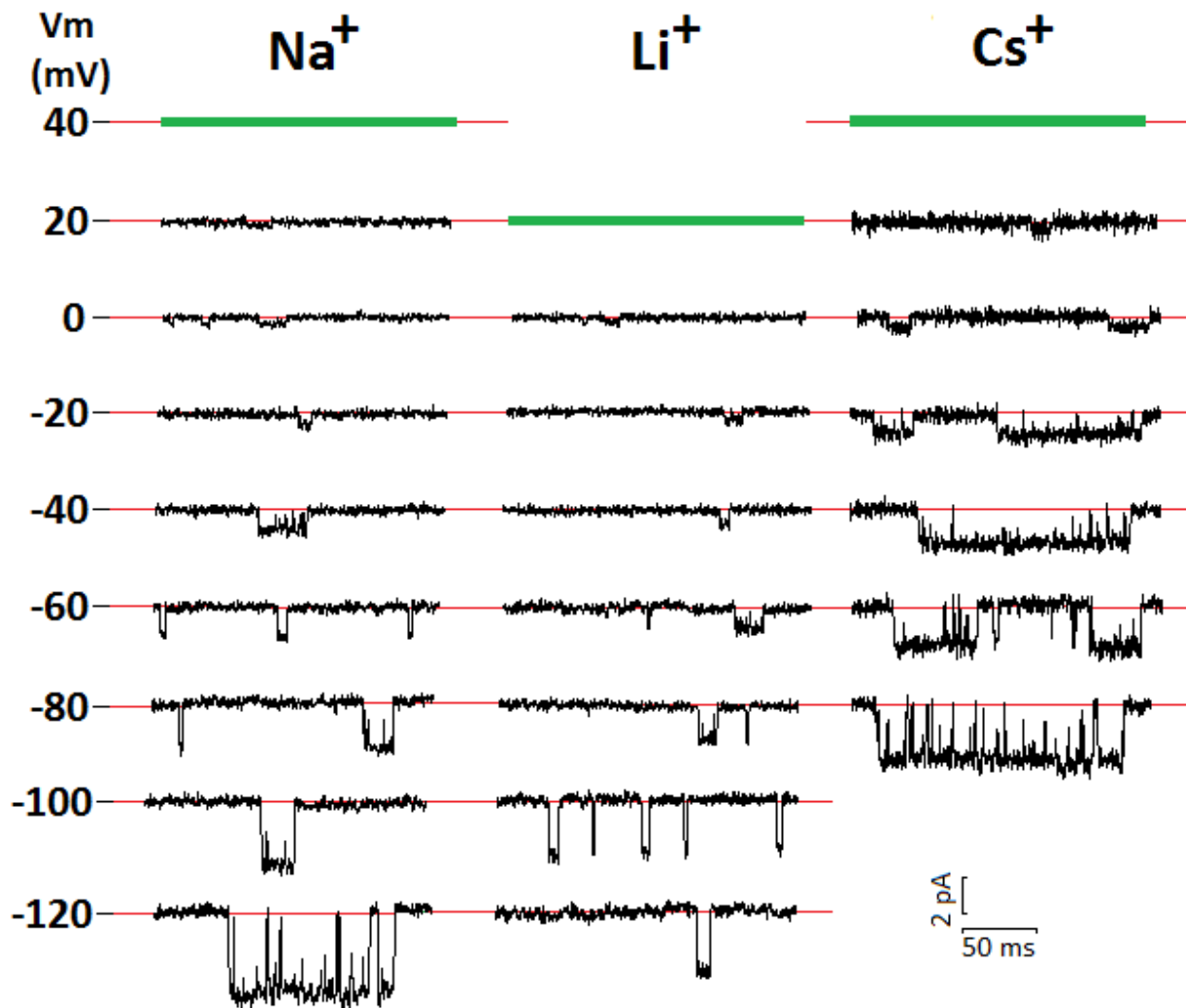


Figura 24. Segmentos de tres registros del HEMKCA expuestos a condiciones bi-iónicas B para su respectivo ion de prueba (Na^+ , Li^+ o Cs^+ en la cámara experimental) a potenciales de membrana de -120 a 40 mV. La línea roja representa la línea base y la línea verde indica el potencial al cual no se evidencio actividad del canal en el registro. Frecuencia de filtrado 1 KHz.

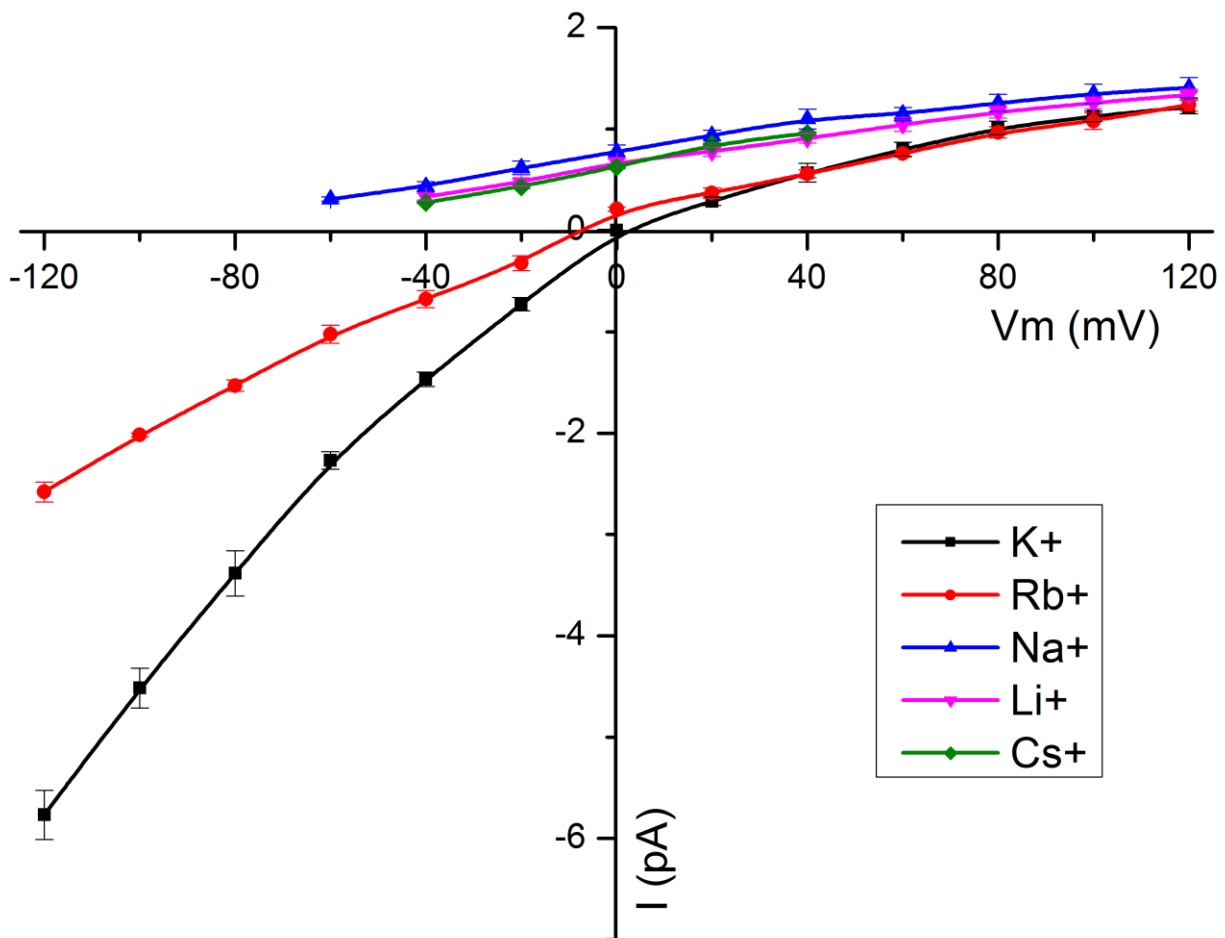


Figura 25. Curvas I-V del HEMKCA (Promedio $\pm$ SD) construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones bi-iónicas A. Soluciones experimentales: 150 mM KCl en la cámara y 150 mM de la sal de prueba en la pipeta (KCl, RbCl, NaCl, LiCl o CsCl), 10 mM Buffer TRIS y 1 mM CaCl_2 a ambos lados ($\text{pH} = 7,3$; osmolaridad = 313 mOsm) (curvas con el ion de prueba Rb^+ , Na^+ , Li^+ y Cs^+ : $n = 5$; curva correspondiente al K^+ : $n = 7$).

