



Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología

**EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LA ACTIVIDAD DEL  
INTERCAMBIADOR  $K^+/Ca^{2+}$  DEL ERITROCITO HUMANO**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela,  
por la bachiller Maryant Paredes.

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

Caracas, Venezuela  
Septiembre – 2012

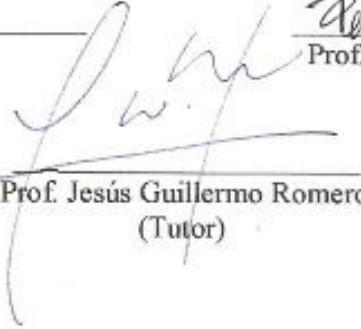
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DE LA Br. MARYANT PAREDES**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Maryant Paredes, C.I: 17650521, titulado "**Efecto del pH intracelular sobre la actividad del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  del eritrocito humano**", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos, y por lo tanto, lo declaramos aprobado con dieciocho (18) puntos.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veintisiete (27) días del mes de Septiembre del año 2012, dejando constar que el Prof. Jesús Guillermo Romero actuó como coordinador del jurado examinador.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Vicenza Cervino  
(Jurado)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Fernando Gonzalez  
(Jurado)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jesús Guillermo Romero  
(Tutor)

## RESUMEN

El eritrocito humano (EH) es una célula altamente especializada en el transporte de oxígeno que posee un pH intracelular de 7,2 y una vida media de 120 días. La elevación de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se ha asociado con la senescencia del EH a pesar de que poco se conoce sobre las vías de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana de esta célula. En nuestro laboratorio se ha propuesto una hipótesis (La hipótesis del  $\text{K}^+$ ), en la que el paso del eritrocito por el capilar ocasiona un estrés mecánico que aumenta la permeabilidad del  $\text{K}^+$ . Esto despolariza la membrana y activa al Intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  (voltaje-dependiente) que introduce  $\text{Ca}^{2+}$  al EH. Utilizamos el T.U.G.O Patch Clamp para medir las corrientes generadas por el intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  al realizar cambios de pH en el lado citoplasmático a 6,7; 6,3 y 5,9. Los resultados obtenidos muestran que a pH más ácido, hay un aumento en la magnitud de las corrientes cuando la dirección del  $\text{K}^+$  es saliente mientras que cuando dicho ion entra, observamos una disminución en la magnitud de las corrientes. En cuanto a la desactivación tenemos que a pH 6,7 el desarrollo temporal es más lento. Proponemos la existencia de más de un residuo de Histidina en la estructura de la proteína afectados por la variable pH que afectan el flujo de  $\text{K}^+$ .

## INDICE

<u>Introducción</u> . . . . .	9
El Eritrocito Humano. . . . .	9
Transportadores reportados en la membrana del eritrocito humano. . . . .	14
Senescencia del eritrocito humano. . . . .	21
<u>Antecedentes</u> . . . . .	24
<u>Objetivos</u>	
Objetivo General. . . . .	32
Objetivos Específicos. . . . .	32
<u>Materiales y Métodos</u>	
Material Biológico. . . . .	33
Soluciones. . . . .	33
Medidas Electrofisiológicas. . . . .	34
<b>T.U.G.O. Patch Clamp</b> . . . . .	34
<b>Elaboración de pipetas</b> . . . . .	36
<b>Visualización de las células</b> . . . . .	37
<b>Formación del sello</b> . . . . .	37

<b>Intercambio de soluciones</b> .....	40
<b>Protocolo de estimulación</b> .....	40
<i>Protocolo de sustracción de fuga P/N</i> .....	41
<i>Protocolo IV</i> .....	42
<b>Protocolos de estimulación para estudios cinéticos</b> .....	<b>43</b>
<i>Protocolo I</i> .....	43
<i>Protocolo II</i> .....	44
<b>Adquisición de datos</b> .....	45
<u>Resultados</u> .....	46
Efecto del pH intracelular sobre las corrientes totales del intercambiador K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> del eritrocito humano .....	47
Efecto del pH intracelular sobre las corrientes instantáneas del intercambiador K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> del eritrocito humano .....	51
Efecto del pH intracelular sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> del eritrocito humano .....	58
<u>Discusión</u>	
Efecto del pH intracelular sobre las corrientes totales del intercambiador K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> del eritrocito humano .....	62

