



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Estudio del Efecto del ATP-Mg sobre las Corrientes Del Intercambiador K^+/Ca^{2+} del Eritrocito Humano

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Almary Victoria Guerra Rodríguez como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutor: Dr. Jesús G. Romero M.

Caracas, Venezuela

Mayo - 2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme bendecido con una familia y por todas las grandiosas oportunidades y experiencias que me ha permitido vivir.

A mi tutor, el Dr. Jesús Romero, por permitirme trabajar en su laboratorio y por haberme brindado oportunidades que contribuyeron con mi formación profesional y personal. A mis jurados, Dr. Antonio Gutiérrez y Dr. Vincenza Cervino por guiarme y por sus sugerencias para que mi Trabajo Especial de Grado fuese exitoso. A la Universidad Central de Venezuela, mi segunda casa por estos años, en donde me formé como bióloga y a todos los profesores que fueron mis guías durante la carrera.

Quisiera agradecer a mis padres por la formación que me dieron, por apoyarme y alentarme en mi decisión de estudiar lejos de casa, porque durante toda mi vida me han apoyado y me han acompañado en mis buenos y no tan buenos momentos, son una parte fundamental en mi vida y se los debo todo a ustedes. A mi tía, Dra. Haydeé Guerra, por abrirme las puertas de su hogar y ser para mí una segunda madre, por sus consejos, su ayuda y su compañía en todo momento. A mi hermana Janeth, por ser mi compañía, mi amiga y consejera aún estando lejos.

A mi equipo de laboratorio, en especial a Willy y a Alejandro por todo su apoyo. Y por último a mis amigos, a los que han estado desde un principio de la carrera: Lucía Serna y a su mamá, Ricardo López y a su familia, Joana Núñez y Michael Ellner ¡Jamás terminaré de agradecerles por su amistad incondicional! A los que llegaron a la mitad de la carrera pero cuya amistad es igual de valiosa para mí: Armando Gutiérrez, Marianny Pernía, Elizabeth de Mendonca, Ana Victoria Ibarra, María de los Ángeles Mayor, Luisana Carballo, Lenin Márquez, Alejandra Guevara y en especial: Daniel Landi cuyo apoyo en los últimos meses ha sido invaluable. Gracias a todos por su ayuda y por todos los momentos inolvidables que he vivido junto a ustedes durante estos años de carrera.

RESUMEN

El eritrocito humano presenta una vida media de 120 días y al ser una célula anucleada, no puede entrar en un proceso de apoptosis clásica. Poco se conoce acerca del proceso de senescencia de los eritrocitos humanos, sin embargo es aceptado que la $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta con la edad de estas células, por lo que se ha planteado que la entrada de este ión asociada al paso por el lecho capilar, estaría relacionado con dicho proceso. En nuestro laboratorio se ha propuesto una hipótesis que explica este proceso, la hipótesis del K^+ , la cual se fundamenta en dos mecanismos: el canal de K^+ dependiente de presión (HEMKCA) y el intercambiador K^+/Ca^{2+} . Ambos mecanismos han sido evidenciados en nuestro laboratorio usando la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp (The U-Shape Giga Ohm Patch Clamp), en la que se busca simular los fenómenos mecánicos a los cuales está sometido el eritrocito en la microcirculación. La activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} presenta una dependencia sigmoidea con el voltaje, una estequiometría de 12:1 y una secuencia de permeabilidad: $K^+ > Rb^+ \gg Cs^+ > Ca^{2+} > Ba^{2+} > Mg^{2+}$.

El complejo ATP-Mg es capaz de regular la actividad de distintos mecanismos transportadores, bien sea uniéndose a ellos de forma directa o fosforilándolos por medio de proteínas kinasas, de esta forma se afecta el transporte de iones a través de la membrana y sus concentraciones intracelulares. La morfología de la membrana plasmática puede ser afectada por el ATP intracelular, induciendo cambios en las propiedades de ésta y en las proteínas que se encuentran en la membrana.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la variación de la concentración interna de ATP-Mg²⁺ sobre la actividad del intercambiador K^+/Ca^{2+} : permeabilidad, activación y el desarrollo temporal de la desactivación. Para esto se emplearon soluciones con una concentración de ATP que varió desde 0 a 4mM, en pasos de 0,5mM. Se empleó la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp.

Se encontró que las corrientes del intercambiador aumentan en presencia de ATP-Mg²⁺ de forma dosis-dependiente, presentando un efecto más acentuado en el modo de entrada de K^+ . No hubo saturación del intercambiador en presencia de 4mM ATP-Mg²⁺. La permeabilidad del intercambiador aumenta en presencia de ATP-Mg²⁺ desde un 48% hasta un 200% en el modo de entrada de K^+ (efecto dosis dependiente), mientras que en el modo de salida de K^+ la permeabilidad aumenta en un 36%. Por otro lado, se observó que el ATP-Mg²⁺ aumenta el tiempo de desactivación del intercambiador en un 20% en el modo de salida de K^+ . Estos resultados sugieren la existencia de dos sitios de unión del ATP-Mg²⁺, uno con una baja afinidad que afecta la activación del mismo y su permeabilidad y otro con una alta afinidad que afecta únicamente la permeabilidad, lo que implica que la activación y la permeabilidad son procesos que se encuentran en dominios distintos del mismo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
El Eritrocito Humano	1
Algunos mecanismos transportadores en la membrana del eritrocito humano	2
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.....	3
Contr transporte K ⁺ /Cl ⁻	3
Ca ²⁺ -ATPasa.....	4
Canal de K ⁺ activado por Ca ²⁺ (canal Gárdos).....	5
Banda 3	5
Intercambiador Na ⁺ /H ⁺	6
ATP en el Eritrocito	6
ATP y la morfología del eritrocito.....	8
Compartimentalización de ATP.....	9
Senescencia del Eritrocito	10
ANTECEDENTES.....	13
Corrientes del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺ en la Membrana del Eritrocito Humano	13
Efecto del Estrés Oxidativo sobre las Corrientes del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	16
Corrientes Instantáneas del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	18
Desarrollo Temporal de la Desactivación de las Corrientes del Intercambiador K ⁺ /Ca ²⁺	19
Mecanismos de Regulación de Canales y Transportadores por ATP	20
Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺	20
Transportador de Glucosa.....	21
Banda 3	22
Ca ²⁺ -ATPasa (PMCA).....	23
OBJETIVOS	25
Objetivo General:	25

Objetivos Específicos:.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material Biológico	26
Soluciones Experimentales.....	26
Medidas Electrofisiológicas	27
El T.U.G.O. Patch Clamp (The U-Shape Giga Ohm Patch Clamp).....	27
La forma de la pipeta:.....	27
Cantidad de membrana aislada:	28
Elaboración de las Pipetas	28
Visualización de las Células	29
Formación del Sello	29
Protocolo para Agregar ATP a la Cámara	30
Protocolos de Estimulación	30
Protocolo de Sustracción de Fuga.....	31
Protocolo I vs. V	32
Protocolo de Corrientes Instantáneas (INST)	33
Protocolo DEAC	34
Adquisición de los Datos.....	35
Análisis de los Datos	35
Análisis Estadístico	35
RESULTADOS.....	37
Efecto de la concentración ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	38
Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	38
Efecto de 1mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	40
Efecto de 1,5mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	43
Efecto de 2mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	45
Efecto de 4mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	47

Efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	51
Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	52
Efecto de 1mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	54
Efecto de 1,5mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	56
Efecto de 2mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	58
Efecto del ATP-Mg ²⁺ sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	61
Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	63
Efecto de 1mM ATP-Mg sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	64
Efecto de 1,5mM ATP-Mg sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	65
Efecto del ATP-Mg ²⁺ sobre el Desarrollo Temporal de la Desactivación del Intercambiador K^+/Ca^{2+} ..	67
Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre el Desarrollo Temporal de la Desactivación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	69
Efecto de 1mM ATP-Mg sobre el Desarrollo Temporal de la Desactivación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	73
DISCUSIÓN	78
Efecto de la concentración del ATP-Mg sobre las corrientes totales del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	78
Efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	79
Efecto del ATP-Mg ²⁺ sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}	81
Efecto del ATP-Mg ²⁺ sobre el Desarrollo Temporal de la Desactivación del Intercambiador K^+/Ca^{2+} ..	82
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	87

INTRODUCCIÓN

El Eritrocito Humano

El eritrocito es una célula carente de núcleo y organelos, altamente especializada en el transporte de O_2 en el cuerpo; posee una forma bicóncava que ocupa un volumen de $87\mu m^3$, un diámetro de $8\mu m$ y un grosor de $2,4\mu m$ en el anillo externo y de $1\mu m$ en el centro. El eritrocito cuenta con una alta concentración de hemoglobina, la cual representa alrededor del 98% de la masa proteica del eritrocito, esta proteína se une al oxígeno que ingresa a la célula y que será transportado desde los pulmones hasta los tejidos (Sperelakis, 2001).

Cada segundo se producen cerca de 2×10^6 eritrocitos (Agre y Parker, 1989), los cuales presentan un tiempo de vida de 120 días y se ha propuesto que luego de este período la proteína banda 3, que se encuentra en la membrana de los eritrocitos, se une a anticuerpos IgG y son reconocidos por macrófagos, los cuales inician la eritrofagocitosis que conlleva el reciclaje de los componentes de los eritrocitos (Sperelakis, 2001).

El potencial de membrana del eritrocito es aproximadamente $-11mV$, el cual es muy cercano al potencial de equilibrio del Cl^- , debido a que la permeabilidad a este anión es 100 veces mayor que para el resto de los cationes (Sperelakis, 2001). Las concentraciones intracelulares y extracelulares de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- , se encuentran especificadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de los iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Mg^{2+} en los eritrocitos humanos (Sperelakis, 2001. Arnaud, 2008).

	Intracelular (mM)	Extracelular (mM)	V equilibrio (mV)
$[K^+]$	135	3,7	-92,99
$[Na^+]$	17	138	54,14
$[Cl^-]$	77	116	-10,59
$[Mg^{2+}]$	0,22	0,855	70,17
$[Ca^{2+}]$	10-30 nM	1,8	58,17

Algunos mecanismos transportadores en la membrana del eritrocito humano

En las membranas de las células existen diferentes mecanismos que regulan las concentraciones de los iones en el interior celular. Dentro de estos mecanismos se encuentran las bombas dependientes de energía como la Ca^{2+} ATPasa, la cual regula la $[\text{Ca}^{2+}]$ interna y la Na^+/K^+ ATPasa que regula la concentración K^+ y Na^+ intracelular. También se encuentran los transportadores acoplados a gradientes como el cotransportador K^+/Cl^- y la banda 3 que intervienen en la regulación del potencial de membrana y el volumen celular, así como el intercambiador Na^+/H^+ que es importante en el mantenimiento del pH intracelular junto con la banda 3. El intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, el cual es objeto de estudio en este trabajo también es conducido por el gradiente electroquímico del Ca^{2+} y el K^+ . Por último, encontramos a los canales como el Gárdos, el cual es permeable a K^+ y participa en la regulación de volumen celular y el canal HEMKCA, un canal dependiente de presión y modulado por Ca^{2+} .

A continuación se describen brevemente algunos mecanismos transportadores que se encuentran en la membrana de los eritrocitos (Fig. 1).

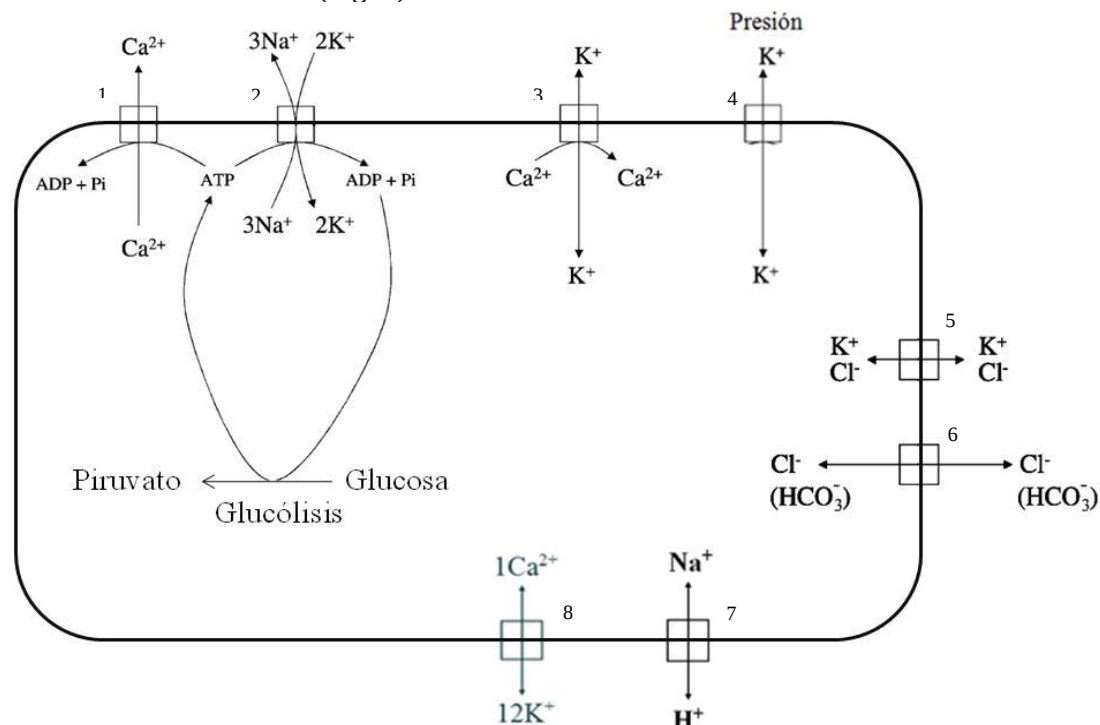


Figura 1. Principales mecanismos transportadores en la membrana del eritrocito humano. (1) Ca^{2+} ATPasa, (2) Na^+/K^+ ATPasa, (3) Canal Gárdos, (4) HEMKCA, (5) Cotransporte K^+/Cl^- , (6) Banda 3, (7) Intercambiador Na^+/H^+ , (8) Intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Modificado de Maher y Kuchel, 2003).

Na⁺/K⁺ ATPasa

La Na⁺/K⁺ ATPasa es una proteína integral de membrana que se encuentra en todas las células del cuerpo humano, esta bomba es la responsable del mantenimiento de la concentración intracelular de Na⁺ y de K⁺ (Lingrel y Kuntzweiler, 1994). Esta proteína hidroliza una molécula de adenosín trifosfato (ATP) al transportar 3 Na⁺ hacia el exterior y 2 K⁺ hacia el interior celular, ambos iones en contra de sus gradientes electroquímicos (Post y Jolly, 1957; Garrahan y Glynn, 1967).

La bomba Na⁺/K⁺, está compuesta por dos subunidades, α y β . La subunidad α , siendo la de mayor tamaño con 1016 aminoácidos y 113KDa, presenta 8 segmentos transmembrana y posee el sitio de fosforilación por ATP, el cual está ubicado en el lado intracelular; la subunidad α es la responsable de la translocación de los iones Na⁺ y K⁺ a través de la membrana (Shull y col, 1985). La subunidad β está constituida por 302 aminoácidos y un solo segmento transmembrana y su función es aún desconocida (Shull y col., 1986).

La Na⁺/K⁺ ATPasa, es inhibida por el vanadato, el cual en concentraciones nanomolares y en presencia de Mg²⁺ (40nM de vanadato y 28mM Mg²⁺) es capaz de unirse al sitio de fosforilación de la Na⁺-K⁺ ATPasa, ya que el vanadato es un análogo del ATP (Cantley y col., 1977). Mientras que la ouabaína actúa desde el lado extracelular uniéndose a la subunidad α (Shull y col., 1985). Por otro lado, la oligomicina es un inhibidor que actúa parcialmente desde el exterior celular disminuyendo la tasa de intercambio más no inhibiendo a la bomba por completo (Esmann y Skou, 1985)

Contransporte K⁺/Cl⁻

En 1986, Hall y Ellory (Hall y Ellory, 1986) estudiaron el efecto de altas presiones hidrostáticas sobre el flujo pasivo de los iones K⁺, Rb⁺, Na⁺, Cs⁺ (insensibles a EGTA, ouabaina y bumetanida) a través de la membrana de los eritrocitos humanos, tomando en cuenta las alteraciones en el volumen celular

producto de las diferentes osmolaridades de las soluciones usadas. Observaron que las altas presiones hidrostáticas aplicadas sobre las células aumentan la permeabilidad de cationes y que además se estimulaba una vía de transporte de KCl, la cual era dependiente de Cl^- ; el movimiento de KCl aumentaba con el volumen celular y mostraba saturación a una alta concentración de K^+ extracelular. Los citados autores proponen que los cambios en el volumen celular causados por las altas presiones hidrostáticas están asociados al transporte de KCl, el cual es dependiente del volumen celular.

Estudios posteriores demostraron que el cotransportador KCl presenta una masa de aproximadamente 150KDa, con 12 segmentos transmembrana y un sitio de glicosilación ubicado en el compartimiento extracelular, los extremos C y N terminal se encuentran ubicados en el lado intracelular, es inhibido por furosemida con una K_i de aproximadamente $40\mu\text{M}$ (Gillen y col., 1996) y por cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} (Brugnara y Tosteson, 1987).

Ca^{2+} -ATPasa

En el eritrocito, la Ca^{2+} -ATPasa es el único mecanismo de expulsión de Ca^{2+} , por lo que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en estas células. La PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase), hidroliza ATP al transportar Ca^{2+} al exterior celular, en contra de su gradiente electroquímico. En los eritrocitos, existen dos isoformas de la PMCA, la PMCA1 y PMCA4, en donde la última es la más abundante, posee una masa molecular de aproximadamente 135 KDa (Stauffer y col., 1995).

Este mecanismo de transporte posee una alta afinidad por el Ca^{2+} y se ha determinado que en óptimas condiciones la K_d de la PMCA activada va de 0,2 a $0,5\mu\text{M}$, siendo la estequiometría del transporte 1:1 $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ (Brini y Carafoli, 2009). La PMCA es activada por la calmodulina y es inhibida por La^{3+} y por vanadato el cual es capaz de inhibir la PMCA con un $\text{K}_{1/2} \sim 3\mu\text{M}$ (Tiffert y Lew, 2001).

Canal de K⁺ activado por Ca²⁺ (canal Gárdos)

El canal Gárdos es un tetrámero, cuya masa molecular es de alrededor de 190 KDa y pertenece a la familia de los canales K⁺ activados por Ca²⁺ de conductancia intermedia. Cada monómero que lo conforma, posee 6 segmentos transmembrana y la región del poro está constituida por los dominios S5 y S6 (Doyle y col., 1998).

Entre los inhibidores del Gárdos se encuentra el antimicótico clotrimazol que con un IC₅₀ de 24,8nM es capaz de inhibir el canal al unirse a él, induciendo un cambio estructural, lo que impide el flujo de K⁺ a través del canal (Brugnara y col., 1993). Otro inhibidor muy conocido del canal Gárdos es el ión tetraetilamonio (TEA), el cual bloquea el poro impidiendo el paso del K⁺ (Armstrong y Bezanilla, 1972).

En estudios utilizando fantasmas de eritrocitos, se ha reportado que el ATP podría fosforilar este canal, ocasionando su cierre y es posible que la fosforilación de la membrana plasmática afecte la actividad del canal. Además, al evaluar el efecto del AMPc sobre el canal, los resultados permiten inferir que el AMPc activa una fosfatasa por medio de una proteína kinasa. La fosfatasa puede afectar el nivel de fosforilación del canal, ocasionando su cierre (Romero y col., 1990).

Banda 3

La glicoproteína Banda 3 es la proteína más abundante en la membrana de los eritrocitos y es la encargada de intercambiar una molécula de bicarbonato por un Cl⁻; esta molécula de bicarbonato proviene del CO₂ producto de la respiración celular que difunde hacia el interior del eritrocito. La anhidrasa carbónica, convierte el CO₂ en H₂CO₃ (ácido carbónico). El ácido carbónico se disocia en HCO₃⁻ + H⁺, este protón se asocia con la hemoglobina y, a su vez, ésta disminuye su afinidad por el O₂ (Efecto Bohr). El HCO₃⁻ (bicarbonato) que se encuentra en el interior celular es luego transportado por la Banda 3, también conocida como Capnoforina o *Anion Exchanger 1* (AE1) (Sperelakis, 2001). El AE1 posee una

masa molecular de 101.791Da y está dividido en tres regiones: una región hidrofílica ubicada en el lado intracelular que interactúa con varias proteínas (como la ankirina, la proteína 4.1 y 4.2); un dominio transmembrana, el cual conforma el intercambiador aniónico y atraviesa la membrana 14 veces, y el extremo C-terminal, cuya función es desconocida (Lux y col., 1989). La banda 3, además de mediar el transporte de CO_2 , tiene un rol importante en la regulación del pH en el eritrocito al expulsar el bicarbonato presente y también en el mantenimiento de la forma del eritrocito, por medio de interacciones con el citoesqueleto (Peters y col., 1996).

La banda 3 es inhibida por 4,4'-diisotiocyano-2,2'-ácido disulfónico estilbeno (DIDS), 4,4'-dinrostilbeno-2,2'-disulfonato (DNDS) y el fenilglioxal (PG), los cuales bloquean el sitio de unión del Cl^- (Falke y Chan, 1986).

Intercambiador Na^+/H^+

El intercambiador Na^+/H^+ está involucrado en el mantenimiento del pH intracelular, transportando Na^+ hacia el interior celular por protones hacia el exterior celular (Escobales y Canessa, 1986), con una estequiometría de 1:1 (Semplicini y col., 1989). El intercambiador es sensible a amilorida, e insensible a la bumetanida y a inhibidores de la bomba Na^+/K^+ como la ouabaína (Escobales y Canessa, 1986). El Li^+ también puede inhibir el intercambiador de forma dosis dependiente (Weinman y Chamras, 1996).

ATP en el Eritrocito

El ATP es una molécula conformada por una adenina unida a una ribosa que a su vez está enlazada a tres fosfatos, está presente en todas las células y es importante en numerosos procesos intracelulares, entre los cuales están los procesos de transporte, metabolismo, entre otros (Nelson y Cox, 2005).

Dependiendo de la reacción que catalice, el ATP puede donar grupos fosforilos, pirofosforilos o adenililo. Las reacciones con ATP generalmente son en dos pasos, en el primero el ATP interactúa con una molécula de sustrato o con un residuo aminoacídico de una enzima. Como consecuencia de esto, en el segundo paso se genera como producto el ADP + P_i o AMP + PP_i. En general, las reacciones de adenililación (ATP → AMP + 2P_i) son las que impulsan las reacciones metabólicas especialmente desfavorables, ya que su ΔG°' es de aproximadamente -65 KJ/mol.

El ATP intracelular está asociado al Mg²⁺ intracelular en un complejo denominado ATP-Mg y en las reacciones enzimáticas en las que interviene el ATP, el verdadero sustrato es el Mg-ATP (Fig. 2) (Nelson y Cox, 2005). El Mg²⁺ neutraliza parcialmente las cargas negativas del ATP, esto reduce las interacciones no específicas entre los fosfatos conforman el ATP y las enzimas que lo usan como sustrato. Por otro lado, las interacciones entre el Mg²⁺ y los oxígenos que se encuentran en los grupos fosfatos del ATP lo mantienen en conformaciones que permiten su unión a las proteínas (Berg y col., 2002).

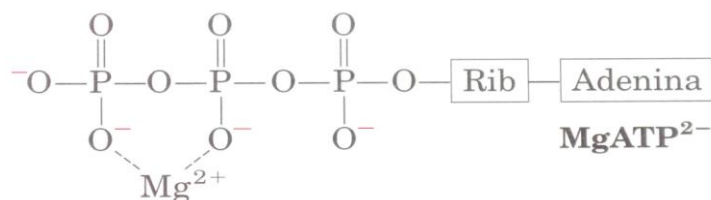


Figura 2. Complejo ATP-Mg²⁺. Tomado de Nelson y Cox, 2005

En 1992, Romero y Rojas observaron que en presencia de ATP-Mg, el canal de K⁺ dependiente de Ca²⁺ con una conductancia típica de 25pS, podía presentar conductancias de 50 y 75pS y luego de un período de tiempo sólo se podía observar una conductancia de 75pS. Esta regulación en la conductancia del canal la atribuyeron a la fosforilación mediada por quinasa del canal; en otras palabras, actividad del canal de K⁺ dependiente de Ca²⁺ puede ser regulada por la fosforilación del mismo (Romero y Rojas, 1992).

ATP y la morfología del eritrocito

Park y col. en 2010 (Park y col., 2010) estudiaron el efecto del ATP sobre la morfología de los glóbulos rojos humanos y encontraron que al eliminar el ATP de los eritrocitos, éstos perdían su forma bicóncava y adoptaban una forma de equinocitos (forma crenada) y al reintroducir el ATP en las células, éstas recuperaban su forma bicóncava (Fig. 3 A-D).

La membrana plasmática es fluida y oscila dependiendo de las interacciones entre ésta y el citoesqueleto, estas oscilaciones son dependientes de ATP y son importantes en el mantenimiento de la forma bicóncava de los eritrocitos; Park y colaboradores observaron que al agotar el ATP en los eritrocitos, las oscilaciones en la membrana disminuyen y que al reintroducir ATP, las vibraciones vuelven a sus niveles normales (Fig. 3 E-H).

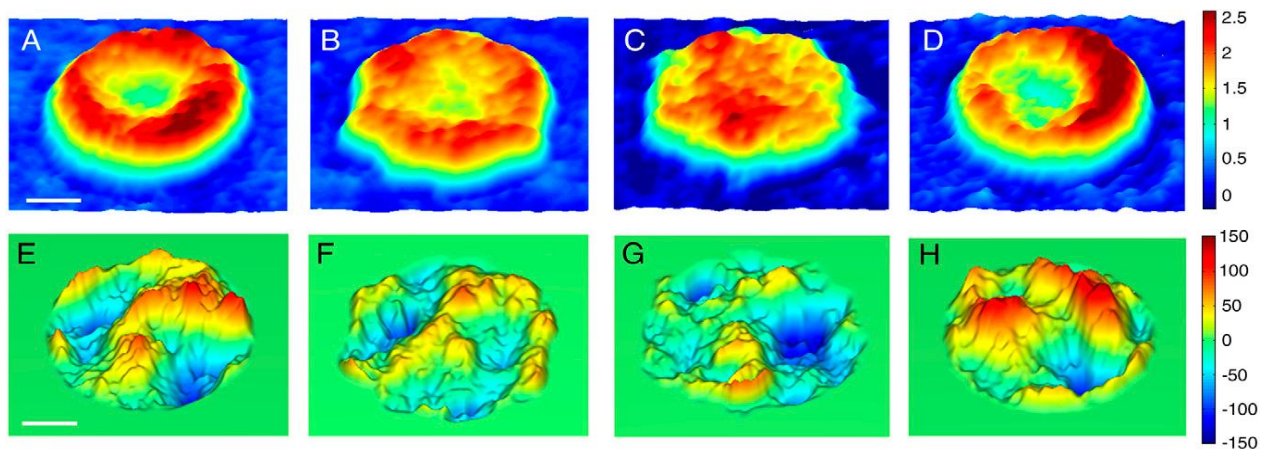


Figura 3. Efecto del ATP en la morfología del eritrocito. Reconstrucción de eritrocitos con microscopía de difracción de fase. (A) Eritrocito sin tratar, (B) Sin ATP (irreversible), (C) Sin ATP (reversible), (D) Célula con niveles recuperados de ATP. (E-H) vibraciones en la membrana de GR que corresponden con la figuras A hasta D. Escalas en μm y nm respectivamente. Tomado de Park y col, 2010.

El origen de las oscilaciones en la membrana de los GR puede explicarse por la fosforilación de proteínas del citoesqueleto y de la membrana (Park y col., 2010). El fosfatidil inositol (PI) al ser fosforilado (PIP_2) se une a la glicoforina (GP es una proteína integral de membrana cuya función principal es el anclaje de la membrana al citoesqueleto) aumentando su afinidad por la proteína 4.1 (la cual se

encuentra unida a la actina). La separación de la GP de la banda 4.1 conlleva la disociación de la membrana del citoesqueleto, lo que genera oscilaciones en la membrana (Fig. 4 A). La banda 4.1 puede ser fosforilada, lo que ocasiona una disminución de su afinidad por la GP y la actina, liberando la membrana del citoesqueleto (Fig. 4 B). De esta forma, la membrana se une y se separa del citoesqueleto de forma repetitiva, causando una oscilación en ese punto de la membrana.