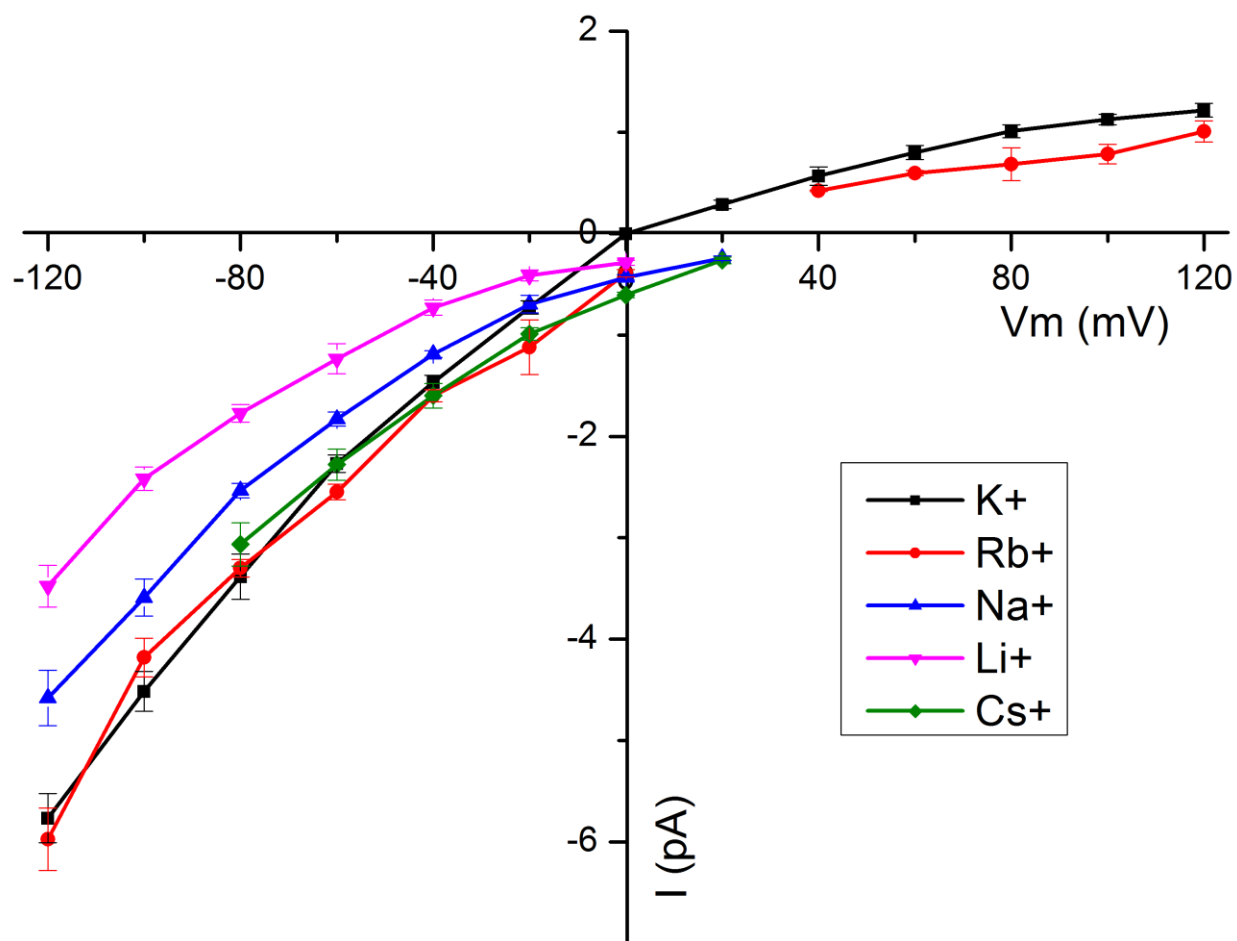


Figura 26. Curvas I-V del HEMKCA (Promedio $\pm$ SD) construidas a partir de registros de parches de membrana expuestos a condiciones bi-iónicas B. Soluciones experimentales: 150 mM de la sal de prueba en la cámara (KCl, RbCl, NaCl, LiCl o CsCl) y 150 mM de KCl en la pipeta, 10 mM Buffer TRIS y 1 mM CaCl_2 a ambos lados (pH = 7,3; osmolaridad = 313 mOsm) (curvas con el ion de prueba Rb^+ , Na^+ , Li^+ y Cs^+ : $n = 4$; curva correspondiente al K^+ : $n = 7$).

Tabla 8. Resumen de los potenciales de cero corriente estimados a partir de los ajustes polinómicos y manuales realizados sobre los gráficos I-V del HEMKCA expuesto a condiciones bi-iónicas A.

Bi-iónico A				
Ion	Polinomio	R ²	Potencial de cero corriente (ajuste polinómico) (mV)	Potencial de cero corriente (ajuste manual) (mV)
K ⁺			0	0
Rb ⁺	$-5 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,0156 + 0,0641$	0,998	-4,06	-10
Na ⁺	$-2 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,00074 + 0,7878$	0,997	-86,32	-89
Li ⁺	$-1 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,0074 + 0,6455$	0,998	-78,83	-78
Cs ⁺	$-1 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,0089 + 0,6366$	0,992	-66,55	-70

Tabla 9. Resumen de los potenciales de cero corriente estimados a partir de los ajustes polinómicos y manuales realizados sobre los gráficos I-V del HEMKCA expuesto a condiciones bi-iónicas B.

Bi-iónico B				
Ion	Polinomio	R ²	Potencial de cero corriente (ajuste polinómico) (mV)	Potencial de cero corriente (ajuste manual) (mV)
K ⁺			0	0
Rb ⁺	$-0,0001x^2 + 0,0267x - 0,4191$	0,994	16,75	18
Na ⁺				62
Li ⁺				81
Cs ⁺				41

Las relaciones de permeabilidad fueron calculadas usando la derivación de la ecuación de GHK en las condiciones bi-iónicas correspondientes (ecuaciones 3 y 4). Juzgando a partir estas (P_K/P_x), las secuencias de selectividad del HEMKCA a los iones K⁺, Rb⁺, Na⁺, Li⁺ y Cs⁺ son:

Para condiciones bi-iónicas A: **K⁺ (1) > Rb⁺ (1,49) > Cs⁺ (16,36) > Li⁺ (22,53) > Na⁺ (34,95)**

Para condiciones bi-iónicas B: **K⁺ (1) > Rb⁺ (2,05) > Cs⁺ (5,14) > Na⁺ (11,89) > Li⁺ (25,39)**

Los valores de las relaciones de permeabilidad del Na^+ y Cs^+ con respecto a K^+ ($P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}$ y $P_{\text{K}}/P_{\text{Cs}}$ respectivamente) calculados a partir de condiciones bi-iónicas B fueron aproximadamente un tercio de los valores obtenidos en condiciones bi-iónicas A. Esto no afectó la posición relativa del Cs^+ en la secuencia de selectividad pero sí la del Na^+ , que ocupa el último lugar en condiciones bi-iónicas A y el penúltimo en bi-iónicas B (intercambió posición con el Li^+).

Probabilidad de apertura

Consideraciones

Inicialmente se realizaron pruebas donde se activó el canal (desde una $P_0 = 0$) y se incrementó su P_0 mediante la aplicación de diferencias de presión negativa sobre el parche de membrana aislado (Figura 27). Estas diferencias de presión se aplicaron utilizando una jeringa. En este sistema, la diferencia de presión aplicada sobre el parche de membrana es proporcional al aire desplazado dentro de la jeringa.

Aunque se desplazara la misma cantidad de aire en la jeringa (en teoría estableciendo la misma diferencia de presión negativa sobre el parche de membrana), la P_0 inicial (determinada en el primer minuto de registro) presentó alta variabilidad en todos los experimentos realizados. En la Figura 28 se representan gráficamente los valores de P_0 inicial para 10 experimentos diferentes.

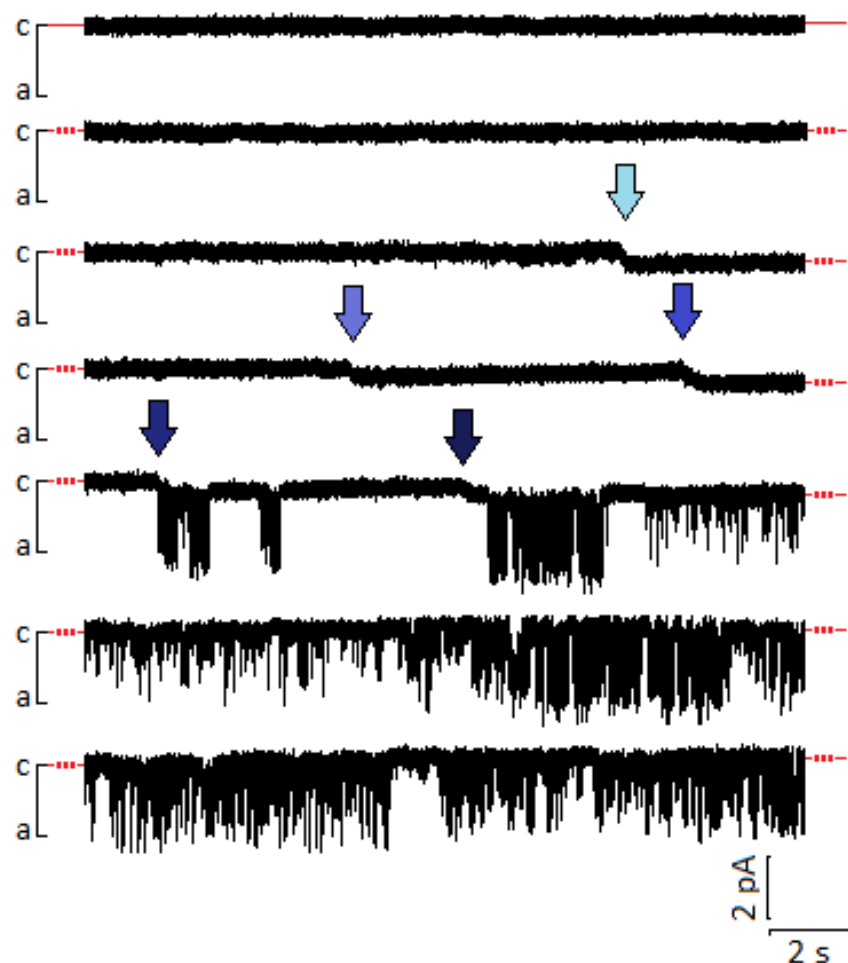


Figura 27. Activación del HEMKCA por efecto de la presión. Trazo de corriente en función del tiempo de un parche de membrana aislado a -60 mV. Las flechas azules indican el momento en el cual se sumó una diferencia de presión negativa sobre el parche de membrana. A partir del cuarto paso de presión se evidencia la actividad del HEMKCA, cuya P_o aumento con el mismo. La línea roja representa la línea base (la letra "c" representa el estado no conductivo y la "a" al conductivo del canal). Solución experimental a ambos lados: 150 mM KCl, 10 Buffer TRIS y 1 CaCl_2 (pH = 7,3; osmolaridad = 313 mOsm). Frecuencia de filtrado: 1000 KHz.

