



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**EFFECTO DEL ADENILIL IMIDODIFOSFATO (AMP-PNP) SOBRE LAS CORRIENTES DEL INTERCAMBIADOR
 K^+/Ca^{2+} DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Bachiller Naileth Daniela
González Sanabria como requisito Parcial para
optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Alejandro Mata

Caracas, Octubre 2017


DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DE LA BACHILLER NAILETH GONZALEZ


Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el trabajo especial de grado de la bachiller Naileth González, portadora de la cédula de identidad V- 20.975.387, titulado:

**“EFECTO DEL ADENILIL IMIDODIFOSFATO (AMP-PNP) SOBRE LAS CORRIENTES DEL
INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+} DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO”**

Considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos para optar al título de Licenciada en Biología, lo declaramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los cinco (05) días del mes de octubre del año dos mil diecisiete (2017), dejando constancia de ello los miembros del jurado.


Profesor Alejandro Mata
(Tutor)


Doctora Cecilia Castillo
(Jurado)


Profesor Fernando González
(Jurado)

INDICE

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN.....	10
El eritrocito humano	11
Membrana del eritrocito	11
Mecanismos de transporte iónico descritos en la membrana del eritrocito	12
• Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.....	12
• Ca ²⁺ ATPasa.....	12
• Canales iónicos en la membrana del eritrocito humano.....	13
▪ canales anionicos.....	13
✓ Canal anionico con multiples conductancias.....	13
✓ Canal anionico mecanosensible y canal anionico rectificador hacia afuera	13
✓ Canal ClC-2.....	13
✓ VDAC (Canal aniónico voltaje dependiente)	14
✓ CFTR (Regulador de la conductacia transmembrana de la fibrosis quística)	14
• Canales catiónicos	14
✓ Gárdos	14
✓ Canal cationico no selectivo voltaje-dependiente	14
✓ Canal cationico no selectivo voltaje-independiente	15
✓ HEMKCA (Human Erythrocyte Mecanosensitive K ⁺ Channel A)	15
✓ TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation channel 6)	15
✓ Bomba de Ca ²⁺ como canal.....	16
✓ Receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato)	16
✓ Canales de Ca ²⁺ tipo L y tipo R.....	16
• Cotransportador K ⁺ /Cl ⁻	16
• Cotransportador Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻	17
• Banda 3.....	18
• Intercambiador Na ⁺ /H ⁺	18
• Intercambiador Na ⁺ /Li ⁺ /Na ⁺	19

• Transportador de glucosa.....	19
Senescencia del eritrocito	19
ANTECEDENTES	23
Corrientes en el eritrocito humano, dilucidadas por la técnica T.U.G.O. "Patch Clamp"	23
Efectos del Ba²⁺ sobre las corrientes I_{mic}	25
¿Co-transporte o contra-transporte?	26
Caracterización parcial del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano	28
Corrientes instantáneas del intercambiador K⁺/Ca²⁺	29
Desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador K⁺/Ca²⁺	29
Efecto del pH intracelular sobre la actividad del intercambiador K⁺/Ca²⁺	31
Efectos del AMPc sobre las corrientes del intercambiador K⁺/Ca²⁺ de la membrana del eritrocito humano.	31
Estudio del efecto del ATP- Mg sobre las corrientes del intercambiador K⁺/Ca²⁺ de eritrocito humano.....	32
• Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	32
• Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	33
• Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la activación del intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	35
• Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la desactivación del intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	36
AMP-PNP	37
OBJETIVOS.....	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Específicos	39
MATERIALES Y METODOS.....	39
Material Biológico.....	39
Soluciones experimentales.....	39
• T.U.G.O. Patch Clamp (the U-shape Giga Ohm Patch Clamp)	40
Elaboración de las pipetas.....	40
Formación del sello.....	41
Protocolos de estimulación	42
• Protocolo de sustracción de fuga P/10	42
• Protocolo de corriente contra voltaje (I vs. V)	42
• Protocolo de Corrientes instantáneas.....	43
• Protocolo de desactivación	44
Adquisición de Datos	44
Análisis estadístico.....	45

RESULTADOS	46
EFECTO DEL AMP-PNP SOBRE LA ACTIVIDAD DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}	46
Efecto de las concentraciones 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM de AMP-PNP sobre la relación corriente voltaje de la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+}	47
Efecto de las concentraciones 2,0mM y 5,0mM de AMP-PNP sobre la relación corriente voltaje de la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+}	48
DEPENDENCIA DEL INCREMENTO DE CORRIENTE CON LA CONCENTRACIÓN DE AMP-PNP.....	50
EFECTO DEL AMP-PNP SOBRE LA VIA DE PERMEACIÓN DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}	51
Efecto sobre la permeación de 0,5mM de AMP-PNP	52
Efecto sobre la permeación de 1,0mM de AMP-PNP	52
Efecto sobre la permeación de 1,5mM de AMP-PNP	53
Efecto sobre la permeación de 2,0mM de AMP-PNP	54
Efecto sobre la permeación de 5,0mM de AMP-PNP	55
EFECTO DEL AMP-PNP SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}	56
EFECTO DEL AMP-PNP SOBRE EL DESARROLLO TEMPORAL DE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}	57
Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP	59
Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP	60
Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP	62
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES	70
ABREVIATURA	71
BIBLIOGRAFIA	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. Las corrientes se normalizaron al valor que se generó a +120mV en cada experimento. Valores tomados de 6 experimentos diferentes. Media \pm ES. Tomado de Romero 2004.....	23
Figura 2. Corrientes en la membrana de un eritrocito humano medidas con la técnica T.U.G.O. Patch Clamp, a potenciales de +/- 40mV. La línea roja señala el nivel de cero corriente. (Tomado de Romero 2004).	24
Figura 3. Corrientes I_{mic} a potenciales de +/- 180mV y pulsos de 6 segundos de duración. La fuga fue sustraída utilizando un protocolo p/10. Obsérvense las diferencias en el comportamiento temporal de las I_{mic} dependiendo del signo del potencial de membrana. (Tomado de Romero 2004).....	25
Figura 4. Efecto de la adición de Ba^{2+} al baño a una concentración de 250 μ M. El trazo rojo indica el control y el trazo azul lo resultante 2min. Posteriores a la adición. Pulsos de un segundo a +/- 100mV. (Tomando de Romero 2004).....	26
Figura 5. Corrientes obtenidas en el patch 518001-000, con la solución normal y con la solución sin K^+ ni Na^+ . El eje de las ordenadas corresponde a la corriente en pA y el eje de las abcisas al valor del punto que se está graficando (cada uno fue tomado a 600 μ s). En este experimento se sostiene un potencial de mantenimiento de 0 mV, el primer pulso a -160mV y el segundo a +160mV, ambos de dos segundos de duración y separados entre sí por 400ms. Es importante aclarar que estas corrientes son las obtenidas luego de restar el protocolo de sustracción de fuga y transitorios capacitativos P/10. El trazo rojo es el control y el trazo azul la corriente luego del cambio de las soluciones. (Tomado de Romero 2004).	27
Figura 6. Relación corriente instantánea normalizada vs potencial de membrana. En rojo los valores de corriente instantánea obtenidos aplicando el protocolo de corrientes instantaneas con pulso activante de +160mV. En azul los valores de corriente instantánea obtenidos con el protocolo de corrientes instantaneas con pulso activante de -160mV. Todos los datos fueron normalizados al valor de corriente instantánea obtenido a +120mV de cada experimento (Tomado de Forsyth 2006).....	29
Figura 7. Relación $ \Delta I $ normalizado vs. tiempo de separación entre los pulsos. $ \Delta I = I_2 - I_1$, donde I_1 es el valor de la corriente medido en el instante de aplicarse el pulso activante y I_2 el valor de corriente instantanea registrado en el instante de aplicación del pulso de prueba. Corrientes obtenidas de experiementos en codición simétrica. Potenciales positivos (azul) y a potenciales negativos (rojo). Los puntos indican los promedios de ocho experimentos diferentes. La linea de ajuste, representa la tendencia de los datos (Tomado de Forsyth 2006)...	30
Figura 8. Relación de corriente normalizada vs. Potencial de membrana con 0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 4mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos azules oscuros representan la condición control (n=15). Puntos rojos representan las corrientes con 0,5mM ATP (n=12). Puntos morados representan las corrientes en presencia de 1mM ATP (n=7). Puntos anaranjados representan las corrientes con 1,5mM ATP (n=5). Puntos verdes representan las corrientes en presencia de 2mM ATP (n=5). Los puntos azules claros representan la condición experimental, 4mM ATP (n=4). Tomado de (Guerra, 2012).....	33
Figura 9. Relación de corriente normalizada vs. Potencial de membrana con 1,5mM ATP-Mg. Los datos desde -160 hasta 0mV fueron obtenidos al aplicar el protocolo INST-A y los puntos desde 0 a +160mV fueron obtenidos con el protocolo INST-B. Los puntos azules representan la condición control (n=17). Los puntos naranjas representan la condición experimental (n=5). En la condición experimental la pendiente en el modo de entrada de K^+ es mayor que la pendiente en el modo de salida de K^+ . Tomado de (Guerra, 2012).....	34
Figura 10. Relación entre las curvas de corriente instantáneas con las corrientes totales con 1,5mM ATP-Mg. Los puntos verdes representan los datos obtenidos con el protocolo INST en la condición control (n=5). Los puntos	

naranja representan el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo I vs V en la condición control (n=5). Las corrientes instantáneas forman una recta, mientras que las corrientes totales adoptan una forma sigmoideal. La diferencia entre estas corrientes es menor que en la condición control y que en presencia de 1mM ATP. Tomado de (Guerra, 2012).	35
Figura 11. Estructura del AMP-PNP en la izquierda (Tomado de Yount y col. 1971) y estructura del ATP a la derecha.	37
Figura 12. Forma de la punta de las pipetas utilizadas en la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp (A). Forma de la punta de una típica pipeta pulida de Patch Clamp (B) (tomado de Romero 2004).....	40
Figura 13. Esquema del posible proceso de formación de un sello de alta resistencia en las condiciones descritas (Tomado de Romero 2004).	41
Figura 14. Esquema del protocolo de estimulación I/V. (A) Potenciales positivos. (B) Potenciales negativos.....	43
Figura 15. Esquema de los protocolos de corrientes instantáneas. Pulso activante +160mV (A), Pulso activante -160mV (B). Modificado de Forsyth, 2006.....	44
Figura 16. Esquema del protocolo de desactivación. El tiempo entre los pulsos es de 500mseg. A, pulso de -160mV. B, pulso de +160mV. Modificado de Forsyth 2006.	44
Figura 17. Curva I/V control. Los círculos negros representan los valores de corriente estandarizada con respecto al valor obtenido a un potencial de +120mV, acompañado con las barras de desviación estándar. n=29.	46
Figura 18. Curva I/V en presencia de 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM de AMP-PNP para el intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los círculos negros representan la corriente estandarizada con respecto al valor obtenido a un potencial de +120mV, condición control (n=29). Los círculos blancos representan la corriente estandarizada con respecto al valor obtenido a un potencial de +120mV de la condición control, desarrollada en presencia de 0,5mM (grafico A) n=6; 1,0mM (grafico B) n=6 y 1,5mM de APM-PNP (grafico C) n=6. En todos los casos se muestran los valores promedios y su desviación estándar.	47
Figura 19. Curva I/V del efecto de 2,0 mM y 5mM AMP-PNP sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los círculos negros representan la corriente estandarizada obtenida bajo la condición control (n=29). Los círculos blancos representan la corriente estandarizada desarrollada en presencia de 2mM de APM-PNP (n=6), grafico de la izquierda; y en presencia de 5,0mM de AMP-PNP grafico de la derecha (n=6). En todos los casos se muestran los valores promedios y su desviación estándar.	48
Figura 20. Curva IV con 0,5mM; 1,0mM; 1,5mM; 2,0mM y 5,0mM de AMP-PNP. Los círculos negros representan la condición control (n=29). Los círculos rojos representan la corriente estandarizada registrada al agregar 0,5mM de AMP-PNP (n=6); presentando un incremento de 52,68% en el modo directo y 41,25% en el inverso. Los círculos azules representan el efecto de 1,0mM de AMP-PNP (n=6) se obtuvo para el modo directo un incremento de 51,33% y de 45,12% para el inverso. Los círculos verdes muestran lo ocurrido con 1,5mM de AMP-PNP (n=6), presentado 52,90% de incremento en el modo directo y 42,86% en el inverso. Los círculos rosa muestra el efecto de 2,0mM de AMP-PNP (n=6) obteniendo un incremento de 170,10% en el modo directo y 139,36% en el inverso. Los círculos morados representan la corriente estandarizada al agregar 5,0mM de AMP-PNP a la cámara (n=5); obteniendo un incremento del 174,71% en el modo directo y 138,06% en el inverso. En todos los casos se muestran los valores promedios y su desviación estándar.	49
Figura 21. Porcentaje de incremento promedio obtenido a 120mV de potencial en presencia de las distintas concentraciones de AMP-PNP. Se muestran las barras de desviación estándar y los parámetros del ajuste lineal.	50
Figura 22. Curva control de corrientes instantáneas. Los círculos negros representan las corrientes estandarizadas obtenidas al inicio del segundo pulso (pulso de prueba) del protocolo de corrientes instantáneas para cada potencial de membrana impuesto. Tales corrientes fueron estandarizadas con respecto al valor de 120mV de	

potencial para cada experimento en particular. Se muestran los valores promedios y su desviación estándar. Adicionalmente se presentan los parámetros de los ajustes lineales.....	51
Figura 23. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), y los círculos blancos representan la condición experimental con 0,5mM de AMP-PNP (n=6). Se muestran los valores promedios y su desviación estándar. Se presenta los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.	52
Figura 24. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 1,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con 1,0mM de AMP-PNP (n=6). Se muestran los valores promedios y su desviación estándar. Se presenta los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.	53
Figura 25. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 1,5mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con 1,5mM de AMP-PNP colocado en la cara citoplasmática de la membrana celular (n=6). Se muestran los promedios y su desviación estándar. Se presentan los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.	54
Figura 26. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), y los círculos blancos representan la condición experimental con 2,0mM de AMP-PNP (n=6). Se muestran los promedios y su desviación estándar. Se presentan los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.	55
Figura 27. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), y los círculos blancos representan la condición experimental con 5,0mM de AMP-PNP (n=5). Se muestran los promedios y su desviación estándar. Se presentan los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.	56
Figura 28. Efecto del AMP-PNP sobre la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los círculos negros corresponden a la diferencia entre las corrientes estandarizadas promedio correspondientes a la activación, y las corrientes estandarizadas promedio correspondientes a la permeabilidad, es decir el efecto sobre la activación. Se muestran los promedios y su desviación estándar.....	57
Figura 29. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+}. Condición control. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas los promedios y su desviación estándar además de los parámetros de los ajustes exponenciales.	58
Figura 30. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas los promedios y su desviación estándar, además contiene los parámetros de los ajustes exponenciales.	60
Figura 31. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas las barras de desviación estándar y los parámetros de los ajustes exponenciales.	62
Figura 32. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas las barras de desviación estándar y los parámetros de los ajustes exponenciales.	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de resultados obtenidos.....	55
Tabla 2. Incremento de corriente promedio según la afinidad.....	55

RESUMEN

El eritrocito humano es una célula que no posee organelos, presenta una alta concentración de hemoglobina en su interior, confiriéndole capacidad de transportar O_2 . Estas células con un diámetro promedio de $8 \mu m$, tienen una alta capacidad de deformación, permitiéndoles transitar por los capilares sanguíneos con diámetros de entre 2 y $4 \mu m$, esto implica someterse a estrés mecánico. Dado que el eritrocito no posee núcleo no se puede afirmar que existe un proceso de apoptosis clásica en este tipo celular. Sin embargo, el retiro de los glóbulos rojos (GR) está controlado, estos poseen una vida media de $120 \text{ días} \pm 1 \text{ día}$. Surge una pregunta ¿Cómo se controla el proceso de senescencia? Se propone que algún proceso cíclico de cambio celular podría servir, como podría ser precisamente, el paso de los eritrocitos a través de los capilares y el estrés mecánico al que están expuestos. Romero (2004) propone la existencia en GR de un canal de K^+ mecanoactivado y de un intercambiador K^+/Ca^{2+} , sugiriendo que estos mecanismos estarían implicados en el control del proceso de senescencia de este tipo celular, proponiendo lo que llamó "hipótesis del K^+ ", con la cual busca explicar la génesis del proceso de senescencia del eritrocito humano. En el presente trabajo se continúa la caracterización del intercambiador K^+/Ca^{2+} en el eritrocito humano que se ha venido realizando en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica de la Universidad Central de Venezuela (LFMB-UCV). Así, se ha caracterizado el efecto de Adenosin $5'$ -(β - γ imido) trifosfato (adenil-Imidodifosfato (APM-PNP)), un análogo no hidrolizable de ATP, sobre la activación, permeabilidad y en el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador, de manera de poder estudiar la posible necesidad de la hidrólisis o no del ATP.

El AMP-PNP incrementa las corrientes totales del intercambiador, alcanzando un incremento máximo de 174% en el modo directo y de 138% en el inverso. Este incremento corresponde en parte al efecto sobre la permeabilidad (139% en el modo directo y 81% en el inverso), donde se ven favorecidas las vías de permeación en presencia del análogo. Y en parte al efecto sobre la activación (35% en el modo directo y 58% en el inverso), haciendo que este mecanismo se haga más sensible al potencial. Finalmente el APM-PNP enlentece el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador en el modo directo, aumentando la T_d hasta 131% .

Con estos resultados se obtiene evidencia de la existencia de dos sitios de unión para el ATP en el intercambiador K^+/Ca^{2+} , uno de alta afinidad con una K_m en el orden de sub-micromolar y otro de baja afinidad con una K_m en el orden de las decenas de mM. Por otro lado los resultados obtenidos son consecuentes con el hecho de que ambos sitios de unión no son catalíticos, sino probablemente sitios reguladores, pues el efecto de ellos sobre la actividad del intercambiador es independiente de la hidrólisis del ATP.

Palabras clave: intercambiador K^+/Ca^{2+} , ATP, AMP-PNP, análogo de ATP, eritrocito humano, Patch Clamp

INTRODUCCIÓN

El eritrocito humano como modelo experimental, ha sido uno de los más utilizados en el estudio de la fisiología de membranas. Sus características particulares, lo hace una de las células más estudiadas en la Biología, en particular como modelo para el estudio de los mecanismos de transportes iónicos en membranas biológicas.

El eritrocito humano

El eritrocito humano es una célula carente de organelos, que posee una alta concentración de hemoglobina, la cual transporta el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, donde se intercambia por anhídrido carbónico. Luego de este intercambio, el eritrocito transportado en la sangre a través del sistema circulatorio regresa a los pulmones, donde se libera el anhídrido carbónico comenzando nuevamente el ciclo.

Los eritrocitos humanos o glóbulos rojos (GR) tienen una forma discoidal bicóncava, con un diámetro promedio de 8 μm , un grosor de 2.4 μm en el anillo exterior y 1.0 μm en el interior, su volumen es de unos 87 μm^3 , un área de superficie de 133 μm^2 y una osmolaridad de 300 mOsm/kg (Diez-Silva y col., 2010). Su capacidad alta de deformación, les permite pasar por los capilares sanguíneos con diámetros entre 2 y 4 μm , sometiéndose a un gran estrés mecánico (Hoffman y col. 2000). Los eritrocitos presentan una vida promedio de alrededor de 120 días +/- 1 día (Rifkind, 1966).

Membrana del eritrocito

La membrana del eritrocito (ME) humano junto al citoesqueleto son responsables de la forma discoidal bicóncava característica del eritrocito, ambos contribuyen a mantener su deformabilidad y elasticidad. Se ha reportado que la membrana de los glóbulos rojos está compuesta por 19,5% de agua, 39,6% proteínas, 35,1% lípidos, y 5,8% carbohidratos (Pennell, 1974). El contenido total de lípido es aproximadamente 5.0×10^{-10} mg por eritrocito, los fosfolípidos ocupan el 60%, lípidos neutros 30% (principalmente colesterol) y el resto son glicolípidos. En el eritrocito humano, la fosfatidilcolina (PC),

fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina (SM) y fosfatidilserina (PS), ocupan de los lípidos totales de la ME, aproximadamente el 31%, 29%, 26% y 13%, respectivamente (Yawata y col. 1984).

En eritrocitos de humanos, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina se encuentran exclusivamente en la monocapa interior de la bicapa lipídica; mientras que fosfatidilcolina y esfingomielina predominan en la monocapa exterior (Cooper, 1970). La asimetría de los lípidos de la membrana tiene un rol importante en la interacción del glóbulo rojo con el medio extracelular (Beverly y col 1999).

Mecanismos de transporte iónico descritos en la membrana del eritrocito

- Na^+/K^+ ATPasa

La Na^+/K^+ ATPasa es una proteína integral de membrana que participa en el mantenimiento de las concentraciones intracelulares de los iones Na^+ y K^+ . La estequiometría de dicha bomba en eritrocitos fue reportada en 1957 (Post y Jolly, 1957). Esta bomba transporta tres iones sodio al exterior celular por cada dos iones potasio que pasan al interior celular (Mercer y col. 1989), todo esto a expensas de la hidrólisis de una molécula de ATP (adenosín trifosfato).

Esta proteína está constituida por dos polipéptidos, una subunidad α , de 113 kDa y una subunidad β de 35kDa. La subunidad α está conformada por ocho segmentos transmembrana. La propiedad catalítica de la Na^+/K^+ ATPasa se le atribuye a esta subunidad, dado que la misma posee el sitio de unión del ATP, ubicado en el lado intracelular. Por otra parte, la subunidad β , está constituida por un solo segmento transmembrana, por ahora se desconoce su función, sin embargo, se presume que podría estar involucrada en el anclaje del complejo proteico a la membrana lipídica (Guyton y Hall 2001).

- Ca^{2+} ATPasa

La Ca^{2+} ATPasa es una proteína transmembrana cuya función en la membrana del eritrocito humano, es la de extraer calcio del interior celular, en contra de su gradiente de concentración, a expensas de la hidrólisis del ATP. En los eritrocitos se han descubierto dos isoformas de dicha bomba: la PMCA1 y PMCA4, esta última es la más abundante (Stauffer y col. 1995).

El mecanismo de transporte de la Ca^{2+} ATPasa posee una alta afinidad por el Ca^{2+} . Se ha determinado que en condiciones óptimas la K_d está entre 200 y 500 nM, siendo la estequiometría de la Ca^{2+} ATPasa de 1:1 Ca^{2+} /ATP (Brini y Carafoli, 2009).

- Canales iónicos en la membrana del eritrocito humano

Se conoce que el potencial de membrana del eritrocito se encuentra cercano al potencial de equilibrio del Cl^- , debido a la alta permeabilidad de este ión (Funder y Wieth, 1966).