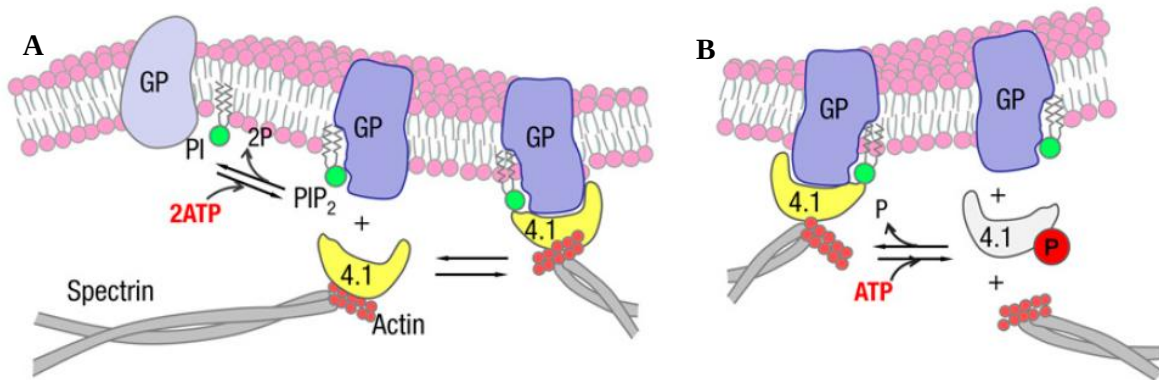


Figura 4. Modelos que explican las vibraciones en la membrana dependientes de ATP. (A) fosforilación del PI. (B) Fosforilación de la banda 4.1. Tomado de Park y col, 2010.

Compartimentalización de ATP

El ATP se encuentra en concentraciones de alrededor de 2mM en el citosol y disminuye con la edad del eritrocito. Sin embargo, se ha planteado la existencia de una forma de almacenamiento de ATP en la membrana de eritrocitos humanos; estos compartimientos de ATP pueden contener cerca de 500 moléculas de ATP, las cuales suplen directamente a la bomba Na^+/K^+ y a la bomba de Ca^{2+} . Se propone la existencia de un compartimiento de ATP por cada bomba Na^+/K^+ (Proverbio, 1988). Las enzimas glicolíticas Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la fosfoglicerato quinasa (PGK) que se encuentran inmersas en la membrana de los eritrocitos, sintetizan el ATP contenido en los compartimientos (Mercer y Dunham, 1981) (Fig. 5).

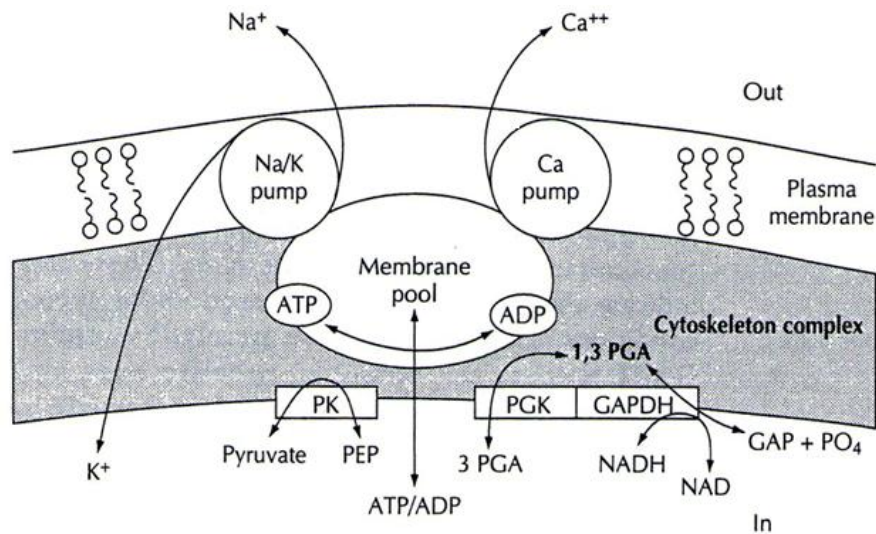


Figura 5. Modelo de una piscina de ATP en la membrana de un eritrocito. Tomado de Hoffman, 1997.

El ATP no sólo es usado por los transportadores para bombear iones en contra de su gradiente electroquímico, sino que puede servir como modulador de otros canales, al igual que otros nucleótidos como el AMPc.

Los eritrocitos, al pasar por los capilares están sometidos una deformación, el estrés mecánico debido a esta deformación activa una vía de salida de ATP (Sprague y col., 1998). El ATP liberado al exterior celular activa el receptor purinérgico P_{2y} que se encuentra en el tejido endotelial vascular, lo que conlleva la liberación de óxido nítrico (NO) (Motte y col., 1993), a liberación del NO genera vasodilatación lo que disminuye la resistencia vascular y la deformación de los eritrocitos por lo que la liberación de ATP cesa.

Senescencia del Eritrocito

El eritrocito humano al carecer de núcleo y organelos es incapaz de ir a un proceso de apoptosis clásica, por lo que no está claro qué mecanismos determinan que su vida media sea de 120 días. Se ha

determinado que la concentración de Ca^{2+} intracelular en eritrocitos aumenta con la edad de éstos, por lo que se podría asociar a su proceso de senescencia (Daugas, Candé y Kroemer, 2001).

Se ha planteado una hipótesis que explica el disparo de los procesos de envejecimiento de los eritrocitos humanos (Romero y col., 1997), ésta se fundamenta en que la concentración de Ca^{2+} aumenta gradualmente con la edad de la célula, por lo que dicho aumento debería pasar de gradual a abrupto alrededor del día 120, lo que llevaría a la célula a su muerte. Se propone que el canal Gárdos se activaría con el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , el cual sería consecuencia de la activación de una permeabilidad a Ca^{2+} que se propone es dependiente del estrés sobre la membrana a nivel de la microcirculación, lo que generaría la salida de K^+ de la célula y por consiguiente la pérdida de Cl^- . La salida de esta sal impulsaría la salida de agua, por lo que la célula se hará más densa. La salida de K^+ a su vez, generaría una hiperpolarización, lo que incrementaría la entrada de Ca^{2+} (Daugas y col., 2001).

En nuestro laboratorio se propone la hipótesis del K^+ que, en contraste con la hipótesis clásica, se basa en dos mecanismos, el canal de K^+ activado por presión (HEMKCA) y el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, el cual es activado por voltaje. Ambos mecanismos se han podido observar con la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp (The U-Shape Giga Ohm Patch Clamp), diseñada en nuestro laboratorio con la finalidad de simular los fenómenos mecánicos a los que está sometido el eritrocito durante su paso por el capilar. La hipótesis del K^+ propone que la célula durante su paso por el capilar sanguíneo, está sometida a un gran estrés mecánico lo cual activa el HEMKCA, lo que aumenta la permeabilidad del K^+ . Esto, a su vez, hiperpolariza la membrana por lo que el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ se activa y permite la entrada de Ca^{2+} al eritrocito. Así, estos dos mecanismos generan la salida del ión K y en conjunto con ésta, la salida de agua, generando que las células se hagan más densas. Al salir del capilar sanguíneo, los mecanismos que se encuentran en la membrana del eritrocito vuelven a su estado inicial. Cada vez que la célula ingresa a un capilar, la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta, ésto conlleva la activación de las calpaínas, las cuales disminuirán la actividad de las Ca^{2+} ATPasas y por tanto la capacidad de bombear Ca^{2+} hacia el exterior celular. Debido a que estos efectos son acumulativos llegará un punto en el que la capacidad de

extraer el Ca^{2+} intracelular es muy baja y las vías de salida de K^{+} no se desactivarán (como el Gárdos y el HEMCKA, debido a que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es alta), por lo que la membrana continuará hiperpolarizada, incrementando el influjo de Ca^{2+} y la célula entrará en el proceso de muerte y de retiro de la circulación (Romero, 2004).

ANTECEDENTES

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

Las primeras evidencias de la existencia de un intercambiador K^+/Ca^{2+} , se dieron a conocer con la utilización de la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp. Con esta técnica se pudieron registrar corrientes de muy baja conductancia que probablemente no se habían identificado con anterioridad, pues por su baja conductancia se encontrarían enmascaradas por las corrientes macroscópicas previamente registradas en la configuración *whole-cell*. Estas corrientes fueron denominadas corrientes microscópicas (I_{mic}), ya que no eran del tipo de canal unitario y eran de mucho menor amplitud que las macroscópicas ya mencionadas; igualmente se reportó que no se comportaban de manera óhmica y presentaban mayor amplitud en un sentido de potencial que en el opuesto (Romero, 2004).

En la Figura 6 se representan las corrientes típicas del intercambiador, desarrolladas en una solución simétrica. La corriente es negativa (o entrante, es decir, entran cargas positivas a la célula) a potenciales de membrana negativos, presentando un aumento pronunciado al inicio del pulso cuadrado de voltaje y luego una estabilización de la corriente, mientras que a voltajes positivos presenta una corriente saliente (o corriente positiva, salen cargas positivas de la célula), con una pendiente positiva pronunciada al inicio, manteniéndose luego en un valor constante. En la Figura 7, se presenta una curva típica de las corrientes del intercambiador vs. el potencial de membrana, en donde se puede observar su dependencia de potencial para el desarrollo de las corrientes, las cuales adoptan una forma sigmoideal respecto a éste; también es posible apreciar que la corriente presenta mayor amplitud a potenciales negativos que a potenciales positivos.

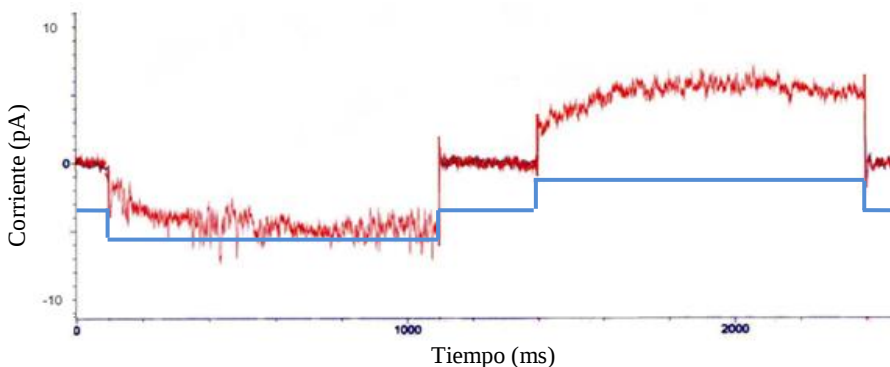


Figura 6. Corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+} . Línea azul (-) pulsos de 1 segundo a -160mV y a +160mV. Trazos rojos (-) corrientes del intercambiador (Romero, 2004).

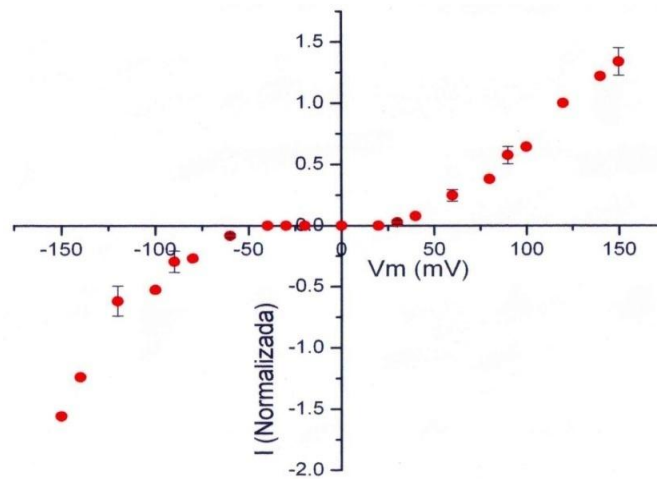


Figura 7. Relación de Corriente normalizada vs Potencial de membrana (Romero, 2004).

Romero, en 2004, observó que al implantar un gradiente de Ba^{2+} hacia el exterior celular, las corrientes generadas, tanto a potenciales positivos como negativos, fueron entrantes (Fig. 8). Estos resultados no podían ser explicados por canales iónicos que permitieran el paso de Ba^{2+} ya que, debido al gradiente químico para este ión, la corriente resultante debería ser saliente. Ya que el Ca^{2+} sería el ión transportado en condiciones normales y para explicar la aparente contradicción entre el sentido de las corrientes y el gradiente electroquímico generado, se propuso un mecanismo electrogénico de cotransporte de Ca^{2+} con Cl^- , o un contratransporte de Ca^{2+} por algún catión monovalente (K^+ o Na^+). Este co/contratransportador fue llamado CaXT1 (Romero, 2004).

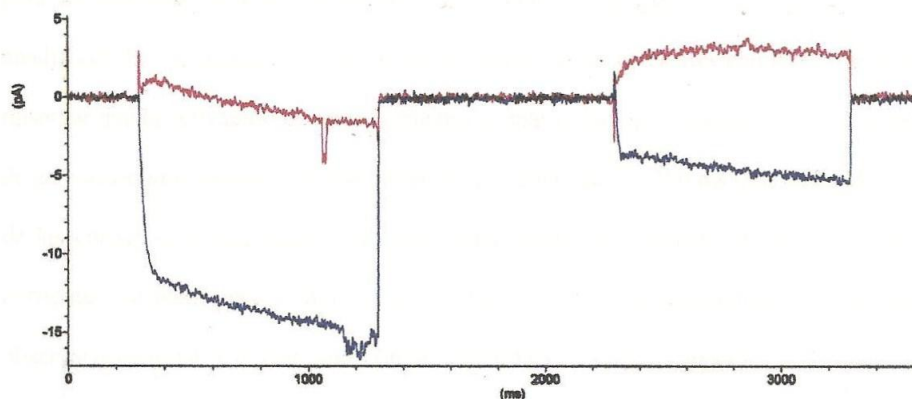


Figura 8. Efecto de la adición de Ba^{2+} sobre las corrientes del intercambiador. El trazo en rojo es la condición control y el trazo en azul 2 minutos después de la adición de Ba^{2+} . Pulsos de 1 segundo a $\pm 100\text{mV}$ (Romero, 2004).

En experimentos en donde se implantó un gradiente de Ca^{2+} hacia el exterior celular, se generó un comportamiento muy similar al observado con la adición de Ba^{2+} a la solución intracelular, es decir, todas las corrientes fueron negativas a todos los potenciales de membrana implantados, lo que implicaba que las corrientes siempre eran contrarias al gradiente de Ca^{2+} y ésto a su vez indicaba que el CaXT1 en efecto se podría comportar como un contratransportador de Ca^{2+} en condiciones fisiológicas del eritrocito.

Hasta este punto se tenía conocimiento de que el CaXT1 transportaba Ca^{2+} con algún otro ión, pero no se conocía si era el Cl^- , el Na^+ o el K^+ (los cuales eran los iones presentes en las soluciones usadas), por lo que el siguiente experimento consistió en eliminar los cationes monovalentes de la solución experimental (el Na^+ y el K^+), sustituyéndolos por el catión monovalente N-metil D-glucamina (NMDG), implantando así un gradiente de estas especies hacia el interior celular. Las corrientes registradas en estos experimentos fueron entrantes a potenciales positivos y negativos (efecto similar al obtenido al agregar Ba^{2+} a la solución experimental, es decir en el interior celular), lo que demostraba que alguno de estos dos iones era transportado por el CaXT1.

Al sustituir sólo el K^+ en la solución intracelular por NDMG (dejando en la solución como único catión monovalente al Na^+), se generó un gradiente sólo para el K^+ hacia el interior celular; de esta forma se obtuvieron de nuevo corrientes entrantes, similares a las descritas anteriormente. No obstante al realizar este mismo experimento pero sustituyendo el Na^+ en vez del K^+ , no se obtuvo este efecto, obteniéndose corrientes muy similares a las registradas en condiciones simétricas. Así, se pudo concluir que el CaXT1 contratransporta 1 Ca^{2+} por mínimo 3 K^+ , y se nombró como el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. En la figura 9 se propone un modelo de funcionamiento del intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, el cual movería mínimo 3 K^+ hacia el exterior por 1 Ca^{2+} hacia el interior a potenciales positivos; y mínimo 3 K^+ hacia el interior por 1 Ca^{2+} hacia el exterior a potenciales negativos.

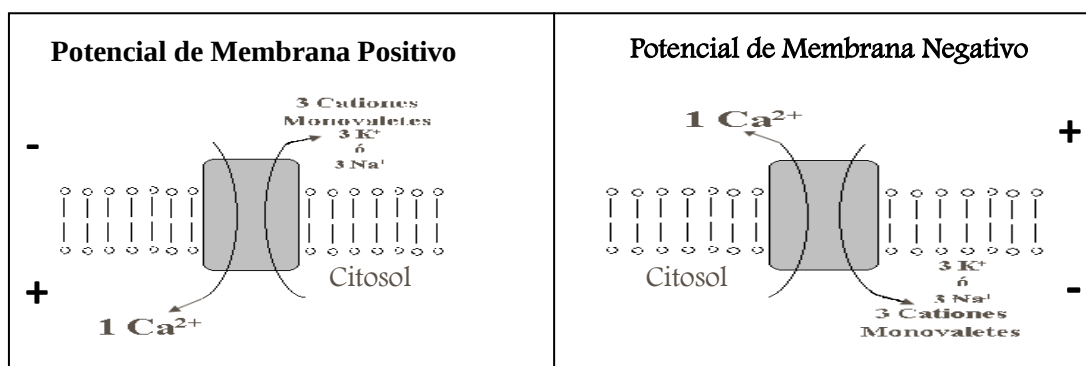


Figura 9. Modelo del CaXT1 y el movimiento de las cargas de acuerdo al signo del potencial establecido en el baño (Modificado de Forsyth, 2008).

En 2005, Matthes presentó resultados que indican que la estequiometría del intercambiador K^+/Ca^{2+} es de 12:1. De igual modo determinó una secuencia de permeabilidad para iones monovalentes de $K^+ > Rb^+ \gg Cs^+$; y para cationes divalentes de $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Mg^{2+}$ (Matthes, 2005). Posteriormente, Forsyth en 2006, evaluó el efecto del Na^+ sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} y encontró que el Na^+ no es transportado por el intercambiador (Forsyth, 2006).

Efecto del Estrés Oxidativo sobre las Corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Los agentes oxidantes pueden tener diversos efectos sobre las células y se ha demostrado que en los eritrocitos la peroxidación lipídica es capaz de cambiar las propiedades de la membrana, haciéndola más rígida y en consecuencia disminuyendo su capacidad de deformación. Asimismo puede alterar la permeabilidad de la membrana plasmática (Stark, 2005). Por estas razones, en 2008, Galué estudió el efecto del estrés oxidativo sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} , para ésto, usó 2 agentes oxidantes: el Ter-Butil Hidroperóxido (t-BPH), el cual es capaz de pasar a través de la membrana plasmática y oxidar ambos lados de la membrana y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual sólo oxida el lado en donde es aplicado. En este estudio se determinó que al someter a la membrana al estrés oxidativo con cualquiera de los dos compuestos nombrados, las corrientes desarrolladas por el intercambiador se ven disminuidas respecto a la condición control, siendo este efecto dependiente de la concentración del agente

utilizado (Fig. 10) (Galué, 2008). Sin embargo, el mayor efecto sobre la corriente fue observado al oxidar ambos lados de la membrana a potenciales de membrana negativos, lo que implica que la oxidación influye mayormente en el modo de entrada de K^+ a la célula (corrientes negativas).

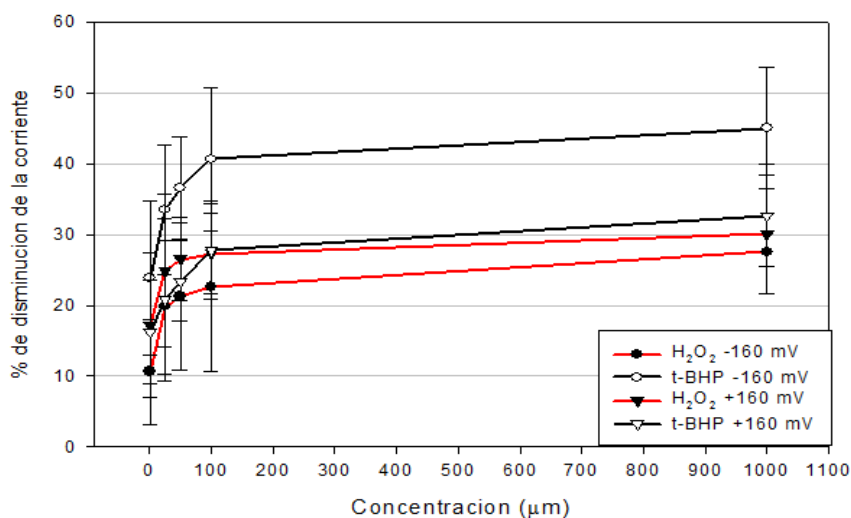


Figura 10. Porcentaje de disminución de la corriente vs. Concentración del agente oxidante. En negro, porcentajes de disminución de las corrientes obtenidas después de exponer el patch de membrana a t-BHP. En rojo, porcentajes de disminución de las corrientes obtenidas después de exponer el patch de membrana a H_2O_2 . Los triángulos representan los valores obtenidos a potenciales de +160 mV, mientras que los círculos los potenciales de -160mV (Galué, 2008).

En cuanto al efecto de oxidar ambos lados de la membrana y el efecto de oxidar solo en el lado intracelular de la membrana, sobre la permeabilidad del intercambiador, se observó que la permeabilidad del intercambiador se ve disminuida bajo ambas condiciones de estrés oxidativo. No obstante, al evaluar el efecto del estrés oxidativo sobre el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador, no se encontraron diferencias significativas con el control (Galué, 2008).

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

Dentro de los estudios realizados por Forsyth (Forsyth, 2006) para caracterizar el intercambiador K^+/Ca^{2+} , se encuentra el registro de las corrientes instantáneas, las cuales permiten la observación de las corrientes del intercambiador que dependen sólo de su permeabilidad. Estas corrientes instantáneas se obtienen al aplicar un pulso activante justo antes del pulso de prueba, eliminando así la fase de activación del intercambiador, la cual es dependiente de potencial. Las corrientes instantáneas difieren significativamente de las corrientes obtenidas en los protocolos IV ya que poseen un comportamiento óhmico (Fig. 11). El comportamiento sigmoide observado en las curvas I vs. V, se debe a que el mecanismo de activación del intercambiador es dependiente del potencial de membrana. Con el uso del protocolo de corrientes instantáneas es posible realizar diversos estudios que permiten estudiar el efecto de diversas variables sobre la permeación del intercambiador. La pendiente de las rectas representan la conductancia del intercambiador.

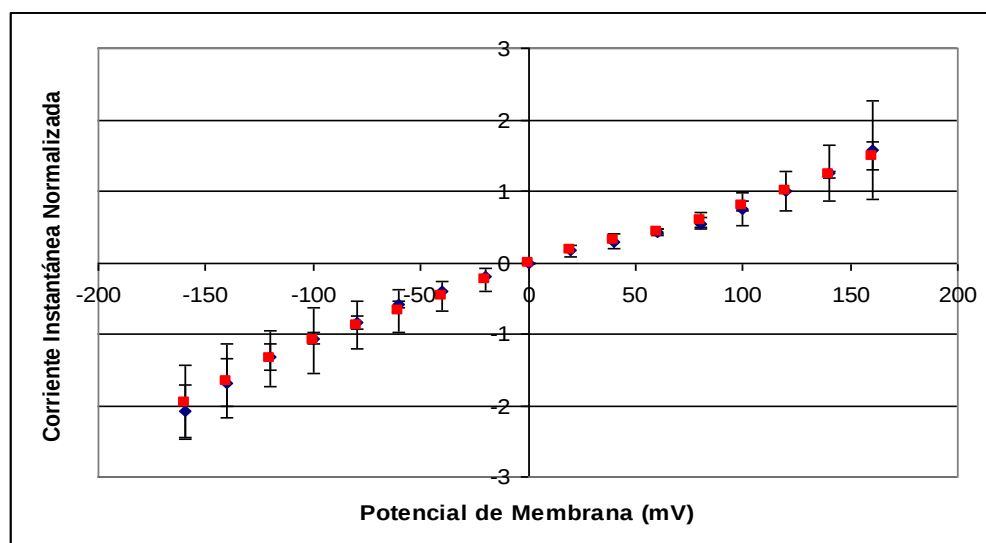


Figura 11. Relación Corriente Instantánea Normalizada vs. Potencial de membrana. En rojo los valores de corriente instantánea obtenidos con el protocolo K1 con pulso activante de +160mV. En azul los valores de corriente instantánea obtenidos con el protocolo K1 con pulso activante de -160mV. Todos los datos fueron normalizados al valor de corriente instantánea obtenido a +120mV de cada experimento (Forsyth, 2006).

Desarrollo Temporal de la Desactivación de las Corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

En otros estudios, realizados también por Forsyth, se estudia la cinética de la desactivación de las corrientes del intercambiador. El protocolo utilizado consistió en aplicar dos pulsos iguales (de +160mV o de -160mV) pero aumentando el tiempo entre ellos, así es posible cuantificar cuánta corriente se pierde en el tiempo que transcurre hasta que se aplica el segundo pulso.

Forsyth, encontró que las corrientes del intercambiador decaen en forma exponencial. Se determinó que el tiempo que debe transcurrir para que disminuya el 33% de corriente que se registra inicialmente (D_{33}) es distinto para los dos modos de movimiento de K^+ ; siendo el D_{33} igual aproximadamente 507ms para la desactivación del intercambiador en el modo de salida de K^+ (potenciales positivos) y de 810mseg para el modo de entrada de K^+ (potencial de membrana negativo). Esto implica que la desactivación de la corriente a potenciales negativos es más lenta que a potenciales positivos (Fig. 12) (Forsyth, 2006).

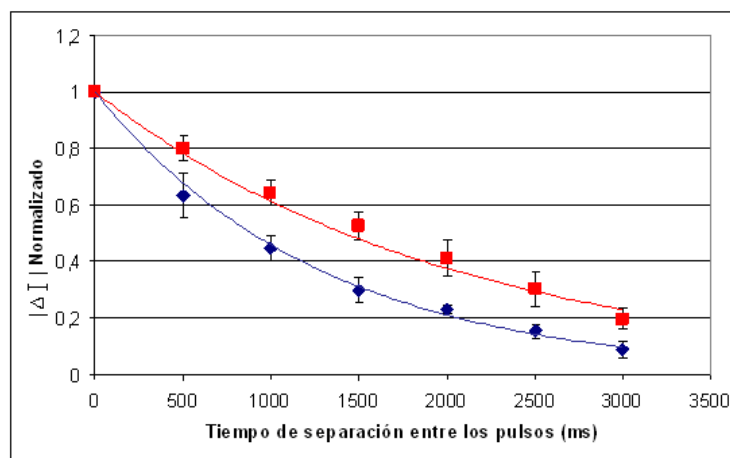


Figura 12. Relación $|\Delta I|$ Normalizado vs. Tiempo de separación entre los pulsos. $|\Delta I| = I_2 - I_1$, donde I_1 es el valor de la corriente medido en el instante en que fue aplicado el pulso activante e I_2 el valor de corriente instantánea registrado en el instante en que se suministró el pulso de prueba. Corrientes obtenidas de experimentos en condición simétrica. Potenciales positivos (azul) y a potenciales negativos (rojo). Los puntos son los promedios de ocho experimentos diferentes. La línea de ajuste, representa la tendencia de los datos (Forsyth, 2006).

Mecanismos de Regulación de Canales y Transportadores por ATP

El ATP es capaz de modular la actividad de una gran cantidad de canales iónicos y transportadores por varias vías: podemos identificar formas de modulación directa, entre las cuales el ATP se une a un segmento de la proteína, cambiando su afinidad por el sustrato, como es el caso del transportador de glucosa (GLUT1). El ATP también modula la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de forma indirecta, regulando la interacción del intercambiador con los fosfolípidos en la membrana. Algunos transportadores pueden ser regulados por proteínas kinasas dependientes de ATP, entre estos mecanismos transportadores se encuentran la Banda 3. A continuación se describe con más detalles las vías de regulación de algunos transportadores por el ATP.

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Este intercambiador se encuentra en la membrana de diversos tipos celulares y está involucrado en el proceso de relajación del músculo cardíaco, en el acoplamiento excitación-contracción, entre otros. La estequiometría de este intercambiador es de 3:1 (Blaustein y Hodgkin, 1969).