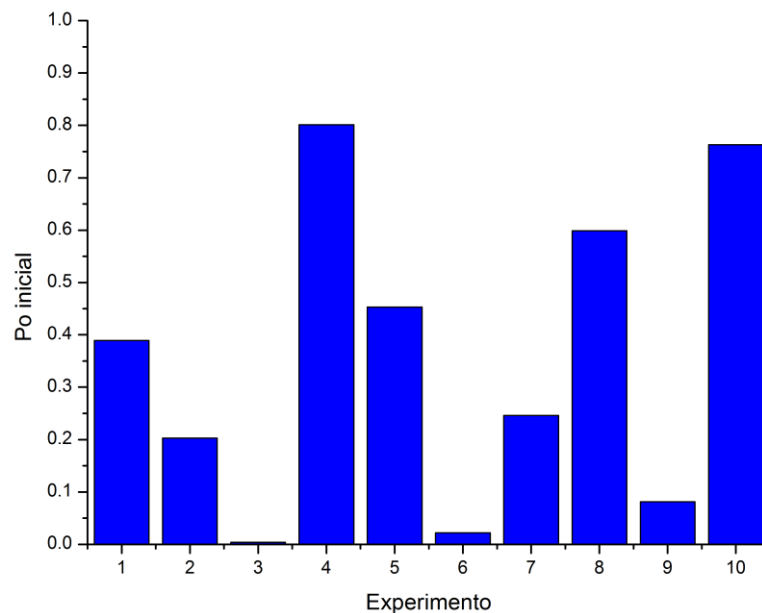


Figura 28. Gráfico de barras de la P_o inicial (en el primer minuto de registro) del HEMKCA en parches de membrana expuestos a condiciones simétricas de K^+ a -60 mV de 10 experimentos diferentes. Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM KCL, 10 mM Buffer TRIS, 1 mM $CaCl_2$ (pH = 7,3; osmolaridad = 313 mOsm).

Para evidenciar el efecto del tiempo sobre la P_o , se registró durante 9 minutos la actividad del HEMKCA en un parche de membrana con una P_o inicial $> 0,5$ (determinada en el primer minuto de registro) a -60 mV (Figura 29). No se sumaron diferencias de presión a través de la jeringa una vez verificada la mecano-sensibilidad del canal. A partir de este registro se construyó un histograma de probabilidad de apertura en ventanas de tiempo de 5 s (Figura 30). En este se evidencian dos fenómenos: i) el decaimiento de la P_o en el tiempo y ii) la variabilidad intrínseca de la P_o del canal en un parche de membrana.

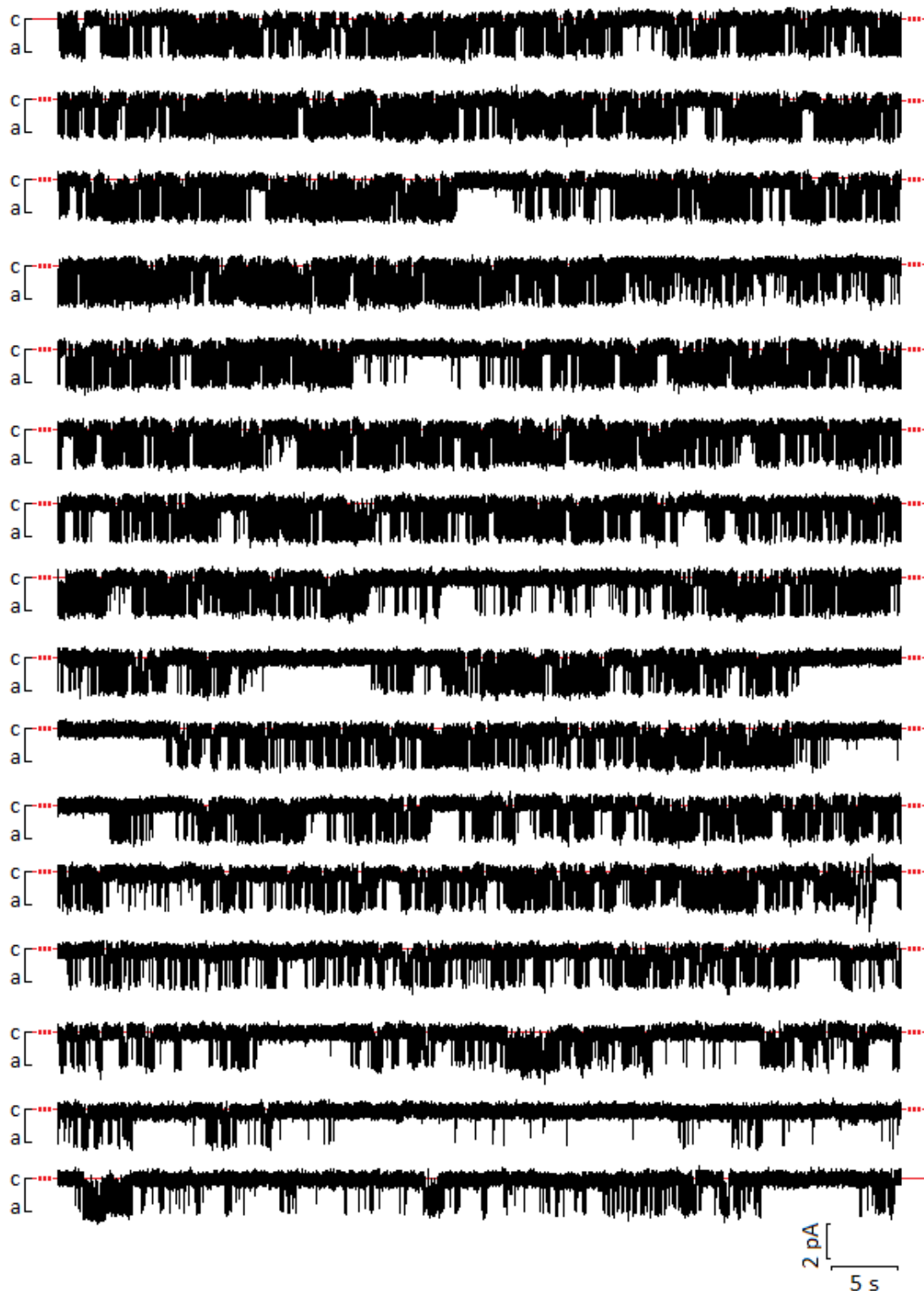


Figura 29. Decaimiento de la P_o del HEMKCA en el tiempo. Trazo de corriente en función del tiempo de un parche de membrana a -60 mV. La línea roja representa la línea base (la letra “c” representa el estado no conductivo y la “a” al conductivo del canal). Solución experimental a ambos lados: 150 mM KCl, 10 Buffer TRIS y 1 CaCl_2 ($\text{pH} = 7,3$; osmolaridad = 313 mOsm). Frecuencia de filtrado: 1000 KHz.