- canales aniónicos

- ✓ Canal aniónico con múltiples conductancias

Glogowska y col. (2010) muestra la existencia de un maxi-canal aniónico en la membrana del eritrocito. Este canal muestra múltiples subniveles de conductancia. Tales subniveles de conductancia varían desde 8 a 12 pS hasta 600 pS (Bouyer y col. 2012).

- ✓ Canal aniónico mecanosensible y canal aniónico rectificador hacia afuera

Egée (2002) muestra evidencias de la existencia de dos canales aniónicos, uno mecanosensible de conductancia lineal y otro rectificador hacia afuera. El primero, con una conductancia de 15 pS, es activado en presencia de proteína kinasa A (PKA) y ATP en la solución de la pipeta o por deformación de la membrana (Egée y col. 2002). El segundo es sensible a la exposición en medio hipertónico y a la caída del pH externo (Kucherenko y col. 2009).

- ✓ Canal CIC-2
- ✓ Empleando la técnica de Western-blots se demostró la existencia de un canal aniónico el cual se llamó canal CIC-2 (Huber y col. 2004). Este canal es activado

por oxidación usando tertbutilhidroperóxido (t-BHP) (Huber y col. 2004), e inhibido por Zn (Shumilina & Huber, 2011).

- ✓ VDAC (Canal aniónico voltaje dependiente)

Bouyer y col (2011a) muestran la existencia de un canal aniónico voltaje dependiente (VDAC por sus siglas en inglés) (Bouyer y col. 2011). La conductancia del VDAC y la selectividad son dependientes de voltaje y muestra múltiples subniveles con permeabilidades a aniones de distintos tamaños, adicional presenta subniveles de baja conductancia con permeabilidad a para cationes (Bathori y col., 2006).

- ✓ CFTR (Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística)

Usando western blots Abraham y col. (2001) muestran la existencia de la proteína CFTR en la membrana de los eritrocitos. Este canal presenta una conductancia de 8-12ps (Decherf y col. 2007).

- Canales catiónicos

- ✓ Gárdos

Gárdos (1958) reporta una salida de K^+ dependiente de Ca^{2+} en eritrocitos. Dicho fenómeno se denominó efecto Gárdos. Posteriormente, en 1981, Hamill consigue registros usando cell-attached donde demuestra que tal efecto está dado por una canal de K^+ activado por Ca^{2+} (Hamill, 1981). El canal que se conoce como canal Gárdos, fue identificado como canal SK4, perteneciente a la familia de canales de K^+ activado por Ca^{2+} de conductancia intermedia.

- ✓ Canal catiónico no selectivo voltaje-dependiente

Halperin y col., (1989) propone la existencia de un canal catiónico no selectivo voltaje-dependiente (Halperin y col. 1989). Este canal posteriormente fue descrito por Bennekou (Bennekou, 1993) y por Kaestner (Kaestner y col. 1999). Dicho canal está acoplado a un receptor de acetilcolina de tipo nicotínico

(Bennekou, 1993) y puede ser activado por prostaglandina E2 (Kaestner y Bernhardt, 2002). El canal muestra una conductancia alrededor de 20 pS (Christophersen y Bennekou, 1991) y es permeable a cationes mono y divalentes.

✓ Canal cationico no selectivo voltaje-independiente

En la membrana del eritrocito humano también se ha descrito un canal catiónico no selectivo voltaje-independiente, este canal es activado por estrés oxidativo (Duranton y col. 2002), por exposición a un medio hiperosmótico (Huber y col. 2001) y por reemplazo del cloruro del medio extracelular (Lang y col. 2003).

✓ HEMKCA (Human Erythrocyte Mecanosensitive K⁺ Channel A)

En el Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (LFMB-UCV), donde se llevó a cabo el presente trabajo, se ha descrito un canal de K⁺ de conductancia intermedia, activado por presión y modulado por Ca²⁺, al cual se le llamo HEMKCA (evidenciado por Romero 2004 en eritrocitos humanos). Dicho canal es 100 veces más permeable al K⁺ que al Na⁺, parece no ser permeable al Ca²⁺ y es bloqueado por Ba²⁺ y por Gd⁺. El autor menciona que la probabilidad de apertura del canal aumenta al incrementar la presión, siendo este un efecto reversible (Romero 2004).

✓ TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation channel 6)

Por métodos no electrofisiológicos también se han descrito canales catiónicos en la membrana del eritrocito humano, como el TRPC6 por sus siglas en inglés "Transient Receptor Potential Cation channel 6". Este canal ha sido detectado en eritrocitos por análisis de Western Blot (Foller y col., 2008).

✓ Bomba de Ca^{2+} como canal

Los trabajos de Pinet y col. (2002) sugieren que la bomba de Ca^{2+} en eritrocitos humanos puede comportarse como un canal de Ca^{2+} compartiendo muchas similitudes con los canales de Ca^{2+} tipo B (Pinet y col. 2002).

✓ Receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato)

En 2013 Makhro y col. muestran la presencia de receptores de N-metil-D-aspartato (receptor NMDA) en los eritrocitos circulantes (Makhro y col., 2013). El canal mecanosensible Piezo también ha sido descrito en la membrana del eritrocito (Cahalan y col., 2015).

✓ Canales de Ca^{2+} tipo L y tipo R

Los canales catiónicos no selectivos descritos hasta ahora son permeables al Ca^{2+} lo que lleva a la hipótesis de que las vías conductoras de Ca^{2+} al interior celular son dichos canales. Pocos estudios han demostrado la existencia de canales de Ca^{2+} en la membrana del eritrocito, como las investigaciones realizadas por el grupo del Dr. Pedro Romero. La presencia de canales de Ca^{2+} tipo L y tipo R fue evidenciada utilizando la técnica de Western Blots y trazadores de flujo con inhibidores específicos (Romero y col., 2006). Experimentos farmacológicos sugieren un efecto activador en estos canales por vanadato (Romero y Romero, 2003) y cafeína (Cordero y Romero, 2002).

- Cotransportador K^+/Cl^-

En 1980 Dunham y colaboradores proponen la existencia de un posible transporte de K^+ dependiente de Cl^- , el cual podría tratarse de un cotransportador. Los autores llegan a dicha conclusión al observar un transporte pasivo de K^+ que presentaba inhibición en ausencia de Cl^- . También observaron que en presencia de furosemida se inhibía ese transporte (Dunham y col. 1980). Guillen y col. (1996) reportan que el cotransportador K^+/Cl^- tiene una masa de aprox. 150 kDa, que está constituido por 12 segmentos transmembrana y un sitio de glicosilación en el compartimiento extracelular. El cotransportador K^+/Cl^- es inhibido por furosemida y por cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} (Brugnara y Tosteson, 1987).

Ellory y Hall en 1986, evalúan el efecto de presiones hidrostáticas altas en el transporte de cationes (K^+ , Rb^+ , Cs^+ y K^+), insensible a ouabaina, bumetanida y EGTA (flujo pasivo) en eritrocitos humanos a los cuales se les alteró el volumen celular. Los diferentes volúmenes celulares fueron producto de variaciones en la osmolaridad de las soluciones utilizadas. Los autores reportan que presiones hidrostáticas altas aumentan la permeabilidad a cationes. También se observó un incremento en el transporte de K^+ cuando el volumen celular fue mayor en el eritrocito (Ellory y Hall, 1986). En el trabajo citado los autores sustituyen el ion Cl^- por $CH_3SO_4^-$, observando una disminución del transporte de K^+ hacia el exterior celular en presencia de presiones hidrostáticas altas. Finalmente los autores señalan que las evidencias observadas están asociadas al mecanismo de transporte K^+/Cl^- sensible a las variaciones en el volumen del eritrocito (Ellory y Hall, 1986).

- Cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$

Brugnara junto a su equipo estudió las corrientes de entrada y salida de Na^+ y K^+ sensibles a la furosamida, cuando estas se hacían casi cero en eritrocitos, a diferentes concentraciones de los cationes (Brugnara y Canessas. 1986). Sus resultados muestran que cuando hay altas concentraciones de K^+ la estequiometría de los flujos es de 2 Na^+ : 3 K^+ , mientras que en células con concentraciones muy altas de Na^+ la estequiometría de los flujos cambia a 3 Na^+ : 2 K^+ , siendo evidente que los flujos de Na^+ y K^+ son dependientes de sus concentraciones en la célula.

Los flujos de Na^+ y K^+ dependientes de Cl^- fueron estudiados mucho más profundamente por Kracke (Kracke y Anatra. 1988). Sus resultados mostraron que el influjo de Na^+ era estimulado por K^+ y viceversa, además la estequiometría para esos iones era de 1:1. Contrario a lo que se debería esperar de un cotransporte, no se observaron los eflujos de Na^+ y K^+ para concentraciones entre 0 y 50 mmol/l célula de los cationes. Sólo hubo estimulación del eflujo de K^+ por Na^+ , y no el eflujo de Na^+ por el K^+ . Todos los influjos fueron estimulados por Cl^- . Al ser sustituido el Cl^- por NO_3^- se detenían las corrientes de entrada de Na^+ y K^+ , proponiéndose la existencia de un cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$.

- Banda 3

La Banda 3 también conocida como Capnóforina o intercambiador de aniones I (AE1) es la proteína integral de membrana más abundante en los eritrocitos, con un promedio de 10^6 copias por célula (Passow, 1986). La Banda 3 posee una masa molecular de 101.791 kDa, esta se divide en tres dominios: un extremo N-Terminal ubicado en el lado intracelular capaz de unir enzimas glicolíticas y hemoglobina; un dominio transmembrana que intercambia Cl^- hacia el interior celular y bicarbonato hacia el exterior celular; y un extremo C-Terminal citoplasmático capaz de unir anhidrasa carbónica II (Lux y col. 1989).

La función principal de la Banda 3 es la de intercambiar el cloruro (Cl^-) extracelular por el bicarbonato (HCO_3^-) intracelular, en el momento en que ocurre el intercambio O_2 - CO_2 , cuando el eritrocito atraviesa por los capilares de los tejidos. Este evento ocurre en forma inversa en los capilares alveolares. Cuando el eritrocito entra al capilar en los tejidos se encuentra con una presión alta de CO_2 (46 mmHg) en comparación con la presión en la circulación arterial (40 mmHg). En el momento que el eritrocito entra en esta nueva atmósfera, la presión de CO_2 dentro de este se eleva hasta 46 mmHg igualándose a la del tejido y en consecuencia se produce un desequilibrio químico de CO_2 y H_2CO_3 . Ello se debe en parte a que una porción de CO_2 es hidratado formando H_2CO_3 (ácido carbónico) en presencia de anhidrasa carbónica, el cual rápidamente se disocia en bicarbonato y protones. Estos protones liberados interactúan con la hemoglobina la cual, al estar protonada disminuye su afinidad por el oxígeno, y este es liberado (efecto Bohr). Ya en esta condición el CO_2 es transportado en tres formas diferentes: CO_2 disuelto en plasma y citoplasma (3,6 %), combinado con proteínas (11%) y en forma de HCO_3^- (81%).

- Intercambiador Na^+/H^+

Canessa y Escóbales (1986) obtuvieron evidencias de la existencia de un intercambiador Na^+/H^+ en la membrana del eritrocito humano, el cual transporta Na^+ hacia el interior celular y H^+ hacia el exterior celular. Realizaron variaciones en el pH intracelular y extracelular, desde 6,4 a 7,8 en el lado interno y desde 6,0 a 8,0 en el lado externo, midiendo los efectos en el flujo de Na^+ . Los autores señalan que a pH intracelular ácido y pH extracelular entre 6,0 a 8,0 y en presencia de amilorida se observa un bloqueo en la entrada de sodio del 60%. Además, reportan que al eliminar el gradiente de pH, se observa una

inhibición en la entrada de Na⁺. Semplicini y col. indican que el intercambiador en cuestión presenta una estequiometría de 1:1 (Semplicini y col.1989).

- Intercambiador Na⁺/Li⁺/Na⁺

Tostesson y Hoffman (1960) reportaron el intercambio de Na⁺ por Na⁺ en una tasa de 1:1 por un mecanismo distinto del descrito para la bomba Na⁺/K⁺. En los años 70 aumento el interés sobre este intercambiador ya que se descubrió que también podía intercambiar Li (Hass y col. 1975). Este cotransporte se ve inhibido por sulfidrilos, en condiciones de pH ácidos y por *N*-etilmaleimida.

- Transportador de glucosa

El proceso de transporte de azúcares a favor de su gradiente, hacia y desde el interior celular esta mediado por una familia de transportadores de azúcares llamadas GLUTs (Carruthers y col., 2009). La GLUT1 fue la primera de estas proteínas en ser identificada, contiene 12 dominios transmembrana (Mueckler y col., 1985).

Esta proteína transporta glucosa a través de la membrana, aportando el sustrato energético requerido por la glicólisis anaerobia (Mueckler, 1989) y se encuentra expresada en grandes cantidades en la membrana de los eritrocitos, siendo la GLUT1 la isoforma más abundante (Takata y col., 1997).

Senescencia del eritrocito

Dado que los eritrocitos no poseen núcleo no podemos hablar de un proceso de apoptosis clásica en este tipo celular, por lo cual Romero P. (2004) propone que el procedimiento que lleva consigo el retiro de los eritrocitos del torrente sanguíneo a los 120 días +/- 1 día, puede ser un proceso cíclico y de retroalimentación positiva. Hasta la fecha existen diferentes hipótesis que buscan esclarecer lo antes mencionado. Quintanar y col. (2005) proponen que la muerte del eritrocito es el final de una muerte celular programada que inició cuando el eritroblasto maduraba a eritrocito. Este para ser eritrocito debe perder las mitocondrias y el núcleo, lo cual sucede con una apoptosis parcial. La apoptosis del eritroblasto se detiene por un estímulo de diferenciación y por la eritropoyetina que dispara un proceso de antiapoptosis (Quintanar y Calderón. 2005).

Quintanar y Calderón. (2005) proponen que el inicio de la apoptosis se da en eritroblasto en el proceso de maduración hacia eritrocito (apoptosis parcial) y se termina aproximadamente 120 días después en el proceso de destrucción del eritrocito. Esto implica pensar en dos posibilidades: una con un programa bioquímico que se consuma después de dejar en receso la apoptosis que se inició en el eritroblasto y que requiere señales moleculares que la vuelvan a reactivar. La otra posibilidad es la generación de una célula que se encuentra muriendo por apoptosis con una entropía muy lenta pero continua hasta su destrucción completando la apoptosis (Quintanar y Calderón. 2005).

Lang, y col. (2003b) plantean que el estrés osmótico activa a la fosfolipasa A2, que libera ácido araquidónico de la fosfatidilcolina. Dicho ácido es convertido por la enzima ciclooxigenasa a prostaglandina E2; esta estimula al canal catiónico del cual dependerá la entrada de calcio y el incremento de la entrada de calcio activará a canales Gárdos (Lang, y col. 2003b).

En 2006 Klarl, y col. Sugieren la hipótesis de la disminución energética según la cual la reducción de ATP afecta a la ATPasa de calcio, reduciendo su actividad y con ello la salida de calcio, con el consecuente incremento de calcio intracelular (Klarl, y col. 2006). Lang, F. y col. (2014) plantean una hipótesis basada en el estrés oxidativo donde formulan que la reducción de glutatión incrementa la permeabilidad a calcio a través del canal de cationes, permitiendo una mayor entrada de calcio y con ello el incremento de este catión en el interior del eritrocito (Lang, y col. 2014).

Se sabe que la senescencia del eritrocito está caracterizada por disminución del volumen celular, rigidez de la membrana y translocación de la fosfatidilserina a la monocapa externa, teniendo en común el desencadenamiento de dichos cambios, el incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Lang, y Lang. 2015).

Romero y col en 1997 (Romero y col. 1997a) a través del estudio de eritrocitos separados por un gradiente de Percoll, que permite obtener una relación entre la densidad de la célula en cuestión y la edad de la misma, consiguen estimar la edad de los eritrocitos. Los autores, miden distintos marcadores relacionados con la edad celular, tal como cantidad de hemoglobina, conociendo que los eritrocitos viejos son más densos que los eritrocitos jóvenes (Lutz, y col. 1992) dan como resultado que la medición

del Ca^{2+} en ambas poblaciones arroja un incremento de 30nM de Ca^{2+} intracelular en los eritrocitos más densos (viejos) en contraposición de los eritrocitos menos densos (jóvenes) con 5 nM de Ca^{2+} intracelular. Relacionan así el incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} con la edad del eritrocito y la densidad de estos (Romero y col. 1997a). Se dice entonces que el incremento de la concentración intracelular de calcio está relacionado con el proceso de senescencia de la mencionada célula.

El incremento del Ca^{2+} intracelular puede explicarse en parte por la disminución de la actividad de la bomba de Ca^{2+} . Romero y Romero (1997b) señalan que la actividad de dicha bomba disminuye en los eritrocitos densos. También podría explicarse mediante la introducción de Ca^{2+} al interior celular vía un transportador a través de la membrana (Romero 2004).

En la búsqueda de explicar el proceso de senescencia del eritrocito, Romero y col. (1998) proponen una hipótesis, la cual para efectos prácticos del presente trabajo será llamada “hipótesis del Ca^{2+} ”. Esta hipótesis plantea que la entrada progresiva de Ca^{2+} por una vía de paso, favorecida por el estrés mecánico al que están expuestos los eritrocitos en su paso por el lecho capilar, lleva a la activación del canal de K^+ activado por Ca^{2+} conocido como el canal Gárdos. La activación de este canal desencadena la salida de K^+ del interior celular lo que promueve una hiperpolarización de la célula que a su vez favorece la entrada de Ca^{2+} , activándose más canales Gárdos, generando una mayor hiperpolarización promoviendo a su vez una mayor entrada de Ca^{2+} , y en consecuencia, un ciclo de retroalimentación positiva (Romero 2004).

La salida de K^+ genera un desequilibrio eléctrico, desencadenando: la salida de KCl y la salida de agua, ocasionando que la célula se haga más densa como consecuencia de la disminución del volumen celular (nótese que se ha indicado que los eritrocitos “viejos” son los más densos, siendo así, este podría ser el evento que explique tal hecho). Ahora bien, partiendo de la presunción de que la entrada de calcio esta favorecida por el paso del eritrocito por los capilares (Romero 2004), dicha entrada generaría un incremento de Ca^{2+} transitorio, dado que la bomba de Ca^{2+} extraería el calcio del interior celular. Sin embargo, este aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} va a generar la activación de las calpains y proteínas-quinasas inactivando la bomba de Ca^{2+} (Lang, y col. 2012, Maellaro, y col. 2013).

Al pasar el eritrocito nuevamente por el capilar, habrá menos bombas de Ca^{2+} que disminuyan el incremento de la concentración intracelular de dicho ion, generado por las vías de paso favorecidas en el lecho capilar, por lo que cada vez habrá menos actividad de las bombas de Ca^{2+} y por ende se acumulará el Ca^{2+} en el interior celular, generando todo lo antes expuesto, que finalmente concluye con el retiro de los eritrocitos del torrente sanguíneo.

En el LFMB-UCV a partir del descubrimiento del “canal de K^+ mecanoactivado del eritrocito humano” (HEMKCA, por sus siglas en inglés) y del “intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ ”, se propone la “hipótesis del K^+ ”. Esta plantea una posible respuesta a cuál es el mecanismo molecular detrás del reloj biológico presente en el eritrocito humano (Romero 2004).

Dicha hipótesis se fundamenta en que el estrés mecánico al que está expuesto el eritrocito en su recorrido por el capilar sanguíneo activa al canal HEMKCA, lo que va a generar la salida de K^+ y por ende la hiperpolarización de la célula, que a su vez activará al intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ voltaje-dependiente. Este es el responsable de la entrada de Ca^{2+} al interior celular, la cual tendrá como consecuencia todo lo expuesto anteriormente, finalizando en la muerte del eritrocito.

Se conoce que el potencial de membrana del eritrocito está alrededor de -8mV y cómo podemos ver en la Figura N°1, a este potencial el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ no presenta corriente; es por ello que fuera del capilar sanguíneo dicho intercambiador se encuentra inactivo. Ahora bien, como se ha mencionado, cuando el eritrocito entra al capilar el estrés mecánico al que está expuesto, activa al HEMKCA y este genera una hiperpolarización de la membrana que activa al intercambiador, el cual presenta corrientes a potenciales menores a -40mV y superiores a $+40\text{mV}$ aproximadamente.

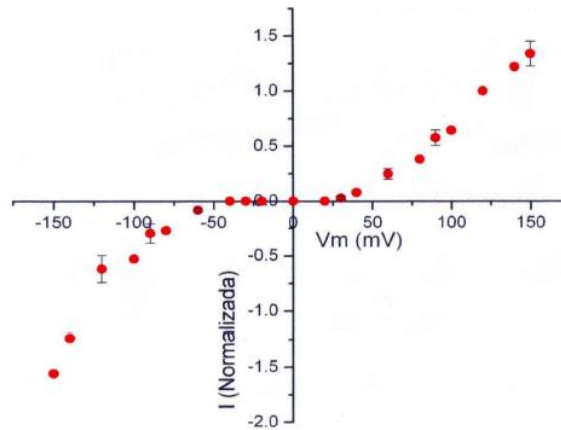


Figura 1. Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. Las corrientes se normalizaron al valor que se generó a +120mV en cada experimento. Valores tomados de 6 experimentos diferentes. Media \pm ES. Tomado de Romero 2004.

ANTECEDENTES

En este apartado se habla del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano, desde cómo se descubrió hasta las caracterizaciones que se le han hecho. Por ello partiremos de las corrientes microscópicas descubiertas en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica de la Universidad Central de Venezuela (LFMB-UCV).

Corrientes en el eritrocito humano, dilucidadas por la técnica T.U.G.O. "Patch Clamp"

En el LFMB-UCV, haciendo uso de la técnica T.U.G.O. "Patch Clamp" (Romero 2004), se visualizaron por primera vez ciertas corrientes que no correspondían a las corrientes de "fugas". Dichas corrientes, no presentaban un comportamiento óhmico, es decir que, al aplicar un potencial similar pero de signo contrario, la corriente generada tenía mayor amplitud a un potencial que a otro; así mismo, esas corrientes no presentaban cambios discretos de conductancia. Estas corrientes no habían sido observadas hasta el momento del estudio realizado por Romero 2004, dado que las investigaciones previas habían utilizado la configuración de "Whole cell" donde las corrientes estarían enmascaradas.

Con la finalidad de diferenciarlas de las corrientes macroscópicas descritas en otros trabajos y de las corrientes de canales unitarios, se les denominó corrientes microscópicas (Imic).