En 1992, Collins y colaboradores (Collins, Somlyo y Hilgemann, 1992), estudiaron el efecto del ATP-Mg sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en parches de membrana y determinaron que el ATP aumenta la actividad de este intercambiador con una K_d de aproximadamente 3mM; también observaron que este efecto es dependiente de la hidrólisis del ATP.

En estudios posteriores (Hilgemann y Ball, 1996. Yaradanakul y col., 2007) se demostró que el fosfolípido fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP2) interactúa con el loop intracelular del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aumentando su afinidad por el Na^+ extracelular y el Ca^{2+} intracelular. El PIP2, es sintetizado a partir del fosfatidil inositol (PI) por la PI 4-Kinasa, la cual es dependiente de ATP-Mg (Fig. 13). Esto implica que la síntesis de PIP2 requiere ATP-Mg y por ende el ATP regula de forma indirecta la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

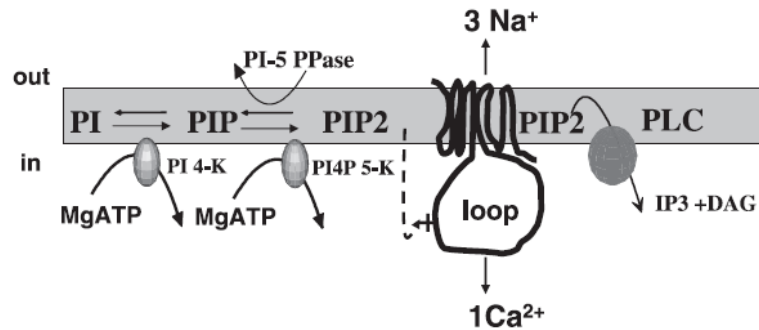


Figura 13. Regulación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de células cardíacas por PIP2.

Tomado de DiPolo y Beaugé, 2006.

Transportador de Glucosa

La difusión de glucosa hacia el interior celular es mediado por la familia de transportadores de glucosa en una gran variedad de células como los eritrocitos, las células del tejido endotelial, adiposo y cardíaco (Joost y col., 2002).

El transportador de glucosa de los eritrocitos (GLUT1) al formar un complejo con el ATP, reduce su capacidad de transporte y aumenta su afinidad por la glucosa. Este transportador posee un sitio de unión al ATP en el lado citoplasmático y el ADP y AMP actúan como inhibidores competitivos del ATP; no obstante, la regulación del GLUT1 no requiere la hidrólisis del ATP (Carruthers y Helgerson, 1989). Se ha determinado que sólo el complejo tetramérico del GLUT1 es capaz de ser regulado por el ATP (Levine y col., 1998).

Blodgett y col. (Blodgett y col., 2007) proponen que el segmento C terminal, ubicado en el lado intracelular y el loop intracelular que une a los segmentos transmembrana 6-7, sufren un cambio conformacional al unirse al ATP, bloqueando el paso de glucosa hacia el interior celular (Fig. 14). Esto traería como consecuencia que en altas concentraciones de ATP, el influjo de glucosa sea reducido, por lo que los niveles de ATP intracelulares bajarían, hasta el punto en que los transportadores de glucosa se disocien del ATP y permitan el paso de glucosa hacia la célula.

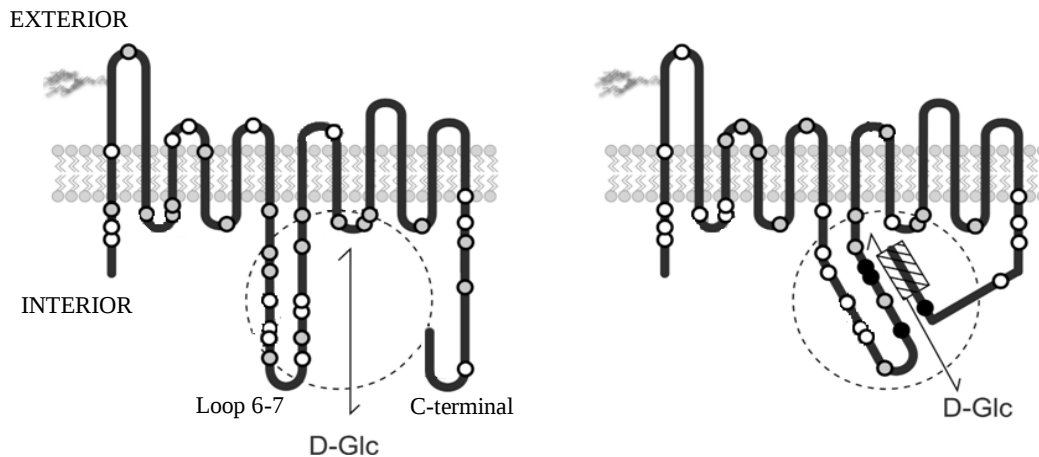


Figura 14. Modelo de la regulación del GLUT1 por ATP. Izquierda: GLUT1 en su conformación abierta. Derecha: cambio conformacional del GLUT1 debido a la unión del ATP, bloqueo del poro por la interacción entre la región C-terminal y el loop intracelular 6-7. Tomado y modificado de Blodgett y col., 2007.

Banda 3

El intercambiador aniónico, una de las proteínas más abundantes en la membrana de los eritrocitos posee un dominio intracelular que interactúa con diversas proteínas que se encuentran del lado citoplasmático (Lux y col., 1989). Se ha reportado que este lado citoplasmático de la banda 3 es fosforilado en el residuo 8 de tirosina por una tirosin-kinasa asociada a la membrana plasmática (Dekowski, Rybicki, Drickamer, 1983). También se han encontrado evidencias de que la banda 3 es fosforilada en el dominio citoplasmático, en los residuos de serina y treonina por la casein-kinasa (Tao, Conway, Cheta, 1980.).

No se ha registrado un cambio en la actividad catalítica de la banda 3 a causa de la fosforilación del dominio citoplasmático, sin embargo se conoce que este dominio de la banda 3 interactúa con diversas proteínas intracelulares. La fosforilación de este dominio previene la unión de las proteínas citoplasmáticas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), aldolasa, fosfofructokinasa y hemoglobina a la banda 3 (Low y col., 1987). Las proteínas glicolíticas antes mencionadas, se encuentran inactivas al estar unidas a la banda 3 cuando ésta no está fosforilada, por lo que la consecuencia fisiológica

de la fosforilación de la banda 3 sería la activación de las enzimas glucolíticas al separarse de ésta y un aumento en la tasa de glucólisis en el eritrocito (Harrison y col., 1991).

Ca²⁺-ATPasa (PMCA)

La bomba de Ca²⁺ encargada de mantener las bajas concentraciones de calcio dentro de la célula posee un sitio de regulación por ATP con una afinidad muy baja y que no requiere Mg²⁺ (Richards y col. 1978). Las curvas de actividad de la PMCA frente a varias concentraciones de ATP poseen un comportamiento bifásico que corresponde a dos curvas del tipo Michaelis-Menten (Fig. 15); la primera curva posee un Km de aproximadamente 2,8μM y se propone que corresponde al sitio catalítico de la PMCA, mientras que la segunda curva posee una Km de aproximadamente 111μM y se atribuye al sitio de regulación por parte del ATP. La activación de la PMCA por ATP es independiente de los fosfolípidos que componen la membrana (Filomatori y Rega, 2003).

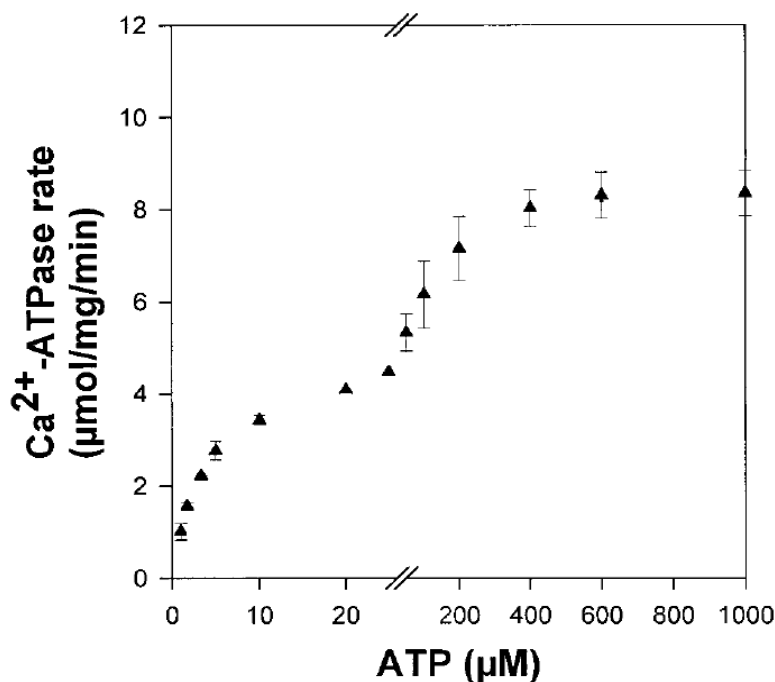


Figura 15. Actividad de la Ca²⁺-ATPasa contra diferentes concentraciones de ATP. Los experimentos se realizaron a 25°C. Tomado de Filomatori y Rega, 2003.

Como se ha visto hasta ahora, el ATP es una molécula que participa en diferentes procesos en las células, entre los cuales se pueden mencionar diversas formas de regulación de la actividad de los mecanismos transportadores en la membrana plasmática como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la Banda 3, la Ca^{2+} -ATPasa. También se ha hecho una breve descripción el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, del cual se conoce muy poco acerca de su estructura y funcionamiento.

Con base en lo anterior, sobre la regulación por ATP de la actividad de mecanismos transportadores ubicados en la membrana plasmática, nos hemos propuesto caracterizar de forma parcial el efecto del ATP sobre el intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana del eritrocito humano, usando la técnica del Patch Clamp en su modalidad T.U.G.O. Patch Clamp, desarrollada en nuestro laboratorio.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Caracterizar el efecto de ATP-Mg²⁺ sobre la actividad del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano.

Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto de la concentración interna de ATP-Mg²⁺ sobre la actividad del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano.
- Estudiar el efecto del ATP-Mg²⁺ sobre la permeabilidad del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano.
- Evaluar el efecto del ATP-Mg²⁺ sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K⁺/Ca²⁺ del eritrocito humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Para la determinación del efecto del ATP-Mg²⁺ sobre las corrientes del intercambiador K⁺/Ca²⁺ se utilizaron glóbulos rojos tomados de donantes, obtenidos por punción epidérmica. Con una micropipeta con 5μL de la solución normal (descrita en la siguiente sección) previamente filtrada, se tomó 1μL de muestra, directamente sobre la piel y se colocó en la cámara experimental, la cual contenía la misma solución experimental.

Soluciones Experimentales

Se usó inicialmente la solución normal en la cámara experimental y en la pipeta (Tabla 2). Posteriormente, se agregó ATP proveniente de una solución 100mM ATP disodio al baño (interior celular), lo que creó un gradiente de ATP hacia la pipeta, es decir, un gradiente hacia el exterior celular. Las concentraciones de ATP en el baño variaron desde los 0,5mM hasta los 2mM de ATP, en pasos de 0,5mM cada una. En los experimentos para determinar el efecto de la concentración de ATP sobre las corrientes del intercambiador K⁺/Ca²⁺, se usó una concentración de 4mM de ATP. Todas las soluciones se ajustaron a pH 7,4.

Tabla 2. Composición de las soluciones experimentales.

Solución	Contenido
Normal	140mM KCl, 10mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ , 10mM TRIS,
ATP-disodio	140mM KCl, 11mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ , 10mM TRIS, 100mM ATP disodio

Medidas Electrofisiológicas

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

Todos los experimentos fueron realizados usando la técnica del Patch Clamp en la modalidad del T.U.G.O. Patch Clamp, la cual fue desarrollada en nuestro laboratorio con la finalidad de simular, en un parche de membrana, los fenómenos mecánicos que suceden en la membrana de los eritrocitos al pasar por los capilares sanguíneos (Romero, 2004). Existen algunas diferencias entre el T.U.G.O. Patch Clamp y el Patch Clamp convencional, las cuales se describen a continuación:

La forma de la pipeta:

En el Patch Clamp convencional, las puntas de las pipetas tienen un diámetro reducido, que se logra al pulir las pipetas con una microforja después de halarlas; ésto garantiza que la cantidad de membrana aislada sea lo suficiente como para tener uno o muy pocos canales en el parche y que el área interna de la pipeta sea lo más amplia posible de forma que disminuya la resistencia en serie asociada a esta zona. En el T.U.G.O. Patch Clamp, las pipetas son construidas con la finalidad de que las paredes queden lo más paralelas posible entre ellas, simulando un capilar (Fig. 16) (Romero, 2004).

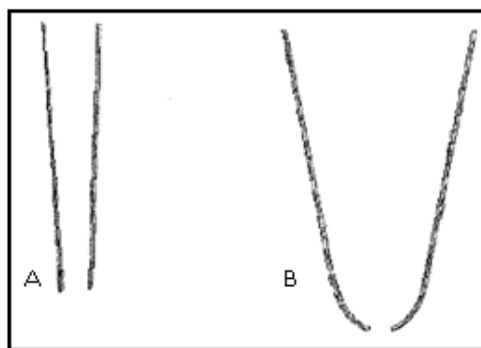


Figura 16. Diferencia en la forma de las puntas de pipetas para T.U.G.O. Patch Clamp (A). Forma de la punta de la pipeta en el Patch Clamp convencional (B). Tomado de Romero, 2004.

Cantidad de membrana aislada:

La forma de las pipetas para el T.U.G.O. Patch Clamp permite aislar una gran cantidad de membrana y a su vez evita que el eritrocito sea succionado por completo, de esta forma un gran área de la membrana queda en contacto con las paredes internas de la pipeta (Romero, 2004).

En el Patch Clamp convencional, debido a la forma de la pipeta, la membrana asociada a la pipeta toma una forma de “Ω”, mientras que en el T.U.G.O. Patch Clamp, la membrana toma una forma de “U” invertida, en donde se supone que la porción de la membrana que está en contacto con las paredes tiene una forma cónica y mide entre 3 y 8 μM , mientras que la región de la membrana que está bajo control de potencial adopta una forma semiesférica (Fig. 17) (Romero, 2004).

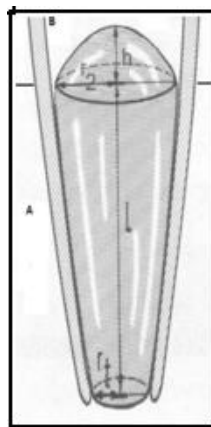


Figura 17. Esquema de la región de la membrana del eritrocito en el interior de la pipeta en el T.U.G.O. Patch Clamp. La región cónica conforma el sello eléctrico, debido a que es la parte de la membrana en contacto con las paredes de la pipeta (A). Región semi-esférica (B). Tomado de Romero, 2004.

Elaboración de las Pipetas

Las pipetas se elaboraron a partir de capilares de borosilicato O.D.: 1,5mm, I.D.: 0,86mm, y 10cm de largo (Sutter Instruments CO., Novato CA, USA.). Los capilares fueron halados en dos pasos, con ayuda de un *puller* vertical por gravedad, modelo 700C (David Kopf Instruments). Se usaron pipetas que presentaron una resistencia entre 8 y 12 $\text{M}\Omega$ en la solución normal.

Visualización de las Células

Para la visualización de las células se empleó un microscopio Nikon Diaphot (Nikon CO, LTD, Tokio, Japón), con oculares de 10X CFW y objetivos de 20 y 40 DL y para la manipulación de las pipetas se usó un micromanipulador hidráulico Narishige modelo MO-203 (Narishige CO, LTD, Tokio, Japón).

Formación del Sello

Una vez que las células estuvieran asentadas en el fondo de la cámara, se seleccionó un eritrocito para hacer el patch. Luego, usando el micromanipulador, se colocó la pipeta frente al eritrocito y se aplicó presión negativa con ayuda de una inyectora, succionando hasta que una parte de la célula entrase a la pipeta (con cuidado de no succionarla por completo) y se esperó hasta que la resistencia del sello aumentara hasta llegar de 2 a 4 G Ω , observando en la computadora hasta que la resistencia se estabilizara.

Para poder realizar el T.U.G.O. Patch Clamp era necesario desprender la región de la célula que quedaba fuera de la pipeta; para eso, se rozó la pipeta con el fondo de la cámara hasta que se rompiera esta zona de la membrana y se liberara el contenido intracelular, así la solución que se encontraba en la cámara pasaba a ser la solución intracelular (Fig. 18). Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo reportado por Romero (Romero, 2004).

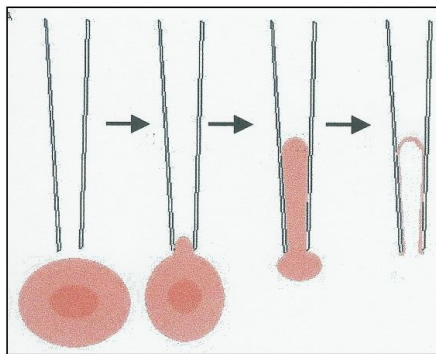


Figura 18. Esquema del posible proceso de formación del sello en T.U.G.O. Patch Clamp.

Tomado de Romero, 2004.

Observaciones hechas por Romero, sugieren que el sello se forma en una región profunda de la pipeta (Romero, 2004).

Protocolo para Agregar ATP a la Cámara

Para determinar el efecto del ATP sobre las corrientes del intercambiador, éste fue incorporado a la solución de la cámara experimental, en distintas concentraciones.

El volumen inicial de solución normal en la cámara fue de 900 μ L. Para evaluar el efecto de 0,5mM de ATP sobre las corrientes del intercambiador, se extrajeron 4,5 μ L de la solución de la cámara y se agregaron 4,5 μ L de la solución madre de 100mM de ATP disodio. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar 2mM de ATP en la cámara, aumentando la concentración de ATP en pasos de 0,5mM, manteniendo siempre un volumen total de 900 μ L en el baño, de igual forma se realizó para alcanzar 4mM de ATP en la cámara (Fig. 19).

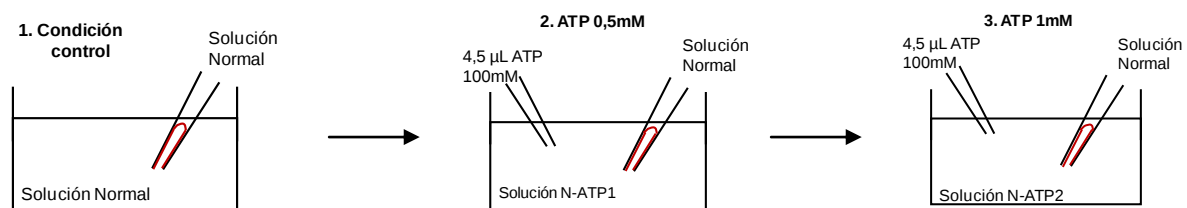


Figura 19. Esquema del protocolo para agregar ATP a la cámara (interior celular). Primero, la solución normal se encuentra en la pipeta y en la cámara. Luego se extraen 4,5 μ L de la solución en la cámara y se agregan 4,5 μ L de ATP disodio 100mM. La concentración de ATP aumenta en pasos de 0,5mM hasta llegar a 2mM en el baño y luego hasta llegar a 4mM.

Protocolos de Estimulación

A continuación se presentan los diferentes protocolos de estimulación que se aplicaron a los parches de membrana. Se repitió cada protocolo 3 veces en cada experimento a fin de calcular un promedio de las corrientes obtenidas.

Protocolo de Sustracción de Fuga

Al aplicar los protocolos de estimulación, las corrientes obtenidas incluyen corrientes biológicas (corrientes del intercambiador) y corrientes no biológicas u óhmicas (corrientes capacitativas y de fuga). Debido a que las corrientes no biológicas son mayores que las corrientes que pueda desarrollar el intercambiador, se debieron sustraer las corrientes no biológicas de las corrientes totales registradas, con la intención de registrar sólo las corrientes biológicas

El protocolo de sustracción se aplicó antes de cada pulso de prueba en todos los protocolos de estimulación. Este protocolo de sustracción tipo P/N, consistió en aplicar 10 veces un pulso con un décimo de la amplitud del pulso final y con el mismo signo de éste (prepulso); este protocolo se denomina P/10 (Fig. 20). Cada uno de estos pulsos genera un 10% de la corriente total de fuga que se registra en el pulso final. La suma de todas las corrientes obtenidas en cada uno de los 10 pulsos, resulta en el 100% de las corrientes óhmicas registradas en el pulso final. Se usa un voltaje de un décimo del pulso final ya que a estos voltajes el intercambiador no está activo, de forma que sólo se desarrollan las corrientes no biológicas.

Es posible aplicar protocolos de sustracción con más de 10 pulsos (p. ej. P/20); sin embargo, al sumar cada una de las corrientes obtenidas en cada prepulso, también se suma el ruido asociado a cada una de ellas, lo que podría generar un ruido de una amplitud que afecte la medición de las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} .

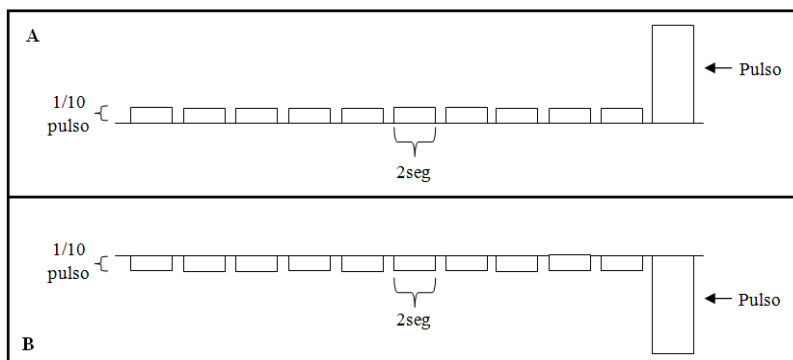


Figura 20. Esquema del protocolo de sustracción de fuga P/10. (A) protocolo P/10 con un pulso de prueba con voltaje negativo y (B) protocolo P/10 con un pulso de prueba con voltaje positivo. Modificado de Matthes, 2005.

Protocolo I vs. V

Para el estudio del efecto de las concentraciones del ATP-Mg sobre las corrientes totales del intercambiador se aplicó el protocolo I vs. V, con esto fue posible construir curvas Corriente vs. Voltaje, en donde se observa el desarrollo de las corrientes del intercambiador. Se realizaron protocolos con pulsos cuadrados de voltaje, cada uno con una duración de 2 segundos y con una amplitud de 0 a ± 160 mV, aumentando en pasos de ± 20 mV (Fig. 21). Las corrientes del intercambiador fueron medidas al final del pulso, a los dos segundos.

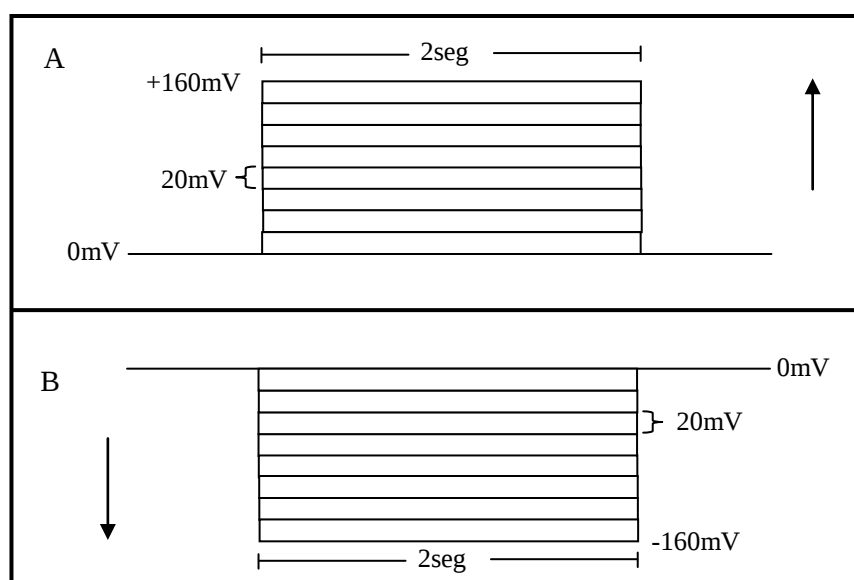


Figura 21. Esquema de los protocolos de estimulación para la construcción de las curvas I vs. V. Pulsos desde 0 a +160mV (A). Pulsos desde 0 a -160mV (B). Modificado de Matthes, 2005.

La forma ideal de expresar las corrientes que son obtenidas, a fin de poder compararlas entre los distintos experimentos, sería la densidad de corriente (pA por unidad de membrana); sin embargo, al usar el método del T.U.G.O. Patch Clamp, es prácticamente imposible medir la cantidad de membrana que se encuentra dentro de la pipeta bajo control de potencial. Por esta razón, las corrientes se normalizaron respecto al valor de corriente obtenido con el pulso de +120mV, ya que este potencial garantiza el desarrollo de las corrientes del intercambiador sin que las corrientes estén saturadas.

Protocolo de Corrientes Instantáneas (INST)

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

El protocolo INST consistió en 2 pulsos, el primero es el activante, el cual posee una magnitud de +160mV o de -160mV y una duración de 2 segundos; el siguiente pulso posee una magnitud de 0 a +160mV ó de 0 a -160mV, aumentando en pasos de $\pm 20\text{mV}$ dependiendo del signo del pulso activante, y una duración de 1 segundo (Fig. 22). Las corrientes se midieron en el instante en que se inició el segundo pulso.

Los valores de corriente instantánea registrados fueron normalizados respecto al valor de corriente obtenido a +120mV del mismo experimento. A partir de estos registros se construyeron gráficas que representan los valores de corriente instantáneas normalizadas contra el potencial de membrana.

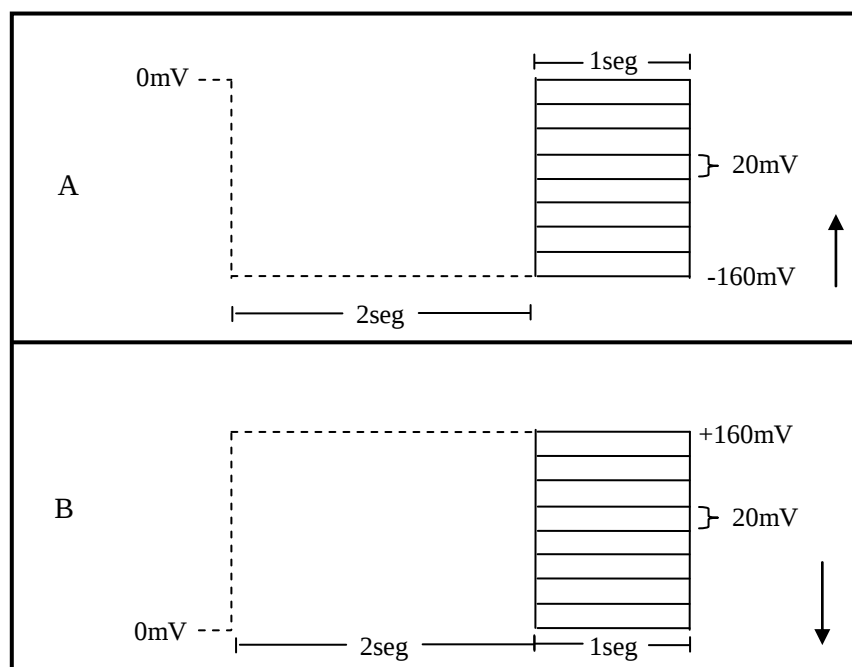


Figura 22. Esquema de los protocolos de estimulación para las corrientes instantáneas, INST. Pulso activante de -160mV (A). Pulso activante de +160mV (B). Modificado de Forsyth, 2006.

Protocolo DEAC

Con este protocolo se determinó el efecto del ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador.

El protocolo DEAC, consistió en aplicar 2 pulsos iguales de $\pm 160\text{mV}$. El tiempo entre los pulsos fue variable y disminuía en pasos de 500mseg (Fig. 23), midiendo las corrientes al inicio del segundo pulso.

En el protocolo DEAC A (potenciales de membrana negativos), el tiempo interpulso se extendió hasta los 5500mseg en la condición control de forma que se pudiera apreciar la desactivación del intercambiador en un mayor tiempo. Mientras que el protocolo DEAC B (potenciales positivos) se extendió hasta los 4000 ms al aplicar 1mM de ATP-Mg al interior celular, con la finalidad de observar el tiempo que tarda en desactivarse el intercambiador en esta condición.