Efecto del pH intracelular sobre las corrientes instantáneas del intercambiador $K^+/Ca^{2+}$ del eritrocito humano. ....	65
Efecto del pH intracelular sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador $K^+/Ca^{2+}$ del eritrocito humano. ....	68
<u>Conclusiones.</u> ....	69
<u>Bibliografía.</u> ....	70

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Relación de la variación de corriente vs. Tiempo de separación entre pulsos. ....	26
Figura 2.- Relación de corriente normalizada vs potencial de membrana. Condición control vs 1mM t- BHP. ....	27
Figura 3.- Relación de corriente normalizada vs potencial de membrana. Condición control vs 1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	28
Figura 4.- Diferencia entre la punta de la pipeta utilizada para el patch clamp clásico y la utilizada en el T.U.G.O. patch clamp. ....	35
Figura 5.- Esquema de la región de membrana en el interior de la pipeta del T.U.G.O. patch clamp . ....	36
Figura 6.- Esquema del la formación del gigasello. ....	38
Figura 7.- Diferentes configuraciones del patch clamp. ....	39
Figura 8.- Esquema del protocolo P/N. ....	41
Figura 9.- Esquema del protocolo de estimulación IV . ....	42
Figura 10.- Esquema del protocolo de corrientes instantáneas. ....	44
Figura 11.- Esquema del protocolo para la determinación del desarrollo temporal de la desactivación. ....	45
Figura 12.- Relación corrientes totales normalizada vs potencial de membrana (pH 7,3 vs 6,7). ....	47

Figura 13.- Relación corrientes totales normalizada vs potencial de membrana (pH 7,3 vs 6,3).	49
Figura 14.- Relación corrientes totales normalizada vs potencial de membrana (pH 7,3 vs 5,9).	50
Figura 15.- Relación corrientes instantáneas normalizada vs potencial de membrana (pH 7,3 vs 6,7).	52
Figura 16.- Relación corrientes instantáneas normalizadas vs potencial de membrana (pH 7,3 vs 6,3).	54
Figura 17.- Relación corrientes instantáneas normalizadas vs potencial de membrana (pH 7,3 vs 5,9).	55
Figura 18.- Relación de la disminución de corriente vs tiempo de separación entre los pulsos a potencial +160mV.	59
Figura 19.- Relación de la disminución de la corriente vs. tiempo de separación entre los pulsos a potencial -160mV.	60



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición de las soluciones utilizadas. . . . .	33
Tabla 2.- Cuantificación del efecto del cambio de pH sobre las corrientes totales. . . . .	50
Tabla 3.- Comparación de las pendientes de las líneas de tendencia. . . .	56
Tabla 4.- Cuantificación del efecto del cambio de pH sobre las corrientes instantáneas. . . . .	57
Tabla 5.- Variación de corriente ( $\Delta I$ ) entre condición control y condiciones experimentales. . . . .	58
Tabla 6.- Comparación de los $\tau$ para los ajustes exponenciales de la desactivación. . . . . . .	61

## INTRODUCCION

### El eritrocito humano:

El eritrocito humano como modelo experimental ha estado presente en los más importantes avances de la fisiología de membranas, debido a que posee características particulares que hacen de éste una de las células más estudiadas en la Biología. Un eritrocito normal presenta una forma de disco bicóncavo capaz de someterse a altas deformaciones manteniendo una superficie de área constante. En la membrana plasmática el contenido de proteínas es 49,2%, de lípidos totales 43,6% (32,5% de fosfolípidos y 11,1% de colesterol) y 7,2% de carbohidratos (Pennel, 1974 citado en Yawata, 2003). La mayoría de los fosfolípidos presentes poseen dos cadenas de ácidos grasos, en las cuales el estado de saturación de cada una determina el grado de fluidez de la membrana (Cooper, 1977 citado en Yawata, 2003).

La membrana plasmática del eritrocito, además de mantener la integridad y funcionalidad de la célula, es especialmente importante, gracias a su particular propiedad elástica la cual le permite soportar las fuerzas generadas al pasar por los capilares. Estas particulares propiedades de elasticidad se pueden atribuir, adicional a su alto contenido de fosfolípidos, a la presencia de la espectrina y un conjunto de proteínas que unen esta proteína a la bicapa lipídica, como lo son la anquirina y el

intercambiador aniónico (banda 3) entre otros, generando la unión del citoesqueleto de la célula a la membrana plasmática. La formación de estos complejos, conforman un arreglo estructural que le permite a la célula soportar grandes deformaciones sin sufrir daños, pudiendo llevar a cabo su principal función de transporte de oxígeno y dióxido de carbono (Alinovi, 2007).