En la Figura N°2 se muestra un registro típico de canal unitario, donde puede observarse la diferencia en el valor de corriente entre ambos potenciales cuando el canal está cerrado. Dicha diferencia es producto de corrientes biológicas (corrientes microscópicas) y no de corrientes óhmicas, dado que si correspondiese a estas últimas serían iguales a ambos potenciales.

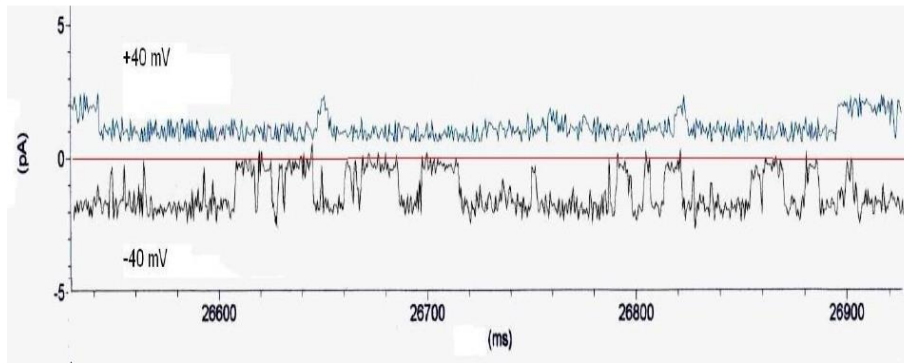


Figura 2. Corrientes en la membrana de un eritrocito humano medidas con la técnica T.U.G.O. Patch Clamp, a potenciales de +/- 40mV. La línea roja señala el nivel de cero corriente. (Tomado de Romero 2004).

Con el fin de descartar que tal efecto fuese un artefacto de la técnica empleada, Romero (Romero 2004) realiza experimento con pulsos de larga duración utilizando soluciones simétricas, con la finalidad de dilucidar si las corrientes microscópicas poseen características cinéticas no atribuibles a las corrientes de fuga. El autor obtiene que tales corrientes presentan características cinéticas distintas según el signo del potencial. Así, a potenciales negativos, el desarrollo de las Imic posee una cinética de activación compleja y muy lenta, y a potenciales positivos presenta una fase de activación en el primer par de milisegundos, manteniéndose la corriente relativamente constante, luego de lo cual comienza una fase de inactivación o decremento (Romero 2004), como puede observarse en la Figura N°3.

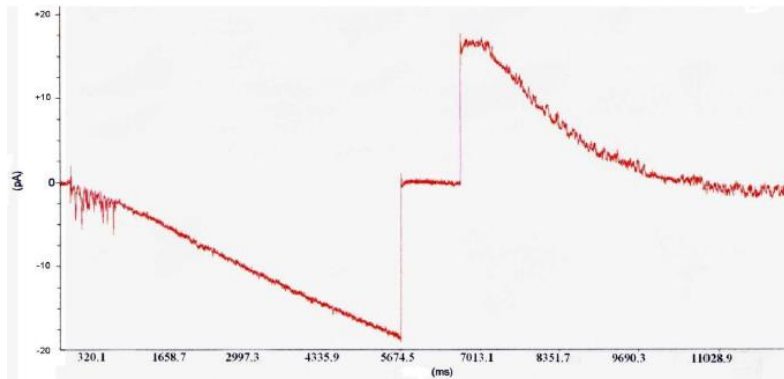


Figura 3. Corrientes Imic a potenciales de $\pm 180\text{mV}$ y pulsos de 6 segundos de duración. La fuga fue sustraída utilizando un protocolo p/10. Obsérvense las diferencias en el comportamiento temporal de las Imic dependiendo del signo del potencial de membrana. (Tomado de Romero 2004).

Finalmente el autor concluye que las Imic poseen características cinéticas que dependen del potencial y que tales características (activación compleja muy lenta a potenciales negativos, y una activación rápida con una inactivación lenta a potenciales positivos) indican que es muy poco probable que dichas corrientes sean generadas por algún artefacto de la técnica empleada.

Efectos del Ba^{2+} sobre las corrientes Imic

Romero en el 2004 evaluó el efecto de añadir el ion Ba^{2+} al baño a una concentración de $250\mu\text{M}$. Los resultados obtenidos por el autor se muestran en la Fig. N°4, donde se observa que, opuesto a lo que se esperaba, a potenciales negativos se obtuvo un aumento en la amplitud de las corrientes, y a potenciales positivos se invirtió la dirección de las corrientes (corrientes de salida pasaron a ser de entrada); adicionalmente, el autor reporta que el efecto de la adición del ion Ba^{2+} se pierde en el tiempo y las corrientes regresan a ser prácticamente las mismas de cómo eran previo añadido el ion.

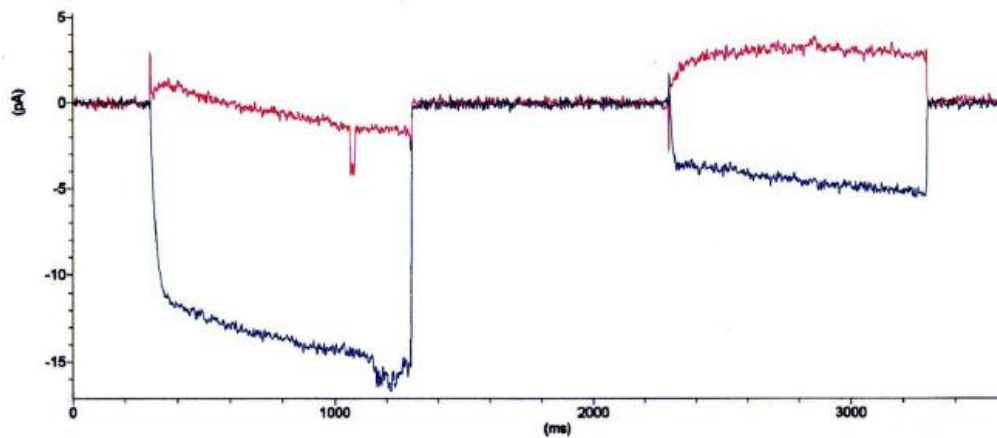


Figura 4. Efecto de la adición de Ba^{2+} al baño a una concentración de $250\mu M$. El trazo rojo indica el control y el trazo azul lo resultante 2min. Posteriores a la adición. Pulsos de un segundo a $\pm 100mV$. (Tomando de Romero 2004).

Dado que el experimento mostrado en la Fig. N°4 fue realizado bajo condiciones simétricas en el baño y en la pipeta, no puede atribuírsele el efecto observado a gradiente químico alguno, ya que los movimientos de cargas estarían dados solo por el potencial eléctrico. Puesto que el Ba^{2+} es añadido en solución para dicho ion podría darse la existencia de un gradiente químico en dirección a la pipeta (corriente de salida), sin embargo, se obtiene una corriente de entrada. Para explicar los resultados el autor propone la existencia de un mecanismo de co/contra-transporte electrogénico en la membrana del eritrocito (Romero 2004). Este transporte debería ser capaz de mover $n Ba^{2+}$ y co-transportarlo a razón de por lo menos $n+1+m Cl^-$ ó, contra-transportarlo con $n+1+m$ cationes monovalentes. Este mecanismo naturalmente movería Ca^{2+} por lo que el autor lo denomina CaXT1 (Romero 2004).

¿Co-transporte o contra-transporte?

Con la finalidad de resolver esta interrogante Romero (2004), realiza una serie de experimentos donde sustituye los cationes monovalentes de la solución de la cámara experimental por el cation monovalente no permeable N-Metil-D-Glucamina. Romero, a sabiendas de que el efecto de sustituir los cationes monovalentes en la pipeta es equivalente a añadir $CaCl_2$ ($BaCl_2$) al baño (como se muestra en la

Fig. N°5), implica que la formación de un gradiente de Ca^{2+} hacia el exterior celular equivale a la formación de un gradiente de Na^+ y/o K^+ hacia el interior celular (Romero 2004).

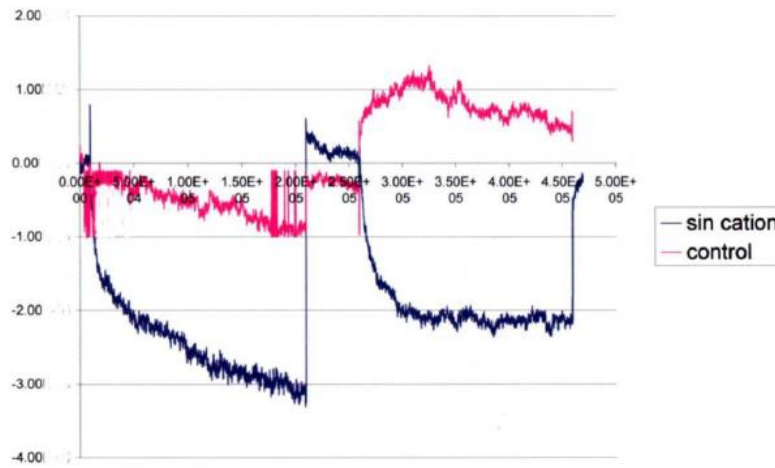


Figura 5. Corrientes obtenidas en el patch 518001-000, con la solución normal y con la solución sin K^+ ni Na^+ . El eje de las ordenadas corresponde a la corriente en pA y el eje de las abscisas al valor del punto que se está graficando (cada uno fue tomado a $600\mu\text{s}$). En este experimento se sostiene un potencial de mantenimiento de 0 mV, el primer pulso a -160mV y el segundo a +160mV, ambos de dos segundos de duración y separados entre sí por 400ms. Es importante aclarar que estas corrientes son las obtenidas luego de restar el protocolo de sustracción de fuga y transitorios capacitativos P/10. El trazo rojo es el control y el trazo azul la corriente luego del cambio de las soluciones. (Tomado de Romero 2004).

Romero concluye que el gradiente de Ca^{2+} en dirección al exterior celular forzaría la entrada de cationes monovalentes en una relación $n+1+m$ cationes monovalentes por cada $n \text{Ca}^{2+}$, esto indicaría que el ion Ca^{2+} esta siendo transportado por el mecanismo en cuestión en sentido contrario al movimiento de Na^+ y/o K^+ , proponiendo consecuentemente la existencia de un intercambiador (Romero 2004).

Para confirmar esta conclusión el autor sustituye los cationes monovalentes en ambos lados de la membrana, en cuyo caso ocurre que las corrientes biológicas se eliminan, persistiendo tan solo corrientes óhmicas, en función de tales resultados concluye que se trata de un intercambiador obligatorio.

Consecuentemente Romero dilucida el papel de los cationes monovalentes, sustituyendo el K^+ en el baño con el catión no permeable, lo cual genera un gradiente infinito de éste desde la pipeta al baño, manteniendo al Na^+ constante. El autor señala que los resultados alcanzados son iguales a los obtenidos en circunstancias de haber sustituido ambos cationes. Concluye así que es suficiente con la generación de un gradiente de K^+ , de la pipeta al baño para forzar el paso de Ca^{2+} en el sentido contrario. También evalúa el efecto de la sustitución de Na^+ determinando que la generación de un gradiente infinito para el sodio desde el exterior celular hacia el interior celular, es incapaz de producir la inversión de las corrientes microscópicas a potenciales positivos, es decir, no es capaz de forzar el movimiento de Ca^{2+} (Romero 2004).

Finalmente el autor propone la existencia de un intercambiador K^+/Ca^{2+} en la membrana del eritrocito humano, el cual sería responsable de las denominadas corrientes microscópicas (Romero 2004).

Caracterización parcial del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano

El estudio de Matthes en 2005 (Matthes 2005) sobre la estequiometría del intercambiador arroja un resultado de 12:1, es decir, el intercambiador transporta 12 K^+ al exterior celular por cada Ca^{2+} al interior celular. La autora llega a la conclusión anterior a partir del uso de distintos gradientes de K^+ hasta obtener el potencial de reversión para tal ion. Conocido dicho valor, el gradiente de K^+ y sabiendo que la concentración de Ca^{2+} permanece constante en tales experimentos, le permitió al autor calcular la estequiometría partiendo de igualar la fuerza química a la eléctrica en las condiciones experimentales (potencial de reversión).

Matthes también estudia el efecto de iones monovalentes (Rb^+ y Cs^+) y divalentes (Mg^{2+} y Zn^{2+}) sobre las corrientes del intercambiador, concluyendo que el intercambiador no transporta Cs^+ y es permeable al Rb^+ , con una tasa 2,5 veces menos permeable que el K^+ . Por otra parte, la autora concluye que el intercambiador permite el paso de los dos cationes monovalentes estudiados, siendo el Mg^{2+} 850 veces menos permeable que el Ca^{2+} , sin embargo no pudo determinar la relación de permeabilidad para el Zn^{2+} . La autora propone la siguiente secuencia de permeabilidad para los cationes monovalentes: $K^+ > Rb^+ > >>> Cs^+$, mientras que para los cationes divalentes propone: $Ca^{2+} > Ba^{2+} >> Mg^{2+}$ (Matthes, 2005).

Corrientes instantáneas del intercambiador K^+/Ca^{2+}

Forsyth en 2006, realiza estudios de corrientes instantáneas al intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano con la finalidad de conocer las que solo dependen de la permeabilidad.

El protocolo de corrientes instantáneas permite captar aquellas que presentan un comportamiento óhmico (Fig. N° 6) para ello establece que sea aplicado un pulso activante seguido de un pulso de prueba que permite medir, exclusivamente, al inicio del segundo pulso, los valores de permeabilidad del intercambiador previamente activado.

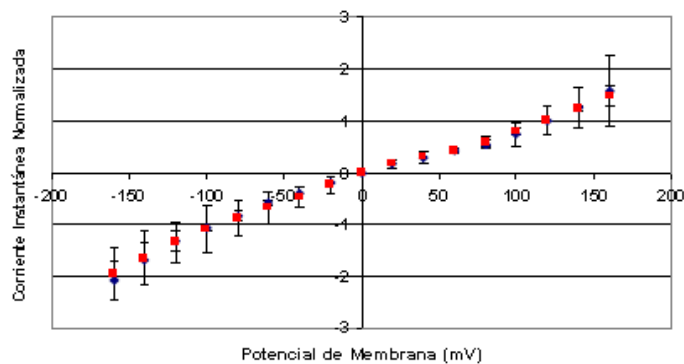


Figura 6. Relación corriente instantánea normalizada vs potencial de membrana. En rojo los valores de corriente instantánea obtenidos aplicando el protocolo de corrientes instantáneas con pulso activante de +160mV. En azul los valores de corriente instantánea obtenidos con el protocolo de corrientes instantáneas con pulso activante de -160mV. Todos los datos fueron normalizados al valor de corriente instantánea obtenido a +120mV de cada experimento (Tomado de Forsyth 2006).

Desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+}

Forsyth también estudió la cinética de la desactivación del intercambiador. Para ello utilizó el protocolo de desactivación que consiste en la aplicación de dos pulsos iguales de +160mV o -160mV incrementando el tiempo entre ellos, permitiendo cuantificar la pérdida de corriente entre ambos pulso. La autora concluye que las corrientes del intercambiador decaen de manera exponencial como se muestra en la Figura N°7. También reporta que la desactivación de la corriente a potenciales negativos es más lenta que a potenciales positivos (Forsyth 2006).

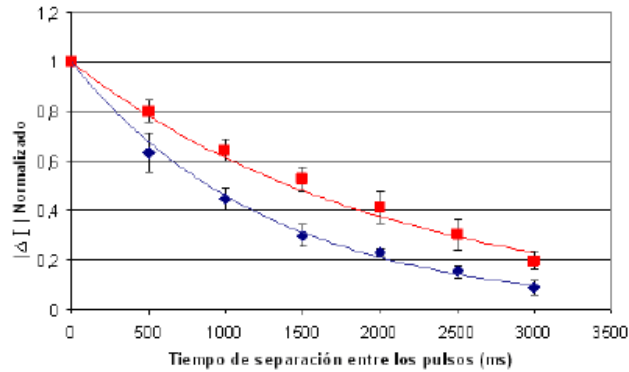


Figura 7. Relación $|\Delta I|$ normalizado vs. tiempo de separación entre los pulsos. $|\Delta I| = I_2 - I_1$, donde I_1 es el valor de la corriente medido en el instante de aplicarse el pulso activante y I_2 el valor de corriente instantánea registrado en el instante de aplicación del pulso de prueba. Corrientes obtenidas de experimentos en condición simétrica. Potenciales positivos (azul) y a potenciales negativos (rojo). Los puntos indican los promedios de ocho experimentos diferentes. La línea de ajuste, representa la tendencia de los datos (Tomado de Forsyth 2006).

Finalmente la autora evaluó el efecto de distintos gradientes de Na^+ sobre las corrientes del intercambiador, obteniendo que el Na^+ no tiene ningún efecto sobre dichas corrientes.

Efecto del estrés oxidativo sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$

Se ha demostrado que en los eritrocitos la peroxidación lipídica es capaz de cambiar las propiedades de la membrana, haciendo que esta se haga más rígida y en consecuencia disminuya su capacidad de deformación. Además puede alterar la permeabilidad de la membrana (Stark, 2005). Esto llevó a Galué en el 2008 a estudiar el efecto del estrés oxidativo sobre las corrientes del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ del eritrocito humano, utilizando dos agentes oxidantes, el Ter-butil Hidroperóxido (t-BPH) (el cual puede oxidar ambos lados de la membrana plasmática) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (el cual solo puede oxidar el lado donde es aplicado).

Galué obtuvo que el estrés oxidativo causa una disminución en la magnitud de las corrientes generadas por el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ y que a su vez dicha disminución depende de la concentración del agente utilizado: a mayor concentración, mayor disminución de las corrientes (Galué, 2008). No

obstante, el mayor efecto sobre las corrientes se observó al oxidar ambos lados de la membrana a potenciales negativos, concluyendo que la oxidación influye más en el modo de entrada de K^+ (Galué, 2008).

Finalmente el autor menciona que la permeabilidad del intercambiador en estudio se ve afectada por el estrés oxidativo sobre el intercambiador, disminuyendo su magnitud, pero sin variar la relación que existe entre las corrientes de potenciales positivos y negativos. El autor también propone que el estrés oxidativo no tiene efecto alguno sobre el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes I_{mic} (Galué 2008).

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

Cambios en el pH intracelular regulan un número amplio de procesos celulares como crecimiento, proliferación, migración y transformación celular. Sin embargo es limitado el conocimiento de cómo estos cambios en el pH afectan la conformación de proteínas y el ensamblaje de macromoléculas que conducen a diferentes procesos celulares. Es por ello que Paredes en 2012 se propone estudiar el efecto del pH intracelular sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano, reportando que la acidificación del medio intracelular pudiera estar generando un posible cambio en un dominio citoplasmático del intercambiador, facilitando la salida de K^+ de la célula. La autora también reporta que la acidificación del medio intracelular genera un aumento progresivo en la magnitud de las corrientes salientes de la célula (Paredes 2012).

Efectos del AMPc sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} de la membrana del eritrocito humano

Landi (2015) estudia el efecto del AMPc sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Para ello evalúa distintas concentraciones: desde $0,1\mu M$ AMPc a $10,0\mu M$ AMPc. Reporta que al aumentar la concentración de AMPc del lado intracelular se reducen las corrientes generadas por el intercambiador de manera dosis-dependiente (Landi 2015). También reporta que el AMPc inhibe las vías de paso en todos los casos estudiados, lo que se evidencia en la disminución de la permeabilidad de dicho

intercambiador. El autor propone la existencia de un sitio de unión del lado intracelular (en la estructura del intercambiador K^+/Ca^{2+}) con una K_i en el orden submicromolar (Landi 2015).

Estudio del efecto del ATP- Mg sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} de eritrocito humano

El ATP puede modular de manera directa la actividad de una gran cantidad de canales iónicos y transportadores, uniéndose a un segmento de la proteína, cambiando su afinidad por el sustrato. También puede modular la actividad de manera indirecta, en cuyo caso, puede regular la interacción de la proteína con los fosfolípidos en la membrana, o regularlos por proteínas kinasas dependientes de ATP. Partiendo de esto, Guerra en el 2012, se plantea caracterizar de forma parcial el efecto del ATP sobre el intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano. Guerra (2012) estudia el efecto de la concentración de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador, sobre la permeabilidad, sobre la activación y sobre la desactivación de dicho intercambiador. Estudios que se profundizan a continuación:

- **Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+}**

Para estudiar tal efecto fue utilizado el protocolo I vs. V variando la concentración intracelular (en el baño) de ATP-Mg desde 0,5mM hasta 2mM (Guerra, 2012). La Figura N°8 muestra los resultados obtenido por Guerra 2012, donde se observa un efecto dosis dependiente del ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador (Guerra, 2012).

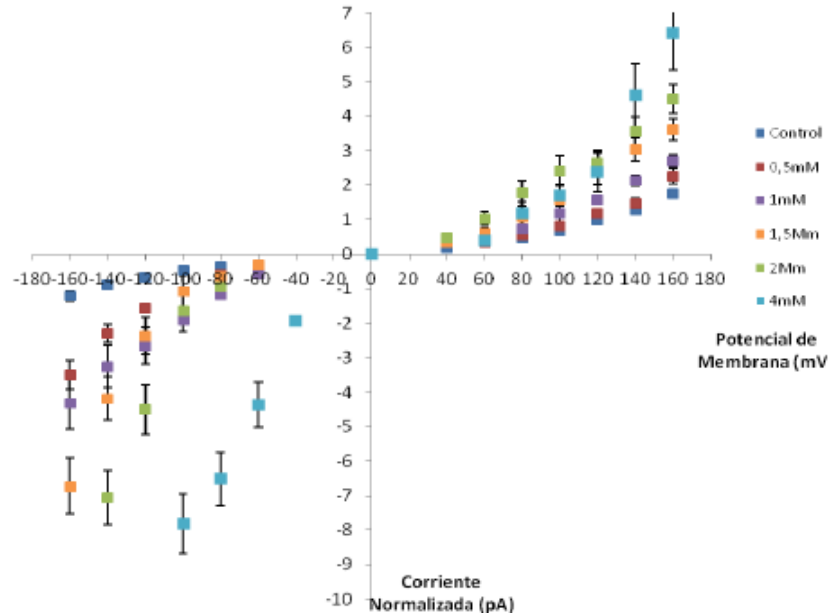


Figura 8. Relación de corriente normalizada vs. Potencial de membrana con 0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 4mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos azules oscuros representan la condición control (n=15). Puntos rojos representan las corrientes con 0,5mM ATP (n=12). Puntos morados representan las corrientes en presencia de 1mM ATP (n=7). Puntos anaranjados representan las corrientes con 1,5mM ATP (n=5). Puntos verdes representan las corrientes en presencia de 2mM ATP (n=5). Los puntos azules claros representan la condición experimental, 4mM ATP (n=4). Tomado de (Guerra, 2012).