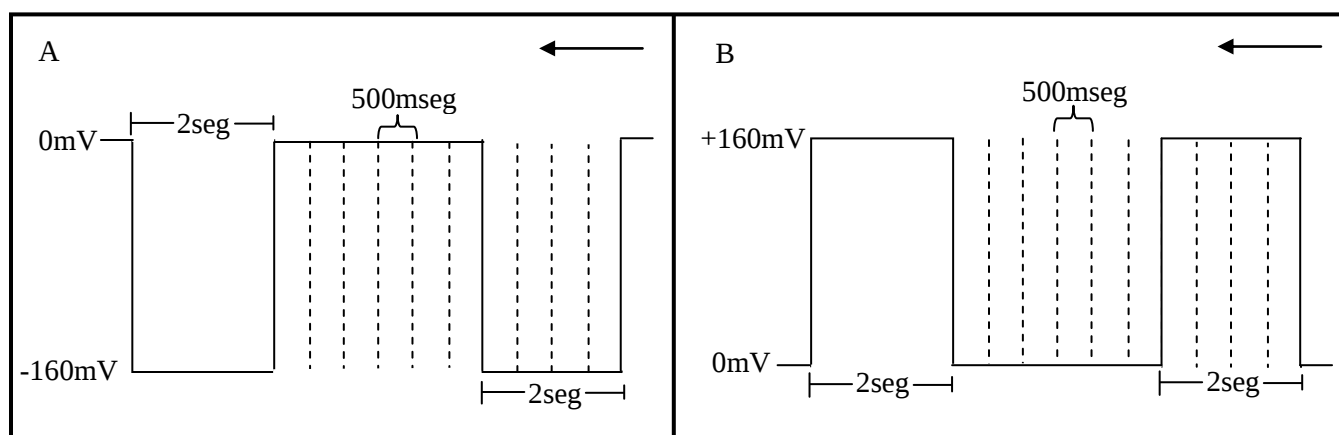


Figura 23. Esquema del protocolo DEAC. El tiempo entre los pulsos idénticos, disminuye en pasos de 500mseg. Pulsos de $+160\text{mV}$ (A). Pulsos de -160mV (B). Modificado de Forsyth, 2006.

Las corrientes registradas en cada pulso de prueba fueron normalizadas respecto al valor de corriente obtenido al aplicar el pulso activante de $\pm 160\text{mV}$ de cada experimento. Las gráficas construidas a partir de este protocolo representan el porcentaje de disminución de la corriente vs el tiempo de separación entre pulsos.

Adquisición de los Datos

Las corrientes se adquirieron en modo Voltage-Clamp, con una ganancia de 100mV/pA, con un filtro pasa-bajos a 1 KHz, para lo cual se empleó un amplificador AXOPATCH-1C (Axon Instrument, Burlingame, CA, USA); simultáneamente se usará 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 usó una interfase ITC-16 (Instrutech, Port Washington, NY, USA), empleando un programa de control y adquisición PULSE (Heka, Lambrecht, Alemania).

Análisis de los Datos

Se compararon las curvas obtenidas con el protocolo I vs. V con las curvas de corriente instantánea con la intención de evaluar el efecto del ATP-Mg sobre la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los experimentos en donde se usó el protocolo I vs. V y en donde se usó el protocolo INST se realizaron por separado, por lo que al comparar estas corrientes se observó que las curvas de corrientes totales eran mayores en algunos puntos que las rectas de las corrientes instantáneas. Para corregir esto, se realizó un ajuste en el cual se igualaron los puntos de 160mV de las curvas de corrientes totales al valor de 160mV de las corrientes instantáneas correspondiente al control y a las diferentes concentraciones de ATP-Mg empleadas. Luego, a partir de estos puntos que ahora son iguales, se calcularon los demás puntos hasta llegar a los 0mV; lo mismo se realizó para los potenciales de membrana negativos.

Análisis Estadístico

Se realizó una prueba estadística con la finalidad de determinar si las diferencias entre los resultados obtenidos son significativas.

Los resultados presentados en este trabajo poseen un $n < 30$ por lo que se empleó la prueba de Mann-Whitney debido a que es una prueba estadística no paramétrica y los datos cumplen con los supuestos de la prueba como: las muestras son de tamaños n y m , cada una; la escala de medición es ordinal y la variable es continua.

Se usó la prueba bilateral de Mann-Whitney, en donde las hipótesis planteadas son las siguientes:

- Hipótesis nula: $H_0: M_1 = M_2$
- Hipótesis alternativa: $H_A: M_1 \neq M_2$

Para este caso se pretende comparar los resultados obtenidos en el tratamiento 1 con los obtenidos en el Tratamiento 2, provenientes del mismo tipo de experimento (patch), donde M_1 es la mediana de los datos correspondientes al tratamiento 1 y M_2 es la mediana de los datos obtenidos del tratamiento 2. La prueba propone que si las poblaciones son diferentes, estas varían solamente en lo que respecta a sus medianas.

Los resultados obtenidos para cada comparación estadística realizada se presentan en tablas. Estas tablas muestran los valores de: medias (medias), desviación estándar (D. E.), número de muestras del tratamiento (n) y el valor de p , que es función del valor del estadístico obtenido de acuerdo a los datos experimentales y de los grados de libertad.

En este caso, se escogió el nivel de significación $p = 0.05$, de esta forma se estableció que hay un 5% de probabilidad de rechazar una hipótesis cuando debería aceptarse, lo cual deja un 95% de confianza para aceptar la hipótesis correcta.

Luego del análisis estadístico se toma en cuenta el valor de p , si este valor es menor a 0,05, se rechaza la hipótesis nula e indicará que sí hay diferencias significativas entre los datos de los dos tratamientos diferentes (valores reportados en **negrita**). Pero si por el contrario, el valor de p resulta mayor a 0,05, se acepta la hipótesis nula que indica que no hay efecto por parte del tratamiento.

RESULTADOS

Empleando la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp fue posible medir las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} y caracterizar el efecto del ATP sobre las corrientes del mismo.

Al aplicar el protocolo I vs. V, se observó que la corriente generada por el intercambiador en condiciones simétricas con la solución normal, posee un comportamiento sigmoide respecto al potencial de membrana impuesto, sin embargo se observó que la corriente desarrollada es mayor a potenciales de membrana positivos en un 42,6% (Fig. 24) lo que difiere con lo reportado anteriormente, ya que se observaba una mayor amplitud en las corrientes entrantes de K^+ (corrientes negativas) (ver Fig. 7) (Romero, 2004. Matthes, 2005. Forsyth 2006. Galué, 2008).

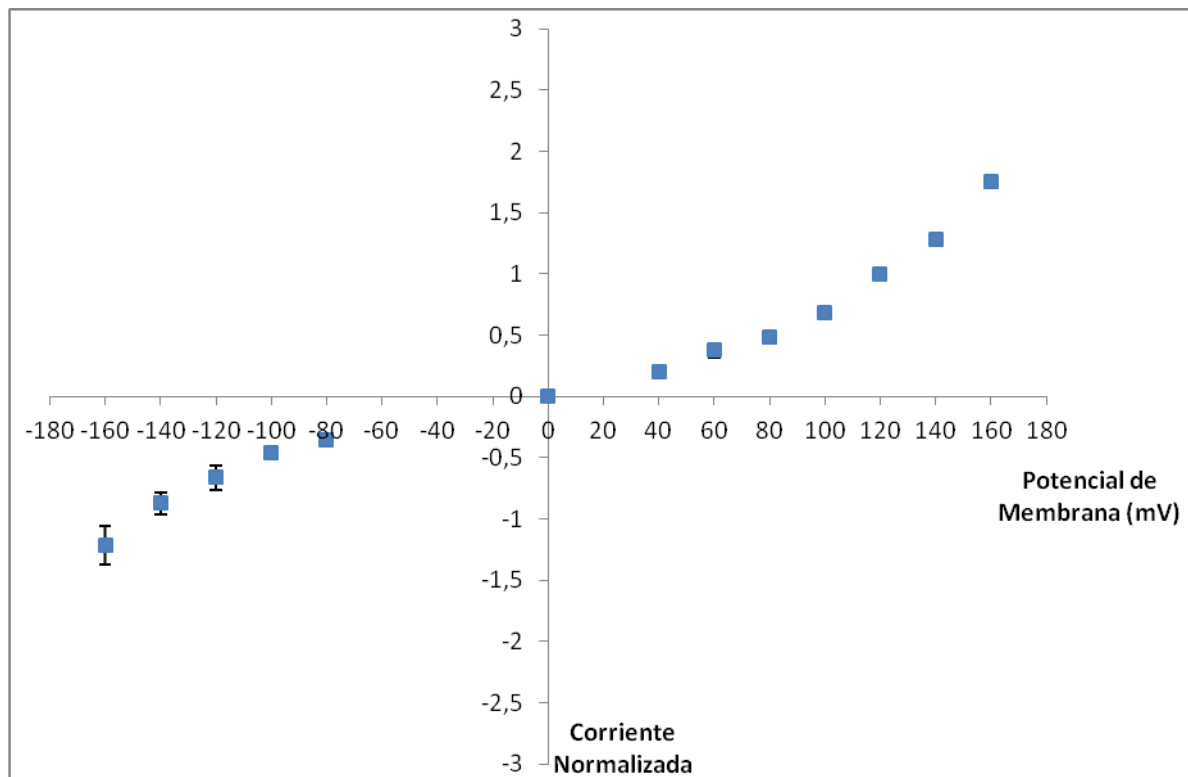


Figura 24. Relación de Amplitud Normalizada vs. Potencial de Membrana en condición control.

La corriente presenta un comportamiento sigmoide respecto al potencial de membrana. Las corrientes son mayores en el modo de salida de K^+ . Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V.

n=15. Barras de error estándar.

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

Para estudiar el efecto de diversas concentraciones de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Se usó el protocolo I vs. V variando las concentraciones intracelulares de ATP desde 0,5mM hasta 2mM en pasos de 0,5mM; por último, se usó una concentración de 4mM de ATP-Mg.

Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Inicialmente se aplicó el protocolo I vs. V con la solución normal en ambos lados de la membrana, luego se agregaron 0,5mM de ATP-Mg a la cámara experimental (lado intracelular) y se aplicó de nuevo el protocolo I vs. V.

En la figura 25 se puede observar el efecto de 0,5mM de ATP-Mg sobre las corrientes normalizadas del Intercambiador K^+/Ca^{2+} . Los puntos en rojo representan las corrientes del intercambiador en presencia de 0,5mM de ATP-Mg, las cuales aumentan respecto al control a -160mV, pasando de $-1,22 \pm 0,56$ a $-3,50 \pm 1,31$, es decir, aumenta en un 187%. Es posible notar que estas corrientes de entrada de K^+ son mayores que las corrientes de salida de este ión en un 54,6%, a +160mV, lo cual es contrario al comportamiento observado en la condición control, en donde la corriente de salida de K^+ es mayor en un 42%. Y en concordancia con lo que fue observado con anterioridad, en la tabla 3 se representan los valores estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney a las corrientes registradas en la condición control contra la condición experimental de 0,5mM ATP-Mg, se observa que las diferencias son significativas a partir de -100mV hasta -160mV; mientras que a potenciales positivos, las diferencias son no significativas.

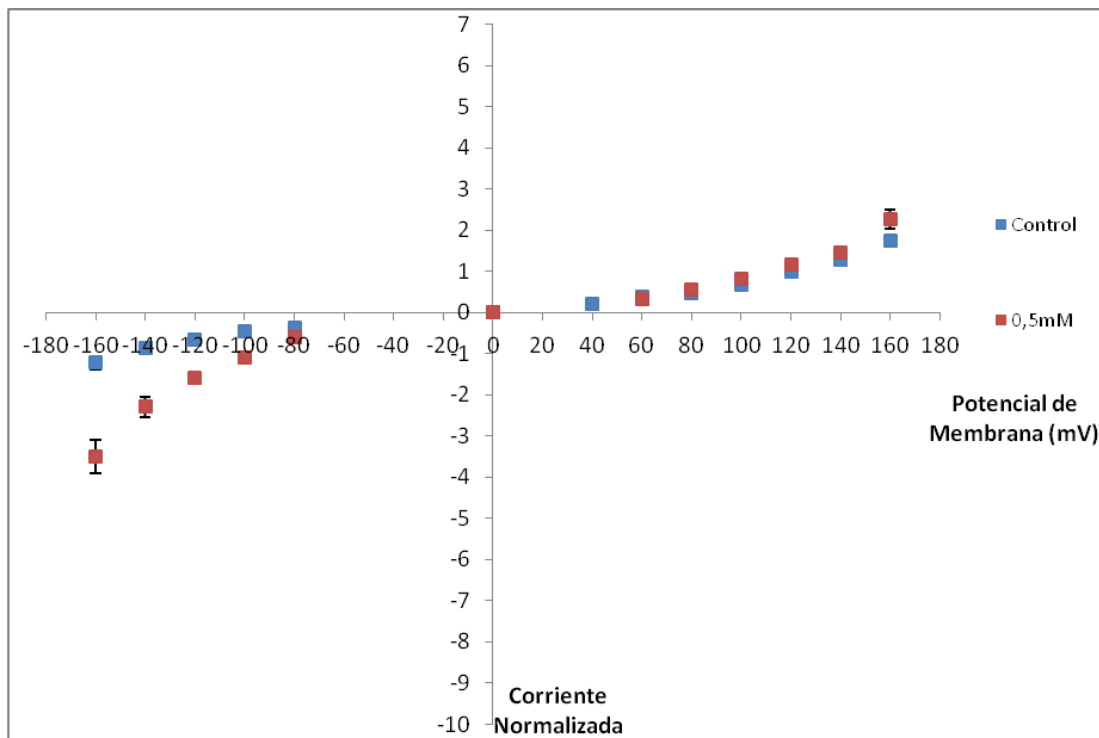


Figura 25. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 0,5mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos en azul (■) representan la condición control (n=15). Los puntos en rojo (■) representan la condición experimental, 0,5mM ATP-Mg (n=12). Barras de error estándar.

Las corrientes son mayores en presencia de ATP-Mg. Se observa que en el modo de entrada de K^+ las corrientes entrantes aumentan respecto a la condición control.

Tabla 3. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 0,5mM ATP con el protocolo I vs. V. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas IV 0,5 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	N	P
160mV	I norm. Control	1,75	0,17	15	0,149
	I norm. Experimental	2,27	0,78	12	
140mV	I norm. Control	1,28	0,10	15	0,482
	I norm. Experimental	1,47	0,47	12	
100mV	I norm. Control	0,69	0,12	15	0,794
	I norm. Experimental	0,82	0,39	11	
80mV	I norm. Control	0,48	0,15	15	0,762
	I norm. Experimental	0,56	0,24	12	
60mV	I norm. Control	0,37	0,21	14	0,857
	I norm. Experimental	0,34	0,23	12	
-80mV	I norm. Control	-0,36	0,13	14	0,1
	I norm. Experimental	-0,59	0,10	12	
-100mV	I norm. Control	-0,46	0,17	15	0,016
	I norm. Experimental	-1,09	0,31	12	
-120mV	I norm. Control	-0,66	0,38	15	0,012
	I norm. Experimental	-1,57	0,27	12	
-140mV	I norm. Control	-0,87	0,34	14	0,014
	I norm. Experimental	-2,29	0,84	11	
-160mV	I norm. Control	-1,22	0,56	13	0,014
	I norm. Experimental	-3,50	1,31	10	

Efecto de 1mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

En la figura 26 se presenta el efecto de 1mM de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} al aplicar el protocolo I vs. V. El efecto del ATP-Mg es mayor en el modo de entrada de K^+ (corrientes entrantes a potenciales negativos) que en el modo de salida de K^+ (corrientes salientes). Por otro lado, se observa que la corriente desarrollada por el intercambiador en presencia de 1mM de ATP a +160 y -160mV es igual a $2,70 \pm 0,43$ y $-4,33 \pm 1,66$, respectivamente; mientras que en presencia de 0,5mM

de ATP-Mg a +160 y -160mV es igual a $2,27 \pm 0,78$ y $-3,50 \pm 1,31$, respectivamente; por lo que la corriente aumenta en un 38% a -160mV y un 47% a +160mV respecto a la corriente en presencia de 0,5mM ATP-Mg y varía en un 297% a -160mV y 91% a +160mV frente a 1mM de ATP-Mg, respecto al control.

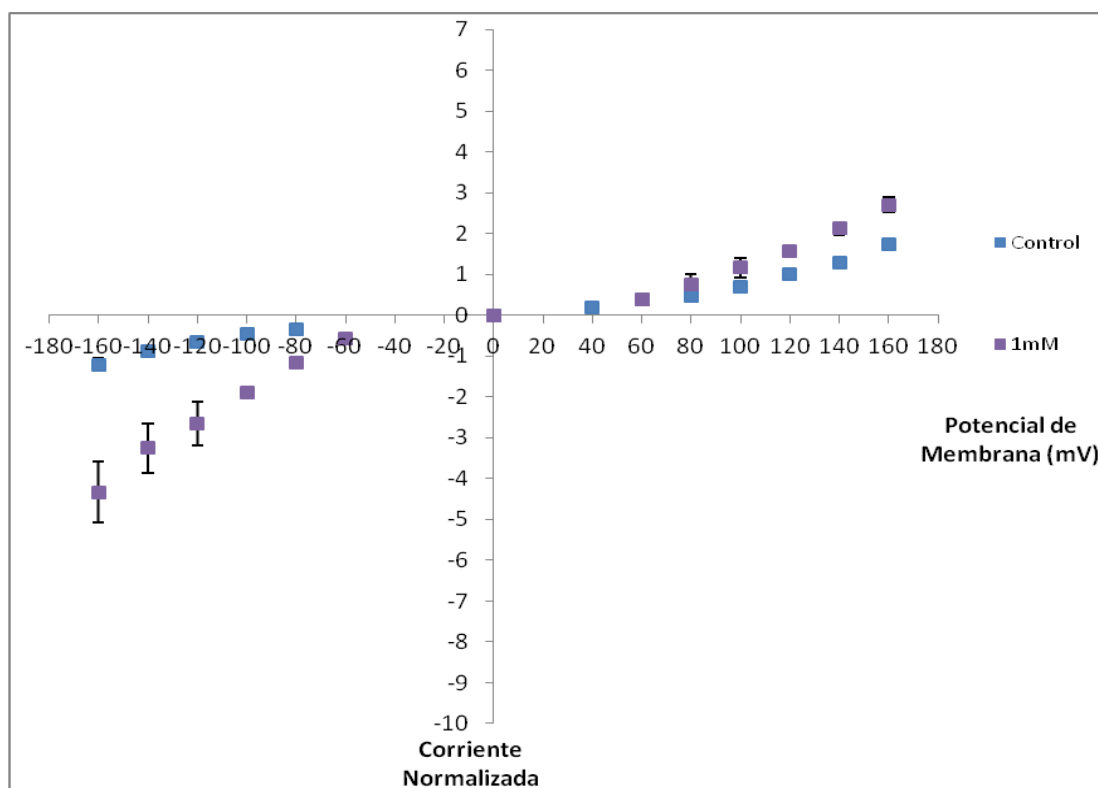


Figura 26. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 1mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos en azul (■) representan la condición control (n=15). Los puntos en morado (■) representan la condición experimental, 1mM ATP (n=6). Barras de error estándar. Las corrientes son mayores en presencia de ATP-Mg. Se observa que en el modo de entrada de K⁺ las corrientes son mayores que en la condición control y que las corrientes en presencia de 0,5mM.

En la tabla 4 se observa que en los potenciales de membrana de +100 y +160mV, la diferencia entre las corrientes de la condición control y las corrientes obtenidas en presencia de 1mM de ATP son significativas, al igual que las corrientes desde -100 hasta -160mV.

Tabla 4. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 1mM ATP con el protocolo I vs. V. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas IV 1 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	N	P
160mV	I norm. Control	1,75	0,17	15	0,00037
	I norm. Experimental	2,70	0,43	5	
140mV	I norm. Control	1,28	0,10	15	0,00052
	I norm. Experimental	2,13	0,35	5	
100mV	I norm. Control	0,69	0,12	15	0,00043
	I norm. Experimental	1,16	0,56	6	
80mV	I norm. Control	0,48	0,15	15	0,142
	I norm. Experimental	0,75	0,64	6	
60mV	I norm. Control	0,37	0,21	14	0,057
	I norm. Experimental	0,39	0,25	6	
-80mV	I norm. Control	-0,36	0,13	14	0,2
	I norm. Experimental	-1,17	0,21	6	
-100mV	I norm. Control	-0,46	0,17	15	0,016
	I norm. Experimental	-1,90	0,11	6	
-120mV	I norm. Control	-0,66	0,38	15	0,040
	I norm. Experimental	-2,65	1,18	5	
-140mV	I norm. Control	-0,87	0,34	14	0,046
	I norm. Experimental	-3,25	1,36	5	
-160mV	I norm. Control	-1,22	0,56	13	0,0086
	I norm. Experimental	-4,33	1,66	5	

Efecto de 1,5mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Al aplicar el protocolo I vs. V en presencia de 1,5mM de ATP en la cámara experimental, se registraron corrientes entrantes mayores a las registradas en la condición control para potenciales de membrana positivos y negativos (Fig. 27).

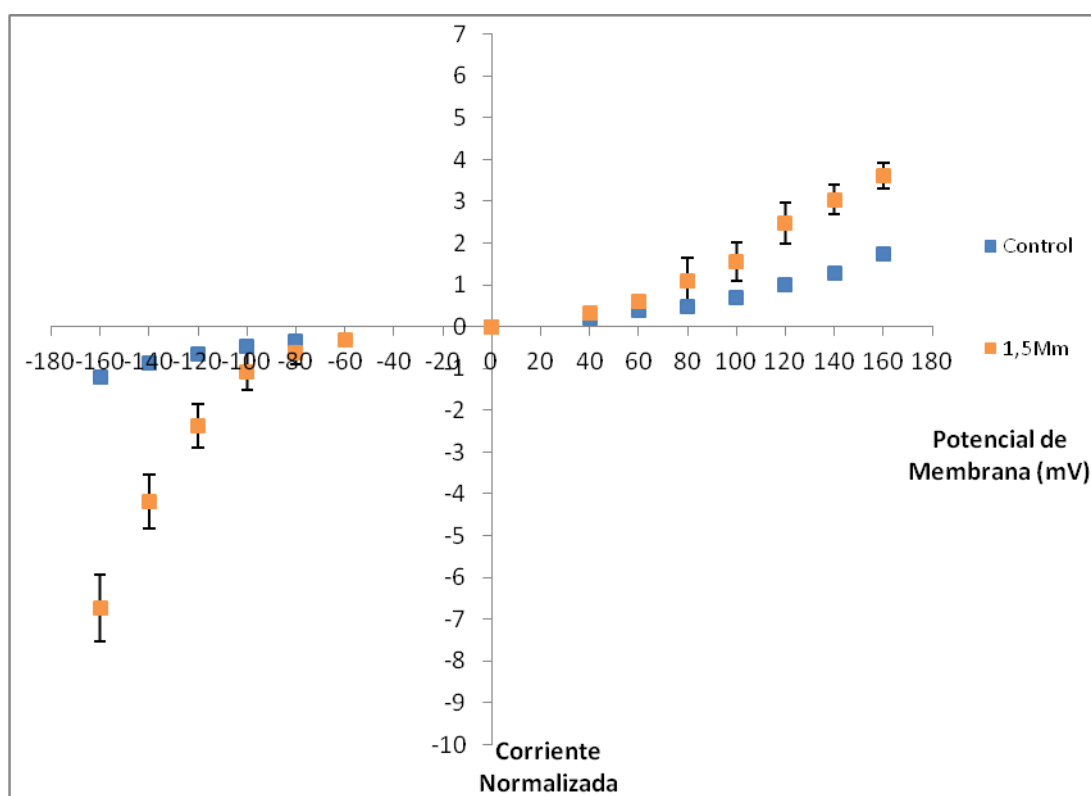


Figura 27. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 1,5mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos en azul (■) representan la condición control (n=15). Los puntos en naranja (■) representan la condición experimental, 1,5mM ATP (n=5). Barras de error estándar. Las corrientes son mayores en presencia de ATP-Mg. También se observa que en el modo de entrada de K^+ las corrientes son mayores que las corrientes frente a menores concentraciones de ATP.

El efecto del ATP-Mg es más acentuado en el modo de entrada de K^+ (potenciales de membrana negativos), ya que la corriente a -160mV pasa de $-4,33 \pm 1,66$ en 1mM ATP a $-6,73 \pm 1,62$ en 1,5mM de ATP-Mg, es decir, aumenta en un 8% respecto a la corriente registrada en 1,5mM ATP-Mg. Mientras que a +160mV la corriente pasa de $2,70 \pm 0,43$ a $3,61 \pm 0,62$, es decir, la corriente incrementa en un 39% con el

aumento de la concentración de ATP-Mg y aumenta respecto a la condición control en un 452% a -160mV y 106% a +160mV.

Al aplicar la prueba estadística correspondiente para comparar los datos mostrados en la figura 27, se obtuvo que hay una diferencia significativa entre los valores obtenidos desde +160mV hasta +100mV y desde -120 hasta -160mV (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 1,5mM ATP con el protocolo I vs. V. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas IV 1,5 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,75	0,17	15	0,0025
	I norm. Experimental	3,61	0,62	4	
140mV	I norm. Control	1,28	0,10	15	0,0025
	I norm. Experimental	3,04	0,77	5	
100mV	I norm. Control	0,69	0,12	15	0,0029
	I norm. Experimental	1,56	1,00	5	
80mV	I norm. Control	0,48	0,15	15	0,769
	I norm. Experimental	1,08	1,25	5	
60mV	I norm. Control	0,37	0,21	14	0,533
	I norm. Experimental	0,60	0,33	5	
40mV	I norm. Control	0,20	0,11	15	0,333
	I norm. Experimental	0,34	0,10	5	
-80mV	I norm. Control	-0,36	0,13	14	0,200
	I norm. Experimental	-0,64	0,55	5	
-100mV	I norm. Control	-0,46	0,17	15	0,095
	I norm. Experimental	-1,07	1,00	5	
-120mV	I norm. Control	-0,66	0,38	15	0,044
	I norm. Experimental	-2,37	1,07	4	
-140mV	I norm. Control	-0,87	0,34	14	0,030
	I norm. Experimental	-4,18	1,27	4	
-160mV	I norm. Control	-1,22	0,56	13	0,030
	I norm. Experimental	-6,73	1,62	4	

Efecto de 2mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

La figura 28, muestra el comportamiento de las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} luego de agregar 2mM de ATP al compartimiento intracelular, es posible observar cómo las corrientes son mayores que las registradas en el control, sin embargo el efecto es mayor en el modo de entrada de K^+ (potencial de membrana negativo). No fue posible registrar el valor de corriente del intercambiador a -160mV ya que éstas sobrepasaban la capacidad de medición del equipo, por lo que sólo están representadas en la Figura 28 hasta -140mV.

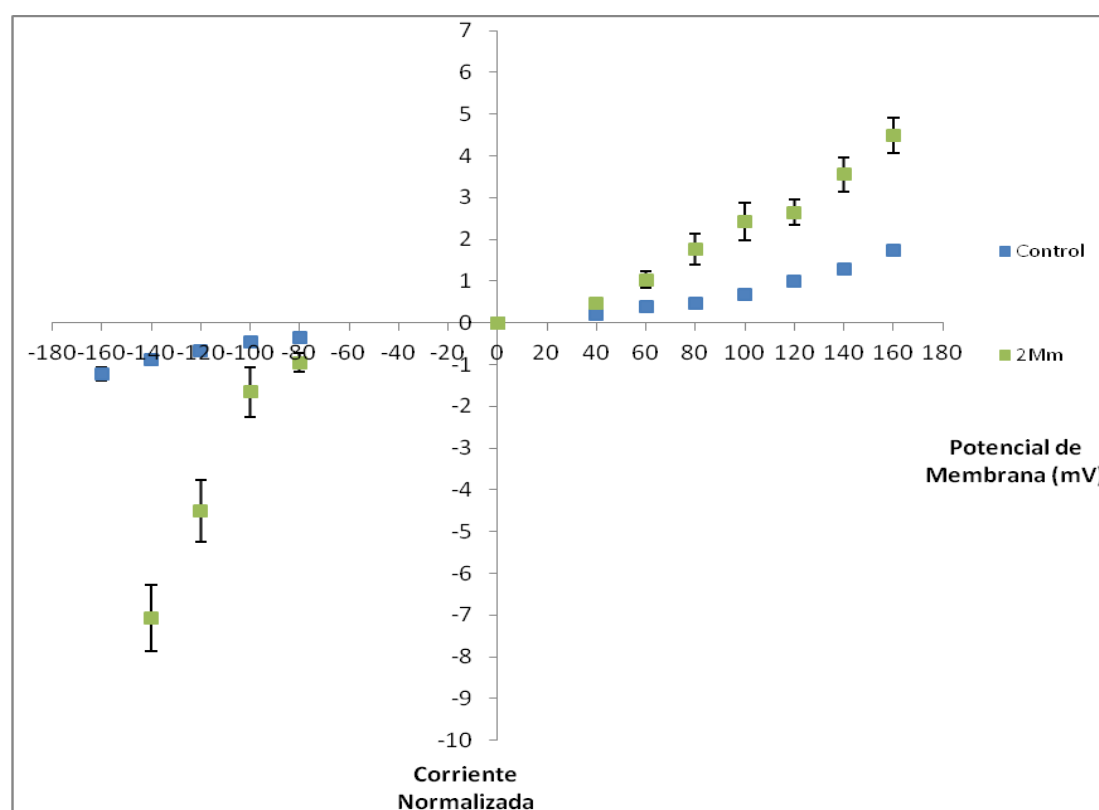


Figura 28. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 2mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos en azul (■) representan la condición control (n=15). Los puntos en verde (■) representan la condición experimental, 2mM ATP (n=5). Barras de error estándar. Las corrientes son mayores en presencia de ATP-Mg. También se observa que en el modo de entrada de K^+ las corrientes son mayores que en la condición control así como el efecto es más pronunciado que en el modo de salida de K^+ .