La vida promedio de un eritrocito, humano, es de 120 días en el sistema circulatorio. Estas células presentan un área aproximada de  $133 \mu\text{m}^2$  y un volumen de  $87 \mu\text{m}^3$ . Un eritrocito promedio tiene un diámetro de aproximadamente  $8 \mu\text{m}$ , presentando un anillo externo de  $2,4 \mu\text{m}$  de espesor y en el centro  $1 \mu\text{m}$ . La forma bicóncava del eritrocito asegura una mayor superficie de intercambio (Speralakis, 2001).

Cada eritrocito contiene aproximadamente 250 millones de moléculas de hemoglobina, cada molécula está conformada por 4 cadenas de globinas y 4 grupos hemo, estos grupos funcionales contiene un átomo de hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ), la unión del  $\text{O}_2$  se da de forma reversible con la proteína formando la oxihemoglobina  $\text{HbO}_2$ , esta unión es muy débil y cederá cuando la presión parcial de  $\text{O}_2$  disminuya, la de  $\text{CO}_2$  aumente y el pH sea más bajo. Es en los capilares sanguíneos bajo condiciones fisiológicas normales, donde se dan dichas condiciones y ocurre el intercambio gaseoso  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ . El transporte de  $\text{CO}_2$  hacia los pulmones es conocido

por 3 vías: primero tenemos que aproximadamente el 8% del dióxido de carbono permanece disuelto en la sangre, como segunda vía tenemos que el 11% se une de modo reversible a los grupos N-terminales de las valinas de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina formando la carbaminohemoglobina ( $\text{HbNHCOO}^-$ ) y para la tercera vía tenemos un transporte de 81% del dióxido de carbono como bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) formado a partir de la unión del dióxido de carbono con agua, dando como resultado ácido carbónico el cual se separa de inmediato en bicarbonato y protones ( $\text{H}^+$ ) mediante la acción de la anhidrasa carbónica. El bicarbonato producido es extraído del eritrocito mediante el complejo de Banda 3 que introduce cloruro en contratransporte del bicarbonato, por otra parte los protones producidos son amortiguados por la hemoglobina y esta reacción de protonación facilita la liberación de oxígeno, ya que al unirse el protón a la hemoglobina disminuye la afinidad de ésta por el oxígeno a lo que se le conoce como "Efecto Bohr". (Agre y Parker, 1989).

Desde el punto de vista estructural los eritrocitos son las células más simples de todas las células eucariotas, particularmente en mamíferos ya que, la ausencia de organelos intracelulares los hacen un modelo clásico para el estudio de cómo los iones, nutrientes y otros solutos atraviesan la membrana plasmática. Sin embargo, Lew y col. (1985) y de Murphy y col. (1987) reportan que en eritrocitos provenientes de pacientes con anemia y en células obtenidas de individuos sanos, una elevada concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  se encuentra secuestrado en vesículas intracelulares,

también Proverbio (1988) propone otro compartimiento conformado por un pool de ATP de unas aproximadamente 500 a 600 moléculas unidas intrínsecamente a la membrana de estas células.

El valor del pH de la sangre arterial humana (37°C) está situado entre 7,37 y 7,43. Este dato corresponde al pH en plasma sanguíneo (Thews, 1983). El pH intracelular suele ser algo inferior al plasmático, ya que el metabolismo de las células produce ácido, sobre todo  $H_2CO_3$ . Según los tipos de células, se ha calculado que el pH del líquido intracelular oscila entre 6,0 y 7,4 (Guyton, 2001). Debido a los avances en las técnicas de medición del pH intracelular ( $pH_i$ ) se ha reportado que en la mayoría de las células el  $pH_i$  está entre 6,8 y 7,2, con una notable excepción para los eritrocitos. Romero y Romero (2004) empleando gradientes discontinuos de percoll separando las células livianas de las densas, reportan una diferencia en el  $pH_i$  de eritrocitos jóvenes y viejos de 0,2 unidades más básico para células viejas, es decir, para células jóvenes se reportó un  $pH_i$  de  $7.09 \pm 0.052$  y para células viejas un  $pH_i$   $7.23 \pm 0.049$ .