Guerra, 2012 concluye que la modulación de ATP-Mg ocurre del lado intracelular y que al no estar saturado el intercambiador a 4mM es indicativo de que la modulación de la actividad del intercambiador por parte del ATP-Mg es de baja afinidad (Guerra, 2012).

- **Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+}**

Guerra 2012, observó un incremento en la pendiente de las rectas en las diferentes condiciones experimentales (distintas concentraciones de ATP-Mg) con respecto a la condición control en ambos sentidos del movimiento de K^+ . Así mismo señala que la pendiente de la recta en el modo salida de K^+ se mantenía igual independientemente de las diferentes concentraciones utilizadas (señal indicativa de la saturación del sistema), mientras que la pendiente de la recta en el modo entrada de K^+ aumentaba

considerablemente. La Figura N°9 refleja los resultados obtenido por Guerra 2012 para la concentración de 1,5mM ATP-Mg, donde se reafirma lo antes expuesto.

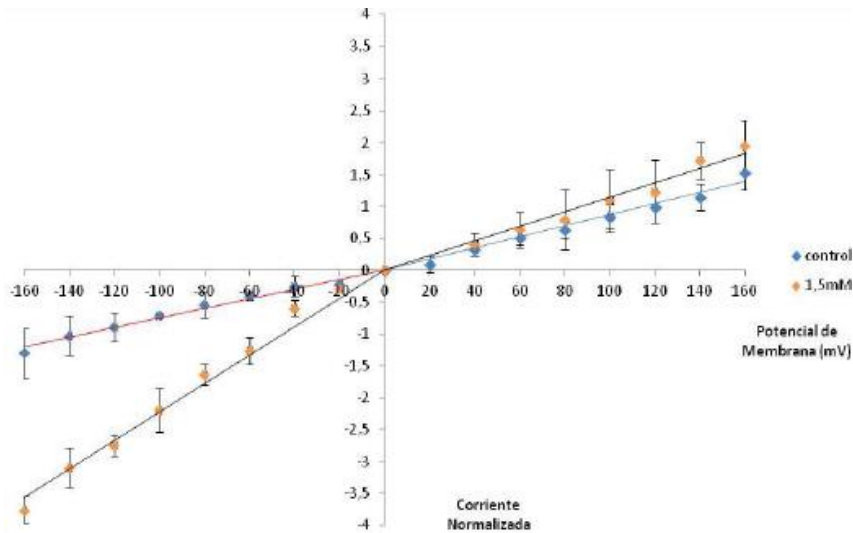


Figura 9. Relación de corriente normalizada vs. Potencial de membrana con 1,5mM ATP-Mg. Los datos desde -160 hasta 0mV fueron obtenidos al aplicar el protocolo INST-A y los puntos desde 0 a +160mV fueron obtenidos con el protocolo INST-B. Los puntos azules representan la condición control (n=17). Los puntos naranjas representan la condición experimental (n=5). En la condición experimental la pendiente en el modo de entrada de K⁺ es mayor que la pendiente en el modo de salida de K⁺. Tomado de (Guerra, 2012).

Consecuentemente con lo antes expuesto, se infiere que, la permeabilidad del intercambiador es afectada de forma distinta dependiendo de la dirección del flujo de K⁺. En modo salida, se observa que la pendiente aumenta en presencia de ATP-Mg, sin embargo a 0,5mM ATP-Mg ya se encuentra saturado el sistema lo que indica la alta afinidad por el ATP-Mg. Esto lleva a Guerra 2012 a proponer la existencia de un sitio de unión para el ATP en el intercambiador en estudio, con una Km en el orden de los μ M que afecta la permeabilidad en el modo salida de K⁺ (Guerra 2012).

Por otro lado, se observa que en el modo de entrada de K⁺, la pendiente aumenta con la concentración de ATP-Mg usadas y no se satura, lo que denota la baja afinidad por el ATP, por lo que Guerra 2012 propone, un segundo sitio de unión del ATP al intercambiador, con una Km en el orden de

los mM (Guerra, 2012). Guerra denomina “A” al primer sitio de unión propuesto y “B” al segundo.

- **Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+}**

Para estudiar el efecto del ATP-Mg sobre el proceso de activación del intercambiador, Guerra (2012), compara las corrientes obtenidas al aplicar el protocolo I vs. V (corrientes totales) con las corrientes obtenidas al aplicar el protocolo de corrientes instantáneas. La forma sigmoidea del gráfico obtenido a partir de las corrientes adquiridas con el protocolo I vs. V se debe a la activación del intercambiador la cual es dependiente de potencial. Por otro lado, las corrientes obtenidas con el protocolo de corrientes instantáneas tienen un comportamiento óhmico debido a que el intercambiador ha sido activado previamente. La comparación de estas curvas refleja que la diferencia entre sí, corresponde al proceso de activación del intercambiador.

La Figura N°10 presenta los resultados obtenidos por Guerra (2012) para 1,5mM ATP-Mg, donde obtiene que la forma de las curvas de corrientes totales en el modo de salida de K^+ se asemeja a la recta de las corrientes obtenidas por el protocolo de corrientes instantáneas, lo que implica que el ATP-Mg tiene un efecto sobre la activación del intercambiador en el modo salida de K^+ (Guerra, 2012).

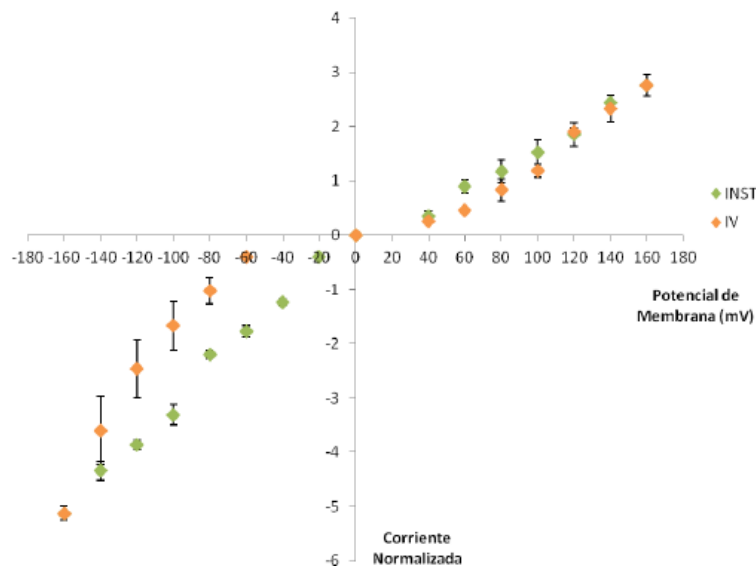


Figura 10. Relación entre las curvas de corriente instantáneas con las corrientes totales con 1,5mM ATP-Mg. Los puntos verdes representan los datos obtenidos con el protocolo INST en la condición control (n=5). Los puntos naranja representan el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo I vs V en

la condición control (n=5). Las corrientes instantáneas forman una recta, mientras que las corrientes totales adoptan una forma sigmoideal. La diferencia entre estas corrientes es menor que en la condición control y que en presencia de 1mM ATP. Tomado de (Guerra, 2012).

El hecho de que la curva correspondiente a las corrientes totales se acerque a la recta correspondiente a las obtenidas por el protocolo de corrientes instantáneas (en el caso del modo de salida de K^+) indica que el ATP-Mg tiene un efecto sobre la actividad del intercambiador, que en el modo salida de K^+ se ve reflejado en la disminución de la dependencia de potencial de la activación del intercambiador para este modo.

Debido a que los efectos observados por Guerra (2012), sobre la activación y la permeabilidad son distintos, se puede inferir que estos mecanismos se encuentran separados dentro del intercambiador y son afectados en distintos sitios de interacción con el ATP-Mg (Guerra 2012).

- **Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+}**

Al evaluar el efecto del ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador, se encontró que el ATP-Mg aumenta el tiempo de desactivación del intercambiador en el modo de salida de K^+ . Este efecto se alcanzó con 0,5mM ATP, por lo que la K_m estaría en el orden de las decenas o centenas de μM , esto implica que el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador en el modo de salida de K^+ podría verse afectado por el sitio de interacción "A" del ATP-Mg, ya que es el sitio con la mayor afinidad por esta molécula. Posteriormente, al evaluar el efecto del ATP-Mg sobre la desactivación en el modo de entrada de K^+ , no se observó ningún cambio en el tiempo de desactivación estudiado (Guerra, 2012).

Con base en lo anterior, se ha planteado caracterizar el efecto del análogo de ATP, Adenilil Imidodifosfato (AMP-PNP) sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} de la membrana del eritrocito humano, usando la técnica del Patch Clamp en la modalidad T.U.G.O. Patch Clamp, desarrollada en el LFMB-UCV.

AMP-PNP

EL Adenilil Imidodifosfato también conocido como: β , γ -Imidoadenosina 5'-trifosfato; AMP-PNP; ATP[β,γ -NH]; Adenosina 5'-(β,γ -imido)trifosfato; y AdoPP(NH)P; es un análogo de ATP, en el cual el tercer oxígeno de la cadena trifosfato es reemplazado por un grupo imido (NH) (Zenón A. 1984). Dicho análogo, que en adelante llamaremos AMP-PNP, fue sintetizado de la reacción Imidodifosfato con P¹-adenosina P²difenil pirofosfato por Ralph G. Yount y colaboradores (1971).

El AMP-PNP estructuralmente es similar al ATP como se observa en la figura 11. Esta semejanza estructural, da una noción de la gran similitud entre el ATP y el AMP-PNP en la interacción con los diferentes sistemas enzimáticos (Yount y col. 1971).

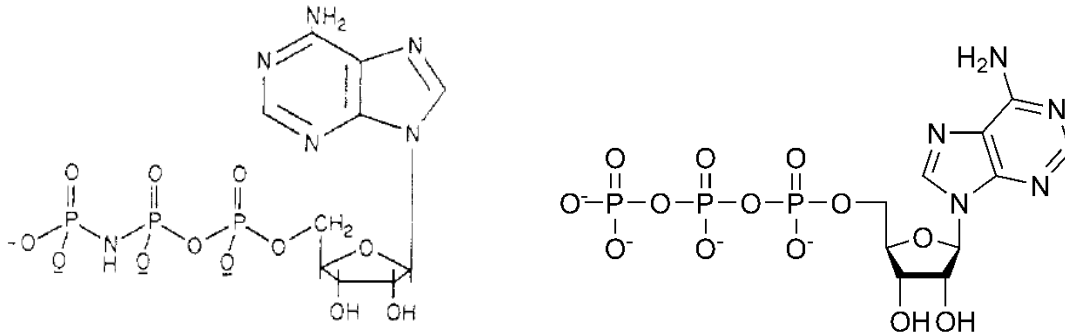


Figura 11. Estructura del AMP-PNP en la izquierda (Tomado de Yount y col. 1971) y estructura del ATP a la derecha.

El AMP-PNP es un análogo no hidrolizable de los nucleótidos de adenina con inhibición de la hidrólisis del ATP (Melnick, y col 1975). Se dice que no es hidrolizable dado que el enlace pirofosfato entre los fosfatos β y γ , que es hidrolizado por la ATPasa es reemplazado por un enlace no hidrolizable (Sakharov, y col. 2014).

En 1981 Ortiz, y col. estudiaron las características del AMP-PNP en F₁-ATPasa mitocondrial y obtuvieron que el ADP pero no los gradientes electroquímicos pueden remover el efecto inhibitorio del AMP-PNP en la actividad de la ATPasa mitocondrial (Ortiz, y col 1981). Los autores también obtuvieron que en la F₁-ATPasa soluble, el metanol al 20% disminuye la habilidad del AMP-PNP para inhibir la

hidrolisis del ATP, lo que en parte es debido a la disminución de la afinidad del sitio de unión para el AMP-PNP (Ortiz y col 1981).

Van de Ven y col. (1981), estudiaron la unión de AMP-PNP en la K^+/H^+ ATPasa bajo distintas condiciones tales como en presencia de ácido ciclodiaminotetraacético (CDTA), Mg^{2+} y cationes monovalentes. Obteniendo que el CDTA inhibe por competitividad la unión de AMP-PNP a la bomba en cuestión (Van den Van y col. 1981). Los autores reportan que concentraciones de hasta 0,5mM de Mg^{2+} disminuyen la cantidad de AMP-PNP unidos a la H^+ -ATPasa a la mitad. Adicionalmente, indican que concentraciones superiores de Mg^{2+} no incrementan la cantidad de AMP-PNP que no se une a la bomba, sino que sólo aumenta la constante de disociación (Van den Van y col. 1981).

Los cationes monovalentes reducen la cantidad de AMP-PNP que se unen a la K^+/H^+ ATPasa en el siguiente orden de efectividad: $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+, Li^+$ (Van de Ven y col. 1981). Los cationes monovalentes K^+, Rb^+ y Cs^+ estimulan la actividad de la K^+/H^+ ATPasa causando una disminución de la unión entre el AMP-PNP y la bomba en el mismo orden de efectividad (Van de Ven y col. 1981). Finalmente los autores concluyen que la unión de los cationes monovalentes inducen una carga conformacional en la enzima, lo que reduce la unión del AMP-PNP al sustrato e incrementa la desfosforilación.

Por otra parte, Yount y col., reportan que el AMP-PNP se une con mayor fuerza a algunos cationes divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} a pH 8.5 (Yount y col. 1971).

Blodow y col. (2016) utilizan AMP-PNP con la finalidad de demostrar que el ATP en canales de K^+ sensibles a ATP en células de soporte coclear de cobayo (*Cavia porcellus*), es necesario como ligando y no como proveedor de energía proveniente de la hidrolisis. Llegan a tal conclusión dado que en ausencia de ATP y en presencia de AMP-PNP la conductancia del canal se ve igualmente disminuida.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el efecto de Adenilil Imidodifosfato sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del Adenilil Imidodifosfato sobre la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano.
- Caracterizar el efecto de Adenilil Imidodifosfato sobre la permeabilidad iónica del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano.
- Caracterizar el efecto de Adenilil Imidodifosfato sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} del eritrocito humano.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico

Se utilizó sangre humana proveniente de donantes sanos, obtenida por punción epidérmica. Utilizando una micropipeta con 4 μ L de solución experimental previamente filtrada, se procedió a tomar 1 μ L de sangre, a ser colocada en la cámara experimental, contentiva de 0,5mL de solución experimental.

Soluciones experimentales

Todos los experimentos partieron de la “solución experimental o normal” compuesta por: 140mM KCl, 10mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ y 10mM TRIS y 300 mOsm/kg. Seguidamente se procedió a colocar en la cámara experimental el AMP-PNP en distintas concentraciones: 0,5mM, 1,0mM; 1,5mM; 2,0mM y 5,0mM. El pH de las soluciones será de 7,4.

Medidas Electrofisiológicas

- T.U.G.O. Patch Clamp (the U-shape Giga Ohm Patch Clamp)

Los experimentos se realizaron aplicando la técnica del Patch Clamp en la modalidad del T.U.G.O. Patch Clamp. Esta técnica ha sido desarrollada en el LFMB-UCV con el fin de simular las condiciones de estrés mecánico a las que está expuesta la membrana de los eritrocitos al pasar por un capilar sanguíneo. Esto fue posible gracias a una modificación en la pipeta, que ahora presenta paredes internas lo más paralelas posible, permitiendo que el eritrocito ingrese al interior de la pipeta sin ser succionado por completo al aplicarse presión negativa. Las características específicas de la pipeta y demás sobre tal modalidad puede verse en Romero, 2004. Bajo esta modalidad una considerable área de membrana está en contacto con las paredes de la micropipeta, siendo en esta zona donde se formará el sello eléctrico. Una vez formado el sello se cambió a la configuración de insideout tocando el fondo de la cámara experimental (Romero, 2004). Esta configuración recibe el nombre de T.U.G.O. Patch Clamp por sus siglas en ingles the U-Shape Giga Ohm Patch Camp.

Elaboración de las pipetas

Las pipetas utilizadas se construyeron a partir de capilares de borocilicato O.D: 1,5 mm, I.D.: 0,86mm y 10cm de largo (Sutter instrument Co., Noato CA, USA). Estos capilares fueron halados en dos pasos con un *Puller* vertical modelo 700C (David Kopf Instruments, USA). El procedimiento de la fabricación de las pipetas fue realizado como se describe en Romero, 2004.

La forma de las pipetas para el T.U.G.O. Patch Clamp intenta simular el paso del eritrocito por el capilar sanguíneo desde el punto de vista mecánico, permitiendole aislar una gran cantidad de membrana y a su vez evitar que el eritrocito sea succionado por completo, la principal diferencia entre la pipeta del T.U.G.O. Patch Clamp y el Patch Clamp original podemos verla en la figura N° 12.



Figura 12. Forma de la punta de las pipetas utilizadas en la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp (A). Forma de la punta de una típica pipeta pulida de Patch Clamp (B) (tomado de Romero 2004).

En las pipetas comúnmente usadas en el Patch Clamp clásico, el diámetro de la punta de la pipeta al final del proceso de fabricación se ve disminuido al pulirla con una forja, de manera que se obtengan pocos canales dentro de la pipeta y también para tratar de disminuir la resistencia en serie asociada a esta zona. En el T.U.G.O. Patch Clamp, las pipetas no se pulen, estas presentan una abertura interna en la punta lo suficientemente grande como para permitir que el eritrocito entre al interior, sin que sea succionado completamente, quedando una porción de la célula en el interior de la pipeta y un área grande de la membrana en contacto con las paredes internas de la misma. Esta área constituye la zona donde se forma el sello eléctrico.

Con la utilización de la técnica T.U.G.O. Patch Clamp, se logra que gran cantidad de membrana quede bajo el control de potencial. Es por esta característica que se han podido observar y medir corrientes asociadas al intercambiador, las cuales no habían sido reportadas anteriormente.

Formación del sello

Para la observación de las células y la manipulación de estas se utilizó un microscopio invertido Nikon Diaphot (Nikon CO, LTD, Tokio Japon) con oculares de 10X CFW y objetivos 20 y 40 DL.

Las células se tomaron con las pipetas, cuando estas se encontraban asentado en el fondo de la cámara. Una vez ubicada la pipeta frente al eritrocito escogido para hacer el patch, se succionó la célula mediante la aplicación de presión negativa a través del *Holder*, en el cual se encuentra la pipeta, esto con la ayuda de una inyectora.

En la figura N°13 se presenta un esquema aproximado de lo que sucede en el transcurso desde el momento en el cual se ubica la pipeta frente al eritrocito, hasta llegar a formar el sello de alta resistencia, también llamado Giga sello.

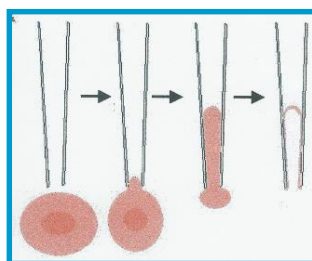


Figura 13. Esquema del posible proceso de formación de un sello de alta resistencia en las condiciones descritas (Tomado de Romero 2004).

Después de la formación del sello, se procedió a desprender la región de la célula en el exterior de la pipeta. Esto se realizó al tocar el resto saliente del eritrocito, en la punta de la pipeta, con el fondo de la cámara. De esta manera, se pasa de la configuración Cell-Attached a la forma Inside-out, donde el lado interno de la membrana de la célula queda expuesto a la solución del baño.

Protocolos de estimulación

- Protocolo de sustracción de fuga P/10

Para medir las corrientes del intercambiador, fue necesario aplicar un protocolo que permita la sustracción de las corrientes de fuga, previo a la aplicación de cualquier protocolo de estimulación.

El protocolo de sustracción de fuga empleado será de tipo P/10. El protocolo P/10 consiste en aplicar un pulso similar al pulso prueba pero con una magnitud equivalente a un décimo de la intensidad del pulso prueba, repitiéndose diez veces (P/10). La magnitud del prepulso, 1/10 del pulso de prueba, fue escogida debido a que a dicho valor no se desarrollan corrientes, por ser un potencial muy bajo, de acuerdo a lo observado con respecto a la dependencia de potencial de las corrientes del intercambiador (Figura N°1).

- Protocolo de corriente contra voltaje (I vs. V)

Con la aplicación de este protocolo, una vez aplicado el protocolo P/10, se obtuvo los valores de corrientes y voltajes necesarios para la realización de las respectivas curvas corriente vs voltaje, donde se observó el desarrollo de las corrientes del intercambiador.

El protocolo en cuestión consiste en la aplicación de pulsos cuadrados de voltaje de 2 segundos de duración cada uno, con una amplitud de +/- 160mV, en pasos de +/-40mV respectivamente (figura 14).

Debido que el método empleado no permite conocer la cantidad de membrana dentro de la pipeta, resulta imposible expresar los datos en densidad de corriente, motivo por el cual se realiza una estandarización de las corrientes en función del valor de corriente obtenido con el pulso de +120mV. Se utiliza dicho punto debido a que tal potencial garantiza el desarrollo de las corrientes del intercambiador sin que estas estén saturadas.

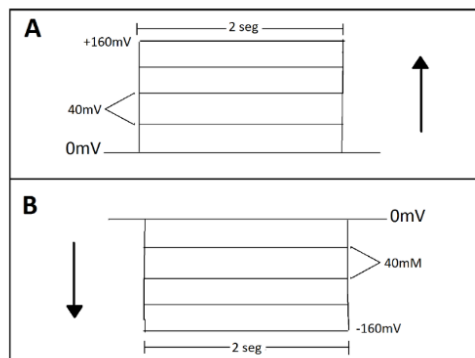


Figura 14. Esquema del protocolo de estimulación I/V. (A) Potenciales positivos. (B) Potenciales negativos.

- Protocolo de Corrientes instantáneas

Con el fin de evaluar el efecto en la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} se aplicó un protocolo que elimina el efecto de dependencia del potencial sobre las corrientes del intercambiador en estudio. Para ello, se aplica un primer pulso de +160mV o -160mV de dos segundos de duración, seguidos de pulsos que van de 0mV a +160mV ó de 0mV a -160mV, aumentando en pasos de +/- 20mV respectivamente. Cada pulso tiene un segundo de duración. En la Figura 15 se muestra un esquema del protocolo de corrientes instantáneas antes descrito.

Las corrientes se midieron al inicio del segundo pulso. Esto debido a que se busca medir el efecto en la permeabilidad y no en la activación del intercambiador. Así, una vez se ha realizado el primer pulso, se ha activado el intercambiador y al medir al inicio del segundo pulso nos aseguramos estar midiendo valores que no corresponden a la activación dependiente de potencial, es por ello que el voltaje del primer pulso es lo suficientemente grande como para asegurar la activación del mencionado intercambiador; posteriormente los datos se normalizan en función del valor de corriente obtenido a +120mV.