La corriente aumenta cerca de un 700% en -140mV y un 156% a +160mV, respecto a la condición control. Se observa que las corrientes aumentan en mayor proporción en el modo de entrada de K ya que al compararlo con las corrientes registradas a 1,5mM ATP-Mg, éstas aumentan un 68% en -140mV y un 24% a +160mV.

En la tabla 6 se encuentran reportados los valores de para la prueba estadística Mann-Whitney en donde se compararon las condición control vs. la condición de 2mM de ATP-Mg; es posible observar que las diferencias son significativas desde +80 hasta +160mV y por el otro lado, en los valores de corrientes obtenidos en -120 y -140mV.

Tabla 6. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 2mM ATP-Mg con el protocolo I vs. V. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas IV 2 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,75	0,17	15	0,015
	I norm. Experimental	4,49	0,84	4	
140mV	I norm. Control	1,28	0,10	15	0,015
	I norm. Experimental	3,55	0,84	4	
100mV	I norm. Control	0,69	0,12	15	0,017
	I norm. Experimental	2,42	1,00	5	
80mV	I norm. Control	0,48	0,15	15	0,026
	I norm. Experimental	1,76	0,85	5	
60mV	I norm. Control	0,37	0,21	14	0,133
	I norm. Experimental	1,56	0,75	5	
40mV	I norm. Control	0,20	0,11	15	0,333
	I norm. Experimental	0,99	0,73	5	
-80mV	I norm. Control	-0,36	0,13	14	0,200
	I norm. Experimental	-0,96	0,50	5	
-100mV	I norm. Control	-0,46	0,17	15	0,095
	I norm. Experimental	-1,65	1,20	4	
-120mV	I norm. Control	-0,66	0,38	15	0,044
	I norm. Experimental	-4,50	1,27	3	
-140mV	I norm. Control	-0,87	0,34	14	0,030
	I norm. Experimental	-7,06	1,37	3	

Hasta este punto se ha observado que las corrientes aumentan a medida que se incrementa la concentración de ATP-Mg en el lado intracelular, y que el efecto es más acentuado en el modo de entrada de K^+ . Debido a este comportamiento, en donde no se ha alcanzado la saturación del intercambiador, se decidió aumentar la concentración de ATP-Mg en la cámara a 4mM; los resultados obtenidos se describen en la siguiente sección.

Efecto de 4mM ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Se evaluó el efecto de 4mM de ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador con la finalidad de lograr calcular la constante K_m . La figura 29 está representado el efecto de 4mM de ATP-Mg y se observa que a esta concentración no se obtuvo la saturación del intercambiador. El efecto de esta concentración de ATP-Mg es similar al efecto observado de 1, 1,5 y 2mM, en donde la corriente de entrada de K^+ ($-7,82 \pm 1,50$ a $-100mV$) es mayor que la corriente de salida de este ión ($1,70 \pm 0,54$ a $100mV$) y aumenta de forma dosis dependiente.

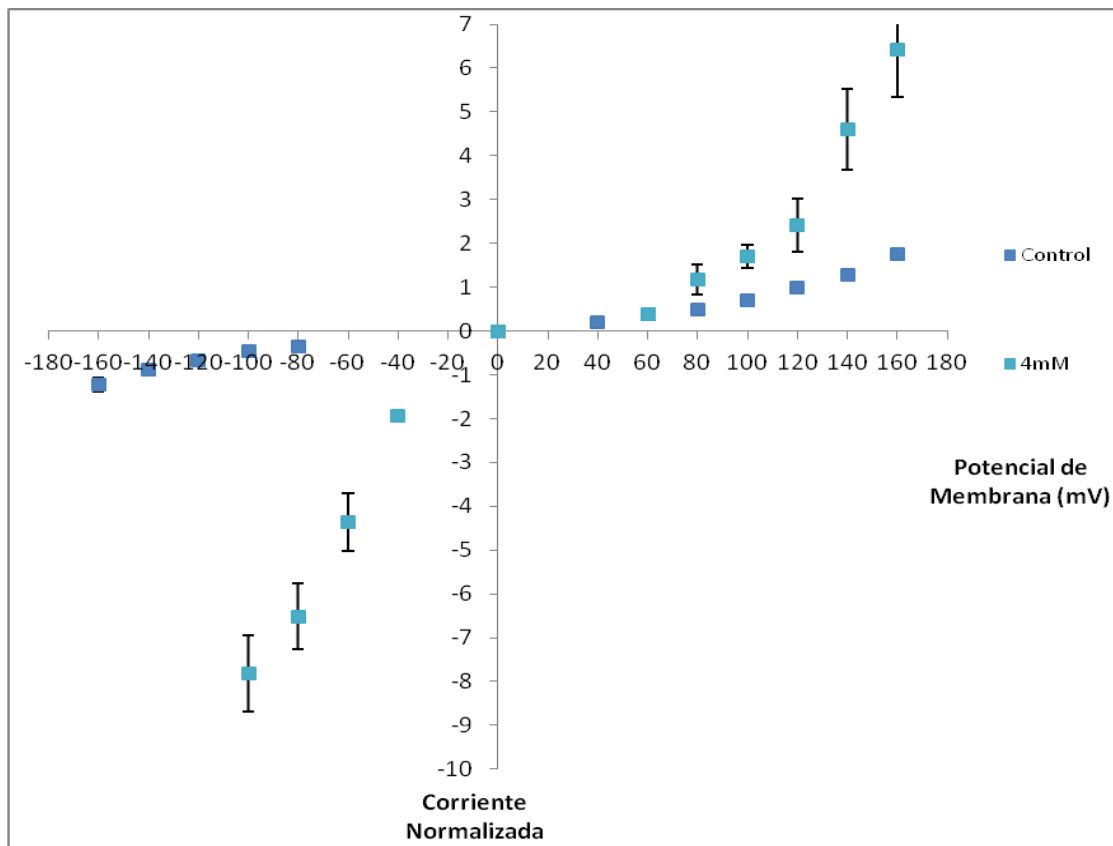


Figura 29. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 4mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V. Los puntos en azul oscuro (■) representan la condición control (n=15). Los puntos en azul claro (■) representan la condición experimental, 4mM ATP (n=4). Barras de error estándar. Las corrientes son mayores en presencia de ATP-Mg. No se observa saturación en las

A continuación se reportan los datos del estadístico Mann-Whitney en donde se comparan los datos mostrados en la figura 29 (tabla 7). Las diferencias fueron significativas desde +80 hasta +160mV, y en -80 y -100mV.

Tabla 7. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 4mM ATP con el protocolo I vs. V. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas IV 4 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,75	0,17	15	0,00013
	I norm. Experimental	6,42	1,86	3	
140mV	I norm. Control	1,28	0,10	15	0,00013
	I norm. Experimental	4,60	1,60	3	
100mV	I norm. Control	0,69	0,12	15	0,00065
	I norm. Experimental	1,70	0,54	4	
80mV	I norm. Control	0,48	0,15	15	0,022
	I norm. Experimental	1,18	0,68	4	
60mV	I norm. Control	0,37	0,21	14	0,467
	I norm. Experimental	0,39	0,09	4	
-80mV	I norm. Control	-0,36	0,13	14	0,01
	I norm. Experimental	-6,51	1,32	3	
-100mV	I norm. Control	-0,46	0,17	15	0,025
	I norm. Experimental	-7,82	1,50	3	

En la Figura 30, se presenta una gráfica que resume el efecto de diversas las concentraciones de ATP-Mg empleadas sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Inicialmente en la condición control, las corrientes desarrolladas por el intercambiador son menores en el modo de entrada de K^+ , luego al agregar ATP-Mg se invierte este comportamiento ya que todas las corrientes entrantes (potenciales de membrana negativos) son mayores que las corrientes salientes. Se observa un efecto dosis dependiente del ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador el cual es más pronunciado en el modo de entrada de K^+ que en el modo de salida. No fue posible calcular la constante K_m debido a que el intercambiador no presentó una saturación en presencia de las diversas concentraciones de ATP-Mg.

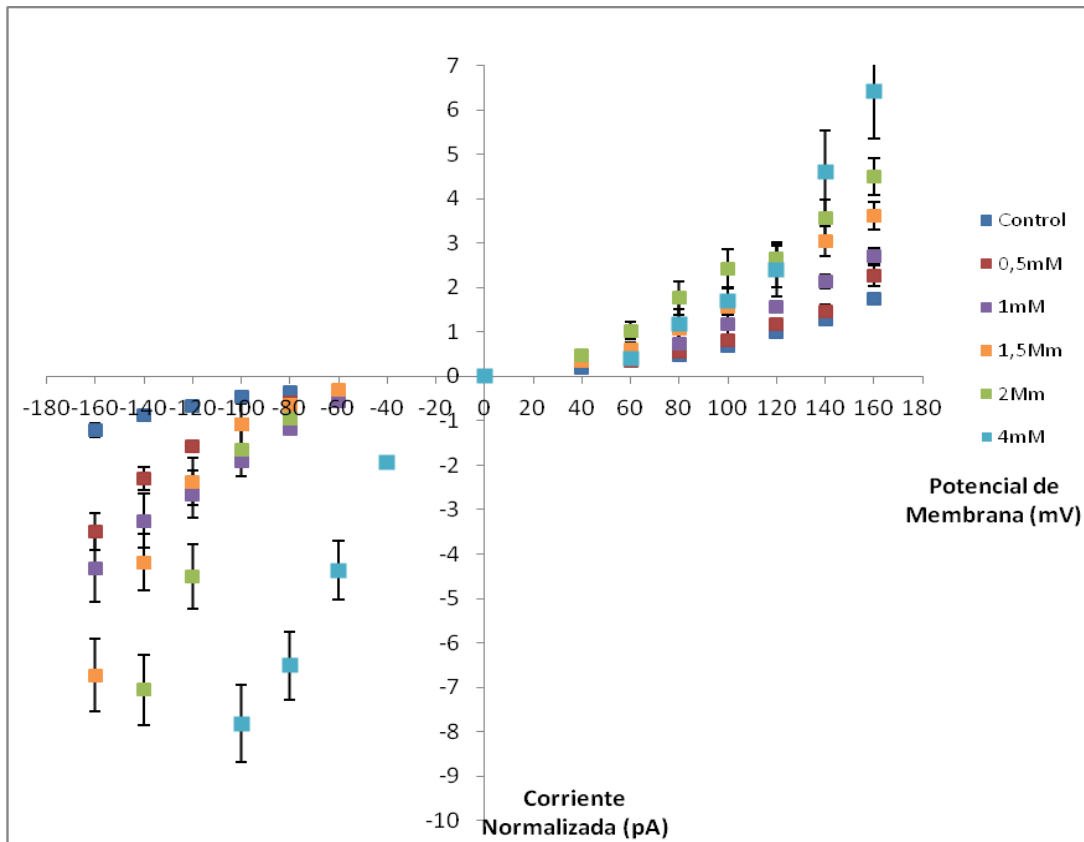


Figura 30. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 4mM ATP-Mg. Datos obtenidos al aplicar el protocolo I vs. V y las barras de error estándar. Los puntos en azul oscuro (■) representan la condición control (n=15). Puntos en rojo (■) representan las corrientes con 0,5mM ATP (n=12). Puntos en morado (■) representan las corrientes en presencia de 1mM ATP (n=7). Puntos en anaranjado (■) representan las corrientes con 1,5mM ATP (n=5). Puntos en verde (■) representan las corrientes en presencia de 2mM ATP (n=5). Los puntos en azul claro (■) representan la condición experimental, 4mM ATP (n=4).

Efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

El efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} fue evaluado al aplicar el protocolo INST a parches de membrana. En primer lugar se aplicó el protocolo INST en la condición control; posterior a esto se agregaron 0,5mM ATP a la cámara experimental y se continuó aumentando la concentración de ATP hasta los 1,5mM en pasos de 0,5mM.

Al aplicar el protocolo INST en la condición control se obtuvo la gráfica en la Fig. 31, en donde se observa que la pendiente de la línea de tendencia (línea roja) de los puntos a potenciales de membrana negativos es ligeramente menor que la pendiente de la línea de tendencia (línea azul) de los datos obtenidos a potenciales positivos. Estos datos son consistentes con lo observado al aplicar el protocolo I vs. V, en donde las corrientes a potenciales negativos son menores a las corrientes registradas a voltajes positivos.

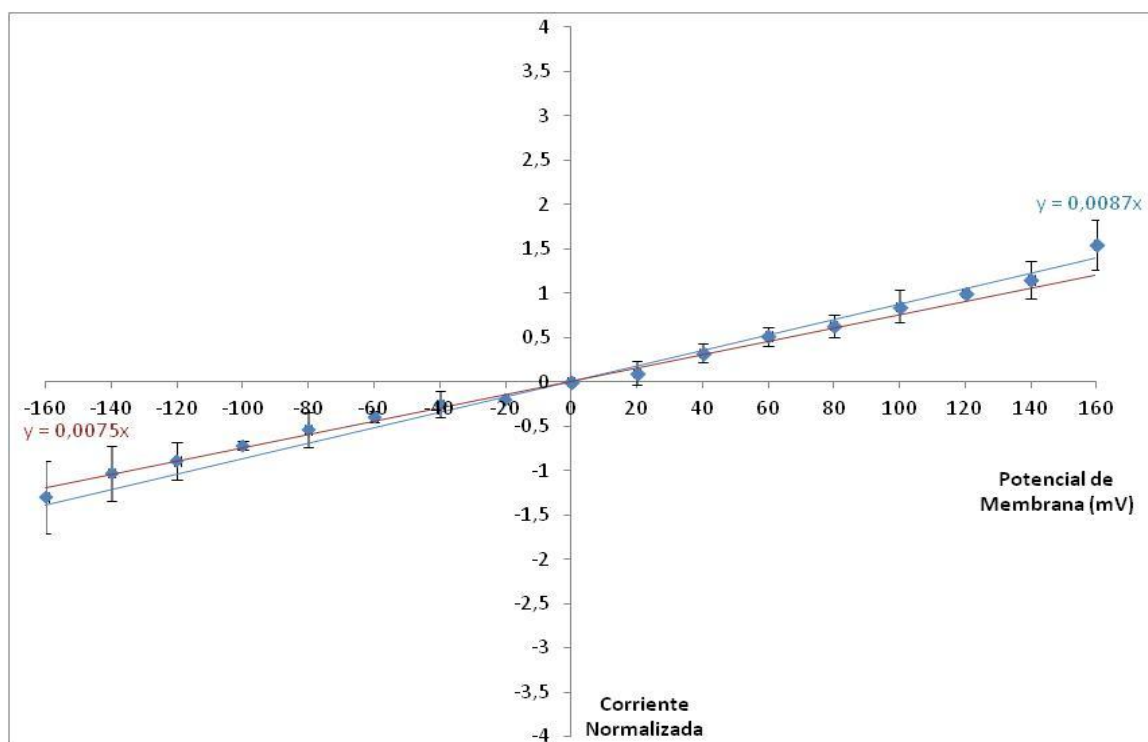


Figura 31. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana en condición control.

Los datos desde -160 hasta 0mV fueron obtenidos al aplicar el protocolo INST-A (línea de tendencia roja) (-) y los puntos desde 0 a +160mV fueron obtenidos con el protocolo INST-B (línea de tendencia azul) (-). n=17.

Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

En la figura 32 se encuentra representado el efecto de 0,5mM de ATP sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} , es posible observar el aumento en la pendiente de la recta en la condición experimental respecto a la condición control en ambos sentidos de movimiento del K^+ . También se observa que la pendiente de la recta en el modo de salida de K^+ , en presencia de 0,5mM de ATP, difiere muy poco de la pendiente en el modo de entrada de K^+ en la condición experimental ($m=0,0119mV^{-1}$ y $0,0111mV^{-1}$, respectivamente), esto implica que la permeabilidad del intercambiador es igual en los modos de salida y de entrada de K^+ en presencia de 0,5mM de ATP. La pendiente en el modo de salida de K^+ aumentó un 36,78% y en el modo de entrada de K^+ en un 48%, respecto a la condición control. Sin embargo, en la tabla 8 se representan los valores de la prueba estadística aplicada para comparar los resultados en las condiciones descritas; la prueba estadística indica que, en general, no hay diferencias significativas entre el tratamiento aplicado y la condición control.

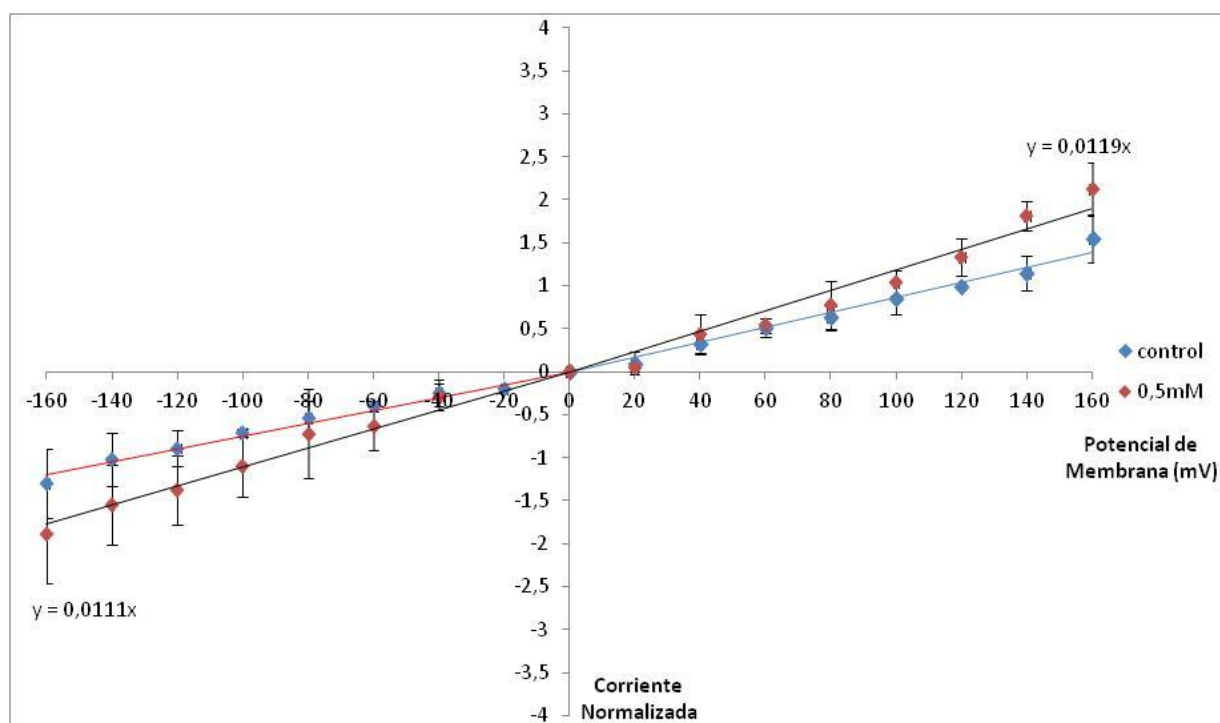


Figura 32. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 0,5mM ATP-Mg. Los datos desde -160 hasta 0mV fueron obtenidos al aplicar el protocolo INST-A y los puntos desde 0 a +160mV fueron obtenidos con el protocolo INST-B. Los puntos en azul (♦) representan la condición control (n=17). Los puntos en rojo (♦) representan la condición experimental (n=7). Barras de error estándar. En presencia de 0,5mM de ATP las pendientes de las curvas son mayores que en la condición control y las pendientes son muy similares en el modo de salida y de entrada de K^+ .

Tabla 8. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 0,5mM ATP con el protocolo INST. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas INST 0,5 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,65	0,37	16	0,971
	I norm. Experimental	2,12	0,31	6	
140mV	I norm. Control	1,15	0,28	17	0,376
	I norm. Experimental	1,82	0,17	6	
100mV	I norm. Control	0,75	0,18	17	0,154
	I norm. Experimental	1,03	0,15	7	
80mV	I norm. Control	0,59	0,13	17	0,357
	I norm. Experimental	0,77	0,28	7	
60mV	I norm. Control	0,51	0,11	17	0,283
	I norm. Experimental	0,54	0,09	7	
40mV	I norm. Control	0,33	0,10	17	0,041
	I norm. Experimental	0,43	0,23	6	
20mV	I norm. Control	0,10	0,13	17	0,914
	I norm. Experimental	0,05	0,05	7	
-40mV	I norm. Control	-0,20	0,29	17	0,548
	I norm. Experimental	-0,30	0,16	7	
-60mV	I norm. Control	-0,40	0,06	17	0,730
	I norm. Experimental	-0,63	0,29	7	
-80mV	I norm. Control	-0,54	0,24	17	0,667
	I norm. Experimental	-0,72	0,52	7	
-100mV	I norm. Control	-0,71	0,05	17	0,628
	I norm. Experimental	-1,10	0,35	6	
-120mV	I norm. Control	-0,72	0,41	17	0,921
	I norm. Experimental	-1,37	0,40	6	
-140mV	I norm. Control	-0,83	0,44	16	0,527
	I norm. Experimental	-1,55	0,47	6	
-160mV	I norm. Control	-1,30	0,53	16	0,812
	I norm. Experimental	-1,88	0,58	6	

Efecto de 1mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Luego de evaluar el efecto de 0,5mM de ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} se agregó de nuevo 0,5mM ATP-Mg a la cámara experimental, de forma de observar el efecto de 1mM sobre la permeabilidad del mecanismo. Se pudo observar que el efecto de 1mM de ATP-Mg es mayor en el modo de entrada de K^+ (potencial de membrana negativo), es decir, la pendiente de la recta a potenciales negativos es mayor en un 47,46% que la pendiente a potenciales positivos (Fig. 33). Por otra parte, la pendiente de la recta en el modo de salida de K^+ es igual en presencia de 0,5mM y 1mM de ATP, mientras que la pendiente en el modo de entrada aumenta un 132% respecto a la condición control en el modo de entrada de K^+ .

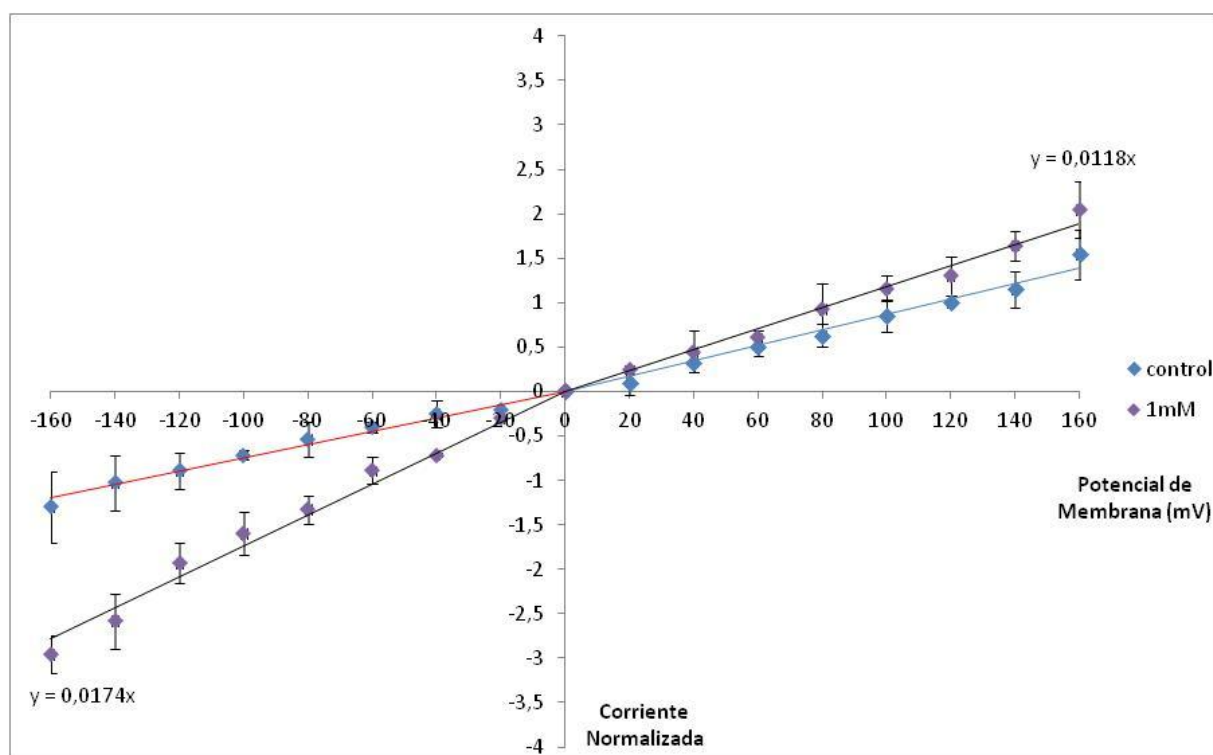


Figura 33. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 1mM ATP-Mg. Los datos desde -160 hasta 0mV fueron obtenidos al aplicar el protocolo INST-A y los puntos desde 0 a +160mV fueron obtenidos con el protocolo INST-B. Los puntos en azul (♦) representan la condición control (n=17).

Los puntos en morado (♦) representan la condición experimental (n=5). Barras de error estándar. 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^+ ; mientras que en el modo de salida de K^+ la pendiente se mantiene igual que en presencia de 0,5mM ATP.

En la siguiente tabla se reportan los valores de p obtenidos al comparar las corrientes instantáneas obtenidas en la condición control con las obtenidas en presencia de 1mM de ATP (Tabla 9). Las diferencias sólo fueron significativas a voltajes negativos (modo de entrada de K^+).

Tabla 9. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 1mM ATP con el protocolo INST. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas IV 1 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,65	0,37	16	0,184
	I norm. Experimental	2,05	0,38	4	
140mV	I norm. Control	1,15	0,28	17	0,178
	I norm. Experimental	1,64	0,27	5	
100mV	I norm. Control	0,75	0,18	17	0,689
	I norm. Experimental	1,16	0,17	5	
80mV	I norm. Control	0,59	0,13	17	0,422
	I norm. Experimental	0,93	0,45	5	
60mV	I norm. Control	0,51	0,11	17	0,044
	I norm. Experimental	0,61	0,12	5	
40mV	I norm. Control	0,33	0,10	17	0,424
	I norm. Experimental	0,45	0,25	5	
-60mV	I norm. Control	-0,40	0,06	17	0,050
	I norm. Experimental	-0,89	0,15	5	
-80mV	I norm. Control	-0,54	0,24	17	0,012
	I norm. Experimental	-1,33	0,16	4	
-100mV	I norm. Control	-0,71	0,05	17	0,029
	I norm. Experimental	-1,59	0,24	4	
-120mV	I norm. Control	-0,72	0,41	17	0,019
	I norm. Experimental	-1,93	0,23	3	
-140mV	I norm. Control	-0,83	0,44	16	0,027
	I norm. Experimental	-2,58	0,31	3	
-160mV	I norm. Control	-1,30	0,53	16	0,005
	I norm. Experimental	-2,96	0,21	3	

Efecto de 1,5mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Posterior al estudio de 1mM de ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador, se agregaron 0,5mM de ATP a la cámara a fin de obtener una concentración final de 1,5mM de ATP-Mg. Al aplicar el protocolo INST se obtuvo la gráfica 34, en donde se observa que la permeabilidad en el modo de salida de K^+ es igual que la permeabilidad en presencia de menores concentraciones de ATP-Mg ($0,115mV^{-1}$); mientras que en el modo de entrada de K^+ la permeabilidad es superior a la registrada con 0,5 y 1mM de ATP ($0,0223mV^{-1}$), ya que aumenta en 197,33% respecto a la pendiente en la condición control.