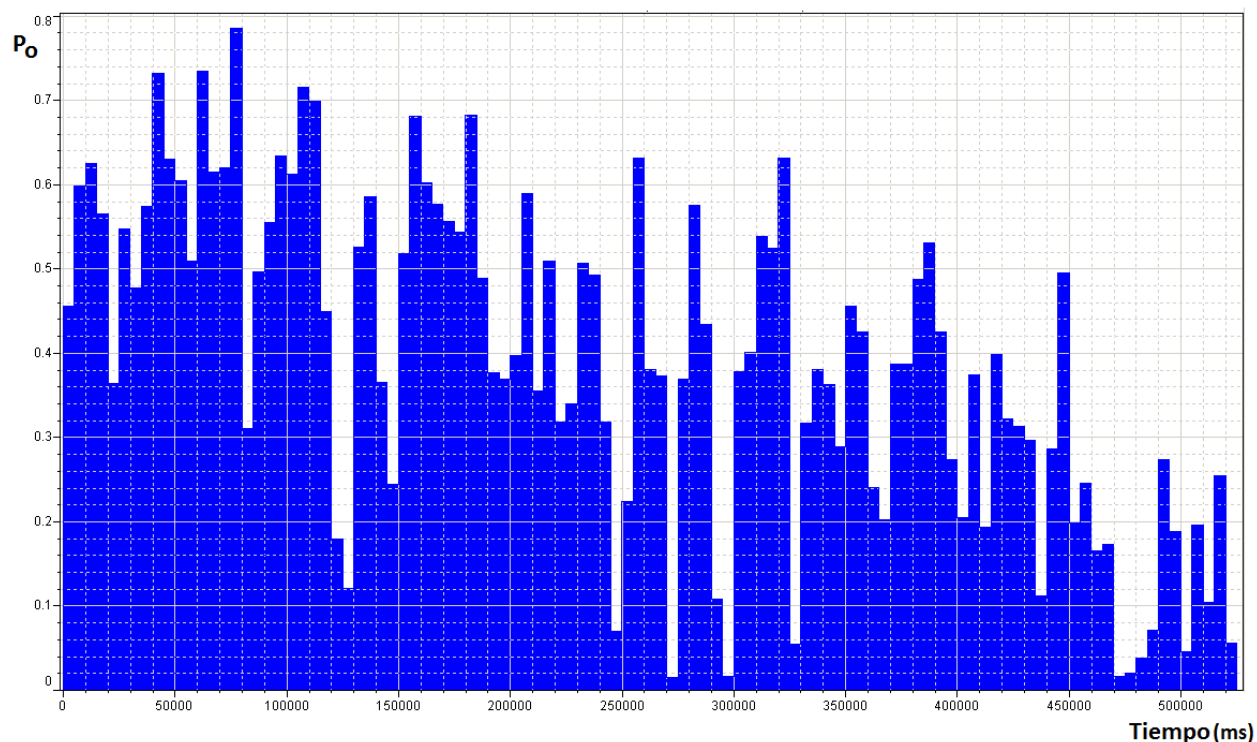


Figura 30. Histograma de la probabilidad de apertura determinada en periodos de 5 s, del HEMKCA a -60 mV en el tiempo. Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM KCL, 10 mM Buffer TRIS y 1 mM CaCl_2 ($\text{pH} = 7,3$; osmolaridad 313 mOsm).

De estas pruebas nos encontramos con tres hechos: i) desplazando la misma cantidad de aire en la jeringa con la que se aplica la presión negativa sobre los parches de membrana, se obtuvo alta variabilidad de la P_o inicial (determinada en el primer minuto de registro); ii) la P_o decae en el tiempo y iii) hay una variabilidad intrínseca de la P_o dentro de cada registro.

Efecto del potencial

Con estas consideraciones en mente se diseñó el protocolo esquematizado en la figura 13, obteniéndose registros como el de la Figura 31. Se determinó la P_o para cada segmento del

registro (30 s) y estos valores se agruparon según el V_m al cual se determinó. Estos grupos se promediaron por registro, obteniéndose parejas de data pareada. Con estos datos se construyó un gráfico P_o -V (Figura 32) en el cual se unió cada par de datos con una línea. Todas estas presentaron una pendiente negativa, indicando que el promedio de la P_o determinada a -60 mV fue mayor que el mismo determinado a 60 mV en todos los experimentos ($n=15$).

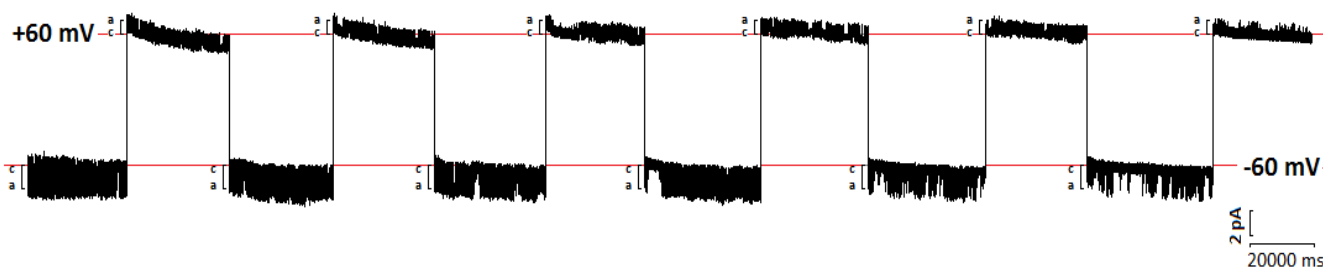


Figura 31. Registro típico del estudio del efecto del V_m sobre la P_o del HEMKCA. Se fijó el V_m de manera alternada de -60 a 60 mV en segmentos de 30 s por un tiempo total de 6 minutos. La línea roja representa la línea base a ambos potenciales de prueba (-60 y 60 mV) (la letra “c” representa el estado no conductivo y la “a” al conductivo del canal). Solución experimental: 150 mM KCl, 10 Buffer TRIS y 1 CaCl₂ (pH = 7,3; osmolaridad = 313 mOsm). Frecuencia de filtrado: 1 KHz.

Este efecto se evaluó estadísticamente utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Se calcularon los estadísticos W y Z para una prueba de dos colas con un nivel de significancia de 0,01. El valor W calculado fue 0. El valor crítico W_{crit} para esta prueba de dos colas, con un N = 15 y el nivel de significancia mencionado es 15. Por lo que $W < W_{crit}$; el valor Z calculado fue -3,41 y el valor p 0,00064. Por lo que $p < 0,01$. Rechazando de esta forma la hipótesis nula, indicando una diferencia significativa entre los tratamientos experimentales (potenciales de membrana fijados).

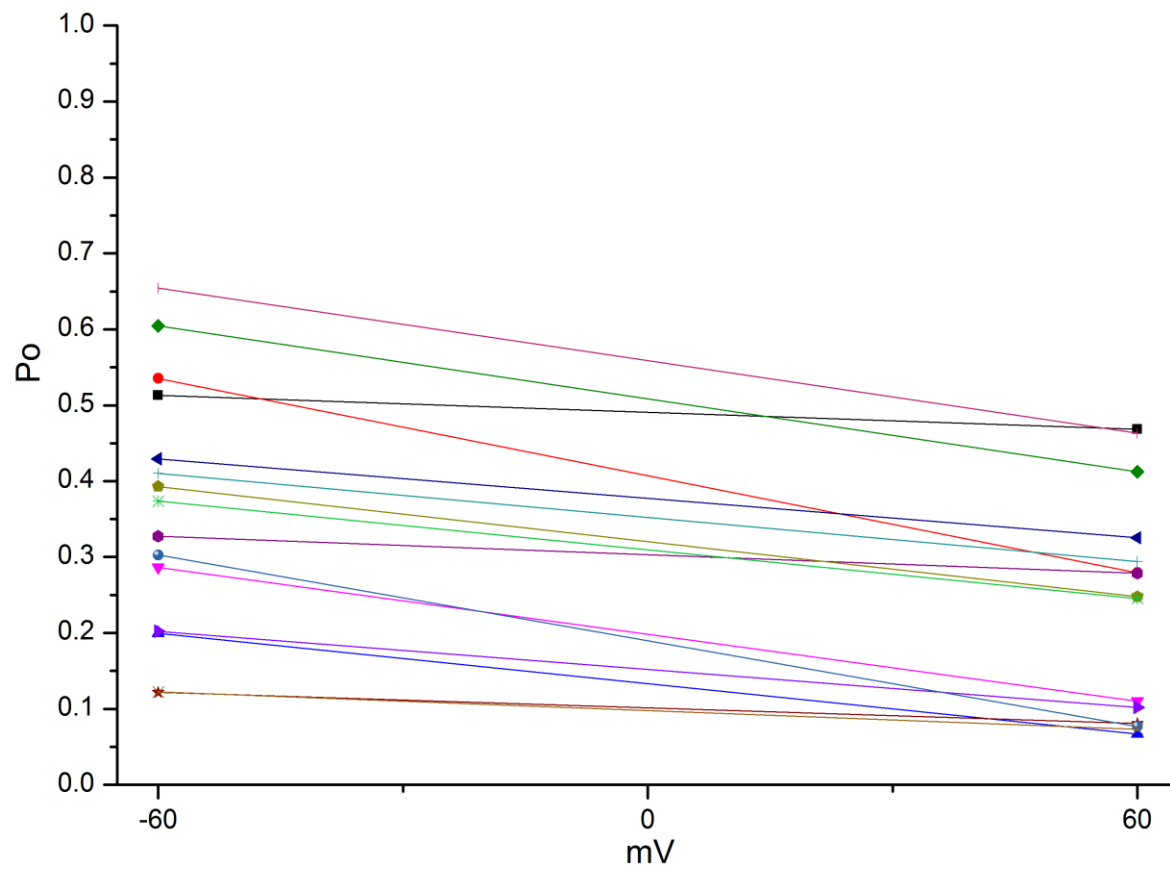


Figura 32. Gráfico P_0 -V del HEMKCA (probabilidad de apertura en función del V_m fijado). Cada par de datos ($n=15$) está unido por una línea y representado por un color diferente. Solución a ambos lados de la membrana: 150 mM KCl, 10 Buffer TRIS, 1 CaCl₂ (pH = 7,3; osmolaridad 313 mOsm).

Discusión

Efecto del potencial de membrana sobre la conductancia

Usar la técnica de T.U.G.O. Patch clamp en condiciones simétricas permitió caracterizar el efecto del potencial de membrana sobre la conductancia del HEMKCA. En estas condiciones, se confirma que este es un canal rectificador hacia adentro débil (Figura 17). Esta característica indica que el HEMKCA debe presentar, en cierto grado, homología estructural con la sub-familia de canales Kir.