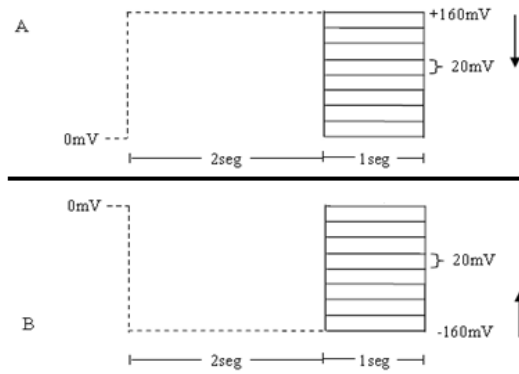


Figura 15. Esquema de los protocolos de corrientes instantáneas. Pulso activante +160mV (A), Pulso activante -160mV (B). Modificado de Forsyth, 2006

- Protocolo de desactivación

Este protocolo consiste en la aplicación de un pulso de +160mV o -160mV. Lo que va a variar es el tiempo de duración del pulso, el cual irá disminuyendo en pasos de 500mSeg. En la Figura N° 16 se muestra un esquema del protocolo de desactivación. La finalidad de este protocolo es evaluar el efecto sobre el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador.

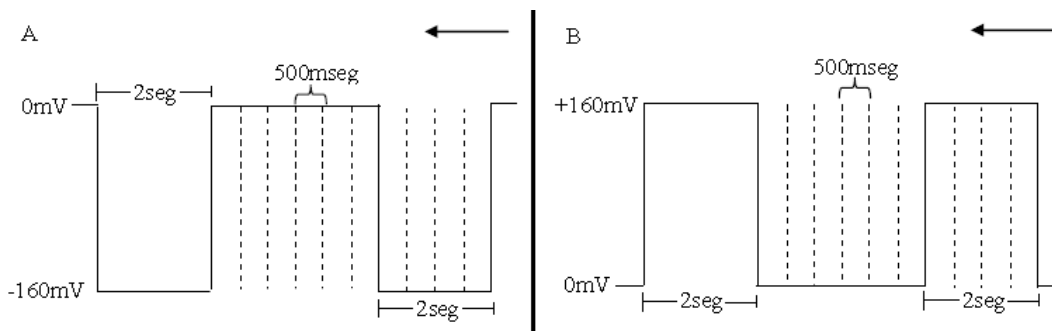


Figura 16. Esquema del protocolo de desactivación. El tiempo entre los pulsos es de 500mseg. A, pulso de -160mV. B, pulso de +160mV. Modificado de Forsyth 2006.

Adquisición de Datos

Las corrientes se adquirieron en modo voltaje-clamp, con una ganancia de 100mV/pA, con un filtro pasa-bajos a 1 KHz, para lo cual se utilizó un amplificador AXOPATCH-1C (Axon Instrument, Burlingame,

CA, USA). Simultáneamente se utilizó un filtro de línea HumBug (50/60Hz Noise eliminator; Quest Scientific, North Vancouver, BC, Canada), para eliminar el ruido de 60 ciclos proveniente de la línea.

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

Análisis estadístico

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

RESULTADOS

Empleando la técnica de T.U.G.O. Patch Clamp fue posible medir las corrientes del intercambiador en estudio y caracterizar el efecto del AMP-PNP sobre dichas corrientes.

EFFECTO DEL AMP-PNP SOBRE LA ACTIVIDAD DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}

Mediante la aplicación del protocolo I vs V (Figura 14) se estudiaron las corrientes del intercambiador. El control para estos experimentos, realizado bajo condición simétrica de solución normal, con un n=29, se muestra en la figura 17. Se observa que las corrientes registradas con este protocolo muestran un comportamiento sigmoideo con respecto al potencial de membrana impuesto. Las corrientes obtenidas en modo directo (salida de K^+) son mayores que las obtenidas en el modo inverso (entrada de K^+).

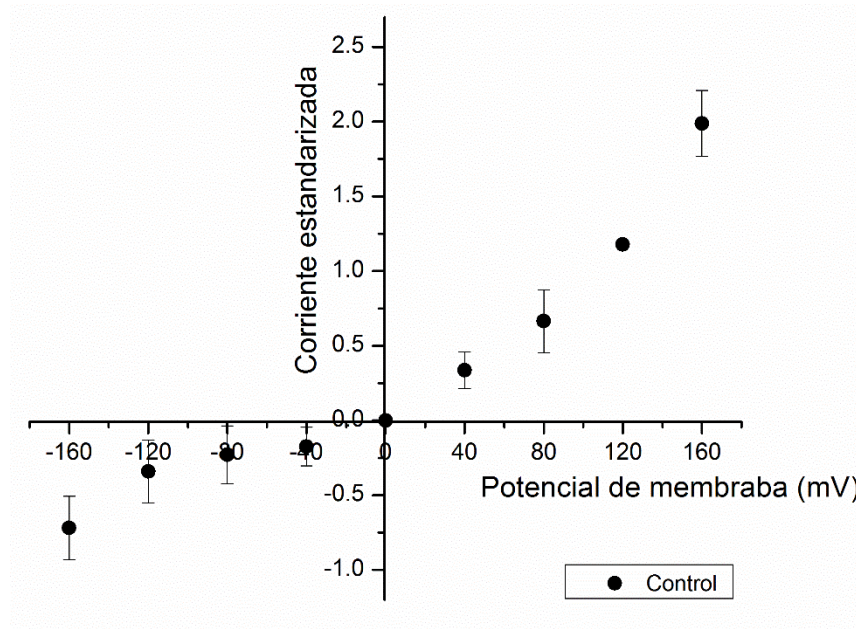


Figura 17. Curva I/V control. Los círculos negros representan los valores de corriente estandarizada con respecto al valor obtenido a un potencial de +120mV, acompañado con las barras de desviación estándar. n=29.

Efecto de las concentraciones 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM de AMP-PNP sobre la relación corriente voltaje de la actividad del intercambiador K^+/Ca^{+2}

En la figura 18 se observa que el AMP-PNP incrementa las corrientes producidas por el intercambiador K^+/Ca^{+2} , respecto a la condición control. Este incremento presenta un valor promedio a todos los potenciales positivos de 52,68% +/- 2,456 en el modo directo y 41,25% +/- 3,865 en promedio para todos los potenciales negativos evaluados, en el modo inverso, con 0,5mM de AMP-PNP. EL incremento de la corriente en presencia de 1mM de AMP-PNP fue de 51,33% +/- 2,132 en el modo directo y 45,12% +/- 1,055 en el modo inverso. Finalmente para 1,5mM de AMP-PNP se observó un incremento de 52,90% +/- 1,754 en el modo directo y 42,86% +/- 1,987 en el modo inverso. También, se muestra que, en todos los casos, el AMP-PNP no afecta el comportamiento sigmoideo respecto al potencial de membrana impuesto.

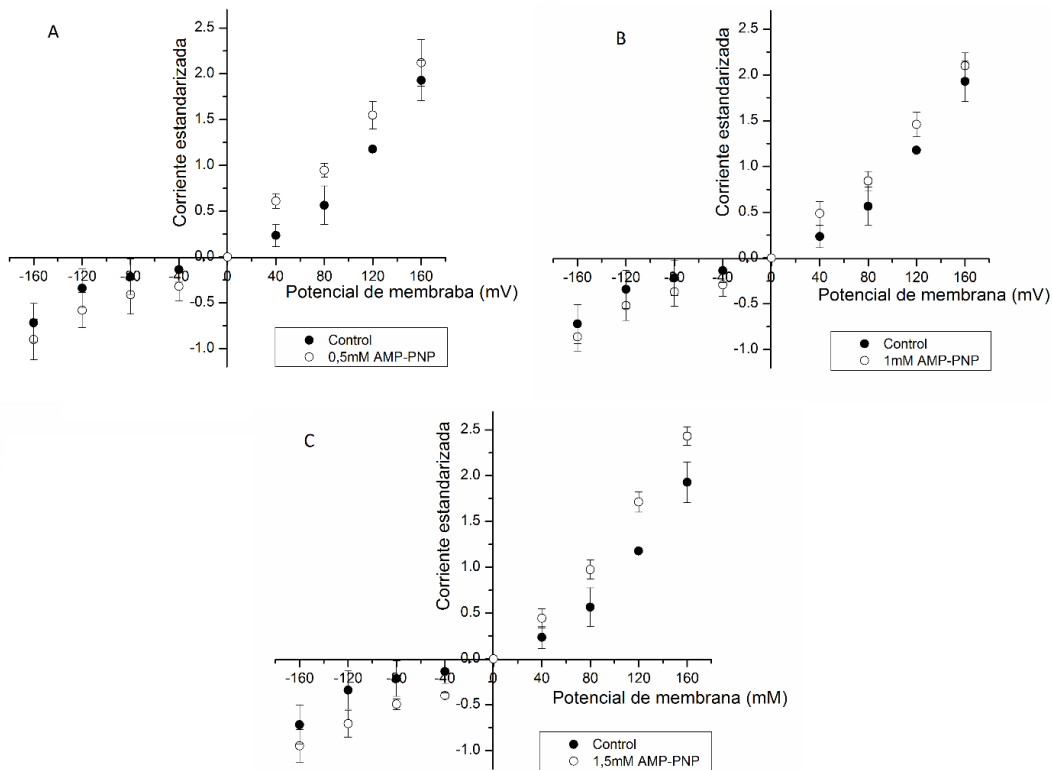


Figura 18. Curva I/V en presencia de 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM de AMP-PNP para el intercambiador K^+/Ca^{+2} . Los círculos negros representan la corriente estandarizada con respecto al valor obtenido a un potencial de +120mV, condición control (n=29). Los círculos blancos representan la corriente

estandarizada con respecto al valor obtenido a un potencial de +120mV de la condición control, desarrollada en presencia de 0,5mM (grafico A) n=6; 1,0mM (grafico B) n=6 y 1,5mM de APM-PNP (grafico C) n=6. En todos los casos se muestran los valores promedios y su desviación estándar.

Efecto de las concentraciones 2,0mM y 5,0mM de AMP-PNP sobre la relación corriente voltaje de la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+}

En la figura 19 se observa que en presencia de 2,0 mM de AMP-PNP intracelular; para el modo directo el incremento es de 170,10% +/- 9,956 en promedio a todos los potenciales positivos, mientras que para el modo inverso es de 139,36% +/- 8,056 en promedio para todos los potenciales negativos. Al elevar la concentración hasta 5,0mM de AMP-PNP del lado intracelular, el incremento es de 174,71% +/- 12,103 en promedio para el modo directo y 138,06% +/- 10,076 en promedio para el modo inverso. Nótese que al igual que en el control la corriente registrada presenta un aumento mayor a potenciales positivos con respecto a los negativos. De igual manera, la dependencia no lineal del mecanismo de activación con el potencial de membrana no se ve afectada.

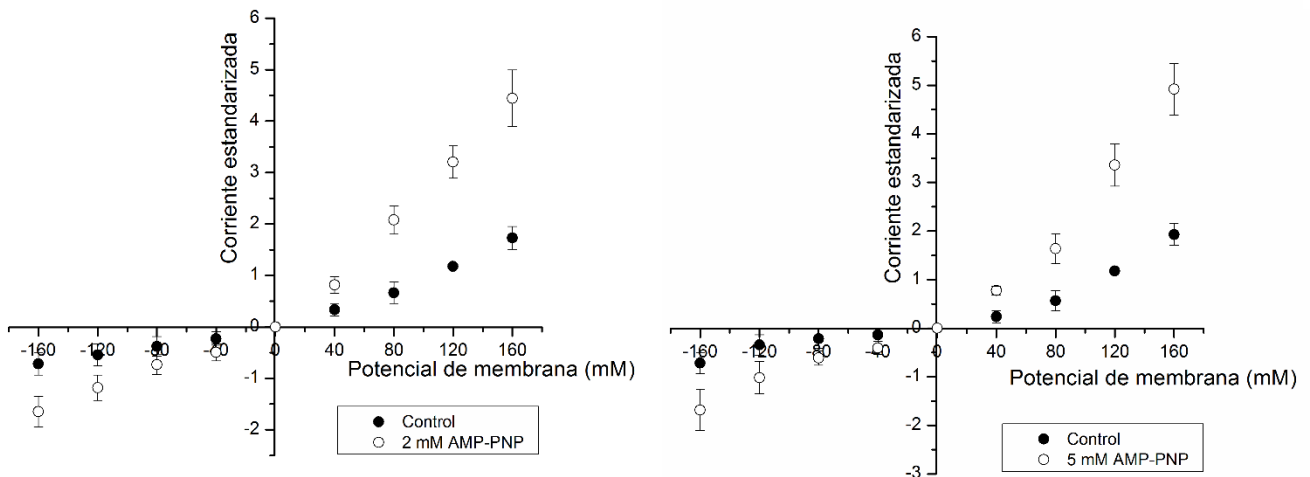


Figura 19. Curva I/V del efecto de 2,0 mM y 5mM AMP-PNP sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los círculos negros representan la corriente estandarizada obtenida bajo la condición control (n=29). Los círculos blancos representan la corriente estandarizada desarrollada en presencia de 2mM

de APM-PNP (n=6), grafico de la izquierda; y en presencia de 5,0mM de AMP-PNP grafico de la derecha (n=6). En todos los casos se muestran los valores promedios y su desviación estándar.

En la figura 20 se presenta una gráfica que resume el efecto de las diversas concentraciones de AMP-PNP empleadas sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} . En todos los casos la corriente en el modo directo es mayor que en el modo inverso. Es importante notar que claramente el efecto a las concentraciones de 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM son similares en cuanto a su amplitud, tanto en el modo directo como en el modo inverso, pero a su vez son diferentes al efecto de 2,0mM y 5,0mM. Siendo el efecto de 2,0mM y 5mM similar entre sí.

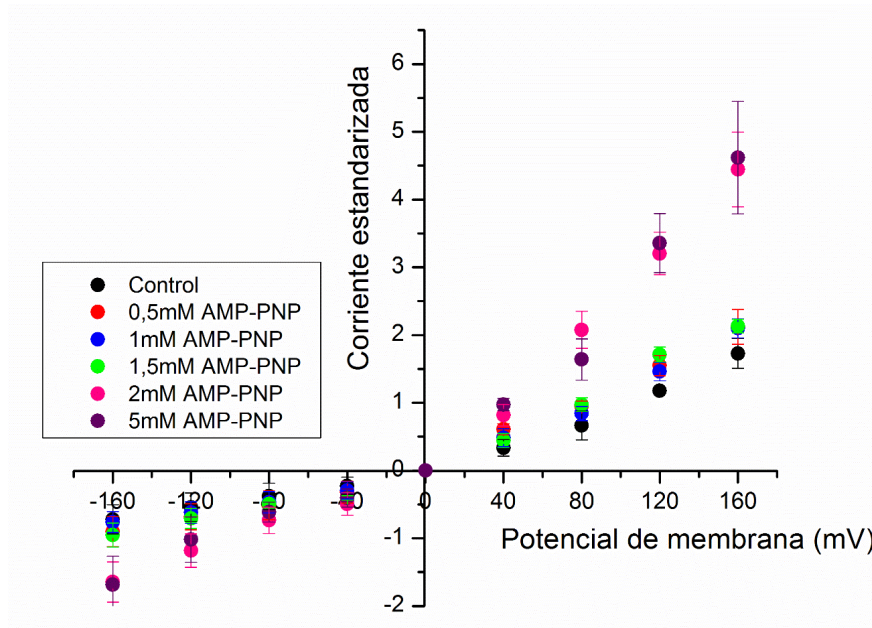


Figura 20. Curva IV con 0,5mM; 1,0mM; 1,5mM; 2,0mM y 5,0mM de AMP-PNP. Los círculos negros representan la condición control (n=29). Los círculos rojos representan la corriente estandarizada registrada al agregar 0,5mM de AMP-PNP (n=6); presentando un incremento de 52,68% en el modo directo y 41,25% en el inverso. Los círculos azules representan el efecto de 1,0mM de AMP-PNP (n=6) se obtuvo para el modo directo un incremento de 51,33% y de 45,12% para el inverso. Los círculos verdes muestran lo ocurrido con 1,5mM de AMP-PNP (n=6), presentado 52,90% de incremento en el modo directo y 42,86% en el inverso. Los círculos rosa muestra el efecto de 2,0mM de AMP-PNP (n=6) obteniendo un incremento de 170,10% en el modo directo y 139,36% en el inverso. Los círculos morados

representan la corriente estandarizada al agregar 5,0mM de AMP-PNP a la cámara (n=5); obteniendo un incremento del 174,71% en el modo directo y 138,06% en el inverso. En todos los casos se muestran los valores promedios y su desviación estándar.

DEPENDENCIA DEL INCREMENTO DE CORRIENTE CON LA CONCENTRACIÓN DE AMP-PNP

Al graficar la relación que existe entre el porcentaje de incremento de las corrientes estandarizadas y las diferentes concentraciones de AMP-PNP empleadas, en este caso a un mismo potencial de 120mV (figura 21), se obtiene que existe una curva bifásica con dos zonas donde el efecto se satura, una primera alcanzada a bajas concentraciones (0,5mM; 1,0mM y 1,5mM) y una segunda a concentraciones mayores (2,0mM y 5,0mM).

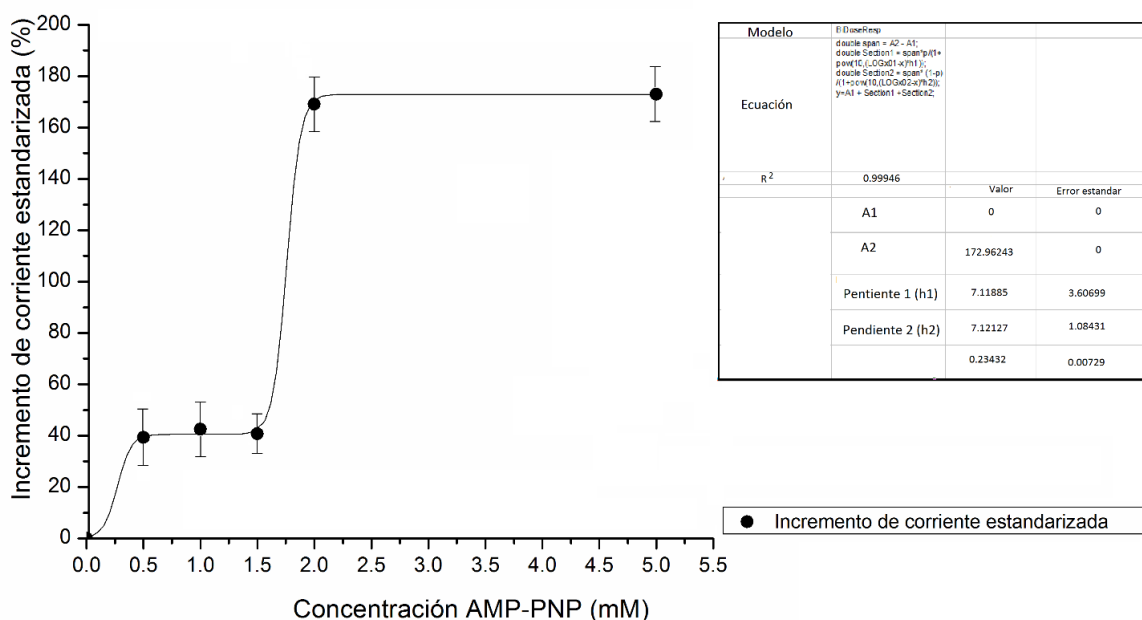


Figura 21. Porcentaje de incremento promedio obtenido a 120mV de potencial en presencia de las distintas concentraciones de AMP-PNP. Se muestran las barras de desviación estándar y los parámetros del ajuste lineal.

EFECTO DEL AMP-PNP SOBRE LA VIA DE PERMEACIÓN DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}

El efecto del AMP-PNP sobre las vías de permeación del intercambiador K^+/Ca^{2+} fue evaluado al aplicar el protocolo de corrientes instantáneas (figura 15). Se midieron las corrientes producidas por el intercambiador a diferentes potenciales de membrana, una vez este había sido activado por un potencial constante para todos los experimentos (+160mV o -160mV). El primer paso fue establecer un control del comportamiento de tales corrientes en el intercambiador, en nuestras condiciones experimentales. Se muestra en la figura 22 con un n=29. Se observa que las corrientes muestran un crecimiento lineal con respecto al potencial de membrana, un comportamiento óhmico. También, se observa que la permeabilidad es mayor en el modo directo que en el modo inverso.

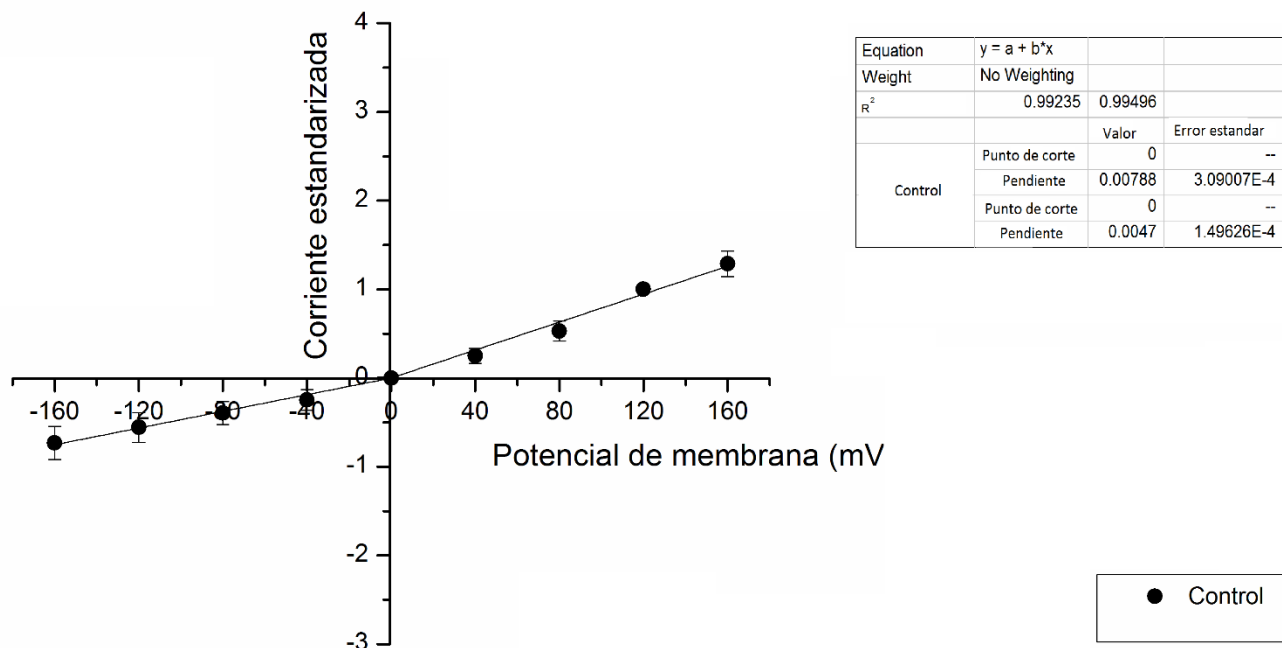


Figura 22. Curva control de corrientes instantáneas. Los círculos negros representan las corrientes estandarizadas obtenidas al inicio del segundo pulso (pulso de prueba) del protocolo de corrientes instantáneas para cada potencial de membrana impuesto. Tales corrientes fueron estandarizadas con respecto al valor de 120mV de potencial para cada experimento en particular. Se muestran los valores

promedios y su desviación estándar. Adicionalmente se presentan los parámetros de los ajustes lineales.