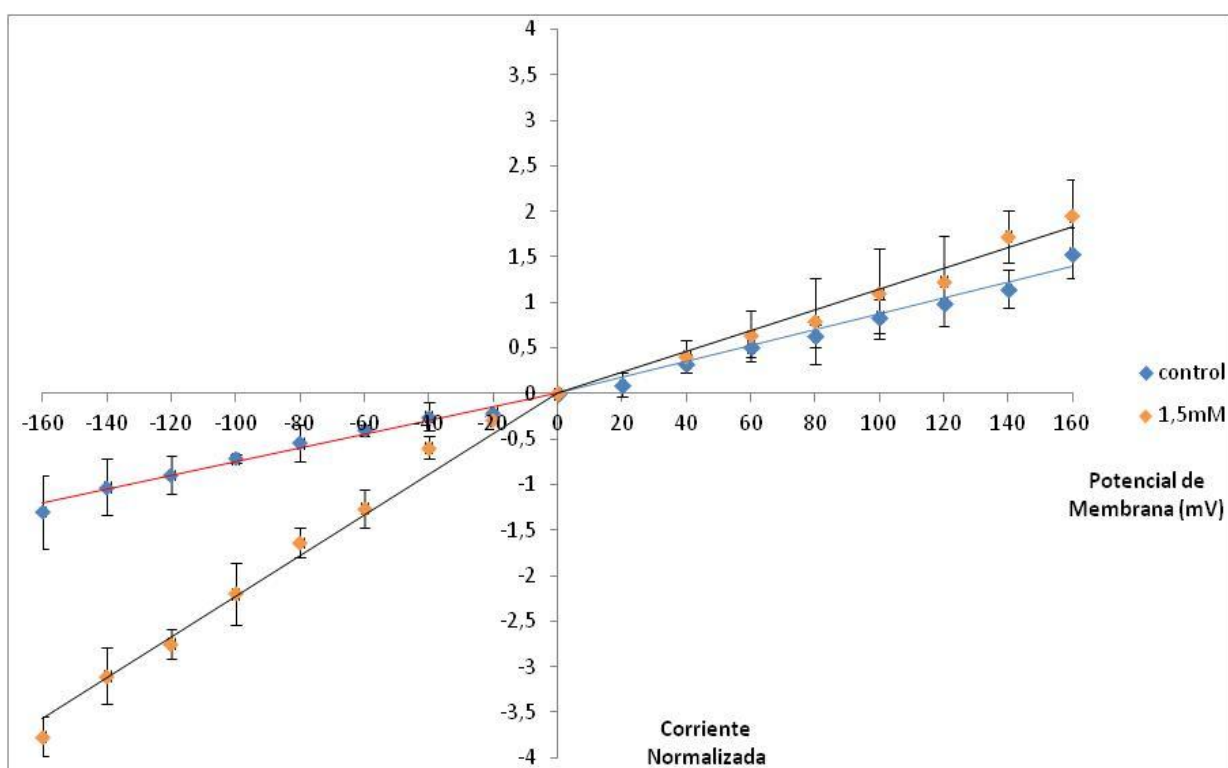


Figura 34. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 1,5mM ATP-Mg. Los datos desde -160 hasta 0mV fueron obtenidos al aplicar el protocolo INST-A y los puntos desde 0 a +160mV fueron obtenidos con el protocolo INST-B. Los puntos en azul (♦) representan la condición control (n=17). Los puntos en naranja (♦) representan la condición experimental (n=5). Barras de error estándar. 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^+ .

El tratamiento estadístico aplicado a los datos reportados anteriormente se encuentran representados en la Tabla 10, es posible observar que, al igual que en la condición experimental anterior, las diferencias fueron significativas en potenciales de membrana negativos, mientras que a potenciales positivos (modo de salida de K^+) no hubo diferencias significativas.

Tabla 10. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 1,5mM ATP con el protocolo INST. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas INST 1,5 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,65	0,37	16	0,287
	I norm. Experimental	1,95	0,40	4	
140mV	I norm. Control	1,15	0,28	17	0,193
	I norm. Experimental	1,73	0,28	4	
100mV	I norm. Control	0,75	0,18	17	0,689
	I norm. Experimental	1,10	0,50	5	
80mV	I norm. Control	0,59	0,13	17	0,0264
	I norm. Experimental	0,79	0,47	5	
60mV	I norm. Control	0,51	0,11	17	0,179
	I norm. Experimental	0,64	0,28	5	
40mV	I norm. Control	0,33	0,10	17	0,372
	I norm. Experimental	0,41	0,18	5	
-40mV	I norm. Control	-0,20	0,29	17	0,042
	I norm. Experimental	-0,59	0,13	5	
-60mV	I norm. Control	-0,40	0,06	17	0,028
	I norm. Experimental	-1,26	0,21	4	
-80mV	I norm. Control	-0,54	0,24	17	0,047
	I norm. Experimental	-1,64	0,16	4	
-100mV	I norm. Control	-0,71	0,05	17	0,041
	I norm. Experimental	-2,20	0,34	3	
-120mV	I norm. Control	-0,72	0,41	17	0,019
	I norm. Experimental	-2,75	0,17	3	
-140mV	I norm. Control	-0,83	0,44	16	0,038
	I norm. Experimental	-3,10	0,31	3	
-160mV	I norm. Control	-1,30	0,53	16	0,007
	I norm. Experimental	-3,76	0,22	3	

Efecto de 2mM ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Luego de evaluar el efecto de 1,5mM de ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador, se agregaron 0,5mM más de ATP-Mg a la cámara, alcanzando una concentración de 2mM ATP-Mg en el interior celular. En la gráfica 35 se encuentra representado el efecto de 2mM de ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador en el modo de salida de K^+ , se observa que la pendiente aumenta en presencia de ATP-Mg en un 40,23% respecto a la pendiente en condición control ($0,0122mV^{-1}$). No obstante, el valor de la pendiente es muy similar al de los valores calculados con concentraciones menores de ATP-Mg.

No fue posible registrar las corrientes instantáneas del intercambiador en el modo de entrada de K^+ con 2mM de ATP-Mg, debido a que las corrientes desarrolladas por el intercambiador, sobrepasaban la capacidad de medición del equipo, es por esta razón que sólo se encuentran representados los valores de corriente en el modo de salida de K^+ .

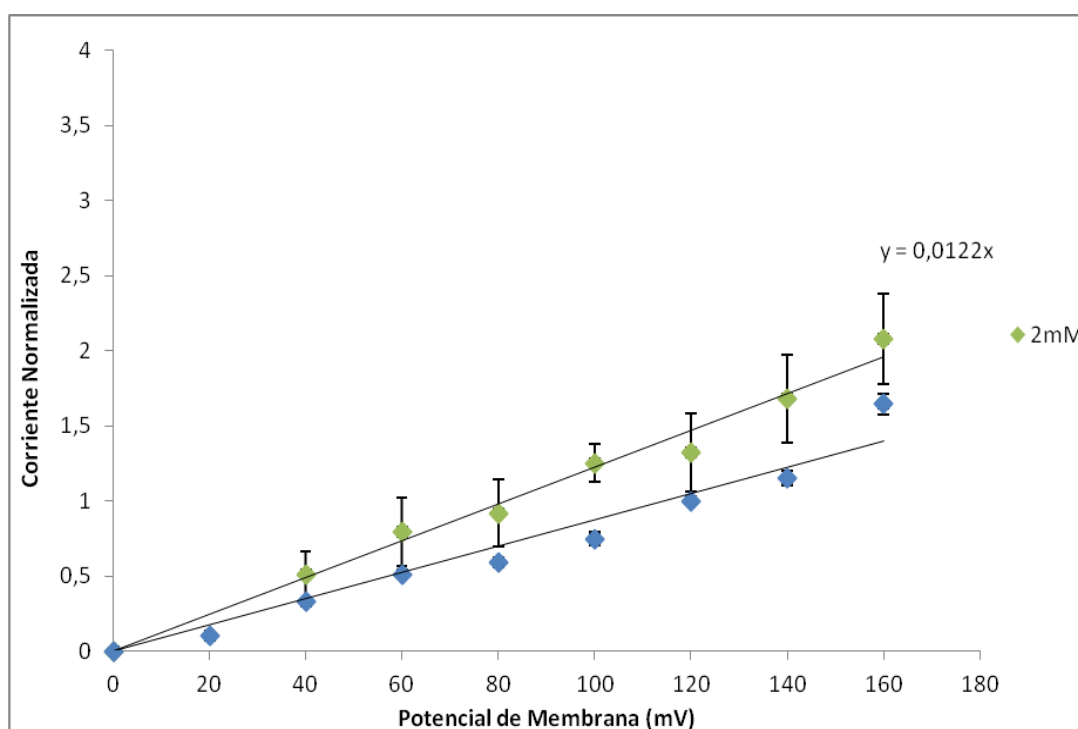


Figura 35. Relación de Corriente Normalizada vs. Potencial de Membrana con 2mM ATP-Mg. Los datos fueron obtenidos con el protocolo INST-B. Los puntos en azul (◆) representan la condición control (n=17). Los puntos en naranja (♦) representan la condición experimental (n=4). Barras de error estándar. La permeabilidad del intercambiador aumenta en presencia de ATP-Mg respecto a la pendiente en condición control.

En la tabla 11 se presentan los valores de p obtenidos al comparar las corrientes instantáneas en presencia de 1mM de ATP-Mg con las corrientes instantáneas en la condición control, se puede observar que las diferencias son no significativas.

Tabla 11. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 2mM ATP con el protocolo INST. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Curvas INST en el modo de salida de K^+ 2 mM ATP-Mg					
		Medias	D. E.	n	p
160mV	I norm. Control	1,65	0,37	16	0,723
	I norm. Experimental	2,08	0,60	3	
140mV	I norm. Control	1,15	0,28	17	0,823
	I norm. Experimental	1,68	0,58	4	
100mV	I norm. Control	0,75	0,18	17	0,284
	I norm. Experimental	1,25	0,25	4	
80mV	I norm. Control	0,59	0,13	17	0,369
	I norm. Experimental	0,92	0,44	4	
60mV	I norm. Control	0,51	0,11	17	0,059
	I norm. Experimental	0,80	0,46	4	
40mV	I norm. Control	0,33	0,10	17	0,074
	I norm. Experimental	0,51	0,31	4	

En la Tabla 12 se encuentra, de forma resumida, el efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} . Se presentan las diferentes pendientes obtenidas al aplicar el protocolo INST en presencia de 0; 0,5; 1; 1,5 y 2mM de ATP-Mg.

Se observa que la pendiente en el modo de salida de K^+ aumenta en presencia de ATP-Mg, sin embargo, no varía en el intervalo de concentraciones de ATP-Mg empleadas. Esto implica que el efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador en el modo de salida de K^+ ya se ha alcanzado con 0,5mM de ATP-Mg, lo que quiere decir que la K_m del mismo se encuentra en el orden de las decenas o centenas de μM .

Por otro lado, en el modo de entrada de K^+ , la pendiente aumenta a medida que se eleva la concentración de ATP-Mg, sin alcanzar la saturación en el intervalo de concentraciones usadas, esto indica que la K_m se encontraría en el orden de los mM, por lo menos un orden de magnitud mayor que la K_m para el modo de salida de K^+ (Tabla 12).

En la tabla 12 se presenta la relación (Pendiente V_m^+) / (Pendiente V_m^-); se observa cómo la relación empieza en 1,16 en la condición control y luego disminuye hasta llegar a 0,5 en presencia de 1,5mM de ATP. Esto indica que, en un inicio, la permeabilidad es ligeramente mayor en el modo de salida de K^+ y que luego se invierte a medida que se aumenta la concentración de ATP-Mg en el compartimiento intracelular.

Tabla 12. Efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} .

	Control	0,5mM	1mM	1,5mM	2mM
Pendiente en el modo salida de K^+ (mV^{-1})	0,0087	0,0119	0,0118	0,0115	0,0122
Pendiente en el modo entrada de K^+ (mV^{-1})	0,0075	0,0111	0,0174	0,0223	-
Relación <u>pendiente modo salida K^+</u> Pendiente modo entrada K^+	1,16	1,0721	0,6782	0,5157	-

En la Tabla 13 se muestra el % de aumento de cada una de las pendientes obtenidas en condiciones experimentales respecto a las obtenidas en la condición control. En el modo de salida de K^+ las pendientes varían entre un 32 y un 40% respecto a la condición control, esto muestra claramente que el hecho de aumentar la concentración de ATP-Mg intracelular, en este intervalo de concentraciones, no cambia la permeabilidad del intercambiador. Por otro lado, en el modo de entrada de K^+ , la pendiente aumenta en un 48% en presencia de 0,5mM de ATP-Mg y un 132 y 197% en presencia de 1 y 1,5mM ATP, respectivamente.

Tabla 13. % aumento de las pendientes en condiciones experimentales respecto a la pendiente en condición control.

	0,5mM	1mM	1,5mM	2mM
% Aumento pendiente en el modo salida de K⁺ respecto al control	36,78	35,63	32,18	40,23
% Aumento pendiente en el modo entrada de K⁺ respecto al control	48	132	197,33	-

Efecto del ATP-Mg²⁺ sobre la Activación del Intercambiador K⁺/Ca²⁺

Para poder estudiar el efecto del ATP-Mg sobre el proceso de activación del intercambiador, es necesario comparar las corrientes obtenidas aplicando el protocolo I vs. V (corrientes totales) con las corrientes obtenidas al aplicar el protocolo INST. Las corrientes obtenidas con el protocolo I vs. V poseen una forma sigmoide respecto al potencial de membrana debido a la activación del intercambiador la cual es dependiente de voltaje; mientras que las corrientes instantáneas son lineales debido a que el intercambiador ha sido activado previamente con un pulso activante; por lo que al medir las corrientes al inicio del pulso de prueba, la activación por potencial es igual para todas las condiciones. Al comparar estas curvas, se observa que la diferencia entre ellas representa el proceso de activación del intercambiador y el efecto que el ATP-Mg tiene sobre éste en las diferentes condiciones estudiadas.

Como los experimentos en donde se evalúa el efecto del ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador y sobre su permeabilidad se hicieron por separado, se observó al comparar las curvas que las corrientes totales eran mayores que las INST en algunos puntos. Estos errores debidos a la comparación entre los datos con unos controles que no provienen del mismo experimento, se corrigieron normalizando los valores de I vs. V a $\pm 160\text{mV}$ a los valores de INST del mismo potencial, puesto que por definición, al usar como valor del pulso activante $\pm 160\text{mV}$, los valores de corriente instantánea a $\pm 160\text{mV}$ deben ser iguales a los valores de corriente desarrollados con el protocolo I vs. V en ese potencial. Por esta razón, los valores de corriente a $\pm 160\text{mV}$ son iguales a los valores de corriente instantánea.

En la figura 36, se presentan las corrientes instantáneas en la condición control, se observa que los puntos forman una recta; mientras que los ajustes de las corrientes totales adoptan una forma sigmoideal respecto al potencial. La diferencia observada entre las curvas se debe al proceso de activación, el cual es dependiente de potencial.

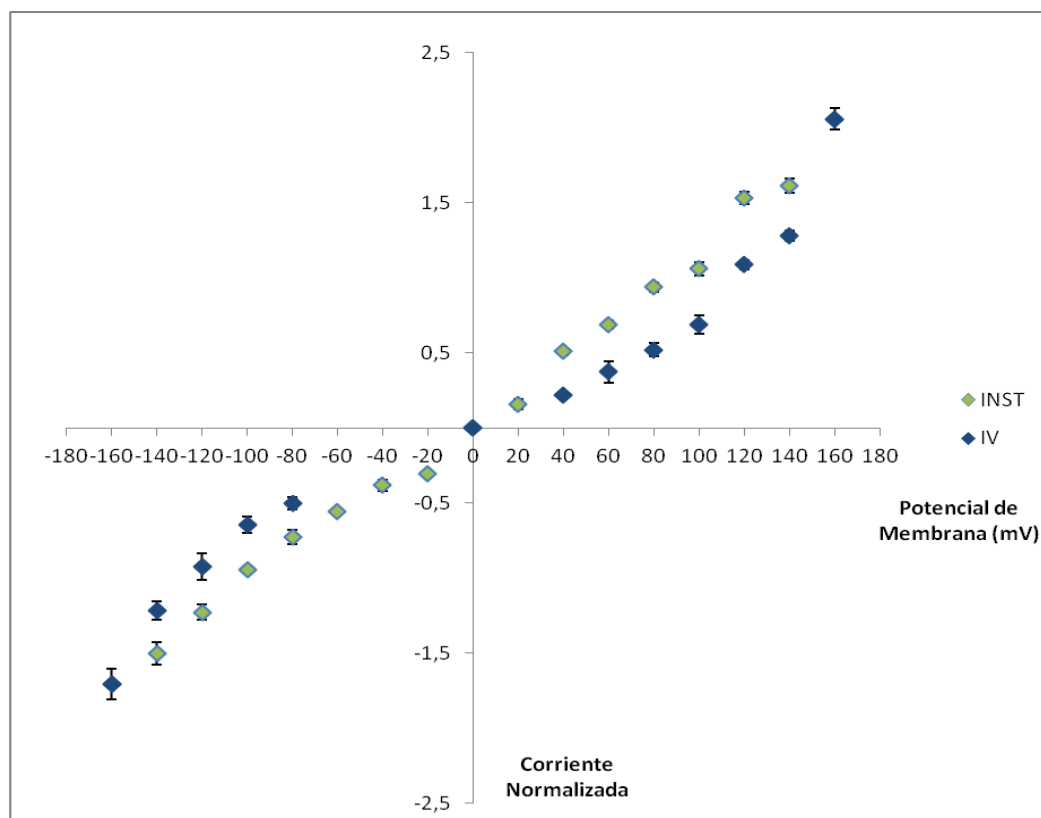


Figura 36. Relación entre las curvas de corriente instantáneas normalizadas con las corrientes IV normalizadas en condición control. Los puntos en verde (♦) representan los datos obtenidos con el protocolo INST en la condición control (n=17). Los puntos en azul (♦) representan el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo I vs V en la condición control (n=15). Barras de error estándar. Se observa que las corrientes instantáneas forman una recta, mientras que las corrientes IV adoptan una forma sigmoideal, la diferencia entre estas corrientes es la activación dependiente de potencial del intercambiador.

Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Se compararon las corrientes instantáneas INST con los ajustes realizados a las corrientes obtenidas IV, ambos en presencia de 0,5mM ATP-Mg (Fig. 37). Se observó que las curvas de corrientes totales comportan de forma muy similar a la observada en la condición control ya que éstas mantienen su forma sigmoideal respecto al potencial de membrana. La diferencia entre las curvas obtenidas con el protocolo I vs. V y las instantáneas es muy similar a la observada en la condición control.

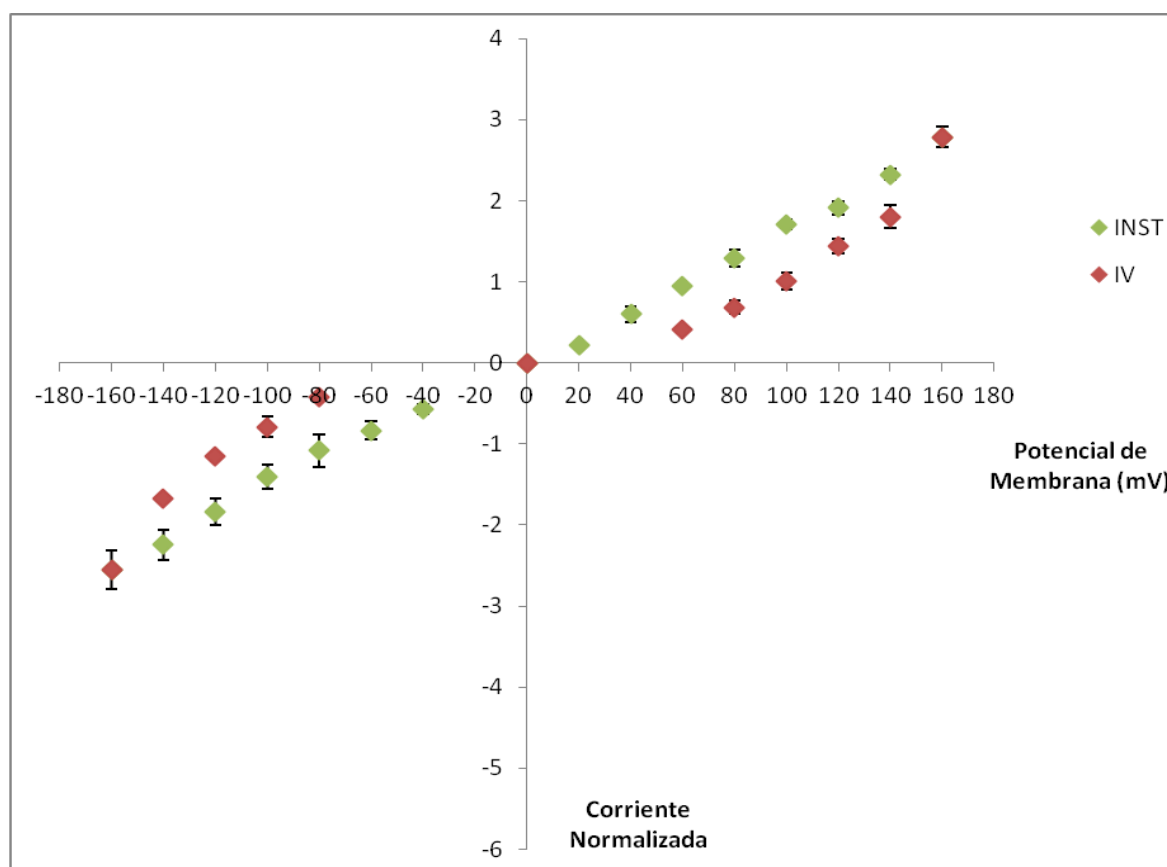


Figura 37. Relación entre las curvas de corriente instantáneas con las corrientes totales con 0,5mM ATP-Mg. Los puntos en verde (♦) representan los datos obtenidos con el protocolo INST en la condición control (n=7). Los puntos en rojo (♦) representan el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo I vs V en la condición control (n=12). Barras de error estándar. Las corrientes instantáneas forman una recta, mientras que las corrientes IV adoptan una forma sigmoideal, el comportamiento de las curvas es muy similar al observado en la condición control.

Efecto de 1mM ATP-Mg sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Al comparar las corrientes instantáneas con los ajustes de las corrientes totales en presencia de 1mM ATP se observa que las curvas de corrientes totales en el modo de salida de K^+ se asemejan a la recta de las corrientes instantáneas (Fig. 38), lo que indica que el ATP-Mg tiene un efecto más marcado sobre el proceso de activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en el modo de salida de K^+ .

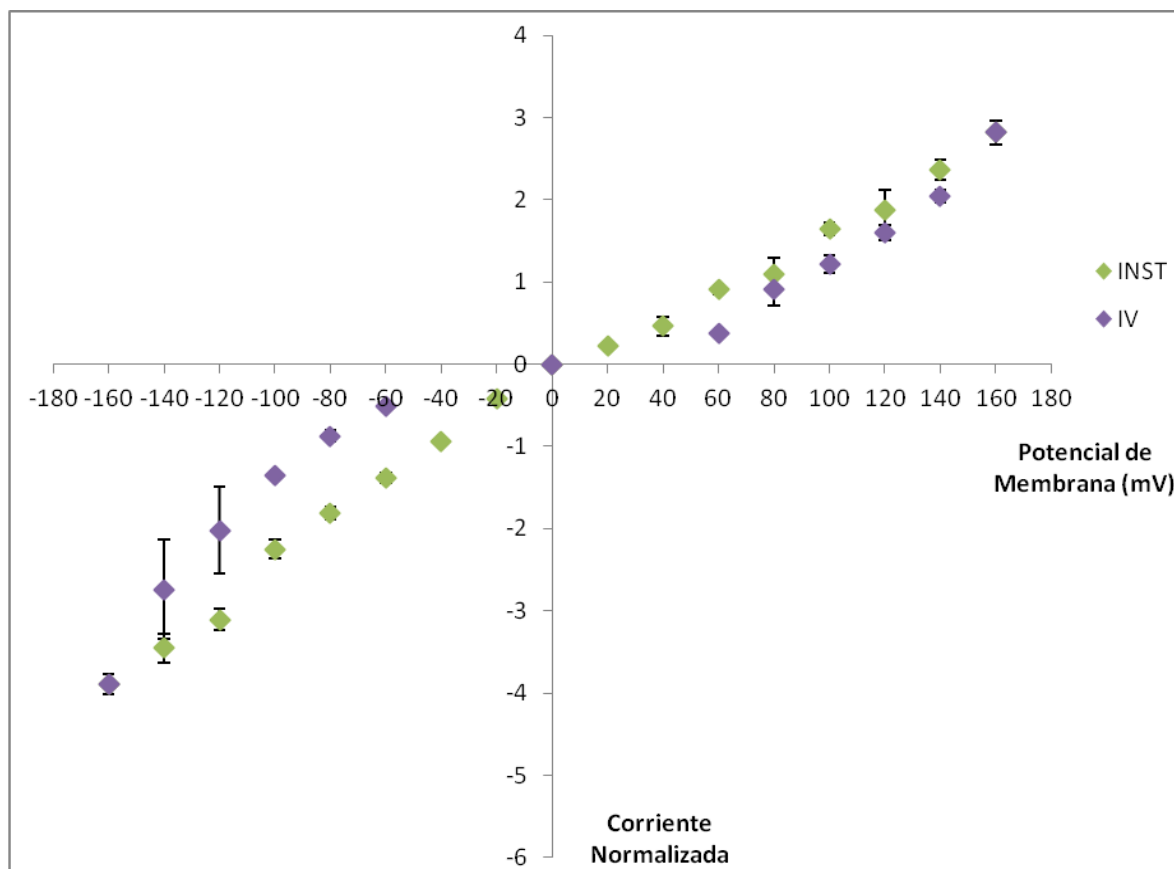


Figura 38. Relación entre las curvas de corriente instantáneas con las corrientes totales con 1mM ATP-Mg.

Los puntos en verde (♦) representan los datos obtenidos con el protocolo INST en la condición control (n=5). Los puntos en morado (♦) representan el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo I vs V en la condición control (n=6) con barras de error estándar. La diferencia entre las curvas de corrientes totales y las instantáneas es menor que en la condición control y que en presencia de 0,5mM ATP, presentando un efecto más marcado en el modo de salida de K^+ .

Efecto de 1,5mM ATP-Mg sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

En la figura 39 se observa que la forma de las curvas de corrientes totales en el modo de salida de K^+ se asemeja a la recta de las corrientes instantáneas, lo que implica que el ATP-Mg tiene un efecto sobre la activación del intercambiador. En el modo de entrada de K^+ , las corrientes totales tienden a acercarse a las corrientes instantáneas pero en menor proporción que las corrientes a voltajes positivos.