Como se menciona en la introducción, es aceptado que la rectificación hacia adentro es una consecuencia del bloqueo voltaje dependiente por Mg^{2+} o poliaminas. Este tipo de bloqueo presenta cinéticas rápidas y la dependencia de voltaje de este fenómeno se atribuye a un fuerte acoplamiento entre el bloqueo de Mg^{2+} o poliaminas con el movimiento de K^+ a través de un poro “largo” (Lopatin y col, 1995; Pearson y Nichols, 1998; Guo y col, 2003; Lu, 2004). La característica de poro largo de los canales Kir ha sido confirmada a partir de estudios de cristalografía que permitieron elucidar la estructura de distintos canales de la familia Kir (Nishida y MacKinnon, 2002; Kuo y col, 2003). Bajo esta hipótesis, la dependencia de voltaje del bloqueo surge ya que el bloqueador entra al poro largo desde el lado citoplasmático y genera un movimiento forzado, desde el citoplasma hacia el exterior celular, de múltiples K^+ en una fila frente a dicho bloqueador. De esta forma, a medida que el potencial de membrana se aleja del potencial de reversión hacia valores más positivos, mayor será la probabilidad de que ocurra este tipo de bloqueo. Esto concuerda con los datos de este trabajo en donde se obtuvo que las conductancias se saturan a

potenciales de membrana positivos (Tabla 7). A potenciales de membrana negativos la conductancia del canal no se saturó. Es aceptado que esta propiedad, en marco del bloqueo mencionado, es consecuencia del “desplazamiento” (del inglés *knockoff*) que realizan iones permeables al canal que se encuentran del lado extracelular de la membrana, sobre el bloqueador que se encuentra interactuando con el poro del lado intracelular. Esto se evidencia en experimentos donde se puede aumentar la conductancia de canal unitario de canales Kir, con respecto a la concentración extracelular de K^+ en soluciones asimétricas (Christophersen, 1991) y simétricas (González y col, 2012; Yang y col, 2012a).

Para determinar la selectividad del HEMKCA (resultados discutidos en la siguiente subsección) se realizaron pruebas en condiciones simétricas de Rb^+ . La corriente mediada por el flujo de Rb^+ (y por lo tanto la conductancia a este ion) siempre fue menor que las corrientes de K^+ en las mismas condiciones, además la rectificación del HEMKCA en estas condiciones fue menor que la evidenciada con K^+ (Figura 21). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yang y colaboradores (2012a). Ellos atribuyen que este comportamiento indica que el Rb^+ presenta una menor tasa de disociación del canal en comparación al K^+ .

En los experimentos realizados en este trabajo no se agregó ningún tipo de poliamina o Mg^{2+} a las soluciones experimentales. Sin embargo, como se menciona en la sección de métodos, en todos los experimentos se agregaron 5 μ L de sangre a la cámara experimental sin ningún tratamiento previo a su extracción. Esto no permite descartar la presencia de estos compuestos del lado intracelular de los parches de membrana aislados. Ya que, por ejemplo, es conocido que al menos el 90% de las poliaminas totales en la sangre se encuentran asociadas a los eritrocitos (Moulinoux y col, 1991).

Christophersen (1991) estudio la rectificación, utilizando la técnica de *patch clamp* en la configuración de *inside-out*, del canal IKCa1 (canal Gardós) en la membrana de los eritrocitos humanos, en sus experimentos, el centrifugó y “lavó” los eritrocitos con una solución de KCl antes de hacer *patch clamp*. En este trabajo el demuestra que el canal Gardós es un rectificador hacia adentro débil. Sin embargo afirma, sustentándose en el tratamiento previo que realizó sobre la sangre utilizada, que la rectificación de este canal no se debe al bloqueo voltaje dependiente de las corrientes de salida por algún bloqueador intracelular sino que es solo consecuencia de la asimetría estructural del canal. En contraste a esta idea, Chepilko y colaboradores (1995) realizaron experimentos donde se expresaron canales Kir1.1b (rectificador hacia adentro débil) en oocitos de *Xenopus laevis*, usando la técnica del *patch clamp* en la configuración de *inside-out*, ellos evidenciaron que Kir1.1b presenta rectificación hacia adentro en la presencia de 5mM de Mg^{2+} en el lado citoplasmático pero no en las mismas condiciones experimentales sin Mg^{2+} . En experimentos análogos al mencionado anteriormente, se expresó Kir2 (rectificador hacia adentro fuerte) en oocitos de *Xenopus sp* y se agregaron distintas poliaminas a la solución del lado intracelular del parche de membrana aislado. Se demostró que en esas condiciones experimentales Kir2 no rectifica hasta que se agregan las poliaminas al medio (Ficker y col, 1994; Lopatin y col, 1994; Fakler y col, 1995; Lopatin y col, 1995).

Aunque no podemos atribuir con certeza la causa de la rectificación del HEMKCA. Los resultados de este trabajo indican que el canal comparte características funcionales con la subfamilia de canales Kir. Por esta razón se sugiere: Realizar experimentos en los que se laven las poliaminas o Mg^{2+} de las soluciones experimentales antes de la realización de experimentos como los realizados en este trabajo o por Christophersen (1991), para así estudiar la posibilidad

de que el bloqueador se encuentra asociado a la membrana y no puede ser lavado o evaluar la hipótesis de que la rectificación del HEMKCA ocurre a consecuencia del bloqueo dependiente de voltaje de alguna de las moléculas mencionadas; realizar experimentos para comprobar la dependencia de la concentración extracelular del ion permeable, como los realizados por Yang y colaboradores (2012a), para evidenciar el efecto del *knockoff*; y continuar investigando el efecto de los iones Na^+ , Mg^{2+} y Ba^{2+} a ambos lados de la membrana (Romero, 2004; Mata; 2016; Portillo, comunicación personal). Se conoce que estos iones bloquean las corrientes de K^+ en los canales Kir y la sensibilidad a la concentración extracelular de Ba^{2+} depende del tipo de canal Kir (González y col, 2012; Yang y col, 2012b).

Selectividad

En este trabajo se demuestra que el HEMKCA es permeable al Rb^+ , mientras que para Na^+ , Li^+ o Cs^+ no se pudieron detectar flujos de corriente. Esto se comprobó bajo dos aproximaciones distintas a la selectividad iónica: i) medidas de la conductancia de canal unitario en condiciones simétricas (Figuras 18, 19 y 20) y ii) potenciales de cero corriente en condiciones bi-iónicas (Figuras 22 A y B, 23 y 24). Como se menciona en la sección de resultados, en los experimentos en condiciones simétricas de Cs^+ no se pudo comprobar la presencia del HEMKCA ya que cuando se intentó introducir K^+ , la inestabilidad de los giga sellos obtenidos en estas condiciones no permitió intercambiar la solución de la cámara experimental, y por ende evidenciar el flujo de corrientes a través del canal, como si pudo hacerse en las pruebas realizadas con Na^+ y Li^+ (Figuras 18 y 19 respectivamente). En estos casos la mecanosensibilidad corrobora la identificación del

HEMKCA, esto se logró aplicando diferencias de presión negativa al final de los registros (no se muestra).

Las relaciones de permeabilidad (P_k/P_x) y las de conductancia (g_k/g_x) son dos medidas distintas de selectividad iónica. P_k/P_x indica el valor de potencial de membrana en el cual las fuerzas electroquímicas de los iones involucrados se encuentran balanceadas. Mientras que g_k/g_x es una medida de la conductancia relativa de iones. Juzgando a partir de (i) g_k/g_x se determinó que: $K^+ (1) > Rb^+ (1,71)$; mientras que a partir de (ii) P_k/P_x , las secuencias de selectividad del HEMKCA a los iones K^+ , Rb^+ , Na^+ , Li^+ y Cs^+ son para condiciones bi-iónicas A (con K^+ en la cámara experimental): $K^+ (1) > Rb^+ (1,49) > Cs^+ (16,36) > Li^+ (22,53) > Na^+ (34,95)$; y para condiciones bi-iónicas B (Con K^+ en la pipeta): $K^+ (1) > Rb^+ (2,05) > Cs^+ (5,14) > Na^+ (11,89) > Li^+ (25,39)$.

Las secuencias de selectividad obtenidas corresponden a las secuencias predichas por Eisenman y Horn (1983) de las afinidades relativas para la unión en equilibrio de estos iones a sitios de fuerza de campo (eléctrico) intermedia. Específicamente a la secuencia IV, esto con y sin la “anomalía del Li^+ ” (del inglés: *Li⁺ anomaly sequence*). Se dice que una secuencia de selectividad presenta dicha “anomalía” cuando esta se desvía de alguna predicha por Eisenman y Horn (1983) cambiando la posición relativa del Li^+ indicando mayor selectividad para este ion que en la secuencia predicha. Los valores de las relaciones de permeabilidad (P_k/P_x) para el Na^+ y Cs^+ fueron diferentes dependiendo del lado de la membrana en el que el ion se encontraba. Esto generó la anomalía del Li^+ obtenida en condiciones bi-iónicas A. Estos resultados no son conflictivos entre sí, si se considera la posibilidad de que estos iones interactúan de manera diferente con el canal dependiendo de qué lado de la membrana se encuentren.

Como se menciona en los antecedentes, Romero (2004) realizó un estudio sobre la selectividad del HEMKCA, específicamente realizó pruebas para determinar la relación de permeabilidades entre el K^+ y el Na^+ (Figura 9). En contraste a los resultados obtenidos en este trabajo, Romero (2004) calculó una $P_K/P_{Na} = 100$ a partir de condiciones iónicas mixtas (concentraciones asimétricas de $K^+ + Na^+$ a ambos lados). Esta diferencia puede ser consecuencia de algún efecto del Na^+ sobre el HEMKCA o de la diferencia de las concentraciones iónicas en las condiciones establecidas. Christophersen (1991) realizó pruebas registrando la actividad del canal Gardós en parches de membrana de eritrocitos humanos en condiciones iónicas mixtas de K^+ y Na^+ evidenciando una disminución de las corrientes de K^+ al aumentar la concentración intracelular de sodio con respecto a un control.