Efecto sobre la permeación de 0,5mM de AMP-PNP

En la figura 23 se encuentra graficado el efecto de 0,5mM de AMP-PNP sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} , se puede observar el aumento de la permeabilidad en la condición experimental respecto a la condición control en ambos sentidos de movimiento de K^+ . Dicho cambio es mayor en el modo directo (33,53% +/- 3,506 de incremento) que en el inverso (26,09% +/- 2,104 de incremento).

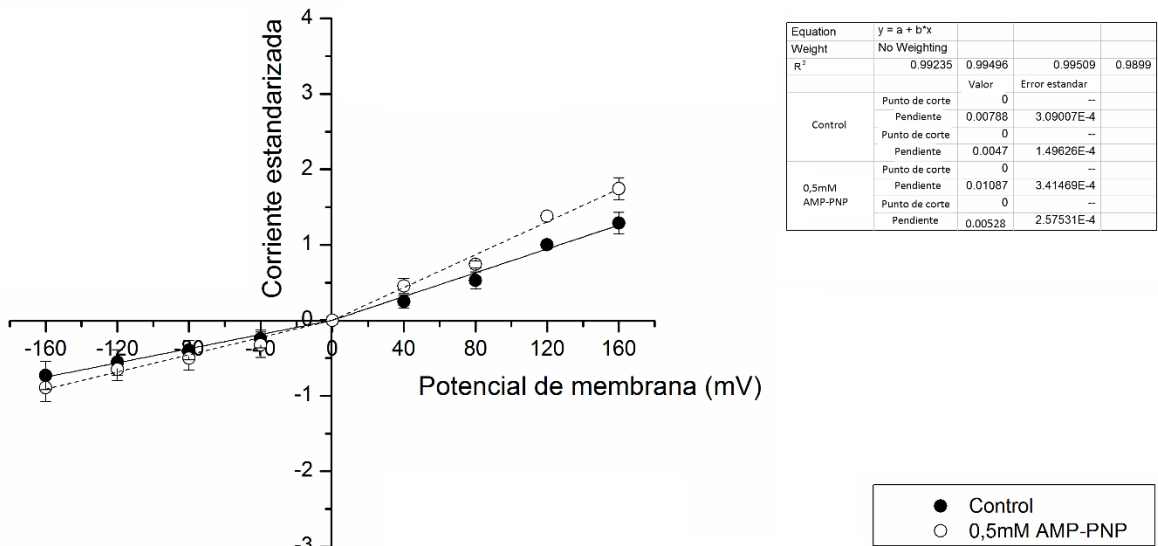


Figura 23. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), y los círculos blancos representan la condición experimental con 0,5mM de AMP-PNP (n=6). Se muestran los valores promedios y su desviación estándar. Se presenta los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.

Efecto sobre la permeación de 1,0mM de AMP-PNP

La Figura 24 muestra la curva obtenida bajo la condición experimental en comparación con la obtenida en el control. Puede verse que la acción del AMP-PNP colocado en el lado interior de la membrana, produce un incremento de la permeabilidad del intercambiador, teniéndose que la pendiente aumenta en un 30,05% +/- 3,406 para el modo directo y 17,25% +/- 2,4 en el modo inverso.

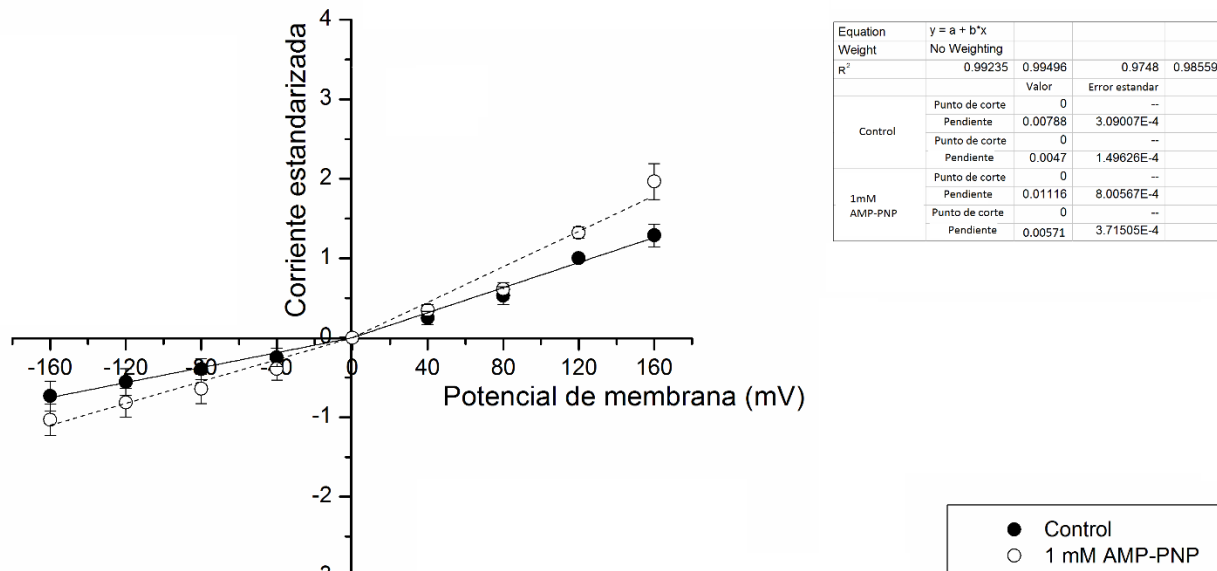


Figura 24. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 1,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con 1,0mM de AMP-PNP (n=6). Se muestran los valores promedios y su desviación estándar. Se presenta los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.

Efecto sobre la permeación de 1,5mM de AMP-PNP

En la figura 25 se muestra el efecto sobre la vía de permeación del intercambiador, en presencia de una concentración de 1,5mM de AMP-PNP en el lado intracelular. Se observa que el incremento de la pendiente es mayor para el modo directo en comparación con el modo inverso. Siendo tal aumento de 29,63% +/- 2,043 en el modo directo y de 22,87% +/- 1,908 en el modo inverso.

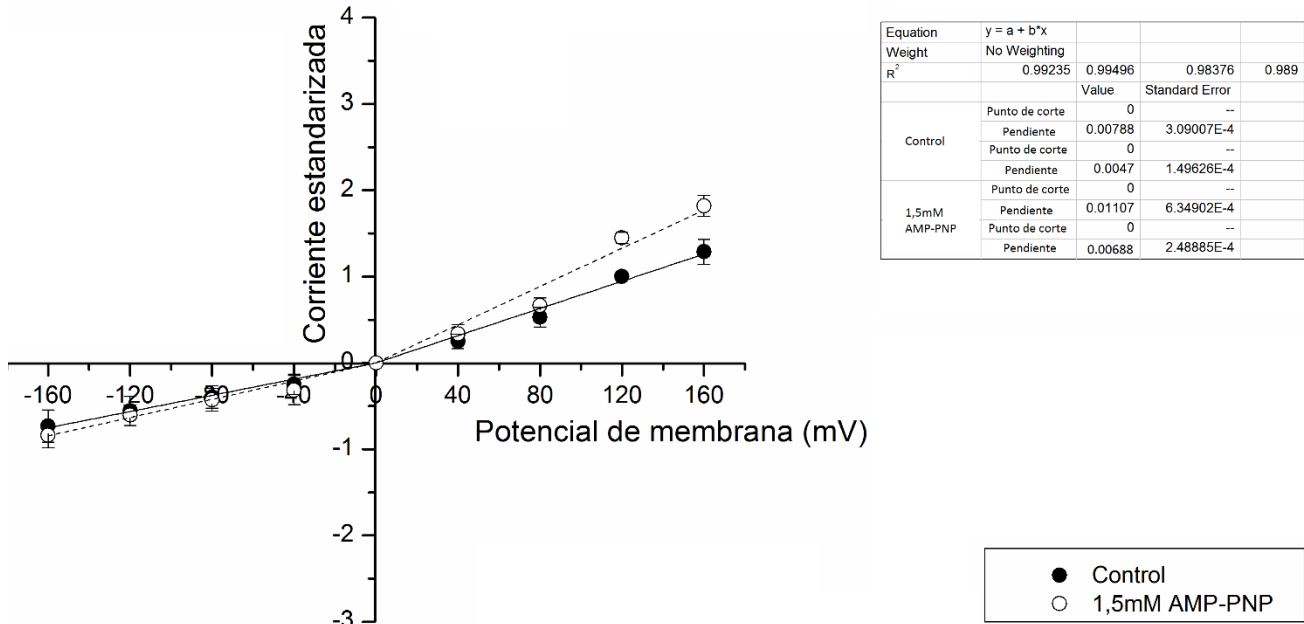


Figura 25. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 1,5mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), mientras que los círculos blancos representan la condición experimental con 1,5mM de AMP-PNP colocado en la cara citoplasmática de la membrana celular (n=6). Se muestran los promedios y su desviación estándar. Se presentan los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.

Efecto sobre la permeación de 2,0mM de AMP-PNP

Utilizando una concentración de 2,0mM de AMP-PNP en la cara citoplasmática de la membrana, se obtiene un incremento de 134,78% +/- 10,954 en el modo directo y 87,92% +/- 4,9 en el modo inverso con respecto a la condición control. Esto se muestra en la figura 26 con un n=6. Nótese que el efecto del AMP-PNP no interfiere con el comportamiento óhmico del transporte, luego de que el intercambiador ha sido activado.

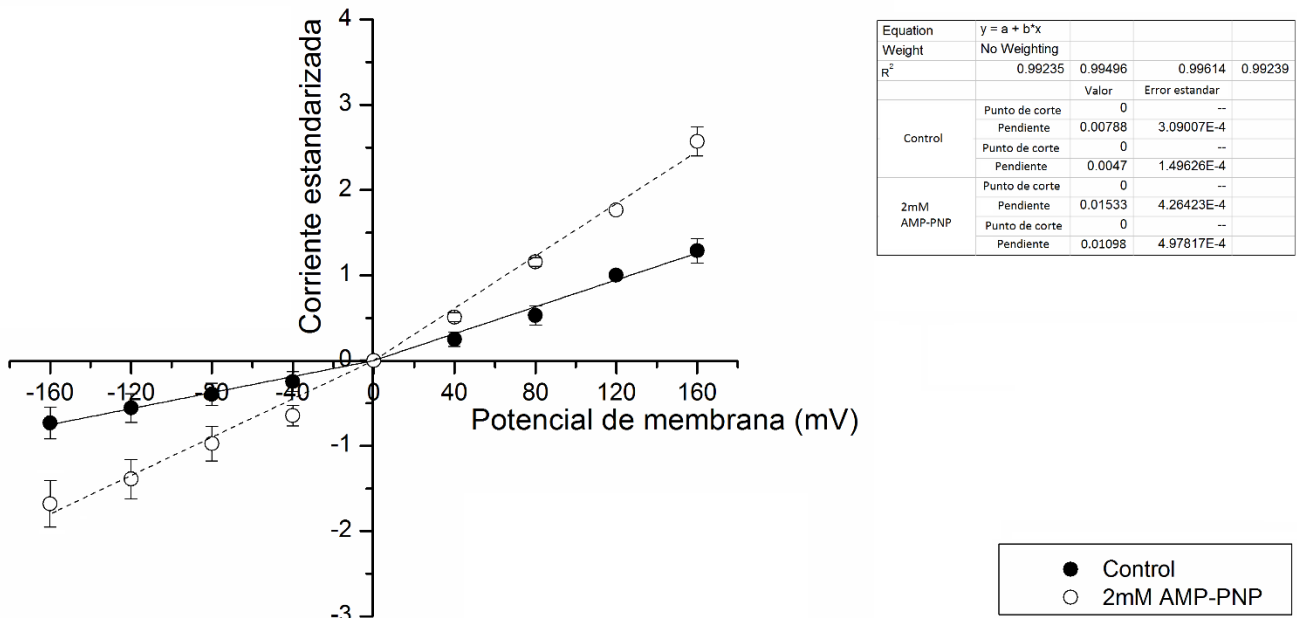


Figura 26. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{+2} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), y los círculos blancos representan la condición experimental con 2,0mM de AMP-PNP (n=6). Se muestran los promedios y su desviación estándar. Se presentan los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.

Efecto sobre la permeación de 5,0mM de AMP-PNP

En la figura 27 muestra las corrientes estandarizadas vs el potencial de membrana impuesto, obtenidas al aplicar el protocolo de corrientes instantáneas en presencia de 5,0mM de AMP-PNP en el baño en comparación con la condición control. Se obtuvo un incremento de 139,22% +/- 7,14 en el modo directo y de 81,10% +/- 8,234 en el modo inverso. El comportamiento óhmico de las corrientes no se ve afectado.

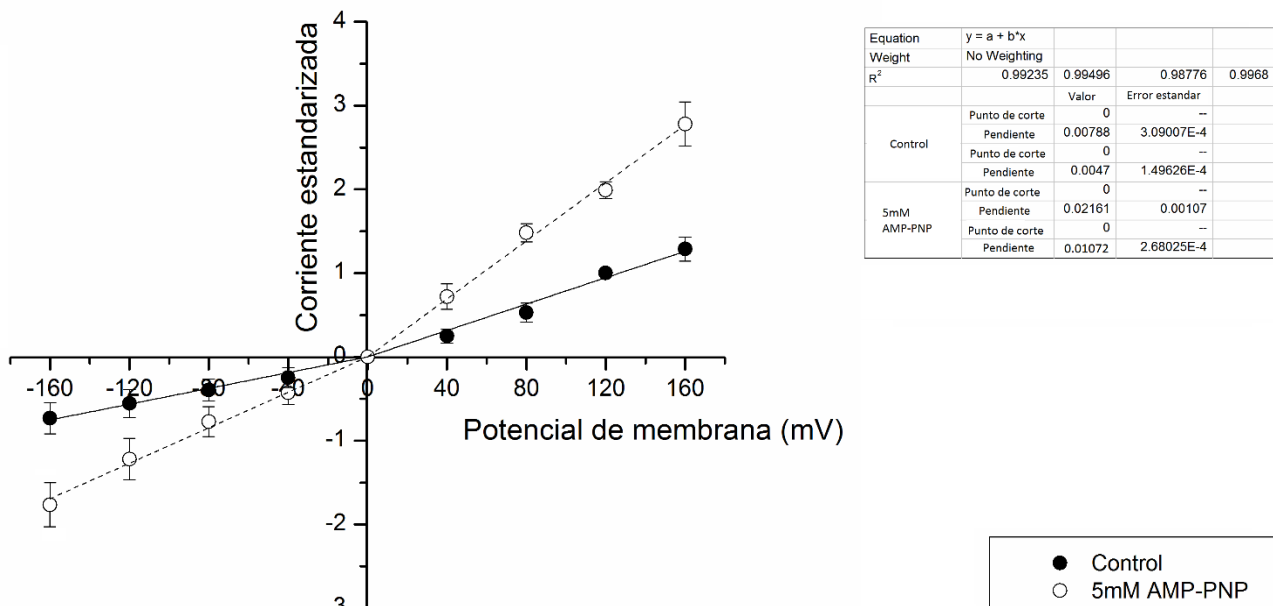


Figura 27. Corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Los círculos negros representan la condición control (n=29), y los círculos blancos representan la condición experimental con 5,0mM de AMP-PNP (n=5). Se muestran los promedios y su desviación estándar. Se presentan los datos correspondientes a los ajustes lineales de cada curva.

EFFECTO DEL AMP-PNP SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}

Se sabe que la actividad total del intercambiador es la suma del efecto en permeabilidad más el efecto de activación, así, si al porcentaje de incremento promedio para todos los potenciales de cada modo (directo o inverso) correspondiente a la actividad total, se le resta el porcentaje promedio de incremento de permeabilidad, se obtendrá entonces, el efecto que ejerce el AMP-PNP sobre la activación a cada concentración.

En la figura 28 se muestra el efecto del AMP-PNP sobre la activación del intercambiador. Se observa que el efecto ejercido de las concentraciones de 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM de AMP-PNP son

similares entre ellos, y a su vez diferentes de lo obtenido para 2,0mM y 5mM, los cuales también son similares.

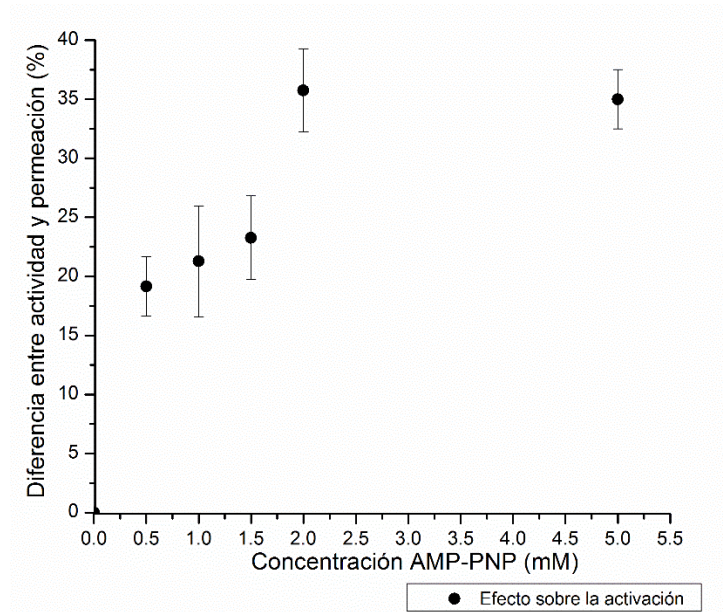
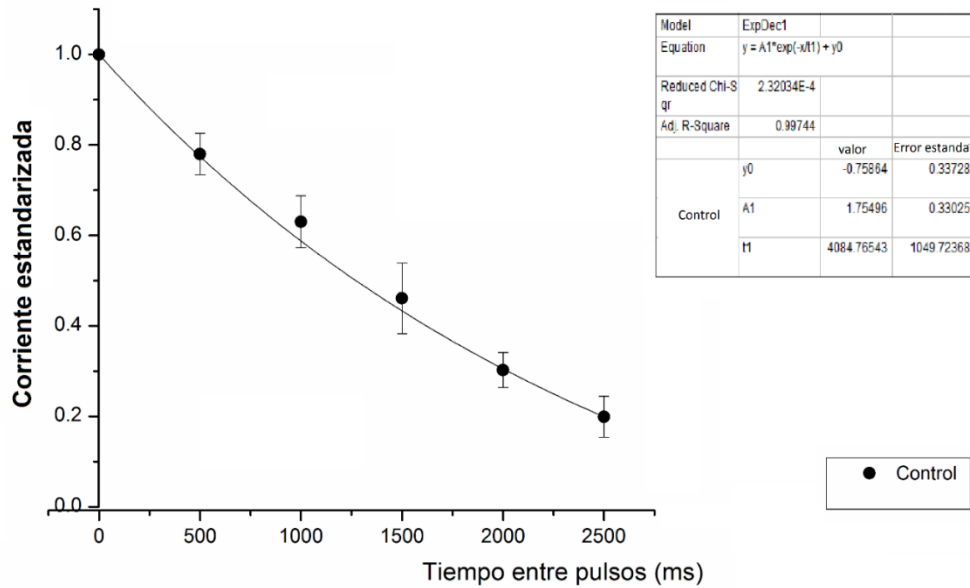


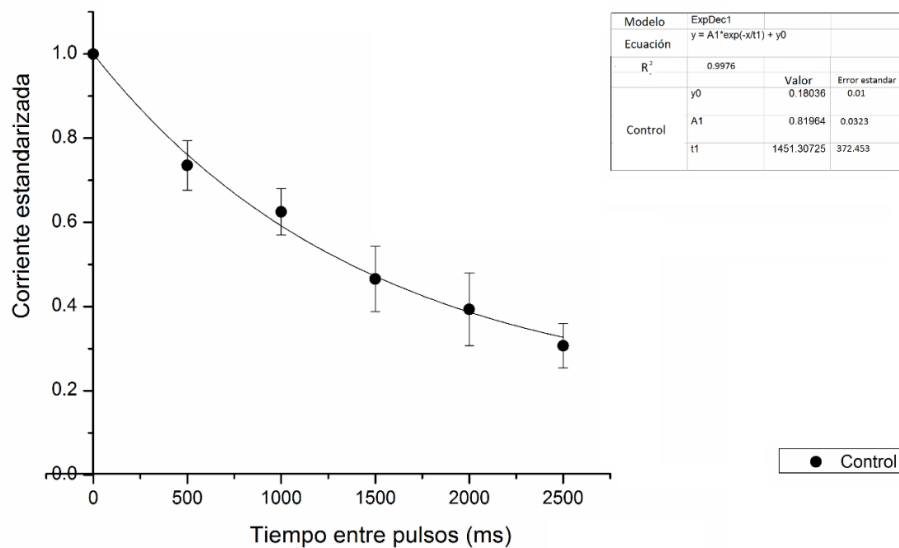
Figura 28. Efecto del AMP-PNP sobre la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los círculos negros corresponden a la diferencia entre las corrientes estandarizadas promedio correspondientes a la activación, y las corrientes estandarizadas promedio correspondientes a la permeabilidad, es decir el efecto sobre la activación. Se muestran los promedios y su desviación estándar.

EFFECTO DEL AMP-PNP SOBRE EL DESARROLLO TEMPORAL DE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR K^+/Ca^{2+}

Finalmente, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de AMP-PNP sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} utilizando el protocolo de desactivación (Figura 16). El primer paso fue establecer un control, el cual se muestra en la figura 29, en la cual puede verse que la curva obtenida a ambos potenciales corresponde a una exponencial negativa con una Tau para el modo directo (T_d) de 4084,76 ms y una Tau para el modo inverso (T_i) igual a 1451,30 ms.



(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo directo. Condición control (n=14).