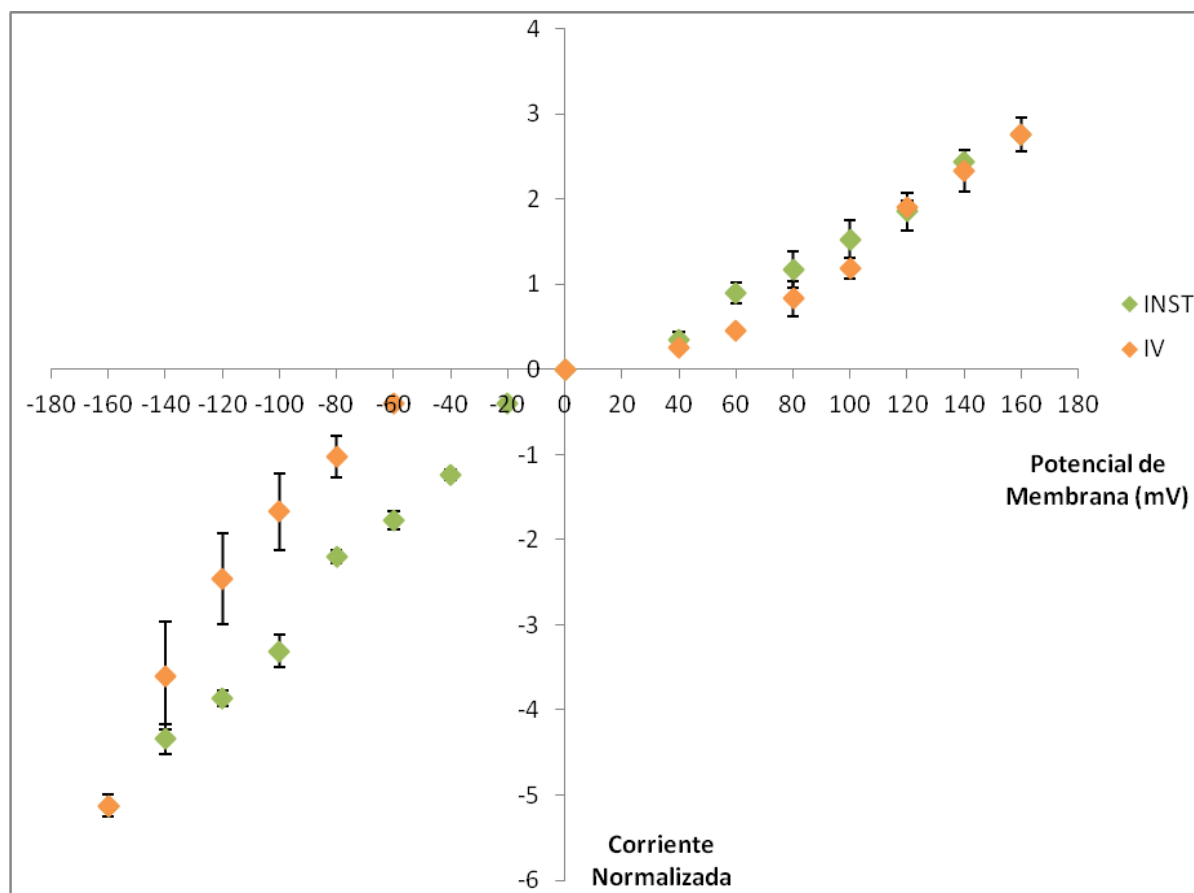


Figura 39. Relación entre las curvas de corriente instantáneas con las corrientes totales con 1,5mM ATP-Mg. Los puntos en verde (♦) representan los datos obtenidos con el protocolo INST en la condición control (n=5). Los puntos en anaranjado (♦) representan el ajuste de los datos obtenidos con el protocolo I vs V en la condición control (n=5). Barras de error estándar. Las corrientes instantáneas forman una recta, mientras que las corrientes totales adoptan una forma sigmoidal, la diferencia entre estas corrientes es menor que en la condición control y que en presencia de 1mM ATP.

Estos resultados indican que el efecto del ATP-Mg sobre la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} es dosis dependiente y actúa en el modo de salida de K^+ . En la Tabla 14 se representan los porcentajes de las corrientes totales respecto a las corrientes instantáneas a medida que se aumenta la concentración de ATP-Mg en la cámara.

Tabla 14. Porcentajes de las corrientes IV respecto a las corrientes instantáneas en presencia de diferentes concentraciones de ATP-Mg.

Potencial de membrana (mV)	Control (%)	0,5mM ATP-Mg (%)	1mM ATP-Mg (%)	1,5mM ATP-Mg (%)
160	100	100	100	100
140	79,55	77,72	86,38	95,87
120	70,97	75,41	85,94	102,43
100	64,68	58,75	73,55	77,89
80	55,59	53,07	82,67	70,65
60	54,33	44,17	40,59	51,32
40	42,81	--	--	72,29
-60	--	--	37,08	22,94
-80	58,00	39,55	48,36	46,50
-100	57,78	56,47	59,87	50,54
-120	63,48	62,35	65,08	63,54
-140	68,36	74,46	79,41	82,89
-160	100	100	100	100

Efecto del ATP-Mg²⁺ sobre el Desarrollo Temporal de la Desactivación del Intercambiador K⁺/Ca²⁺

Para estudiar el desarrollo temporal de la desactivación del Intercambiador K⁺/Ca²⁺ se ejecutó el protocolo DEAC el cual consistió en aplicar dos pulsos idénticos de $\pm 160\text{mV}$ con un tiempo entre cada pulso variable, desde 0 a 5500mseg en DEAC-A (potencial de membrana negativo) y desde 0 a 3000mseg en DEAC-B (potencial de membrana positivo), en pasos de 500mseg.

De acuerdo a los resultados obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-A, el intercambiador se desactiva en el tiempo con una constante de tiempo “ τ ” de 2245,38mseg (Fig. 40).

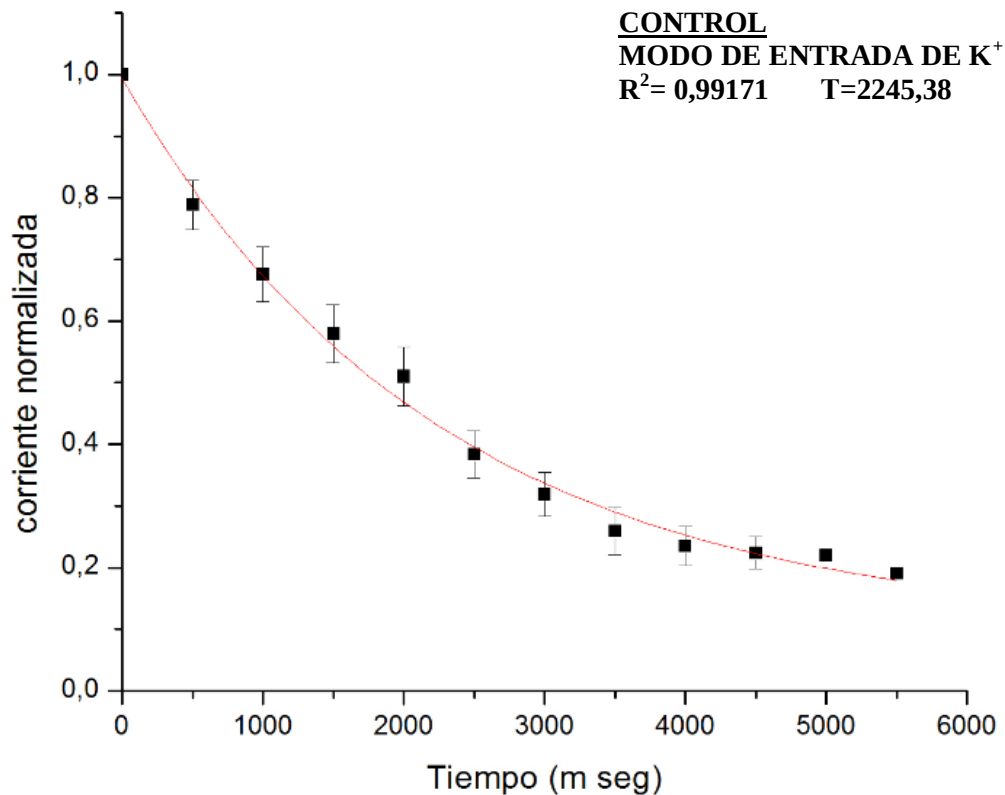


Figura 40. Relación de Corriente Normalizada vs. Tiempo de desarrollo de la desactivación en condición control. Los datos fueron obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-A. Los puntos en negro (■) representan la condición control (n=17). La línea roja representa la línea de tendencia exponencial (-). Barras de error estándar. La corriente decae de forma exponencial con el tiempo con un $\tau=2245,38\text{mseg}$.

Al aplicar el protocolo DEAC-B se obtuvo una curva que presenta un comportamiento similar al obtenido con el protocolo DEAC-A, con una constante de tiempo τ fue de 1021,15mseg (Fig. 41). Estos resultados indican que la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} es más rápida a potenciales positivos, ya que se puede observar que al aplicar el protocolo DEAC-B ($V_m > 0$) la corriente remanente a 3000mseg se encuentra cercana al 3% de la corriente inicial. Por otro lado, al aplicar el protocolo DEAC-B la corriente tarda 5000mseg en alcanzar un 20% de la corriente inicial.

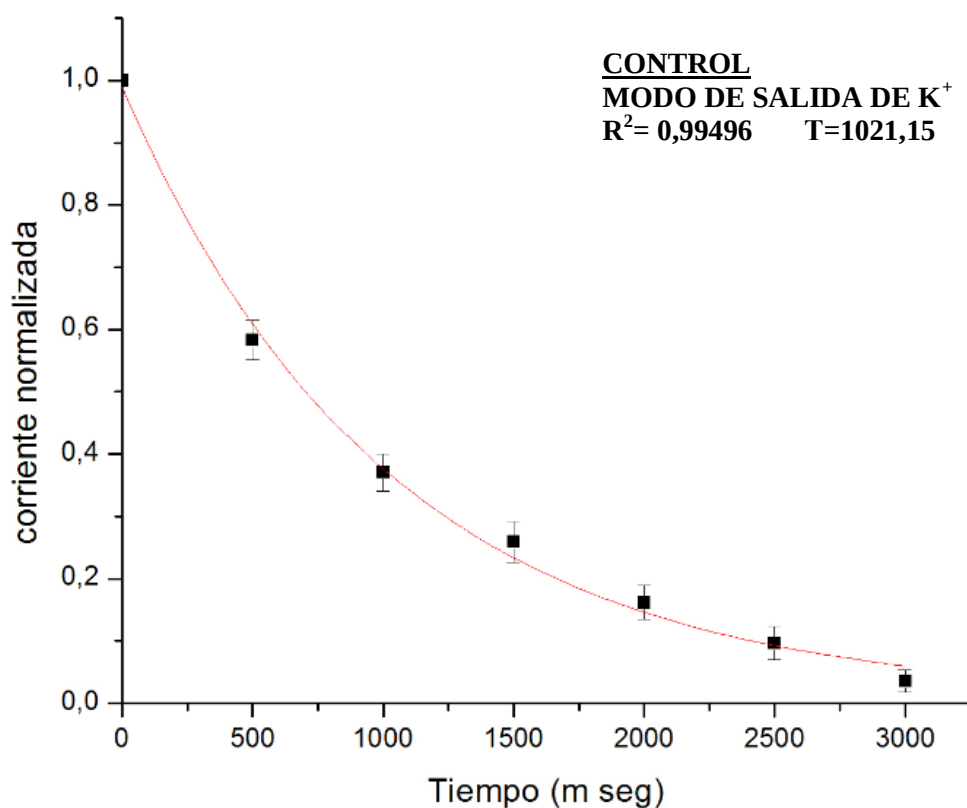


Figura 41. Relación de Amplitud Normalizada vs. Tiempo de desarrollo de la desactivación en condición control. Los datos fueron obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-B. Los puntos en negro (■) representan la condición control (N=17) la línea roja (-) representa la línea de tendencia exponencial. Barras de error estándar. La corriente decae de forma exponencial, hasta los 3000mseg. $\tau=1021,15$ mseg.

Efecto de 0,5mM ATP-Mg sobre el Desarrollo Temporal de la Desactivación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Al aplicar el protocolo DEAC-A en presencia de 0,5mM de ATP-Mg se observó que el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador se mantuvo similar al presentado en la condición control con una $\tau=2205,02\text{mseg}$ (Fig. 42)

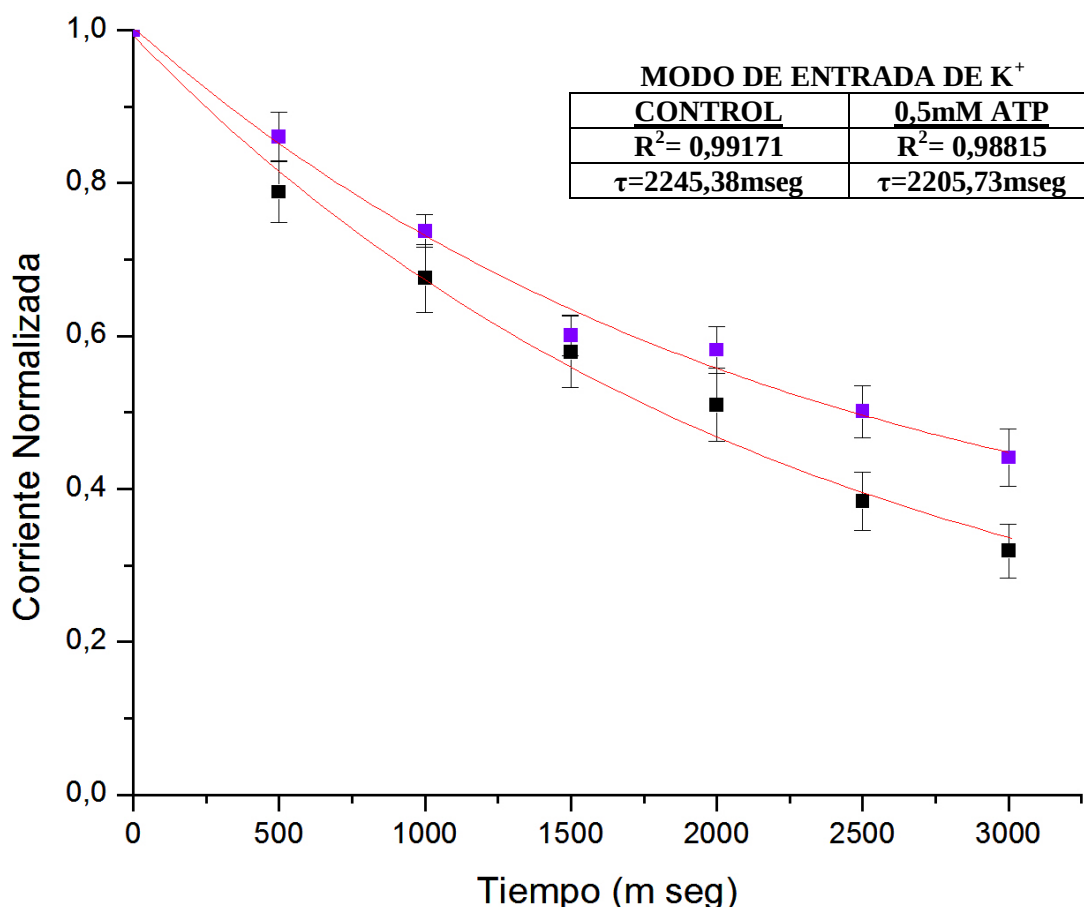


Figura 42. Relación de Corriente Normalizada vs. Tiempo de desarrollo de la desactivación con 0,5mM ATP-Mg. Los datos fueron obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-A. Los puntos en negro (■) representan la condición control (n=17). Los puntos morados (■) la condición experimental (n=8). La línea roja (-) representa la línea de tendencia exponencial. Barras de error estándar. La diferencia entre las tendencias es no significativa.

En la tabla 15 observamos el análisis estadístico de las corrientes reportadas en la figura 42. La estadística revela que las diferencias entre los valores de la corriente en condición control y los valores de la corriente después de agregar 0,5mM de ATP-Mg a la cámara no son significativas.

Tabla 15. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 0,5mM ATP en el modo de entrada de K⁺. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Desarrollo temporal de la desactivación en el modo de entrada de K⁺ ATP-Mg 0,5mM.					
		Medias	D. E.	n	<i>p</i>
500ms	I norm. Control	0,79	0,17	17	0,351
	I norm. Experimental	0,86	0,09	8	
1000ms	I norm. Control	0,68	0,18	17	0,573
	I norm. Experimental	0,74	0,06	8	
1500ms	I norm. Control	0,58	0,19	17	0,749
	I norm. Experimental	0,60	0,08	8	
2000ms	I norm. Control	0,51	0,20	17	0,421
	I norm. Experimental	0,58	0,09	8	
2500ms	I norm. Control	0,38	0,16	16	0,325
	I norm. Experimental	0,50	0,10	8	
3000ms	I norm. Control	0,32	0,15	16	0,267
	I norm. Experimental	0,44	0,11	8	

Al aplicar el protocolo DEAC-B se observa que el intercambiador se desactiva más lento en presencia de 0,5mM de ATP que en la condición control, el ajuste exponencial en la condición experimental presenta un $\tau = 1231,73\text{mseg}$ (Fig. 43).

Las diferencias entre los valores en la condición control y en presencia de ATP-Mg son significativas a partir de los 2000mseg (Tabla 16).

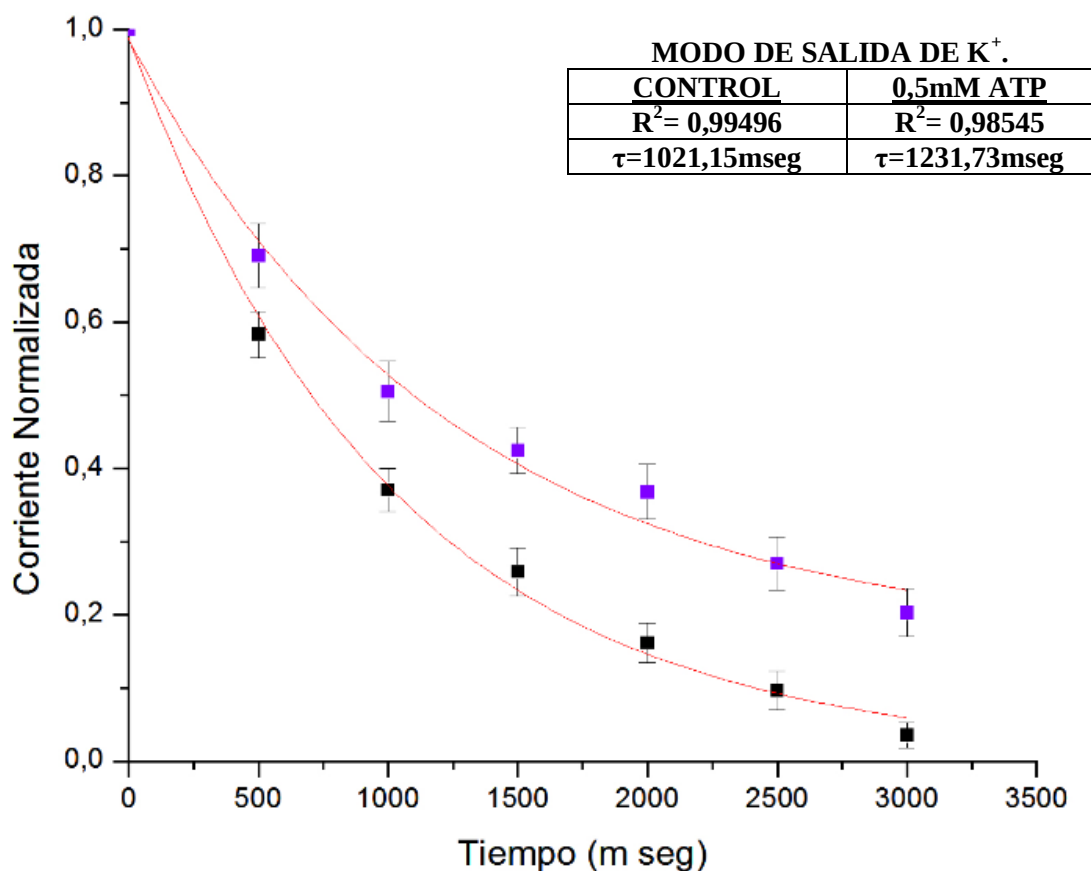


Figura 43. Relación de Corriente Normalizada vs. Tiempo de desarrollo de la desactivación con 0,5mM ATP-

Mg. Los datos fueron obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-B. Los puntos en negro (■) representan la condición control (n=17). Los puntos en morado (■) la condición experimental (n=9). La línea roja (-) representa la línea de tendencia exponencial. Barras de error estándar. En presencia de ATP-Mg y en el modo de salida de K⁺, el intercambiador se desactiva más lento respecto al tiempo.

Tabla 16. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 0,5mM ATP en el modo de salida de K⁺. Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Desarrollo temporal de la desactivación en el modo de salida de K ⁺ ATP-Mg 0,5mM.					
		Medias	D. E.	n	<i>p</i>
500ms	I norm. Control	0,52	0,13	17	0,733
	I norm. Experimental	0,65	0,13	9	
1000ms	I norm. Control	0,31	0,12	17	0,328
	I norm. Experimental	0,49	0,12	9	
1500ms	I norm. Control	0,21	0,14	17	0,127
	I norm. Experimental	0,39	0,10	9	
2000ms	I norm. Control	0,16	0,11	17	0,041
	I norm. Experimental	0,37	0,11	9	
2500ms	I norm. Control	0,10	0,11	17	0,024
	I norm. Experimental	0,27	0,11	9	
3000ms	I norm. Control	0,04	0,07	17	0,050
	I norm. Experimental	0,19	0,09	8	

Posterior a la evaluación del efecto de 0,5mM de ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador se agregaron 0,5mM de ATP-Mg adicionales a la cámara, de forma que se alcanzó una concentración de 1mM ATP-Mg. Se evaluó el efecto de 1mM de ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación de este mecanismo en el modo de entrada de K^+ (potencial de membrana negativo). Los resultados se encuentran reportados en la figura 44. Se realizó un ajuste exponencial a los puntos obtenidos en la condición experimental y el τ obtenido fue muy similar al del ajuste exponencial en la condición control, lo que indica que las curvas son muy parecidas entre ellas; esto concuerda con los resultados estadísticos representados en la tabla 17, en donde las diferencias entre los datos en ambas condiciones no son significativas.

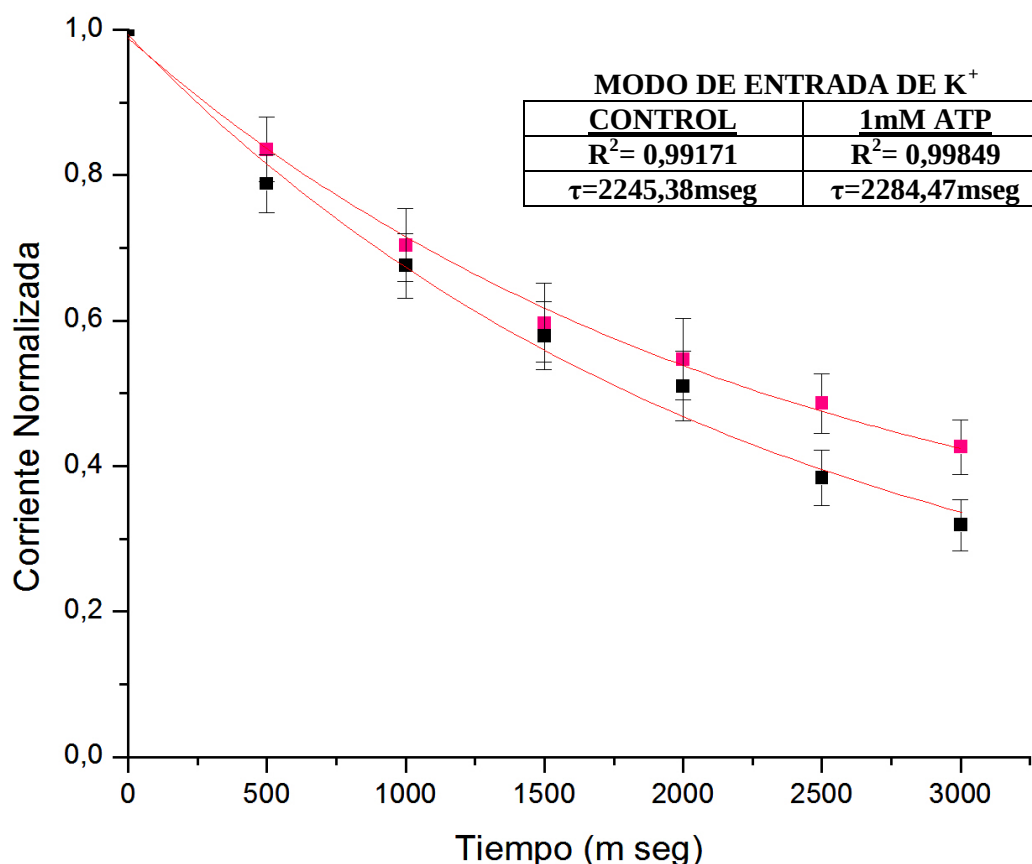


Figura 44. Relación de Corriente Normalizada vs. Tiempo con 1mM ATP-Mg. Los datos fueron obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-A. Los puntos en negro (■) representan la condición control (n=17). Los puntos en fucsia (■) la condición experimental con 1mM ATP-Mg (n=8). La línea roja (-) representa la línea de tendencia exponencial. Barras de error estándar. La diferencia entre las tendencias no es significativa.

Tabla 17. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 1mM ATP en el modo de entrada de K^+ . Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Desarrollo temporal de la desactivación en el modo de entrada de K^+					
ATP 1mM					
		Medias	D. E.	n	p
500ms	I norm. Control	0,79	0,17	17	0,942
	I norm. Experimental	0,80	0,13	8	
1000ms	I norm. Control	0,68	0,18	17	0,942
	I norm. Experimental	0,65	0,14	8	
1500ms	I norm. Control	0,58	0,19	17	0,942
	I norm. Experimental	0,56	0,15	8	
2000ms	I norm. Control	0,51	0,20	17	0,942
	I norm. Experimental	0,51	0,16	8	
2500ms	I norm. Control	0,38	0,16	16	0,583
	I norm. Experimental	0,42	0,12	8	
3000ms	I norm. Control	0,32	0,15	16	0,267
	I norm. Experimental	0,39	0,11	8	

Luego de evaluar el efecto de 1mM sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en el modo de entrada de K^+ , se evaluó su efecto sobre el modo de salida de K^+ (Fig. 45). Los resultados obtenidos mantienen la misma tendencia que se observó cuando se estudió el efecto de 0,5mM de ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación en el modo de salida de K^+ , ya que se obtuvo que $\tau=1224,01\text{mseg}$ la cual es muy similar a la reportado en presencia de 0,5mM ATP-Mg. Los resultados estadísticos se presentan en la tabla 18, en donde se observa que las diferencias entre los resultados son significativas en 2500 y 3000mseg.

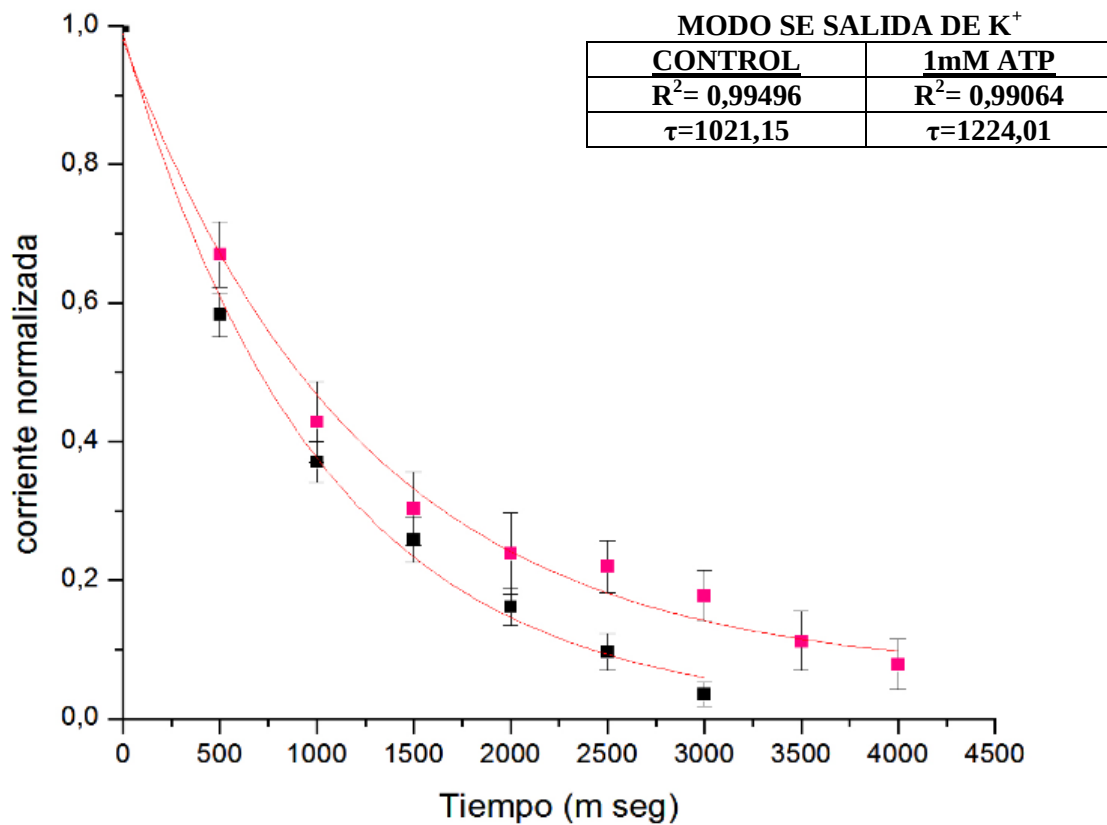


Figura 45. Relación de Corriente Normalizada vs. Tiempo de desarrollo de la desactivación con 1mM ATP-Mg. Los datos fueron obtenidos al aplicar el protocolo DEAC-B. Los puntos en negro (■) representan la condición control (n=17). Los puntos en fucsia (■) la condición experimental (n=8). La línea roja (-) representa la línea de tendencia exponencial. Barras de error estándar. En presencia de ATP y en el modo de salida de K⁺, el intercambiador se desactiva más lento respecto al tiempo.