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos soportar la idea de que hay un efecto de los iones monovalentes utilizados, por el lado interno de la membrana, sobre las corrientes de K^+ . Esto lo podemos ver comparando las Figuras 25 y 26 de la siguiente manera: Las condiciones bi-iónicas de K^+ como ion de prueba resultan en una condición simétrica para dicho ion. Por esta razón en las Figuras 25 y 26, se presenta una curva I-V correspondiente a las corrientes de K^+ en condiciones simétricas. Conocemos que la dirección del flujo de iones a través de canales iónicos viene dada por su gradiente electroquímico (MacKinnon, 2003) y este está compuesto por dos componentes: el gradiente químico (establecido por la concentración del ion a ambos lados) y el gradiente eléctrico (establecido por el potencial de membrana). En las condiciones bi-iónicas A (Figura 25), las corrientes de K^+ con los iones de prueba en la pipeta son mayores a las corrientes de K^+ en condiciones simétricas. Esto concuerda con el hecho de que hay una suma de los gradientes químico y eléctrico que impulsa el flujo de K^+ en condiciones bi-

iónicas, mientras que en las condiciones simétricas de K^+ solo hay un gradiente eléctrico impulsando el flujo. En las condiciones bi-iónicas B (Figura 26) ocurre lo contrario, es decir, las corrientes de K^+ con los iones de prueba en la cámara experimental son menores que las corrientes de K^+ en condiciones simétricas. Esto no concuerda con el razonamiento anterior y sirve como evidencia para sugerir que se estudie el efecto de la concentración de K^+ , Na^+ y Cs^+ a ambos lados de la membrana sobre la actividad del HEMKCA en futuras investigaciones.

Efecto del potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura

Como se evidencia en las Figuras 7, 8 y 27, la P_o del HEMKCA depende de la presión (Romero, 2004; Mata, 2016). Idealmente, al establecer diferencias de presión negativa similares sobre distintos parches de membrana aislados en las mismas condiciones, la P_o inicial de los registros sería parecida. En nuestro sistema experimental, las diferencias de presión negativa se aplican a través de una jeringa calibrada desplazando una cantidad de aire determinada. En todos los experimentos, aunque se desplazó la misma cantidad de aire con la finalidad de obtener P_o iniciales dentro de un intervalo estrecho, se evidenció una alta variabilidad en la P_o inicial, determinada en el primer minuto de registro, de los experimentos (Figura 28). Estos resultados son similares a los obtenidos por Mata (2016). Esto podría estar ocurriendo debido a diferencias de la tensión que experimentan los parches de membrana mientras se registra la actividad del HEMKCA. A su vez, estas pueden ser consecuencia de diferencias en las dimensiones exactas de las pipetas y la cantidad de membrana que entra a estas en cada experimento. Lo que resultaría en una diferencia de las fuerzas mecánicas que actúan sobre cada parche de membrana aislado.

Como se menciona en los antecedentes, la P_o del HEMKCA decae con el tiempo (Romero y Zambrano, 2010). Este comportamiento se evaluó en las condiciones experimentales planteadas para este estudio evidenciándose cualitativamente en un registro (Figura 29) y cuantitativamente con un histograma de P_o en intervalos de tiempo de 5 s (Figura 30). Adicionalmente al comportamiento mencionado, en este tipo de histogramas se evidencio otra propiedad del HEMKCA: este presenta una variabilidad intrínseca de la P_o en un mismo registro. Esta variabilidad parece ser estocástica.

Para estudiar el efecto del potencial de membrana sobre la P_o del HEMKCA fue necesario hacer un diseño experimental que permitiera i) comparar diferentes experimentos minimizando el efecto de la variabilidad de P_o inicial, ii) obtener data lo menos sesgada posible por el efecto del tiempo sobre la P_o , iii) impedir subestimar o sobreestimar la P_o debido a la variabilidad intrínseca de la P_o entre distintos registros. Para solucionar estos problemas se decidió: i) realizar un diseño que permitiera obtener data pareada; ii) fijar el potencial de membrana de manera alternada y iii) que los segmentos alternados tuvieran una duración lo suficientemente corta como para propagar equitativamente el error producto del decaimiento de la P_o en el tiempo, pero lo suficientemente larga como para no subestimar o sobreestimar la P_o a consecuencia de la alta variabilidad.

El protocolo resultante (Figura 13), aunque no eliminó por completo los errores considerados, permitió demostrar que al cambiar la polaridad del potencial de membrana de -60 a 60 mV, la P_o disminuye. En la Figura 32 se evidencia que la pendiente de las líneas que conectan cada par de datos pareados es negativa, indicando que la P_o determinada a 60 mV siempre es

menor que a -60 mV. Esta disminución de la P_o es significativa con un nivel de significancia de 0,01 (evaluando con una prueba de dos colas de rangos con signo de Wilcoxon).

Estos resultados indican que la P_o del HEMKCA presenta una leve dependencia a la polaridad del potencial de membrana. Entendiéndose esta dependencia como algo ajeno al concepto clásico de voltaje-dependencia donde el *gating* de un canal esta acoplado al movimiento de un “sensor” que responde a variaciones en el potencial transmembrana. En este trabajo se evaluó el cambio de polaridad de solo un potencial (± 60 mV) de manera alternada como una primera aproximación al estudio del efecto del potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura del HEMKCA. Evaluar el efecto de distintos potenciales de membrana fijados, debe realizarse en futuras investigaciones.

Conclusiones

- El HEMKCA es un canal rectificador hacia adentro débil.
- En estas condiciones experimentales, las conductancias del HEMKCA a Na^+ , Li^+ y Cs^+ son tan bajas que no es posible detectar corrientes de estos iones.
- La conductancia del HEMKCA a K^+ es 1,71 veces mayor a la conductancia al Rb^+ .
- La rectificación evidenciada con K^+ disminuye cuando el ion permeante es Rb^+ .
- Cuando se evalúa las relaciones de permeabilidades en condiciones bi-iónicas con K^+ en la cámara experimental la secuencia de selectividad es:
$$\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+.$$

Y en condiciones bi-iónicas con K^+ en la pipeta la secuencia de selectividad es:
$$\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+.$$
- El protocolo utilizado alternando la polaridad del potencial de membrana fijado es adecuado para el estudio del efecto de cambios en el potencial de membrana sobre la probabilidad de apertura.

- En condiciones simétricas, la probabilidad de apertura del HEMKCA presenta una dependencia del potencial de membrana, siendo mayor a potenciales negativos que a positivos.

Bibliografía

Andersen, O. S., Koeppe, R. E. 2007. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**:107—130.

Arese, P., Turrini, F., Schwarzer, E. 2005. Band 3/Complement-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **16**:133-146.

Barksmann, T. L., Kristensen, B. I., Christophersen, P., Bennekou, P. 2004. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel; Part I. Activation by clotrimazole and analogues. *Blood Cells. Mol. Dis.* **32**:384—388.

Bavi, N., Nakayama, Y., Bavo O., Cox, C. D., Qin, Q-H., Martinac, B. 2014. Biophysical implications of lipid bilayer rheometry for mechanosensitive channels. *Proc. Nat. Ac. Scie.* **111**:13864—13869.

Bennekou, P. 1993. The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1147**:165—167.

Bennekou, P., Barksmann, T. L., Kristensen, B. I., Jensen, L. R., Christophersen, P. 2004. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part II: inactivation and blocking. *Blood Cells. Mol. Dis.* **33**:356—361.

Bezania, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* **80**:555-592.

Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J., Kaczmarek, L. K. 2003. Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J. Neurosci.* **23**:11681—11691.

Blatz, A. L., Magleby, K. L. 1986. Single apamin-blocked Ca^{2+} -activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature.* **323**:718—720.

Bouyer, G., Egee, S., Thomas, S. L. 2006. Three types of spontaneously active anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells. Mol. Dis.* **36**:248—254.

Bouyer, G., Egee, S., Thomas, S. L. 2007. Toward a unifying model of malaria-induced channel activity. *Pro. Nat. Aca. Sci. USA.* **104**:11044—11049.

Bouyer, G., Cueff, A., Egee, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., Gallagher, P. G., Thomas, S. L. 2011. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood.* **118**:2305-2312.

Brohawn, S. G., Su, Z., MacKinnon, R. 2014. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *PNAS*. **111**:3614-3619.

Browning, J. A., Staines, H. M., Robinson, H. C., Powell, T., Ellory, J. C., Gibson, J. S. 2007. The effect of deoxygenation on whole-cell conductance of red blood cells from healthy individuals and patients with sickle cell disease. *Blood*. **109**:2622—2629.

Brugnara, C., Armsby, C. C., De Franceschi, L., Crest, M., Euclaire, M. F., Alper, S. L. 1995. Ca²⁺-activated K⁺ of human and rabbit erythrocytes display distinctive patterns of inhibition by venom peptide toxins. *J. Membrane. Biol.* **147**:71—82.

Brugnara, C., Gee, B., Armsby, C. C., Kurth, S., Sakamoto, M., Rifai, N., Alper, S. L. y colaboradores. 1996. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* **97**(5):1227-1234.

Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Sachs, F., Lazduski, M., Honore, E. 2007. Up-and down regulation of the mechano-gated K (2p) channel TREK-1 by pip(2) and other membrane phospholipids. *Plff. Arch. Eur. J. Physiol.* **455**:97—103.

Chepilko, S., Zhou, H., Sackin, L., Palmer, G. 1995. Permeation and gating properties of a cloned renal K channel. *A. J. Physiol.* **268**:389—401.

Christophersen, P. 1991. Ca^{2+} -activated K^+ channel from human erythrocyte membranes: single channel rectification and selectivity. *J. Membrane. Biol.* **119**:75—83.

Christophersen, P., Bennekou, P. 1991. Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1065**:103—106.

Colquhoun, D., Sigworth, F. J. 1995. Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. Págs: 483-585 en: Sakmann, B., Neher, E. (eds.), 1995. Single-Channel Recording. Plenum Press. Segunda Edición. New York, USA.

Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., Perozo, E. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nature Struc. Mol. Bio.* **13**:311-318.

Cordero, J. F., Romero, P. J. 2002. Caffeine activates a mechanosensitive Ca^{2+} channel in human red cells. *Cell Calcium.* **31**:189—200.

Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., Sompornpisut, A., Purdy, M. D., Wiener, M. C., Perozo, E. 2010. Design and characterization of a constitutively open KcsA. *FEBS letters.* **584**:1133-1138.

Dao, M., Li, J., Suresh, S. 2006. Molecularly based analysis of deformation of spectrin network and human erythrocyte. *Mater. Sci. Eng. C.* **26**:1232-1244.

Del Carlo, B., Pellegrini, M., Pellegrino, M. 2002. Calmodulin antagonists do not inhibit IK(Ca) channels of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1558**:133—141.

Dietrich, A., Gudermann, T. 2007. TRPC6. *HEP*. **179**:125—141.

Doyle, D.A., Morais-cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. **5360**:69—77.

Dunn, P. M. 1998. The action of blocking agents applied to the inner face of Ca²⁺-activated K⁺ channels from human erythrocytes. *J. Membrane. Biol.* **165**:133—143.

Duque, D., Li, X. J., Katsov, K., Schick, M. 2002. Molecular theory of hydrophobic mismatch between lipids and peptides. *J. Chem. Phys.* **116**:10478—10484.

Durantón, C., Huber, S. M., Lang, F. 2002. Oxidation induces a Cl[−]-dependent cation conductance in human red blood cells. *J. Physiol.* **539**:847—855.

Dyrda, A., Cytlak, U., Ciuraszkiewicz, A., Lipinska, A., Cueff, A., Bouyer, G., Egee, S., Bennekou, P., Lew, V. L., Thomas, S. L. 2010. Local membrane deformations activate Ca²⁺-dependent K⁺ and anionic currents in intact human red blood cells. *PLoS. One*. **5**:e9447.

Eisenman, G., Horn, R. 1983. Ionic Selectivity Revisited: The Role of Kinetic and Equilibrium Processes in Ion Permeation Through Channels. *J. Membran. Biol.* **76**:197-225.

Engelman, D. M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature.* **438**:578—580.

Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Weidenann, S., Zenner, H. P., Ruppersberg, J. P. 1995. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell.* **80**:149—154.

Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M., Brown, A. M. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science.* **166**:1068—1072.

Föller, M., Kasinathan, R. S., Koka, S., Lang, C., Shumilina, E., Birnbaumer, L., Lang, F., Huber, S. M. 2008. TRPC6 Contributes to the Ca²⁺ Leak of human Erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **21**:183—192.

Freedman, J. C. 2001. Membrane Transport in Red Blood Cells. Págs: 377-392 en: Sperelakis, N. (ed.), Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach. Academic Press. Tercera edición. California, USA.

Freedman, J. C. 2012. Cell membranes. Págs. 49-61 en: Sperelakis, N. (ed.), Cell Physiology Sourcebook: Essentials of Membrane Biophysics. Academic Press. Cuarta edición. California, USA.

Freund, J. B. 2013. The flow of red blood cells through a narrow spleen-like slit. *Phys. Fluids*. **25**:110807. Maryland, USA.

Gallagher, P. G., Forget, B. G., Lux, S. E., 1998. Disorders of the erythrocyte membrane. Págs: 544-664 en: Nathan, D. G., Orkin, S. H. (eds.), Hematology of Infancy and Childhood. W. B. Saunders. Primera edición. Philadelphia, USA.

Gardós, G. 1956. The permeability of human erythrocytes to potassium. *Acta Physiol*. **4**:185-189.

Gincel, D., Silberberg, S. D., Shoshan-Barmatz, V. 2000. Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate. *J. Bioenerg. Biomembr*. **32**:571—583.

Glowgowska, E., Dyrda, A., Cueff, A., Bouyer, G., Egee, S., Bennekou, P., Thomas, S. L. 2010. Anion conductance of the human red cell is carried by maxi-anion channel. *Blood Cells. Mol. Dis*. **44**:243—251.

Goldman, D. E. 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol*. **27**:37-60.

González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., Latorre, R. 2012. K Channels: Function-Structural Overview. *Compr. Physiol.* **2**:2087--2149.

Guo, D., Ramu, Y., Klem, A. M., Lu, Z. 2003. Mechanism of rectification in inward rectifier K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **121**:261—275.

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**:5—6.

Grygorzyc, R., Schwarz, W., Passow, H. 1984. Ca²⁺-Activated K⁺ channels in human red cells: Comparison of single-channel currents with ion fluxes. *Biophys. J.* **45**:693-698.

Hamill, O. P. 1981. Potassium channel currents in human red blood cells. *J. Physiol.* **319**:97—98.

Hamill, O. P. 2006. Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch.* **453**(3):333—351.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers. Arch.* **391**:85-100.

Haswell, E. S., Phillips, R., Rees, D. C. 2011. Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How They Do It?. *Structure*. **19**:1356-1369.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. and MacKinnon, R. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**:1061-1067.

Heinemann, S. H. 1995. Guide to Data Acquisition and Analysis. Págs: 53-91 en: Sakmann, B., Neher, E. (eds.), Single-Channel Recording. Plenum Press. Segunda edición. New York, USA.

Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y. 2010a. Inwardly rectifying channels: Their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* **90**:291—366.

Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., Kurachi, Y. 2010b. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers. Arch.* **459**:521—533.

Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Inc. Tercera edición. Massachusetts, USA.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **117**:449-572.

Hodgkin, A. L., Katz, B. 1949. The effect on sodium ions in electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* **108**:37-77.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., Katz, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo. *J. Physiol.* **116**: 424-448.

Hoffman, J. F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., Wickrema, A. 2003. The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (gardos channel) in human red blood cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:7366—7371.

Honore, E. 2007. The neuronal background K2P channels: Focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**:251—261.

Huber, S. M., Duranton, C., Henke, G., Van De Sand, C., Heussler, V., Shumilina, E., Sandu, C. D., y colaboradores. 2004. Plasmodium induces swelling-activated ClC-2 anion channels in the host erythrocyte. *J. Bio. Chem.* **279**:41444—41452.

Huber, S. M., Gamper, N., Lang, F. 2001. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* **441**:551—558.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. **423**:33—41.

Kaestner, L. 2013. Cation Channels in Erythrocytes – Historical and Future Perspective. Págs: 223-233 en: Calcium signaling: Approaches and Findings in the Heart and Blood. Springer. Primera Edición. Berlin, Alemania.

Kaestner, L., Bernhardt, I. 2002. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectroch.* **55**:71—74.

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 characterization. *Bioelectroch.* **53**:117—125.

Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., Adelman, J. P. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*. **273**:1709—1714.

Kung, C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*. **436**(7051):647–654.

Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., Doyle, D. A. 2003. Crystal structure of the potassium channel Kirbac1.1 in the closed state. *Science*. **300**:1922—1926.

Lang, K. S., Myssina, S., Tanneur, V., Wieder, T., Huber, S. M., Lang, F., Duranton, C. 2003. Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *N-S. Arch. Pharmacol.* **367**:391—396.

Lew, V. L., Tiffert, T., Etzion, Z., Perdomo, D., Daw, N., Macdonald, L., Bookchin, R. M. 2005. Distribution of dehydration rates generated by maximal Gardos-channel activation in normal and sickle red blood cells. *Blood*. **105**(1):45-63.

Lew, V. L., Tsien, R. Y., Miner, C., Bookchin, R. M. 1982. Physiological $[Ca^{2+}]_i$ level and pump-leak turnover in intact red cells measured using an incorporated Ca^{2+} chelator. *Nature*. **298**(5873):478-481.

Li, J., Lykotrafitis, G., Dao, M., Suresh, S. 2007. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *PNAS* **104**(12): 4937-4942.

Li-Smerin, Y., Hackos, D. H., Swartz, K. J. 2000. Alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K^+ channel. *J. Gen. Physiol.* **115**:33—50.

Lopatin, A. N., Makhina, E. N., Nichols, C. G. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. **372**:366—369.

Lopatin, A. N., Makhina, E. N., Nichols, C. G. 1995. The mechanism of inward rectification of potassium channels: “Long-pore plugging” by cytoplasmic polyamines. *J. Gen. Physiol.* **106**:923—955.

Lu, Z. 2004. Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu. Rev. Physiol.* **66**:103—129.