En todas las células animales se observa un gradiente entre las concentraciones iónicas de los diferentes cationes, de igual forma ocurre en los eritrocitos teniéndose para el ion  $Na^+$  de 145-15mM, para el ion  $K^+$  se tiene de 5-140mM desde el exterior al interior celular respectivamente, en muchos tipos celulares se mantiene muy similar esta distribución iónica. (Alberts, 1994). El contenido de calcio total intracelular es dos o tres órdenes de magnitud por debajo del

observado en otros tipos celulares, debido a la ausencia de organelos intracelulares como mitocondrias o retículo endoplasmático. Se ha reportado que gran parte del calcio total (70-90%) está unido a residuos con carga negativa ubicados en el interior de la membrana. Engelmann (1991) presenta un rango de concentraciones totales de calcio entre 1,5 - 4 $\mu$ M, una pequeña cantidad del total de calcio intracelular se encuentra de forma ionizada ( $\text{Ca}^{+2}$ ) oscilando entre 20 – 60nM, dicha concentración se debe a un balance entre la salida de calcio en contra de su gradiente químico por la bomba  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa y la entrada de calcio mediante canales y algunos otros mecanismos, como por ejemplo, el intercambiador  $\text{K}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ , aún no caracterizado completamente. (Engelman, 1991; Romero y col, 1997). Para el ión cloruro que es de gran importancia en estas células, tenemos que la concentración intracelular es de 77mM y la concentración extracelular es de 116mM (Funder y Wieth, 1966 citado en Sperelakis, 2001), este ión posee una conductancia de al menos dos órdenes de magnitud mayor a la del ión potasio e ión sodio, como consecuencia el potencial de membrana del eritrocito se ubica con valor -11mV que coincide con el potencial de equilibrio del ión cloruro (Agre y Parker, 1989).

#### Transportadores iónicos de membrana plasmática reportados en los eritrocitos.

Cotransporte  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}/\text{Cl}^{-}$ :

Dunham y col (1980) reportaron que el transporte pasivo de  $K^+$  dependiente de  $Cl^-$  también llamado transporte insensible a ouabaina, en eritrocitos humanos fue inhibido en un 70% cuando fue sustituido extracelularmente el ión  $Cl^-$  por aniones monovalentes permeables como propionato, acetato, metilsulfonato, nitrato, yoduro y bromuro, esta inhibición se ve anulada con un aumento en la concentración externa de  $Cl^-$ . También observaron que se produce inhibición del mecanismo cuando se coloca en el medio furosamida, inhibidor del transporte de  $K^+$ , en presencia de  $Cl^-$ . Adicionalmente observaron una entrada de ión  $Na^+$  dependiente de  $Cl^-$  que de igual forma fue inhibido al sustituir el  $Cl^-$  externo por aniones monovalentes permeables. Los autores no dejan muy claro la relación entre estos tres iones.

#### Cotransporte $K^+/Cl^-$ :

Dunham y col. (1980) reportaron un transporte pasivo de  $K^+$  insensible a ouabaina, el cual mostró inhibición al sustituir el ión  $Cl^-$ , también se registro una permeabilidad para aniones monovalentes, y en presencia de Furosamida se inhibio el transporte pasivo de  $K^+$ . Para descartar el intercambiador aniónico, utilizaron diferentes inhibidores específicos de éste y no observaron efectos inhibitorios, por lo que proponen un posible transporte de  $K^+$  dependiente de  $Cl^-$ , que quizás podría ser un cotransporte.

Kaji (1986) estudia la modificación del transporte de  $K^+$  inducido por alteraciones en el volumen celular, observando que las concentraciones de  $Na^+$  extra e intracelular no afectan el flujo de  $K^+$ , diferentes inhibidores del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{+2}$  incluyendo ouabaina los cuales no mostraron efecto. Sustituyen el ión  $Cl^-$  por diferentes iones monovalentes ( $SCN^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_3^-$ ) donde observaron una disminución en el transporte de  $K^+$ , proponiendo un posible transporte de potasio sensible al volumen celular, dependiente de  $Cl^-$  e independiente de  $Na^+$ .