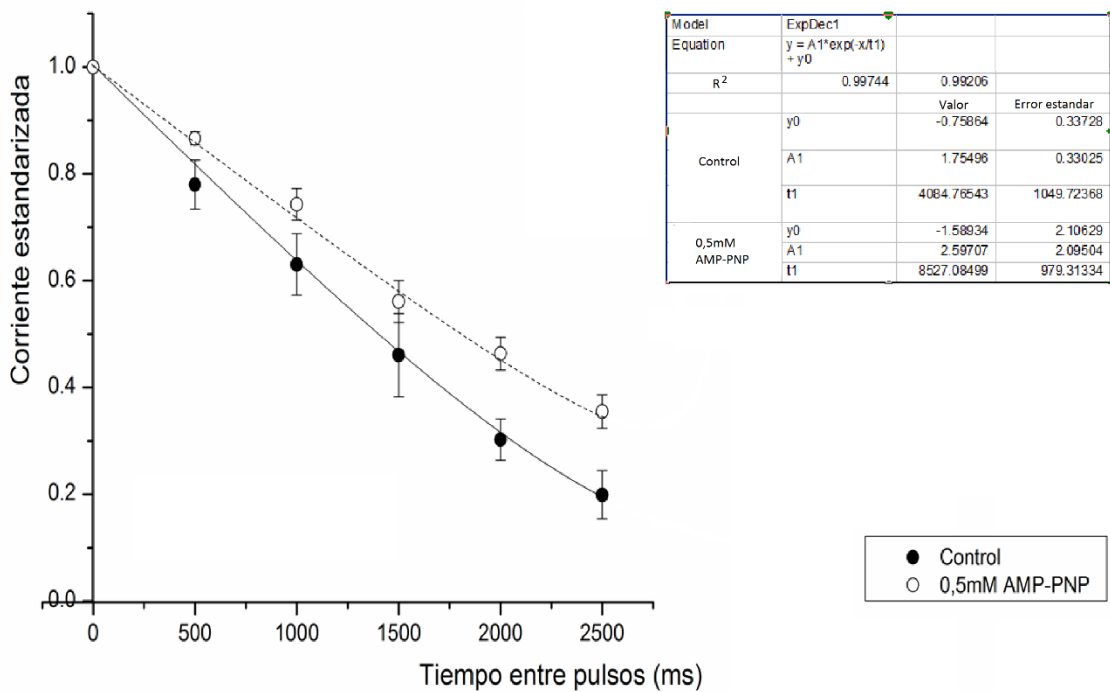


(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} para el modo inverso. Condición control (n=14).

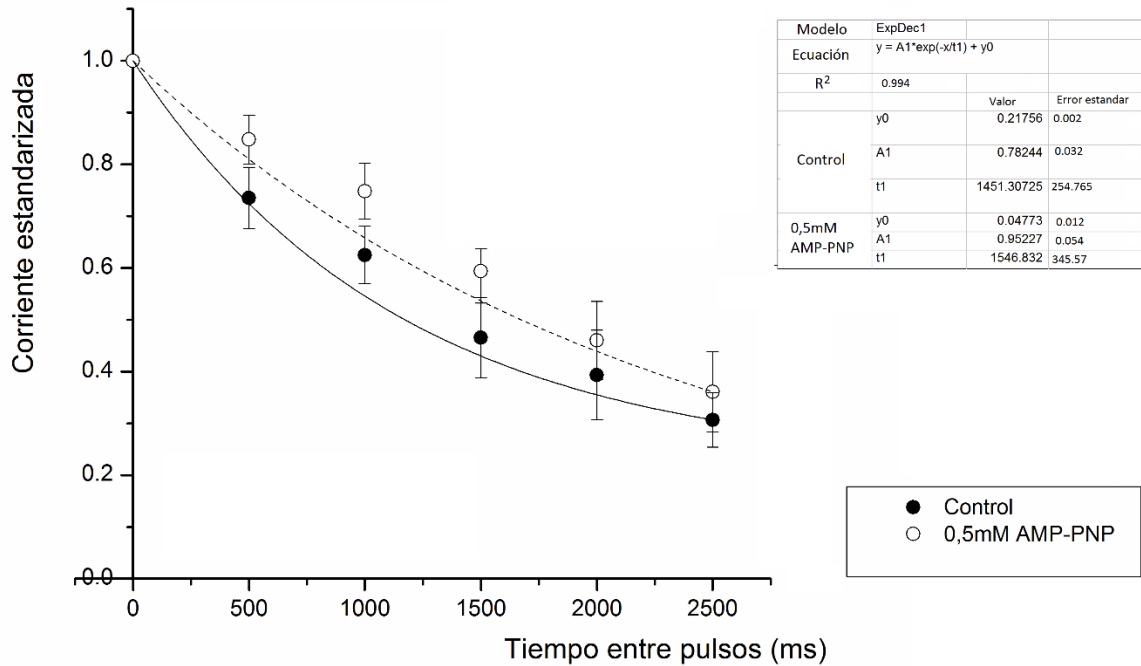
Figura 29. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Condición control. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas los promedios y su desviación estándar además de los parámetros de los ajustes exponenciales.

Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP

Una vez establecido el comportamiento del intercambiador en la condición control, se agregó 0,5mM de AMP-PNP en el baño y se procedió a repetir el experimento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30. Se observa que en el modo directo el AMP-PNP lentifica el desarrollo temporal de la desactivación de intercambiador. Incrementando la $T_d=4084,76$ a $8527,08$ (108,75%). Es de resaltar que para el modo inverso, esta concentración de AMP-PNP no produce un efecto sobre el desarrollo temporal de la desactivación, teniéndose que la T_i aumenta de $1451,30$ a $1546,83$.



(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP. Modo directo (n=5).

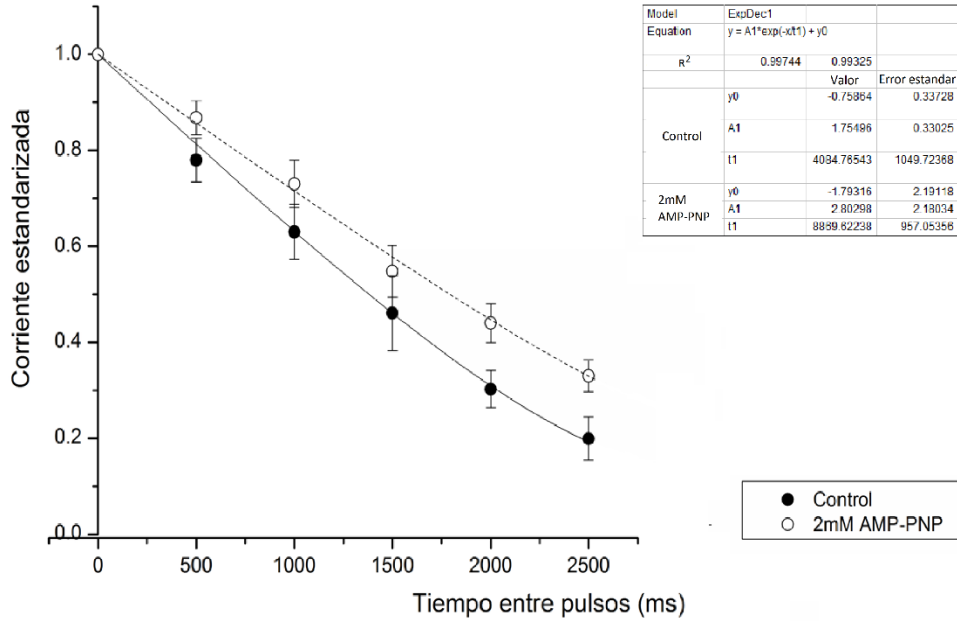


(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP. Modo inverso (n=5).

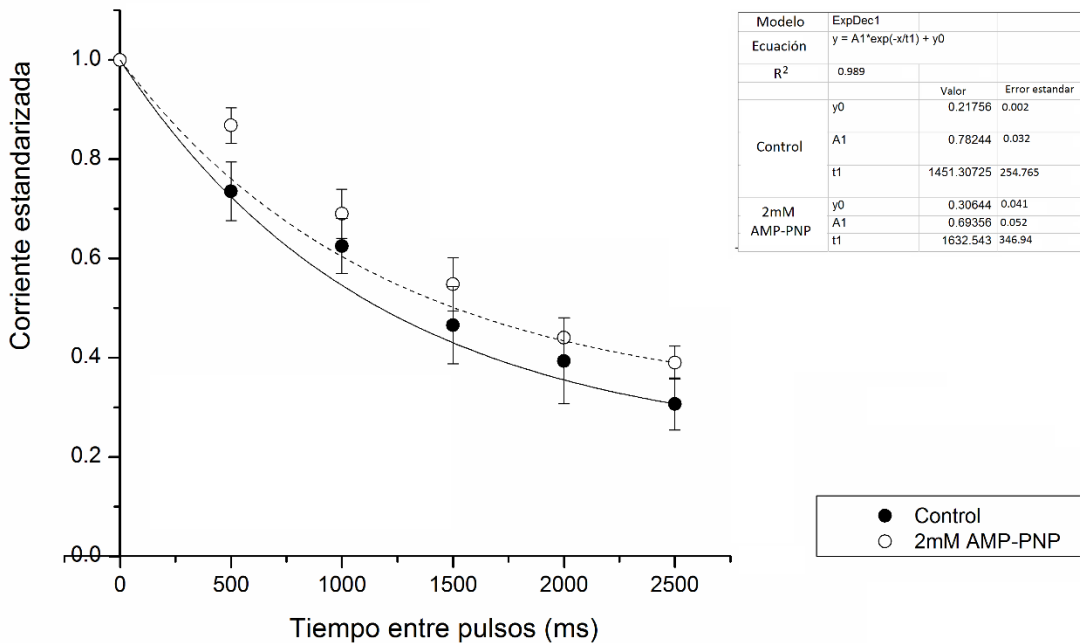
Figura 30. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 0,5mM de AMP-PNP. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas los promedios y su desviación estándar, además contiene los parámetros de los ajustes exponenciales.

Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP

En la figura 31 se muestra el efecto sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador, al agregar 2,0mM de AMP-PNP en la cámara experimental. Una vez más se obtiene que en presencia de AMP-PNP el desarrollo de tales corrientes se hace más lento en comparación con la condición control para el modo directo (T_d pasa de 4084,76 a 8869,62; incremento de 117%), mientras que no se observa efecto en el modo inverso, T_i pasa de 1451,30 a 1632,543 (12,48% de incremento). Presentando un efecto similar a lo obtenido con la concentración de 0,5mM.



(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP. Modo directo (n=5).

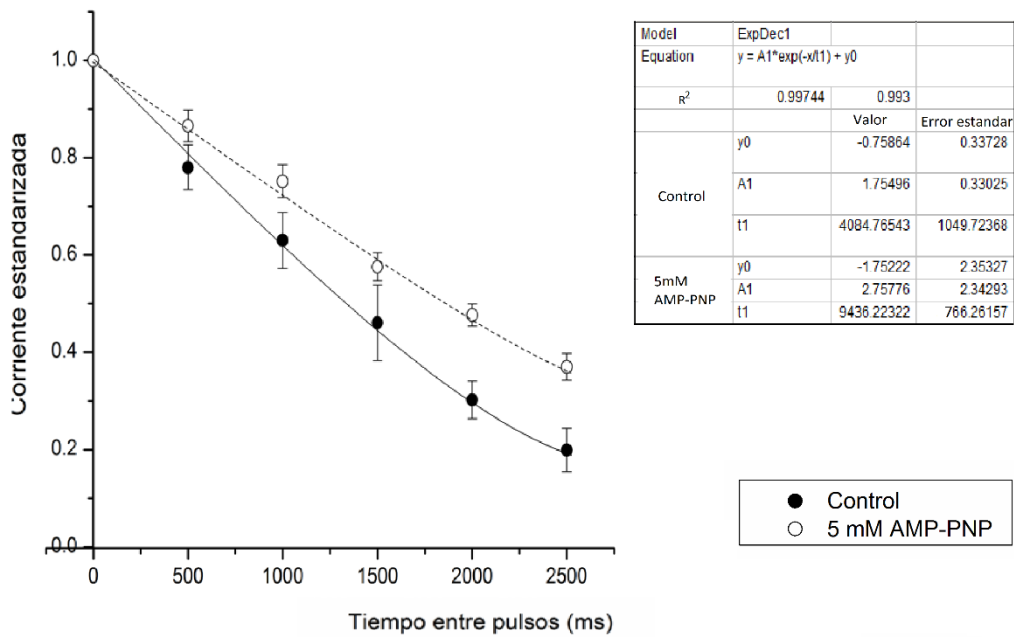


(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP. Modo inverso (n=5).

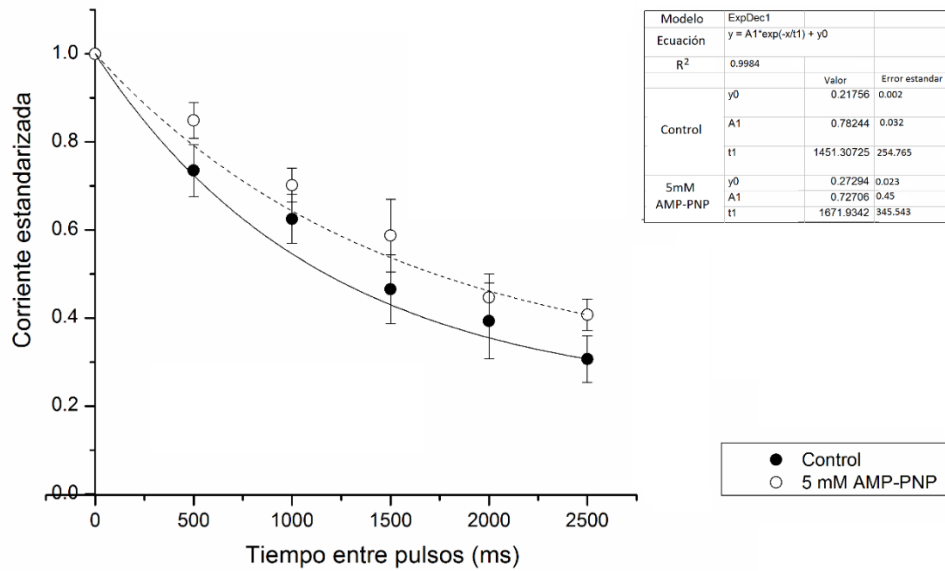
Figura 31. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 2,0mM de AMP-PNP. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas las barras de desviación estándar y los parámetros de los ajustes exponenciales.

Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP

La última prueba se hizo en presencia de 5,0mM de AMP-PNP en el baño (Figura 32). Igualmente se observa un efecto en el modo directo, donde la T_d aumenta de 4084,76 a 9436,22 (131% de aumento), mientras que en el modo inverso la T_i aumenta de 1451,30 a 1671,93 (15,20% de aumento), sin embargo esta última diferencia se encuentra dentro del error estándar del ajuste, por lo que nuevamente el efecto a esta concentración es similar a 0,5mM y 2,0mM.



(a) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP. Modo directo (n=4).



(b) Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP. Modo inverso (n=4).

Figura 32. Desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en presencia de 5,0mM de AMP-PNP. (a) modo directo. (b) modo inverso. Se muestran en ambas curvas las barras de desviación estándar y los parámetros de los ajustes exponenciales.

Finalmente, la Tabla 1 resume los valores del promedio del incremento de corriente obtenido para cada experimento de actividad total y permeabilidad. El valor promedio fue calculado a partir de los porcentajes de incremento de cada experimento para todos los potenciales, es decir por cada experimento se calculó el incremento respecto al control a cada potencial, y se promedió entre todos los experimentos de cada concentración, y a su vez se promedió entre todos los potenciales correspondientes al modo directo y al inverso, siendo esto lo mostrado. También se indican los datos resultante de actividad total menos permeabilidad, es decir, sobre la activación; además del aumento de las constantes de tiempo calculados a partir de los datos obtenidos durante esta investigación. En la tabla se observa que los valores de porcentaje de incremento sobre la actividad (primeras dos columnas) son en todos los casos mayores a los obtenidos en el proceso de permeación (tercera y cuarta columna). Esto se debe en que el efecto observado sobre la actividad total es en parte producto de efecto del AMP-PNP sobre la permeabilidad y en parte sobre la activación.

Tabla 1: Resumen de resultados obtenidos

[AMP- PNP] (mM)	Porcentaje de incremento promedio sobre la actividad del intercambiador		Porcentaje de incremento promedio sobre el proceso de permeación del intercambiador		Efecto sobre la activación del intercambiador		Aumento de la constante de tiempo para la desactivación del intercambiador	
	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso
0,5	52,68% +/- 2,456	41,25% +/- 3,865	33,53% +/- 3,506	26,09% +/- 2,104	19,15% +/- 2,945	15,16% +/- 1,505	108,75%	6,58%
1,0	51,33% +/- 2,132	45,12% +/- 1,055	30,05% +/- 3,406	17,23% +/- 2,4	21,28% +/- 2,358	27,89% +/- 1,987		
1,5	52,90% +/- 1,754	42,86% +/- 1,987	29,63% +/- 2,043	22,87% +/- 1,908	23,27% +/- 1,976	19,99% +/- 2,045		
2,0	170,10% +/- 9,956	139,36% +/- 8,056	134,78% +/- 10,954	87,92% +/- 4,9	35,32% +/- 3,30	51,44% +/- 4,294	117%	12,48%
5,0	174,71% +/- 12,103	138,06% +/- 10,076	139,22% +/- 7,14	81,10% +/- 8,234	35,49% +/- 2,011	56,96% +/- 3,965	131%	15,20%

La tabla 2 muestra el valor promedio para cada modo (directo e inverso) según la afinidad. Esto, en actividad total, permeabilidad y activación. El valor promedio fue calculado a partir de los porcentajes de incremento de cada experimento para todos los potenciales, es decir por cada experimento se calculó el incremento respecto al control a cada potencial, y se promedió entre todos los experimentos de cada concentración, y a su vez se promedió entre todos los potenciales correspondientes al modo directo y al inverso, teniendo en cuenta la zona de alta afinidad (alcanzada en 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM) y la de baja afinidad (alcanzada a 2,0mM y 5,0mM) por separado, siendo esto último lo mostrado en la tabla 2.

Tabla 2. Incremento promedio según la afinidad.

	Actividad Total		Efecto sobre Permeabilidad		Efecto sobre Activación	
	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso	Modo directo	Modo inverso
Alta afinidad	52,30	43,07	31,07	22,06	21,23	21,01
Baja afinidad	172,40	138,71	137	84,51	35,4	54,2

DISCUSIÓN

En LFMB-UCV se ha demostrado que el ATP ejerce un efecto complejo sobre los diversos procesos de la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} (Guerra et al. 2012), una vez establecido este hecho, y siendo que este es un intercambiador que se propone utiliza la energía de los gradientes iónico para el movimiento de los mismos, se planteó estudiar si este efecto del ATP, que en líneas generales aumenta la actividad del intercambiador, requiere de la unión de la molécula a los sitios de unión en el intercambiador, o también requiere de la hidrólisis del mismo, de esta manera se decidió usar el AMP-PNP, un análogo no hidrolizable del ATP que ha demostrado unirse de manera similar al ATP en muchos otros mecanismos (Melnick, y col 1975). Igualmente en el LFMB-UCV se propuso la existencia de dos sitios de unión para el ATP, uno de baja afinidad (con una K_m en el orden de los mM) y otro de alta afinidad (con una k_m en el orden de lo sub-micromolar). En este trabajo y con el uso del análogo no hidrolizable se quiso demostrar la existencia o no de dichos sitios con afinidades diferentes.

Se sabe que la actividad del intercambiador K^+/Ca^{+2} tiene una fase de activación del mecanismo y una fase en la que las corrientes desarrolladas dependen únicamente de la permeación del mismo. Con el fin de evaluar la actividad del intercambiador se aplicó el protocolo de corriente vs voltaje. Al ver la Figura 20 puede observarse que en presencia de AMP-PNP se incrementa la corriente del intercambiador en todas las concentraciones utilizadas. Teniendo en cuenta que la actividad total es la suma del efecto sobre la activación y permeabilidad, lo obtenido permite concluir que el análogo utilizado presenta un efecto sobre uno o varios de los mecanismos involucrados.

Se puede decir, que el AMP-PNP no afecta la forma de las curvas I/V , ya que mantienen sus características de comportamiento sigmoideo con el potencial de membrana independientemente de la concentración de AMP-PNP utilizada. Esto se ve al comparar las Figuras 18 y 19 en las que se muestra que la amplitud de las corrientes generadas por el intercambiador aumenta a medida que el potencial de membrana se aleja de 0mV, siendo siempre mayor en el modo directo de transporte que en el modo inverso.

En la figura 20 se observa que el efecto sobre la actividad total es igual para las concentraciones de 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM de AMP-PNP; y que a su vez, al comparar el efecto observado en las dos últimas concentraciones (2,0mM y 5,0mM) son idénticos; pero en todos los casos, diferente del control (puede observarse en las figuras 18 y19). Al graficar el porcentaje de incremento de la corriente estandarizada (porcentaje de la actividad total) vs las diversas concentraciones de AMP-PNP empleadas (figura 21), se obtiene que, el efecto del AMP-PNP sobre la actividad de intercambiador, presenta dos zonas de saturación. Una primera, alcanzada a 0,5mM de AMP-PNP y una segunda a 2mM de AMP-PNP. Dando evidencia de la existencia de dos sitios de unión del ATP o su respectivo análogo (AMP-PNP) en el intercambiador: uno de alta afinidad con una Km en el orden de los sub mM y otro de baja afinidad con una Km en el orden de las decenas de mM. En concordancia con lo reportado por Guerra en el 2012.

Esto es de primordial importancia, pues el hecho que tanto el ATP y su análogo se comporten de la misma manera da fuertes indicios de que efectivamente la existencia de estos sitios con afinidades diferentes, alta y baja, son una realidad en este mecanismo de transporte iónico. Más aun indica que estos dos sitios son de regulación y no tienen que ver con una posible actividad ATPásica del intercambiador. Esta conclusión permite inferir que este mecanismo es regulado por el estado energético de la célula, además regulado de una manera compleja, pues como se ha visto el efecto de esta señal celular es aumentar la actividad del intercambiador, es decir que esta regulación haría que este mecanismo este más activo en células con un alto estado energético, es decir, que entraría más calcio y la célula se hiperpolarizaría más, cuando la misma tenga más ATP libre; lo que es similar a las células jóvenes (Brewer GJ. 1974), sin embargo, en una célula vieja, para la cual se ha propuesto que niveles de ATP libre son menores (Bernstein RE. 1959). El mecanismo estaría regulado a la baja, es decir, entraría menos calcio y la hiperpolarización sería menor, por lo que, éste mecanismo de regulación estaría acelerando el proceso de envejecimiento en las células jóvenes y lo estaría enlenteciendo en las células viejas, así esta regulación estaría ayudando a mantener a los eritrocitos al final de su vida en un estado "estable", por lo que podríamos hablar de una especie de amortiguador molecular del mecanismo de envejecimiento.