MacKinnon, R. 2003. Potassium Channels. *FEBS letters*. **555**:62-65.

MacKinnon, R. 2004. Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Biosci. Rep.* **24**:75—100.

Maher, A. D., Kuchel, P. W. 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell B.* **35**:1182-1197.

Makhro, A., Hanggi, P., Goede, J. S., Wang, J., Bruggemann, A., Gassmann, M., Schmugge, M., Kaestner, L., Speer, O., Bogdanova, A. 2013. N-methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *Am. J. physiol.* **305**:1123—1138.

Marty, A. 1981. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* **291**:497—500.

Mata, A. 2016. Caracterización biofísica y fisiológica del canal de K⁺ dependiente de presión del eritrocito humano. Tesis doctoral. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.

Mathur, R., Zheng, J., Yan, Y., Sigworth, F. J. 1997. Role of the S3-S4 linker in Shaker potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* **109**:191—199.

Matsuda, H., Saigusa, A., Irisawa, H. 1987. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K⁺ channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature*. **325**:156—159.

Maylie, J., Bond, C. T., Herson, P. S., Lee, W. S., Adelman, J. P. 2004. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J. Physiol.* **554**:255—261.

Minetti, G., Egée, S., Morsdorf, D., Steffen, P., Makhro, A., Achilli, C., Ciana, A. y colaboradores. 2013. Red cell investigations: art and artefacts. *Blood. Rev.* **27**(2):91-101.

Mohandas, N., Morrow, J. S. 2000. Plasma membrane dynamics and organization. Págs: 40-48 en: Hoffman, R., Benz, E. J., Shatil, S. J., Furie, B., Cohen, H. J., Silberstein, L. E., McGlave, P. (eds.),

Hematology: Basic Principles and Practice. Churchill Livingstone. Tercera edición. Pensylvania, USA.

Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., MacKinnon, R. 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*. **414(6859)**:37—42.

Moulinoux, J. P., Quemener, V., Khan, N. A. 1991. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell. Mol. Biol.* **37**:773—783.

Neher, E., 1981. Unit conductance studies in biological membranes. En: Baker, P. F. (ed). *Techniques in cellular physiology*. Elsevier. Primera edición. Amsterdam, Holland.

Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-Channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature*. **260**:799-802.

Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J. H., 1978. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers. Arch.* **375**:219-228.

Nicolson, G. L. 2014. "The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years". *BBA - Biomembranes* **1838** (6): 1451–1466.

Nishida, M., MacKinnon, R. 2002. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell*. **111**:957—965.

Park, Y. B. 1994. Ion selectivity and gating of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **481**:555—570.

Pearson, W. L., Nichols, C. G. 1998. Block of the Kir2.1 channel pore by alkylamine analogues of endogenous polyamines. *J. Gen. Physiol.* **112**:351—363.

Penner, R. 1995. A Practical guide to patch clamping. Págs: 3-28 en: Sakmann, B., Neher, E. (eds.), 1995. Single-Channel Recording. Plenum Press. Segunda Edición. New York, USA.

Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M., Martinac, B. 2002. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat. Struct. Biol.* **9**:696—703.

Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., Sens, P. 2009. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*. **459**:379—385.

Pierigè, F., Serafini, S., Rossi, L., Magnani, M. 2008. Cell-based drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **60**:286-295.

Pinet, C., Antoine, S., Filoteo, A. G., Penninston, J. T., Coulombe, A. 2002. Reincorporated Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase can Mediate B-Type Ca^{2+} Channels Observed in Native Membrane of Human Red Blood Cells. *J. Membrane. Biol.* **187**:185—201.

Plant, L. D., Rajan, S., Goldstein, S. A. 2005. K2P channels and their protein partners. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**:326—333.

Romero, J. G. 2004. Diseño y aplicación de un símil físico de capilar sanguíneo para la caracterización biofísica de canales iónicos del eritrocito humano en condiciones fisiológicas. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Romero, J. G., Romero, P. J. 2005. De lo molecular a lo celular: De lo biofísico a lo fisiológico. Una nueva hipótesis para explicar el envejecimiento del eritrocito humano. *MIBE*. Vol.**4**:9-12.

Romero, J. G., Zambrano, A. R. 2008. El canal de potasio del eritrocito humano (HEMKCA) es el disparador de la senescencia y su regulación por Ca^{2+} es el mecanismo de seguridad. *MIBE*. Vol.**5**:93-96.

Romero J. G., Zambrano, A. R. 2010. A kinetic Characterization of the human erythrocyte mechano-activated K channel inactivation process. *Biophys. J.* Vol.**98**:324a—325a.

Romero, J. G., Zambrano, A. R. 2011. Effect of Intracellular pH on the Mechano Activated Potassium Channel from Human Erythrocyte. *Biophys. J.* Vol.**100**:280a.

Romero, J. G., Zambrano, A. R. 2012. The Mechano-Activated Potassium Channel from Human Erythrocyte (HEMKCA): Effect of Oxidative Stress and its Implication on the Senescence Process. *Biophys. J.* Vol.**102**:121a.

Romero, P. J. Hernández, C., 2008. Canales iónicos y envejecimiento de los eritrocitos humanos. *MIBE*. Vol.**5**:1—4.

Romero, P. J., Romero, E. A. 1997. Differences in Ca^{2+} pumping activity between sub-populations of human red cells. *Cell Calcium*. **21**:353-358.

Romero, P. J., Romero, E. A. 2003. New vanadate-induced Ca^{2+} pathway in human red cells. *Cell. Biol. Int.* **27**:903—912.

Romero, P. J., Romero, E. A., Mateus, D., Hernandez, C., Fernandez, I. 2006. Voltage dependent calcium channels in young and old human red cells. *Cell. Biochim. Biophys.* **46**:265—276.

Romero, P. J., Romero, E. A., Wikler, M. D. 1997. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim. Biophys. Acta.* **1323**:23-28.

Roux, B., MacKinnon, R. 1999. The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*. **285**:100—102.

Ruta, V., MacKinnon, R. 2004. Localization of the voltage-sensor toxin receptor on KvAp. *Biochemistry*. **43**:10071—10079.

Sakmann, B., Neher, E., 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* **46**:455-472.

Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., Wie, A. 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**:921—931.

Shieh, R. C., Chang, J. C., Arreloa, J. 1999. Interactions of Ba²⁺ with the pores of the cloned inward rectifier K⁺ channels Kir2.1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* **75**:2313—2322.

Shumilina, E., Huber, S. 2011. ClC-2 Channels in Erythrocytes. *Open Biol. J.* **4**:18—26.

Sigworth, F.J. 1994. Voltage gating of ion channels. *Q. Rev. Biophys.* **27**:1-40.

Simons, T. J. B. 1976. Calcium-dependent potassium exchange in human red cell ghost. *J. Physiol.* **256**:227-244.

Singer, S. J., Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. **175**(4023). 720-731.

Soh, H., Park, C. S. 2001. Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance Ca^{2+} -Activated K^+ channel rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys. J.* **80**:2270-2215.

Soh, H., Park, C. S. 2002. Localization of divalent cation-binding site in the pore of a small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel and its role in determining current-voltage relationship. *Biophys. J.* **83**:2528—2538.

Stocker, M., Hirzel, K., D'Hoedt, D., Pedarzani, P. 2004. Matching molecules to function: Neuronal Ca^{2+} -activated K^+ channels and afterhyperpolarizations. *Toxicon*. **43**:933—949.

Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Kung, C. 1997. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annu. Rev. Physiol.* **59**:633—657.

Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., Bayliss, D. A. 2001. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* **21**:7491—7505.

Thomas, S. L. Y., Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Glogowska, E., Ollivaux, C. 2011. Ion channels in human red blood cell membrane: Actors or relics?. *Blood cell mol. Dis.* **46**:261-265.

Tiffert, T., Spivak, J. L., Lew. V. L. 1988. Magnitude of calcium influx required to induce dehydration of normal human red cells. *Biochim. Biophys. Acta* **943**:157-165.

Tse, W. T., Lux, S. E. 2001. Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. Págs: 4665-4727 en: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.), *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill. Octava edición. New York, USA.

Vandorpe, D. H., Xu, C., Shmukler, B. E., Otterbein, L. E., Trudel, M., Sachs, F., Gottlieb, P. A., Brugnara, C., Alper, S. L. 2010. Hypoxia activates a Ca²⁺-permeable cation conductance sensitive to carbon monoxide and to GsMTx-4 in human and mouse sickle erythrocytes. *PLoS ONE*. **5**:e8732.

Veenman, L., Shandalov, Y., Gavish, M. 2008. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**:199—205.

Yawata, Y. 2003. *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a model*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Primera edición. Weinheim, Alemania.

Wickman, K. and Clapham, D.E. 1995. Ion Channel Regulation by G Protein. *Physiol. Rev.* **75**:865-885.

Wilcoxon, F. 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*. **1**:80—83.

Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E. y colaboradores. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. **395**:503—507.

Yang, L., Edvinson, J., Backin, H., Palmer, L. G. 2012a. Ion selectivity and current saturation in inward-rectifier K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **139**:145—157.

Yang, L., Edvinson, J., Palmer, L. 2012b. Interactions of external K⁺ and internal blockers in a weak inward-rectifier K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **140**:529—540.

Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., Salkoff, L. 2000. SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat. Neurosci.* **3**:771—779.

Zhou, Y., Morais-cabral, J. H., Kaufman, A., MacKinnon, R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*. **414(6859)**:43—48.