Ellory y Hall (1986a) reportan un estudio en el cual realizan observaciones sobre el efecto de altas presiones hidrostáticas en el transporte pasivo de cationes ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cs^+$ ) insensible a ouabaina, bumetanida y EGTA en eritrocitos humanos a los cuales se les alteró el volumen celular. Bajo estas condiciones, el transporte de  $K^+$  se vio incrementado cuando el volumen celular fue mayor en eritrocitos expuestos a altas presiones. En dicho trabajo también se realizó la sustitución de ión  $Cl^-$  por  $CH_3SO_4^-$  en el medio observando una disminución en el transporte de  $K^+$  hacia el exterior celular en presencia de altas presiones hidrostáticas, con este resultado proponen que los cambios evidenciados en la forma del eritrocito a altas presiones hidrostáticas, están asociados con el mecanismo  $K^+/Cl^-$  sensible a variaciones de volumen en eritrocitos.

El mismo año estos autores publican otro trabajo (Ellory y Hall, 1986b), en el cual realizan una separación de eritrocitos jóvenes de eritrocitos viejos basados en



sus densidades, observando que a volúmenes y presiones normales en las células jóvenes presentaban una entrada pasiva de  $K^+$  dependiente de  $Cl^-$  que en las células maduras no estaba presente, sugiriendo que en células jóvenes este mecanismo esta funcionalmente activo y se va ocultando con la maduración celular.

#### Intercambiador $Na^+/H^+$ :

Canessa y Escobales (1986) reportan evidencias de la existencia de un transporte de  $Na^+$  resistente a ouabaina y bumetanida en eritrocitos humanos, en el cual al variar el pH interno (6.4, 7.0 y 7.8) y el pH externo (6.0, 7.0, 8.0) midieron el efecto de dicho cambio sobre el flujo de  $Na^+$ , teniendo que a pH intracelular ácido (6.4) y pH extracelular entre 6.0 a 8.0 y en presencia de amilorida se observó un bloqueo de la entrada de  $Na^+$  del 60%. También observaron que al eliminar el gradiente de pH, por ejemplo con pH intracelular 6.4 y pH extracelular 6, la inhibición para la entrada de  $Na^+$  fue de  $0,15 \pm 0,16 \text{ mM} \cdot \text{hr}$  mientras que para el caso de pH 7 y 8 la inhibición fue total. Por otro lado, en ausencia de un gradiente químico para el  $Na^+$  se genera un gradiente pasivo de  $H^+$  hacia el exterior celular, suprimido a pH 6.0, proponiendo a los  $H^+$  como la fuerza que genera el funcionamiento de este intercambiador. Estos resultados son consistentes con la presencia de un mecanismo intercambiador  $Na^+/H^+$  sensible a amilorida en eritrocitos humanos.

Se ha relacionado la hiperactividad de este mecanismo con patologías como hipertensión, donde se ha observado sobreexpresión de este intercambiador (Canessa, 1991). Por otra parte, al estimular con insulina dicho intercambiador, se observó una disminución en la afinidad por el  $\text{Na}^+$  sin realizar cambios en la afinidad por los  $\text{H}^+$ , los autores proponen que dicha hormona incrementa la fosforilación de los residuos serin-treonina (Pontremoli y col, 1994).

#### Intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$

El intercambiador aniónico banda 3 como también se le conoce a este mecanismo, es la principal proteína integral de membrana de los eritrocitos, conformada por tres (3) dominios: un dominio transmembrana que transporta  $\text{Cl}^-$  hacia el interior celular y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) hacia el exterior celular, un pequeño dominio C-terminal citoplasmático capaz de unir anhidrasa carbónica II, constituyendo un complejo metabólico que permite la formación de bicarbonato y un dominio N-terminal citoplasmático capaz de unir enzimas glicolíticas y hemoglobina. Este intercambiador posee dos funciones principales: la primera de ellas juega un papel muy importante en el proceso de intercambio gaseoso, como el encargado principal de transportar hacia el exterior celular  $\text{HCO}_3^-$  formado mediante el proceso de respiración y la segunda, está relacionada con su unión a diferentes proteínas del citoesqueleto del eritrocito que mantienen la integridad de esta célula, aún cuando está expuesta a fuertes fuerzas en su paso por el sistema

circulatorio, esta proteína de membrana mantiene el equilibrio osmótico del eritrocito (Alinovi y col, 2007).