Tabla 18. Resultados estadísticos obtenidos al aplicar la prueba de Mann-Whitney en la condición de 1mM ATP en el modo de salida de K^+ . Las diferencias son significativas con $p < 0,05$.

Desarrollo temporal de la desactivación en el modo de salida de K^+					
ATP 1mM					
		Medias	D. E.	n	P
500ms	I norm. Control	0,52	0,13	17	0,121
	I norm. Experimental	0,67	0,14	9	
1000ms	I norm. Control	0,31	0,12	17	0,267
	I norm. Experimental	0,43	0,17	9	
1500ms	I norm. Control	0,21	0,14	17	0,417
	I norm. Experimental	0,30	0,16	9	
2000ms	I norm. Control	0,16	0,11	17	0,417
	I norm. Experimental	0,24	0,18	9	
2500ms	I norm. Control	0,10	0,11	17	0,045
	I norm. Experimental	0,22	0,11	9	
3000ms	I norm. Control	0,04	0,07	17	0,033
	I norm. Experimental	0,18	0,11	8	

En la Tabla 19 se muestra el efecto del ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} . En el modo de salida de K^+ (potenciales positivos) el τ aumenta, cerca de un 20%, en presencia de ATP-Mg; sin embargo, al aumentar la concentración de ATP en el baño, los valores calculados de τ se mantienen constantes, por lo que la saturación del efecto ya se ha alcanzado a la concentración de 0,5mM de ATP-Mg. Aunque no se pudo calcular la K_m con el intervalo de concentraciones usadas, los resultados indican que el efecto sobre la desactivación del intercambiador en el modo de salida de K^+ posee una K_m alrededor de las decenas o centenas de μM .

Interesantemente, cuando se evaluó el efecto del ATP-Mg sobre la desactivación del intercambiador en el modo de entrada de K^+ no se observó ningún efecto, ya que los valores de τ se mantuvieron constantes al aumentar la concentración de ATP-Mg.

Tabla 19. Efecto del ATP-Mg sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K^+/Ca^{2+} .

	Control	0,5mM	1mM
τ en el modo de salida de K^+	1021,15	1231,73	1224,01
τ en el modo de entrada de K^+	2245,38	2205,62	2284,47

DISCUSIÓN

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

En los antecedentes se exponen diversas formas de regulación de mecanismos de transporte de membrana por parte del ATP-Mg. La modulación por parte del ATP-Mg puede ser directa (uniéndose al mecanismo) o puede ser indirecta (por medio de proteínas kinasas, por ejemplo). Debido a estas evidencias se realizó el estudio del ATP-Mg sobre las corrientes del Intercambiador K^+/Ca^{2+} .

Al aplicar el protocolo I vs. V en presencia de diferentes concentraciones se observó que las corrientes desarrolladas incrementaban con la concentración de ATP-Mg. También se observó que el comportamiento registrado en la condición control se invirtió en presencia de ATP-Mg, ya que las corrientes entrantes aumentaban en mayor proporción que las corrientes salientes (Fig. 30), es decir, que el efecto del ATP-Mg es diferente dependiendo del sentido de movimiento del K^+ , lo cual se tratará con mayor detalle en las secciones siguientes.

Este comportamiento da una idea de cómo el ATP-Mg puede estar afectando el intercambiador, ya que se nota un mayor efecto en el modo de entrada de K^+ , lo que conlleva proponer la siguiente hipótesis: dentro de los parches de membrana usados para los experimentos pueden estar algunas proteínas kinasas como una tirosin-kinasa, la cual es dependiente de ATP-Mg; esta kinasa podría fosforilar el intercambiador K^+/Ca^{2+} bien sea en el sitio de unión intracelular de los iones o en algún otro sitio del intercambiador que también se encuentre del lado intracelular y que afecte el transporte de los iones a través de la membrana. Este tipo de modulación se ha reportado para la Banda 3 (Dekowski, Rybicki, Drickamer, 1983).

Por otro lado, también existe la posibilidad de que el ATP-Mg interactúe directamente con el intercambiador en uno o más sitios de unión, como es el caso del transportador de glucosa GLUT1, (Carruthers y Helgerson, 1989).

Dentro de estas posibilidades, se hace claro que la modulación por parte del ATP-Mg ocurre desde el lado intracelular del intercambiador y el hecho de que en presencia de 4mM de ATP-Mg, el intercambiador no se encuentre saturado, indica que la modulación de la actividad del intercambiador por parte del ATP-Mg es de baja afinidad. Además, como se mencionó anteriormente, estos resultados indican que el efecto del ATP-Mg es dependiente del flujo de los iones, ya que el comportamiento es distinto en ambos sentidos de movimiento del K^+ .

Efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Para estudiar el efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} se empleó el protocolo INST. La construcción de los gráficos a partir de los datos obtenidos con este protocolo, permitió evaluar las variaciones en la permeabilidad del intercambiador producto de su interacción con el ATP-Mg; de ahí proviene la diferencia entre los gráficos obtenidos con el protocolo INST y los obtenidos con el protocolo I vs. V. Las curvas de las corrientes totales presentan una forma sigmoidal debido a su dependencia de potencial para la activación, mientras que las corrientes instantáneas forman rectas, ya que la fase de activación se elimina con un pulso activante previo al pulso de prueba.

La relación entre las pendientes en el modo de salida de K^+ respecto al modo de entrada de K^+ en cada una de las concentraciones de ATP-Mg empleadas, se encuentra en la Tabla 12 y se puede observar cómo varía la relación, de forma que en la condición control es superior a 1, lo que significa que la permeabilidad del intercambiador es mayor en el modo de salida de K^+ . Luego se observa que a medida que se aumenta la concentración de ATP-Mg en el baño, la relación disminuye hasta alcanzar 0,5 en

presencia de 1,5mM de ATP-Mg; es decir, la pendiente de la recta en el modo de salida de K^+ es aproximadamente el 50% de la pendiente en el modo de entrada de K^+ en esta condición; esto indica que la permeabilidad del intercambiador en presencia de 1,5mM de ATP-Mg en el modo de salida de K^+ es el doble de la permeabilidad en el modo de salida de este ión, lo cual es contrario a lo observado bajo la condición control.

También se observó que la permeabilidad del intercambiador es afectada de forma distinta dependiendo de la dirección del flujo de K^+ . Cuando se observa el efecto del ATP-Mg sobre la permeabilidad en el modo de salida de K^+ , se puede notar que la pendiente aumenta en presencia de ATP-Mg, sin embargo a 0,5mM de ATP-Mg ya se ha saturado el mecanismo, esto indicio de la alta afinidad por el ATP-Mg, por lo que la K_m se debe encontrar en el orden de las decenas o centenas de μM . Ahora, en el modo de entrada de K^+ , se observa que la pendiente aumenta con la concentración de ATP-Mg y no se satura con el intervalo de concentraciones de ATP-Mg usadas; esto denota la baja afinidad por el ATP e implica que la K_m estaría en el orden de las decenas o centenas de mM.

El hecho de que se observen efectos distintos sobre la permeabilidad en el modo de salida y en el modo de entrada de K^+ indica que el efecto es dependiente de la dirección del flujo de K^+ y esto a su vez indica que podrían haber dos sitios de interacción del ATP en el intercambiador: uno con una K_m en el orden de los μM que afecta la permeabilidad en el modo de entrada de K^+ y otro con una alta afinidad, en el orden de los mM, que afecta la permeabilidad del intercambiador en el otro sentido de flujo de K^+ .

Estos posibles sitios de interacción del ATP los denominaremos “A”, al sitio de interacción con alta afinidad que aumenta la permeabilidad en el modo de salida de K^+ y “B” al sitio de interacción con baja afinidad que afecta la permeabilidad del intercambiador en el modo de entrada de K^+ .

Por otro lado, es necesario recalcar que, como se mencionó en un principio, la diferencia entre los resultados obtenidos con el protocolo INST y con el protocolo I vs. V es que estos últimos reflejan tanto los cambios sobre la permeabilidad, como los cambios sobre la activación dependiente de voltaje del

intercambiador. Dicho esto, al aplicar el protocolo I vs. V se observó que las corrientes aumentaban (en ambos sentidos de movimiento de K^+) a medida que la concentración de ATP-Mg en el baño incrementaba, por lo que la diferencia observada entre el aumento de las corrientes totales y las corrientes instantáneas puede atribuirse a un efecto del ATP-Mg sobre el mecanismo responsable de la activación del intercambiador.

Como el ATP-Mg fue agregado a la cámara experimental, también se puede concluir que el ATP-Mg actúa desde el lado intracelular del intercambiador. Por otro lado, estas diferencias en los resultados son evidencias de que el mecanismo de activación es distinto de la permeabilidad del intercambiador.

Efecto del ATP-Mg²⁺ sobre la Activación del Intercambiador K^+/Ca^{2+}

Para evaluar el efecto del ATP-Mg sobre el proceso de activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} se compararon las distintas curvas obtenidas con el protocolo I vs. V con las curvas de corrientes instantáneas en cada una de las concentraciones de ATP-Mg empleadas. Se observó que, a medida que se aumenta la concentración de ATP-Mg, las corrientes totales se acercan a la recta de las corrientes instantáneas, es decir, la curva de corrientes totales se aplanan con el incremento de la concentración de ATP-Mg. Como se mencionó anteriormente, la forma sigmoidea de las corrientes totales es producto de la dependencia de potencial del intercambiador y el hecho de que la forma sigmoidea de estas curvas disminuya, haciéndose cada vez más recta en presencia de ATP-Mg, significa que éste tiene un efecto sobre la activación del intercambiador, por lo que se puede decir que el ATP-Mg disminuye la dependencia de potencial de la activación del intercambiador, en el modo de salida de K^+ .

Estos resultados soportan lo observado en datos obtenidos con el protocolo I vs. V, ya que en ambos se observa un aumento de las corrientes con las concentraciones de ATP-Mg usadas, sin embargo no

se observa la saturación del mecanismo, lo que indica que el posible sitio de unión del ATP-Mg al intercambiador posee una baja afinidad por esta molécula.

Interesantemente, al evaluar en conjunto el efecto del ATP-Mg sobre el proceso de activación y sobre el transporte (permeabilidad) del intercambiador, se observan dos efectos distintos: en cuanto a la permeabilidad, el sitio de interacción del ATP-Mg “A”, afecta el transporte con una alta afinidad en el modo de salida de K^+ y otro efecto en donde el sitio de interacción “B” afecta la permeabilidad en el modo de entrada de K^+ con una baja afinidad. Por el otro lado, se observa un efecto sobre el proceso de activación del intercambiador con una baja afinidad, muy marcado en el modo de K^+ . Es posible que el sitio de interacción del ATP-Mg “B” que afecta la permeabilidad en el modo de entrada de K^+ sea el mismo que afecta el proceso de activación del intercambiador, mientras que el sitio de alta afinidad “A” afecta sólo la permeabilidad en el modo de salida de K^+ . Debido a que los efectos observados sobre la activación y sobre el transporte del intercambiador son distintos, se puede inferir que estos mecanismos se encuentran separados dentro del mismo intercambiador y son afectados por distintos sitios de interacción con el ATP-Mg.

Efecto del ATP-Mg²⁺ sobre el Desarrollo Temporal de 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 ser afectado por el sitio de interacción “A” del ATP-Mg, ya que es el sitio con la mayor afinidad por esta molécula. Luego, 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 observado.

Al igual que en la permeabilidad, el efecto del ATP-Mg no es igual en los dos sentidos de movimiento del K^+ y en este caso en particular se observa que en el modo de salida sí hay un efecto, mientras que en el otro sentido no lo hay, este resultado implica que el efecto es dependiente del sentido de movimiento de K^+ y soporta la hipótesis de que los sitios de unión del ATP-Mg al intercambiador afectan de distintas formas los diferentes procesos del intercambiador K^+/Ca^{2+} .

A modo de resumen, se propone la existencia de dos sitios de interacción con el ATP: el sitio A el cual posee una alta afinidad (en el orden de las decenas o centenas de μM) que aumenta la permeabilidad en el modo de salida de K^+ y el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador en el modo de salida de K^+ . El sitio B, el cual presenta una baja afinidad por el ATP y su K_m debe encontrarse en el orden de las decenas o centenas de mM , el cual aumenta la permeabilidad del intercambiador en el modo de entrada de K^+ y que a su vez disminuye la dependencia de potencial de la activación del intercambiador en ambos sentidos de movimiento de K^+ . Estos sitios de interacción pueden ser sitios de unión del ATP al intercambiador, o bien sitios en donde el intercambiador es fosforilado por una proteína kinasa (inserta en la membrana).

Por otro lado, de acuerdo a las primeras evidencias reportadas sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} (Romero, 2004), las curvas que se obtienen al aplicar el protocolo I vs. V muestran que la corriente es mayor en el modo de entrada de K^+ (Fig. 7). No obstante, en los experimentos realizados en este trabajo, se observó que las corrientes del intercambiador poseen una mayor amplitud en el modo de salida de K^+ en la condición control (Fig. 24). Estas diferencias podrían ser atribuidas a la composición de las soluciones usadas ya que en este estudio se usó Mg^{2+} como componente de las soluciones empleadas en los controles y en las condiciones experimentales. La composición de las soluciones puede variar el desarrollo de las corrientes del intercambiador dependiendo de la permeabilidad

del mismo hacia los componentes del medio. Sin embargo, en estudios previos se demostró que el intercambiador K^+/Ca^{2+} es muy poco permeable al ión Mg (Matthes, 2005), por lo que el Mg^{2+} no es el causante de este comportamiento.

La gráfica construida luego de ejecutar el protocolo INST, permitió observar que la permeabilidad del intercambiador K^+/Ca^{2+} es ligeramente menor en el modo de entrada de K^+ en la condición control (Fig. 31) lo que concuerda con los resultados obtenidos con la aplicación del protocolo I vs. V bajo estas mismas condiciones. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se observó que el comportamiento de las corrientes se invirtió en presencia de ATP-Mg, de forma que las corrientes entrantes fueron mayores que las corrientes salientes.

Existe la posibilidad de que los intercambiadores empleados en este estudio sean ligeramente distintos de los usados anteriormente debido a variabilidad genética entre individuos, esto explicaría la diferencia entre las corrientes observadas en este estudio respecto a lo antes reportado; dicha variabilidad, podría variar la permeabilidad (siendo esta menor en el modo de entrada de K^+), o podría afectar el proceso de activación del intercambiador y es por esta razón que se observa que la corriente desarrollada es mayor en el modo de salida de K^+ . Es interesante observar que esta diferencia observada es compensada cuando el intercambiador funciona en presencia de ATP-Mg, ya que las corrientes en el modo de entrada de K^+ aumentan en mayor proporción a las corrientes en el modo de salida, llegando a superarlas, de esta forma, se podría pensar que en condiciones fisiológicas la corriente de los intercambiadores usados en este trabajo puedan llegar a desarrollarse como los intercambiadores empleados en los estudios reportados anteriormente.

Ahora, al relacionar este efecto observado con la Hipótesis del K^+ , propuesta en nuestro laboratorio (Romero, 2004) se puede resaltar que: en condiciones fisiológicas, el K^+ posee un gradiente electroquímico hacia el exterior celular, mientras que el Ca^{2+} presenta un gradiente electroquímico hacia el interior celular, el cual es varios órdenes de magnitud mayor al del K^+ , por lo que el intercambiador

K^+/Ca^{2+} transporta Ca^{2+} hacia el interior celular durante el paso del eritrocito a través del capilar sanguíneo. Por otro lado, la concentración de ATP-Mg en el eritrocito es cercana a 1,5mM, lo que indica que el intercambiador en condiciones fisiológicas debería tener una conductancia mayor a la observada en este estudio.

El ATP-Mg disminuye la dependencia de potencial de la activación del intercambiador, por lo que en condiciones fisiológicas, cuando el eritrocito no está en los capilares, se esperaría que el intercambiador pase K^+ hacia el exterior celular, impulsado por el gran gradiente electroquímico del Ca^{2+} y por el efecto del ATP-Mg sobre el intercambiador.

Por otro lado, el efecto del ATP-Mg sobre la desactivación del intercambiador, indica que luego de que el eritrocito abandona el capilar, el intercambiador podría continuar transportando Ca^{2+} hacia el interior en vez de desactivarse a la salida del capilar, como se propone en la hipótesis del K^+ .

CONCLUSIONES

- Al estudiar el efecto de la concentración del ATP-Mg sobre las corrientes del intercambiador K^+/Ca^{2+} se encontró que:
 - ✓ Las corrientes totales aumentan con la concentración de ATP-Mg.
 - ✓ El efecto del ATP-Mg sobre las corrientes es dependiente de la dirección de flujo de K^+ .
- La permeabilidad del intercambiador se ve afectada por el ATP-Mg de la siguiente forma:
 - ✓ El efecto en la permeabilidad del intercambiador en el modo de salida de K^+ debe poseer una K_m en el orden de las decenas o centenas de μM .
 - ✓ El efecto sobre la permeabilidad del intercambiador en el modo de entrada de K^+ debe presentar una K_m en el orden de las decenas o centenas mM .
- El ATP-Mg disminuye la dependencia de potencial de la activación del intercambiador K^+/Ca^{2+} en el modo de salida de K^+ , con una K_m en el orden de decenas o centenas de mM .
- Se presentan evidencias de que los mecanismos de activación y transporte son distintos.
- El ATP-Mg aumenta el tiempo de desactivación del intercambiador en un 20% en el modo de salida de K^+ .
- Los mecanismos responsables de la activación, desactivación y transporte en el intercambiador K^+/Ca^{2+} son susceptibles a modulación por parte del ATP-Mg desde el lado intracelular.
- Se presentan las primeras evidencias de que existen dos sitios de interacción con el ATP, uno con baja afinidad con una K_m en el orden de los mM y otro sitio con alta afinidad, que presenta una K_m en el orden de los μM que afectan los mecanismos de activación, desactivación y transporte de distintas formas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agre, P., Parker, J. C. 1989. Red Blood Cell Membranes. Structure, Function, Clinical Implications. Editorial Marcel Dekker. USA.
2. Arnaud, M. J. 2008. Update on the assessment of magnesium status. *Br. J. Nutr.* **99(3)**: S24-36.
3. Bezanilla, F., Armstrong, C. M. 1972. Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J Gen Physiol.* **60(5)**: 588-608.
4. Blaustein, M. P., Hodgkin, A. L. 1969. The Effect of Cyanide on the Efflux of Calcium from Squid Axons. *J. Physiol.* **200**: 497-527.
5. Blodgett, D. M., De Zutter, J. K., Levine, K. B., Karim, P., Carruthers, A. 2007. Structural Basis of GLUT1 Inhibition by Cytoplasmic ATP. *J. Gen. Physiol.* **2**: 157–168.
6. Berg, M. J., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2002. Biochemistry. 5ta Edición. W. H. Freeman. USA.
7. Brini, M., Carafoli, E. 2009. Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rev.* **89**: 1341–1378.
8. Brugnara, C., Tosteson, D.C. 1987. Inhibition of K⁺ transport by divalent cations in sickle erythrocytes. *Blood.* **70**: 1810-1815.
9. Brugnara, C., Franceschi, L., Alper, S. L. 1993. Inhibition of Ca²⁺-dependent K⁺ Transport and Cell Dehydration in Sick Erythrocytes by Clotrimazole and Other Imidazole Derivatives. *J Clin Invest.* **92**: 520-526.
10. Cantley, L. C., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., Guidotti, G. 1977. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* **252(21)**: 7421-3.
11. Carruthers, A., Helgerson, A. L. 1989. The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry.* **28** (21): 8337-46.
12. Collins, A., Somlyo, A. V., Hilgemann, D. W., 1990. The giant cardiac membrane patch method: stimulation of outward Na-Ca exchange current by MgATP. *J Physiol.* **424**: 27-57.

13. Daugas, E., Candé, C., Kroemer, G. 2001. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell. Death. Differ.* **8(12)**: 1131-3.
14. Dekowski, S. A., Rybicki, A., Drickamer, K. 1983. A Tyrosine Kinase Associated with the Red Cell Membrane Phosphorylates Band 3. *J Biol Chem.* **258(5)**: 2750-3.
15. Doyle D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity. *Science.* **280(5360)**:69-77.
16. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C., Suresh, S. 2010. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull* **35(5)**: 382–388.
17. DiPolo, R., Beaugé, L. 2006. Sodium/Calcium Exchanger: Influence of Metabolic Regulation on Ion Carrier Interactions. *Physiol Rev.* **86**: 155–203.
18. Escobales, N., Canessa, M. 1986. Amiloride-sensitive Na^+ transport in human red cells: evidence for a Na/H exchange system. *J Membr Biol.* **90**: 21-28.
19. Esmann, M., Skou, J.C. 1985. Occlusion of Na^+ by the Na,K-ATPase in the presence of oligomycin. *Biochem Biophys Res Commun.* **127(3)**: 857-63.
20. Falke, J. J., Chan, S. I. 1986. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors. *Biochemistry.* **25(24)**: 7888-94.
21. Filomatori, C. V., Rega, A. F. 2003. On the mechanism of activation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by ATP and acidic phospholipids. *J Biol Chem.* **278(25)**: 22265–71.
22. Forsyth, Patricia I. 2006. El intercambiador K/Ca: Efectos del ión Na y Caracterización Cinética Parcial. s.n.: Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
23. Galué, D. 2008. El intercambiador K^+/Ca^{2+} 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.
24. Garrahan, P. J., Glynn, I. M. 1967. The stoichiometry of the sodium pump. *J Physiol.* **192**: 217-235.

25. 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.* Jul **271(27)**: 16237-44.
26. Hall, A. C., Ellory, J.C. 1986. Effects of High Hydrostatic Pressure on 'Passive' Monovalent Cation Transport in Human Red Cells. *J. Membr. Biol.* 1986; **94(1)**:1-17.
27. Harrison, M. L., Rathinavelu, P., Arese, P., Geahlen, R. L., Low, P. S. 1991. Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis. *J Biol Chem.* **266(7)**: 4106-11.
28. Hilgemann, D. W., Ball, R. 1996. Regulation of cardiac Na^+/Ca^{2+} exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science.* **273** (5277):956-9.
29. Hoffman, J. P. 1997. ATP compartmentation in human erythrocytes. Review. *Curr. Opin. Hematol.* **4**:112-115.
30. Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H. y colaboradores. 2002. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282(4)**: E974-6.
31. Levine, K. B., Cloherty, E. K., Fidyk, N. J., Carruthers, A. 1998. Structural and physiologic determinants of human erythrocyte sugar transport regulation by adenosine triphosphate. *Biochemistry.* **37(35)**: 12221-32.
32. Lingrel, J. B., Kuntzweiler, T. 1994. Na^+, K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **269(31)**: 19659-62.
33. Low, P. S., Allen, D. P., Zioncheck, T. F., Chari, P., Willardson, B. M., Geahlen, R. L., Harrison, M. L. 1987. Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. *J Biol Chem.* **262(10)**: 4592-4596.
34. 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.
35. Maher, A. D., Kuchel, P. W. 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca^{2+} -activated K^+ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 1182–1197.

36. Matthes, E. 2005. Caracterización Parcial del Contratransporte K/Ca del Eritrocito Humano: Estequiometría y Efecto de Iones Mono y Divalentes. s.l. : Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
37. Mercer, R. W., Dunham, P. B. 1981. Membrane-bound ATP fuels the Na/K pump. Studies on membrane-bound glycolytic enzymes on inside-out vesicles from human red cell membranes. *J Gen Physiol.* Nov; **78(5)**: 547-68.
38. Motte, S., Piroton, S., Boeynaems, J. M. 1993. Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells. Involvement of P2y and P2u receptors in inositol phosphate response. *Circ Res.* **72 (3)**: 504-10.
39. Nelson, L. D., Cox, M. M. 2005. Lehninger Principios de Bioquímica. 4^{ta} Edición. Editorial OMEGA. USA.
40. Park, Y., Best, C. A., Auth, T., Gov, N. S., Safran, S. A., Popescu, G., Suresh, S., Feld, M. S. 2010. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. **107 (4)**: 1289–1294.
41. Peters, L. L., Shivdasani, R. A., Liu, S-C., Hanspal, M., John, K. M., Gonzalez, J. M., Brugnara, C. y colaboradores. 1996. Anion Exchanger 1 (Band 3) Is Required to Prevent Erythrocyte Membrane Surface Loss but Not to Form the Membrane Skeleton. *Cell.* **86**: 917–927.
42. 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(1)**:118-28.
43. Proverbio, F., Shoemaker, D. G., Hoffman, J. F. 1988. Functional consequences of the membrane pool of ATP associated with the human red blood cell Na/K pump. *Prog Clin Biol. Res.* **268A**:561-7.
44. Richards, D. E., Rega, A. F., Garrahan, P. J. 1978. Two classes of site for ATP in the Ca²⁺-ATPase from human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta.* **511(2)**:194-201.
45. 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.

46. Romero, J. G., Zambrano, A. R. 2008. El canal de potasio del eritrocito humano (HEMCKA) es el disparador de la senescencia y su regulación por Ca^{2+}_i es el mecanismo de seguridad. Memorias del Instituto de Biología Experimental volumen 5. Ediciones IBE. Venezuela, Caracas.
47. Romero, P. J., Ortíz, C. E., Melitto, C. 1990. Metabolic control of the K^+ Channel of Human Erythrocyte. *J Membr Biol.* 116, 19-29
48. Romero, P. J., Rojas, L. 1992. The effect of ATP on Ca^{2+} -dependent K^+ channels of human red cells. *Acta Cient Venez.* **43(1)**: 19-25.
49. Romero, P. J., Romero, E. A., Winkler, M. D. 1997. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim Biophys Acta.* **1323(1)**: 23-8.
50. Semplicini, A., Spalvins, A., Canessa, M. 1989. Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na^+/H^+ exchanger. *J Membr Biol.* **107**: 219-228.
51. Shull, G. E., Schwartz, A., Lingrel, J. B. 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ deduced from a complementary DNA. *Nature.* **316** (6030): 691-5.
52. Shull, G. E., Lane, L. K., Lingrel, J. B. 1986. Amino-acid sequence of the β -subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ deduced from a cDNA. *Nature.* **321** (6068): 429-31.
53. Sperelakis, N. 2001. Cell Physiology. 3^{ra} Edición. Editorial Academic Press. USA.
54. Sprague, R. S., Ellsworth, M. L., Stephenson, A. H., Kleinhenz, M. E., Lonigro, A. J. 1998. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am J Physiol.* **275** (5 Pt 2): H1726-32.
55. Stark, G. 2005. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol.* **205**: 1-16.
56. Stauffer, T. P., Guerini, D., Carafoli, E. 1995. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *J Biol Chem.* **270(20)**: 12184-90.
57. Tao, M., Conway, R., Cheta, S. 1980. Purification and Characterization of a Membrane-bound Protein Kinase from Human Erythrocytes. *J Biol Chem.* **255(6)**: 2563-2568.
58. Tiffert, T., Lew, V. L. 2001. Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. *Cell Calcium.* **30(5)**, 337-342

59. Weiman, E., Chamran, H. 1996. Reconstitution of human red blood cell Na/H and Na/Na exchange transport. *Am J Med Sci.* **312** (2): 47-53.
60. Yaradanakul, A., Feng, S., Shen, C., Lariccia, V., Lin, M. J., Yang, J., T. M., K., Dong, P., Yin, H. L., Albanesi, J. P., Hilgemann, D. W. 2007. Dual control of cardiac $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange by PIP2: electrophysiological analysis of direct and indirect mechanisms. *J. Physiol.* **582.3**: 991–1010.