En este trabajo se ha demostrado que el AMP-PNP de manera similar que el ATP, modifica la actividad del intercambiador, generando un incremento en las corrientes registradas. Sin embargo es importante dilucidar cuales son los mecanismos están siendo afectando, para ello se procede a evaluar tales mecanismos por separado.

Para estudiar el efecto del ATP-PNP sobre la permeabilidad y el proceso de activación y su dependencia con el potencial, en el intercambiador K^+/Ca^{2+} , se empleó el protocolo de corrientes instantáneas, con el cual se puede separar los efectos sobre estos dos mecanismos, pues con este protocolo al activar el mecanismo con el pulso activante siempre a un mismo valor (+160mV o -160mV) y luego midiendo las corrientes generadas justo al inicio del pulso de prueba, es decir, antes que se dé de manera importante el mecanismo de desactivación, las corrientes generadas a un potencial de prueba dado y el efecto que se pueda observar, serán debidas únicamente al mecanismo de permeación y al efecto que sobre él pueda ejercer el análogo. Luego de obtener este valor, por ejemplo del efecto que una dada concentración de AMP-PNP tenga sobre el mecanismo de permeación, este efecto se sustrae del efecto total, así se puede determinar cuál porcentaje del total es explicado por el efecto sobre la permeación y lo que no, se toma como efecto sobre la activación, como se presentó en la quinta y sexta columna de la tabla 1, para el modo directo y el inverso, respectivamente.

Al evaluar las variaciones en la permeabilidad iónica del intercambiador producto de su interacción con el AMP-PNP; se obtiene que el análogo incrementa la permeabilidad iónica del intercambiador. Además, se observa claramente que el efecto describe los mismos cambios ya comentados para el efecto sobre las corrientes totales, nuevamente se observa que entre las concentraciones de 0,5mM; 1,0mM y 1,5mM los efectos no tienen diferencia significativa y son mayores sobre el modo directo que sobre el modo inverso, y luego observa que los efectos de 2,0mM y 5,0mM son mayores que las otras concentraciones y no son diferente entre ellos, esto siendo interpretado nuevamente como la evidencia de la existencia de dos sitios de interacción uno de alta afinidad (K_m en el orden de sub-micromolar) y otro de baja afinidad en el orden de las decenas de mM. Interesantemente, del incremento promedio de las corrientes totales (112% para el modo directo, y 90,89%), todo el efecto correspondiente a corrientes instantáneas, en promedio, solo

explica el 84,03% para el modo directo y 53,28% para el inverso. Por lo tanto, el 28,31% para el modo directo y 37,60% para el inverso, se debe a un efecto del AMP-PNP sobre el proceso de activación y su dependencia de potencial. En la tabla 2 pueden verse los valores.

En la tabla 2 se presenta un interesante efecto, en el cual el sitio de alta afinidad afecta a la vía de permeación y al mecanismo de activación de una manera mucho más pareja 59,40% de permeación a 40,59% de activación en el modo directo; y 51,21% - 48,78% en el modo inverso, respectivamente. En comparación con el sitio de baja afinidad que afecta mucho más a la vía de permeación (79,46% en el modo directo y 60,92% en el inverso) que al mecanismo de activación (20,53% en el modo directo y 39,07% en el inverso). Además en cuanto a cómo afecta diferencialmente cada sitio, al modo inverso y al modo directo, se encuentra efectos diferentes; ya que para todos los demás procesos estudiados siempre el efecto sobre el modo inverso había sido menos que sobre el directo, sin embargo, en este caso no se pueden ver diferencias entre los dos modos. esto nuevamente apoya la existencia de dos sitios diferentes con afinidades distintas, pues el efecto de cada uno de ellos es diferente para el mismo proceso y además también es diferente cuando se compara entre todos los procesos que están siendo estudiados.

En la figura 28, se grafica la diferencia entre la corriente total y la permeabilidad, es decir, el efecto sobre la activación versus las distintas concentraciones empleadas, una vez más puede observarse la existencia de dos sitios de unión, con saturaciones distintas, concluyendo que la activación esta modulada por ambos sitios de unión. Por último, en este punto, hay que aclarar que aun cuando el tipo de dependencia con el potencial del mecanismo de activación no se ve afectado por ninguno de los sitios ni en ninguno de los modos, esto es, que existe una dependencia sigmoidea entre la activación y el potencial, si hay un efecto de los sitios, pues la dependencia de potencial se ve aumentada cuando ambos sitios se encuentra ocupados. Lo que quiere decir, que al mismo cambio de potencial, ahora el mecanismo se activa en un porcentaje mayor al compararlo con la condición control.

Finalmente se estudió el efecto que el AMP-PNP produce sobre el mecanismo de desactivación del intercambiador, para ello se aplicó el protocolo de desactivación. Encontrando que genera un aumento en el tiempo de desactivación del intercambiador en el modo directo. Este efecto

se alcanzó con 0,5mM AMP-PNP, y no aumento al incrementar la concentración, por lo que la K_i estaría en el orden de los sub μ M, esto implica que el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador en el modo directo es afectado únicamente por el sitio de interacción de alta afinidad. Al evaluar el efecto del AMP-PNP sobre la desactivación en el modo de inverso, no se observó ningún cambio en el tiempo de desactivación observado.

El efecto del AMP-PNP en el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador, no es igual en el modo directo y el inverso. En este caso en particular se observa que en el modo directo sí hay un efecto, mientras que en el modo inverso no hay, este resultado implica que el efecto es dependiente del sentido del modo de actividad, interesantemente en este proceso solo uno de los sitios es capaz de ejercer su efecto, y lo hace en uno solo de los modos, esto apunta a afianzar la idea de la existencia de dos sitios diferente.

Lo obtenido en este estudio concuerda con lo reportado por Guerra en el 2012. Guerra estudió el efecto del ATP sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{+2} . Con base en la similitud de los resultados obtenidos por Guerra y los mostrados en este estudio, utilizando un análogo de ATP no hidrolizable. Se puede concluir que ambos sitios de unión reportados para el ATP, no dependen de la hidrolisis de este. Lo que a su vez, permite inferir que dichos sitios no son sitios activos de la molécula sino sitios de regulación metabólica que censan la concentración de ATP.

Estudios como el de Blodow y col. (2016) han reportado que en algunas proteínas el ATP es necesario como ligando y no en dependencia de la hidrólisis. En el estudio realizado por Blodow y col. (2016) utilizan AMP-PNP con la finalidad de demostrar que el ATP en canales de K^+ sensibles a ATP en células de soporte coclear de cobayo (*Cavia porcellus*), es necesario como ligando y no como proveedor de energía proveniente de la hidrólisis. Llegando a tal conclusión dado que en ausencia de ATP y en presencia de AMP-PNP la conductancia del canal se ve igualmente disminuida.

CONCLUSIONES

- El AMP-PNP incrementa las corrientes del intercambiador.
- La permeabilidad del intercambiador incrementa en presencia de AMP-PNP.
- El AMP-PNP aumenta la sensibilidad al potencial del mecanismo de activación.
- Se reafirma la existencia de dos sitios de unión para el ATP del lado intracelular, uno de alta afinidad con una K_m en el orden de los sub mM y otro de baja afinidad con una K_m en el orden de las decenas de mM.
- Se propone que los dos sitios de unión del ATP son sitios reguladores.
- El AMP-PNP aumenta el tiempo de desactivación del intercambiador en el modo directo.
- El efecto sobre la desactivación es únicamente producido por el sitio de alta afinidad.

ABREVIATURA

- AMP-PNP: Adenilil Imidodifosfato
- GR: Globulo Rojo
- ME: Membrana del eritrocito
- PC: Fosfatidilcolina
- PE: Fosfatidiletanolamina
- SM: Esfingomielina
- PS: Fosfatidilserina
- VDAC: Canal Aniónico Voltaje Dependiente
- CFTR: Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística
- HEMKCA: Canal A de K⁺ Mecanosensible del Eritrocito Humano
- TRPC6: Transient Receptor Potential Cation Channel 6
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- LFMB-UVC: Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica de la Universidad Central de Venezuela
- T.U.G.O. Patch Clamp: The U-shape Giga Ohm Patch Clamp
- Imic: Corrientes mocroscópicas

BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, E., Sterling, K., Kim, R., Salikhova, A., Huffman, H., Crockett, M., Johnston, N., y col., 2001. Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, Vol. 27, No. 1, (Jan-Feb), pp. 165-180, ISSN 1079-9796.
2. Bathori, G., Csordas, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., Hajnoczky, G. 2006. Ca²⁺ dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, No. 25, (Jun 23), pp. 17347-17358, ISSN 0021-9258.
3. Bennekou, P. 1993. The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1147, No. 1, pp. 165-167, ISSN 0006-3002
4. Bernstein RE. 1959. Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of red cells. *J clin invest*; 38:1572.
5. Bevers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., Zwaal, R.F. [1999](#). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. Aug 18; [1439:317-30](#).
6. Blödow, A., & Begandt, D., Bader, A., Becker, A., y col. 2016. ATP-sensitive K⁺ channels (Kir6.1/SUR1) regulate gap junctional coupling in cochlear-supporting cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* DOI 10.1007/s00424-016-1815-8.
7. Bouyer, G., Cueff, A., Egee, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., Gallagher, P. G. y col., 2011a. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood*, Vol. 118, No. 8, (Aug 25), pp. 2305-2312, ISSN 0006-4971.
8. Bouyer, G., Thomas, S., Egee S. 2012. Patch-Clamp Analysis of Membrane Transport in Erythrocytes, *Patch Clamp Technique*, Prof. Fatima Shad Kaneez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0406-3, InTech.

9. Brewer GJ. 1974. General red cell metabolism. En Surgenor DM. The red blood cells. 2a ed. New York. Academic Press. 392.
10. Brini, M., Carafoli, E. 2009. Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rec.* 89: 1341-1378.
11. Brugnara, C., M. Canessa. 1986. Furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. Net uphill Na extrusion and equilibrium properties. 91-112, s.l. : *J Gen Physiol*, Vol. 87(1).
12. Brugnara, C., Tosteson, D.C., 1987. Inhibition of K⁺ transport by divalent cations in sickle erythrocytes. *Blood.* 70: 1810-1815.
13. Cahalan, SM., Lukacs, V., Ranade, SS., Chien, S., Bandell, M., Patapoutian, A. 2015. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *eLife* 4:e07370.
14. Canessa, M., Escobales N. 1986. Amiloride-sensitive Na⁺ transport in human red cells: evidence for a Na/H exchange system cell membrane. *Membrane Biology.* 90: 21-28. 103:61., s.l. : Ref. Phylol. Biochem. Farmacol
15. Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., Devaskar, S.U. 2009. Will the original glucose transport isoform please stand up! *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: E836_E848.
16. Christophersen, P., Bennekou, P. 1991. Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1065, No. 1, pp. 103-106, ISSN 0006-3002
17. [Cooper, R.A.](#), 1970. Lipids of human red cell membrane: normal composition and variability in disease. [Semin Hematol.](#) ;7(3):296-322.
18. Cordero, J. F., Romero, P. J., 2002. Caffeine activates a mechanosensitive Ca²⁺ channel in human red cells. *Cell Calcium*, Vol. 31, No. 5, pp. 189-200, ISSN 0143-4160.
19. Decherf G., Bouyer G., Egée S., Thomas SLY., 2007. Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis* 39(1):24-34.
20. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.T., Suresh, S. 2010. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bull* 35: 382_388.
21. Dunham, P., Ellory, J. and G. Stewart. 1980. Chloride-activated passive potassium transport in human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sc.* Vol. 77, Nº. 3, 1711-1715.

22. Duranton, C., Huber, S., Lang, F., 2002. Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *The Journal of Physiology*, Vol. 539, No. Pt 3, pp. 847-855, ISSN 0022-3751.
23. Egée, S., Lapaix F., Decherf, G., Staines, M., Ellory, J., Doerig, C., Thomas, S. 2002. A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol* 542(3):795_801.
24. Ellory, J., Hall, A. 1986. Effects of high hydrostatic pressure on “passive” monovalent cation transport in human red cells. *J. Membrane Biol.* 94: 1-17.
25. Foller, M., Kasinathan, R. S., Koka, S., Lang, C., Shumilina, E., Birnbaumer, L., Lang, F., y col. 2008b. TRPC6 contributes to the Ca²⁺ leak of human erythrocytes *Cellular Physiology and Biochemistry*, Vol. 21, No. 1-3, pp. 183-192, ISSN 1015-8987.
26. Forsyth, P.I. 2006. El intercambiador K⁺/Ca²⁺: Efectos del ion Na⁺ y caracterización cinética parcial. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
27. Funder, J. y Wieth JO. 1966a. Chloride and Hydrogen Ion Distribution between Human Red Cells and Plasma. *Acta Physiol Scand* 68(2):234-245.
28. Galué, D. 2008. El intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano: efecto del estrés oxidativo en uno o en ambos lados de la membrana. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
29. Gardos, G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 30, No. 3, (Dec), pp. 653-654, ISSN 0006-3002.
30. Glogowska, E., Dyrda, A., Cueff, A., Bouyer, G., Egee, S., Bennekou, P., Thomas, S. 2010. Anion conductance of the human red cell is carried by a maxi-anion channel. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, Vol. 44, No. 4, (Apr 15), pp. 243-251, ISSN 1079-9796
31. Guerra, A. 2012. Estudio del efecto del ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

32. Guillen, C. M., Brill, S., Payne, J. A., Forbush, B. 1996. Molecular cloning and functional expression of the K⁺-Cl⁻ cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem.* 271: 16237-44.
33. Guyton, A., Hall, J. 2001. *Tratado de fisiología medica.* Decima edición.
34. Halperin, J., Brugnara, C., Tosteson, M., Van Ha, T., Tosteson, D. C. (1989). Voltage activated cation transport in human erythrocytes. *The American Journal of Physiology*, Vol. 257, No. 5 Pt 1, (Nov), pp. C986-996, ISSN 0002-9513
35. Hamill, O. P. 1981. Potassium channel currents in human red blood cells. *The Journal of Physiology*, Vol. 319 (suppl), No. pp. 97P-98P, ISSN 0022-3751
36. Hass, M., Schooler, J., Tostenson, D.C. 1975. Coupling of lithium to sodium transport in human red cells., s.l. : *Nature*, Vol. 258 pag. 424 – 427.
37. Hoffman, R., Benz, E.J., Shatil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E., McGlave, P. 2000. *Hematology: Basic Principles and Practice 3rd Edition.* Phyladelphia, Pensylvania. : Churchill Livingstone.
38. Huber, S. M., Durantón, C., Henke, G., Van De Sand, C., Heussler, V., Shumilina, E., Sandu, C. y col. 2004. Plasmodium induces swelling-activated ClC-2 anion channels in the host erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 40, (Oct 1), pp. 41444-41452, ISSN 0021-9258.
39. Huber, S., Gamper, N., Lang, F. 2001. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 441, No. 4, pp. 551-558, ISSN 0031-6768.
40. Kaestner, L., Bernhardt, I. 2002. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry*, Vol. 55, No. 1-2, pp. 71-74, ISSN 1567-5394
41. Kaestner, L., Bollensdorff, C., Bernhardt, I. 1999. Non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1417, No. 1, pp. 9-15, ISSN 0006-3002

42. Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S. y col. 2006. "Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion," *The American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 290, no. 1, pp. C244–C253.
43. Kracke, G. R., Anatra, M. 1988. Asymmetry of Na-K-Cl cotransport in human erythrocytes. s.l. : *Am J Physiol*, Vol. 254(2 Pt 1) C243-50.
44. Kucherenko, YV., Mörsdorf, D., Lang, F. 2009. Acid-sensitive outwardly rectifyin anion channels in human erythrocytes. *J Membr Biol* 230(1):1_10.
45. Landi, D. 2015. Efecto del AMPc sobre el intercambiador K⁺/Ca²⁺ de la membrana del eritrocito humano. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
46. Lang, E., Lang, F. 2015. Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 513518, 16 pages.
47. Lang, E., Qadri, S.M., Lang, F. 2012. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 1236-1243.
48. Lang, F., Abed, M., Lang, E., Föller, M., 2014. "Oxidative stress and suicidal erythrocyte death," *Antioxidants&Redox Signaling*, vol. 21, no. 1, pp. 138–153.
49. Lang, K. S., Duranton, C., Poehlmann, H. y col. 2003. "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes," *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, no. 2, pp. 249–256.
50. 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. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol. 367, No. 4, pp. 391-396, ISSN 0028-1298.
51. Lutz, H. U., Stammler, P., Fasler, S., Ingold, M., Fehr, J. 1992. Density separation of human red blood cells on self forming Percoll gradients: correlation with cell age. *Biochim Biophys Acta* 11 16:1-10.
52. Lux, S. E., John, K. M., Kopito, R. R., Lodish, H. F. 1989. Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchanger protein (AE1). *Proc. Nati. Acad. Sci.* **86**: 9089-9093.
53. Maellaro, E., Leoncini, S., Moretti, D., Del Bello, B., Tanganelli, I., De Felice, C., Ciccoli, L. 2013. Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol* 50: 489-495.

54. Makhro A., Hänggi P., Goede JS., Wang J., Brüggemann A., Gassmann M., Schmugge M., y col., 2013. N-methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 305(11):C1123-C1138.
55. Matthes, E. 2005. Caracterización Parcial del Contratransporte K/Ca del Eritrocito Humano: Estequiometría y Efecto de Iones Mono y Divalentes. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
56. Melnick, R.L., Tavares De Suosa, J., Maguire, J. and Packer, L. 1975. Action of the adenosine triphosphate analog, adenylyl imidodiphosphate in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 139-144.
57. Mercer, R.T., Sweadner J., Benz, E. J. 1989. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 988:185-220
58. Mueckler, M. 1989. Structure and function of the Glucose Transporter. En: P. Agre, J.C. Parker (eds.), *Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical implications*, capítulo 2, págs. 31_45. Marcel Dekker, Inc., New York, primera edición.
59. Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., y col. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941_945.
60. Ortiz Flores, G., Acosta, A., Gomez, P., 1981. Imidodiphosphate- and ADP- Binding sites insoluble and articulate mitochondrial ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 679:466-473.
61. Paredes, M. 2012. Efecto del pH intracelular sobre la actividad del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela.
62. Passow, H. 1986. Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood. [Rev Physiol Biochem Pharmacol.](#) 103:61-203.
63. Pennell R. B. 1974. In "The Red Blood Cell" (D.M. Surgenor, ed.) 2nd ed., pp, 93-146. Academic Press, New York.
64. Pinet, C., Antoine, S., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., Coulombe, A. 2002. Reincorporated Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase can Mediate B-Type Ca²⁺ Channels Observed in Native Membrane of Human Red Blood Cells. *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 187, No. 3, pp. 185-201, ISSN 0022-2631.

65. Post, R. L., Jolly, P. C. 1957. The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*. 25:118-28.
66. Quintanar, M., Calderón, J. 2005. ERIPTOSIS, LA APOPTOSIS DEL ERITROCITO. Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Avenida IPN 2508, Zacatenco. A.P. 14-740.
67. Rifkind, R.A. 1966. Destruction of injured red cells in vivo. *Am. J. Med.* 41: 711_723.
68. 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. Postgrado en Biología Celular. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
69. Romero, P., E. Romero. 2004. Determinant factors for an apparent increase in oxygen affinity of senescent human erythrocytes. *Acta Científica Venezolana*. Vol. 55:83-85.
70. Romero, P. J., Romero, E. A. (2003). New vanadate-induced Ca²⁺ pathway in human red cells. *Cell Biology International*, Vol. 27, No. 11, pp. 903-912, ISSN 1065-6995
71. Romero, P. J., Romero, E. A. 1999. The Role of Calcium Metabolism in Human Red Blood. *Cell Ageing: A Proposal. Blood Cell, Molecules and Diseases IDEA*. Vol. 25 pag. 9-19.
72. Romero, P. J., Romero, E. A., 1997b. Differences in Ca²⁺ pumping activity between subpopulations of human red cells. *Cell calcium* 21:353-358.
73. Romero, P. J., Romero, E. A., Mateu, D., Hernandez, C., Fernandez, I. (2006). Voltage dependent calcium channels in young and old human red cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, Vol. 46, No. 3, pp. 265-276, ISSN 1085-9195.
74. Romero, P. J., Romero, E. A., Winkler, M. D. 1997a. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim Biophys Acta*. 1323: 23-8.
75. Sakharov, P.A., Sokolov, A.S., and Agalarov, S. Ch. 2014. Nonhydrolyzable ATP Analog 5'-Adenylyl Imidodiphosphate (AMP-PNP) Does Not Inhibit ATP-Dependent Scanning of Leader Sequence of mRNA. Original Russian Text © P. A. Sakharov, A. S. Sokolov, S. Ch. Agalarov, 2015, published in *Biokhimiya*, 2015, Vol. 80, No. 1, pp. 59-64.
76. Semplicini, A., Spalvins, A., Canessa, M. 1989. Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na⁺/H⁺ exchanger. *J Membr Biol*. 107: 219-228.

77. Shumilina, E., Huber, S. 2011. CIC-2 Channels in Erythrocytes. *The Open Biology Journal*, Vol. 4, No. pp. 18-26, ISSN 1874-1967.
78. Singer S.J., Nicolson G.L. 1972. The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.
79. Stark, G. 2005. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol.* 205: 1-16.
80. Stauffer, T. P., Guerini, D., Carafoli, E. 1995. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem.* 270:12184-90.
81. Strehler, E. E. y col. 2007. Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. s.l. : *Ann N Y Acad Sci*, 1099:226-36.
82. Takata, K., Hirano, H., Kasahara, M. 1997. Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int. Rev. Cytol.* 172: 1_53.
83. Van De Ven F.J., Mschrijen, J.J., De Pont, J.J.H.H.M., Bonting S.L. 1981. Studies on (K^{*} + H⁺) - ATPase III. Binding of Adenylyl Imidodiphosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 640 (1981) 487—499 © Elsevier/North-Holland Biomedical Press BBA 79075.
84. Yawata, Y. Shimoda, M., and Miyashima, K. 1984. Increased calcium uptake in the red cells of unsplenectomized patients with hereditary spherocytosis: significant contribution of reticulocytosis. *Clin. Chim. Acta* 142, 183-192.
85. Yount, R. G., Babcock, D., Ballantyne, W., Ojala D. 1971. Adenylyl Imidodiphosphate: an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage. *Biochemistry* 10:2484-2489.
86. Zenon, A. 1984. Mitochondrial adenosine triphosphatase from human placenta- effects of Adenylyl and Gunylyl Imidodiphosphate. *Int. Biochem* 17:229-234.