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa:

Así como en todas las membranas plasmáticas de la gran mayoría de las células animales, en las membranas plasmáticas de los eritrocitos humanos también está presente la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, como su nombre lo indica hidroliza ATP y con dicha energía transporta en contra de su gradiente tres iones Na<sup>+</sup> hacia el exterior celular y dos iones K<sup>+</sup> hacia el interior celular. En fantasmas de eritrocitos humanos Dunham y Glynn (1961) observaron que la actividad de la bomba está constituida por dos componentes, el primer componente necesita la presencia de iones Mg<sup>2+</sup> y no se ve inhibida por glicósidos cardíacos, mientras que el segundo componente necesita la presencia de Mg<sup>2+</sup>, iones K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> y es inhibido por glicósidos cardíacos, adicionalmente se ve inhibido por Ca<sup>2+</sup> en bajas y altas concentraciones. Los autores proponen que esté último compite con el Mg<sup>2+</sup>. También evaluaron el efecto de cambios de pH, donde a pH ácidos se observa una notable disminución de la actividad. Años más tarde se demostró que el efecto inhibitorio por ouabaina o estrofantidina, se debe a que actúa solo en la superficie exterior de la membrana plasmática del eritrocito (Agre y Parker, 1989).

Canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> o Canal Gárdos:

Los reportes iniciales sobre una salida de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{+2}$  en eritrocitos fueron presentados por Gárdos en 1958, revelando posteriormente que se trata de una proteína de membrana específica para  $K^+$ , denominado en su honor canal Gárdos. Se establecieron varios criterios para certificar que los flujos por el canal Gárdos son de  $K^+$ , entre ellos: la alta selectividad de  $K^+$  sobre  $Na^+$ ; la inhibición por drogas específicas como clotrimazol presentando inhibición en ausencia de  $K^+$  extracelular; también el requerimiento de  $Ca^{+2}$  intracelular y que el canal presente una conductancia de aproximadamente 20pS. Posteriormente diferentes investigadores sugirieron la existencia de varios sitios de unión por la cara interna del canal, los cuales unen  $Ca^{+2}$ . Simons (Simons, 1976 citado en Maher and Kuchel, 2003) realizando cambios en los cationes divalentes, como del ión  $Mg^{+2}$  el cual actúa como un antagonista del  $Ca^{+2}$ , adicionalmente observó transporte de ión  $Rb^+$  y posiblemente  $Cs^+$ ; la inhibición de  $Na^+$  es intracelular sugiriendo competencia con  $K^+$ . Yingst y Hoffman (Yingst y Hoffman, 1984 citado en Maher y Kuchel, 2003) determinan la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular necesaria para activar el canal (2-3 $\mu$ M).

En conclusión, desde la primera descripción del canal se sabe que el  $Ca^{+2}$  es un requisito para la activación del canal, diferentes pruebas se han realizado de nuevos componentes que aumenten la actividad del canal y en todas se necesita la presencia de  $Ca^{+2}$  para que se dé el flujo de  $K^+$ . La activación del canal viene dada por la coordinación de diferentes señales intracelulares y el  $Ca^{+2}$ . Adicionalmente se

ha observado que en presencia de prostaglandinas (PGE) y  $\text{Ca}^{+2}$  hay activación del canal (Maher y Kuchel, 2002).

#### Canal de presión

Romero y Romero (2004) observan la presencia de un canal sensible a estrés mecánico en la membrana del eritrocito humano, el cual denominan Canal de  $\text{K}^+$  mecanosensible de eritrocitos humanos (*Human Erythrocyte Mechanosensitive  $\text{K}^+$  Channel 1*, **HEMKC1**), dicho canal es permeable a  $\text{K}^+$ . Entre las características del canal los autores identifican que posee una permeabilidad entre 22 y 28pS; es 100 veces más permeable a  $\text{K}^+$  que a  $\text{Na}^+$ ; parece no ser permeable a  $\text{Ca}^{+2}$ ; es bloqueado por  $\text{Ba}^{+2}$  y por  $\text{Gd}^+$ ; la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) aumenta al aplicar presión sobre la membrana y el efecto de la presión sobre la membrana es reversible. Cuando se modifican las características geométricas de la membrana, con la inserción de fosfolípidos que poseen una sola cadena alifática con una forma similar a un cono, el cual se inserta de forma invertida a la forma de la membrana, se observa que la  $P_o$  se ve disminuida. Por otra parte, realizaron la inserción de compuestos anfipáticos, en este caso clorpromazina utilizado como inhibidor de canales mecanosensibles en mamíferos, el resultado que obtuvieron fue diferente, ya que al aumentar la concentración del compuesto en la membrana la  $P_o$  se vio aumentada. El canal depende de la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{+2}$  aún a concentraciones tan bajas como las presentes en una célula fisiológicamente activa teniendo una afinidad muy alta por este ión.

### Senescencia del eritrocito:

En la mayoría de las células la apoptosis es un proceso complejo multifactorial y en último grado regulado genéticamente, pero en el caso de los eritrocitos, que son células que no poseen material genético, donde la apoptosis clásica no existe, se plantea que este proceso está ligado a un proceso cíclico. Se ha observado una relación logarítmica entre la vida media de los eritrocitos de diferentes especies de mamíferos y su respectiva frecuencia cardíaca (Romero, 2008), siendo un fuerte indicio la aparente relación entre el control de la vida media del eritrocito humano y algún fenómeno asociado al sistema circulatorio, como sería el estrés mecánico que se genera al pasar por los capilares sanguíneos. Aunque no se conoce con exactitud cómo se da el proceso de senescencia en los eritrocitos, numerosos estudios realizados proponen que está relacionando con un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, Romero y col (1997) realizando una separación en gradientes de densidad, reportaron un aumento de 3 veces en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en eritrocitos densos (viejos), teniendo que para eritrocitos ligeros la concentración ( $8,4 \pm 2,8\text{nM}$ ) y en eritrocitos densos ( $31,2 \pm 13\text{nM}$ ). Este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los glóbulos rojos podría venir dado por alguna modificación o alteración de los mecanismos implicados en el mantenimiento de las concentraciones intracelulares de este ión, así por ejemplo Romero y Romero (1997) han encontrado que los parámetros cinéticos de la Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  son

afectados por la edad, en donde la capacidad máxima de transporte de este ión disminuye a la mitad en células viejas.

Para poder explicar la entrada del ión calcio al interior celular del eritrocito se han planteado varias hipótesis. En **la hipótesis clásica** se propone que el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a medida que el glóbulo rojo envejece es debido a la exposición del eritrocito a un estrés mecánico, el cual activa canales mecanosensibles lo cual permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a los eritrocitos a nivel de los capilares, este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  produce la activación de un canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  (Canal Gárdos), la correspondiente salida de  $\text{K}^+$  de la célula es acompañada de una salida de  $\text{Cl}^-$ , obligando la salida de  $\text{H}_2\text{O}$  produciendo la deshidratación de la célula asociada al envejecimiento, estas células menos flexibles, podrían ser atrapadas a nivel esplénico y retiradas del sistema circulatorio. En años recientes nuestro laboratorio ha propuesto la llamada **hipótesis del  $\text{K}^+$** , en ella se plantea que el estrés mecánico a nivel de los capilares activa un canal de  $\text{K}^+$ , generando una hiperpolarización de la membrana y dicho cambio a su vez produce la activación del intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{+2}$ , el cual genera la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y la salida de  $\text{K}^+$  de la célula. Toda la hipótesis del  $\text{K}^+$  está basada en que mediante el uso del método del T.U.G.O Patch Clamp, se observó la presencia de un canal sensible a presión en la membrana del eritrocito, dicho canal correspondía a un canal de  $\text{K}^+$  y no de  $\text{Ca}^{+2}$  como se había propuesto en la bibliografía, al igual que un nuevo mecanismo que sería el responsable de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , este es nombrado intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^+$ .

Lo que propone esta hipótesis es que al hiperpolarizar la membrana y activarse el Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  activando la entrada de  $Ca^{2+}$  y la salida de agua, cuando la célula sale del capilar sanguíneos los mecanismos se desactivan permitiendo que el eritrocito regrese a su estado inicial, debido a que este proceso es cíclico aumenta paulatinamente la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, originando activación de las calpains, afectando así la actividad de la  $Ca^{2+}$  ATPasas disminuyendo su capacidad de extraer  $Ca^{2+}$  de la célula. Estos efectos son acumulativos y generan un influjo de  $Ca^{2+}$ , llevando la célula a la muerte y retiro de la circulación (Romero, 2004).

## **ANTECEDENTES**

Mediante la utilización del T.U.G.O. Patch Clamp en nuestro laboratorio Romero y Romero (2004) observaron en eritrocitos humanos la presencia de corrientes  $I_{mic}$  que poseen características cinéticas que depende del potencial y que tales características serian una rápida activación y una lenta inactivación o decremento a potenciales positivos y una activación compleja y muy lenta a potenciales

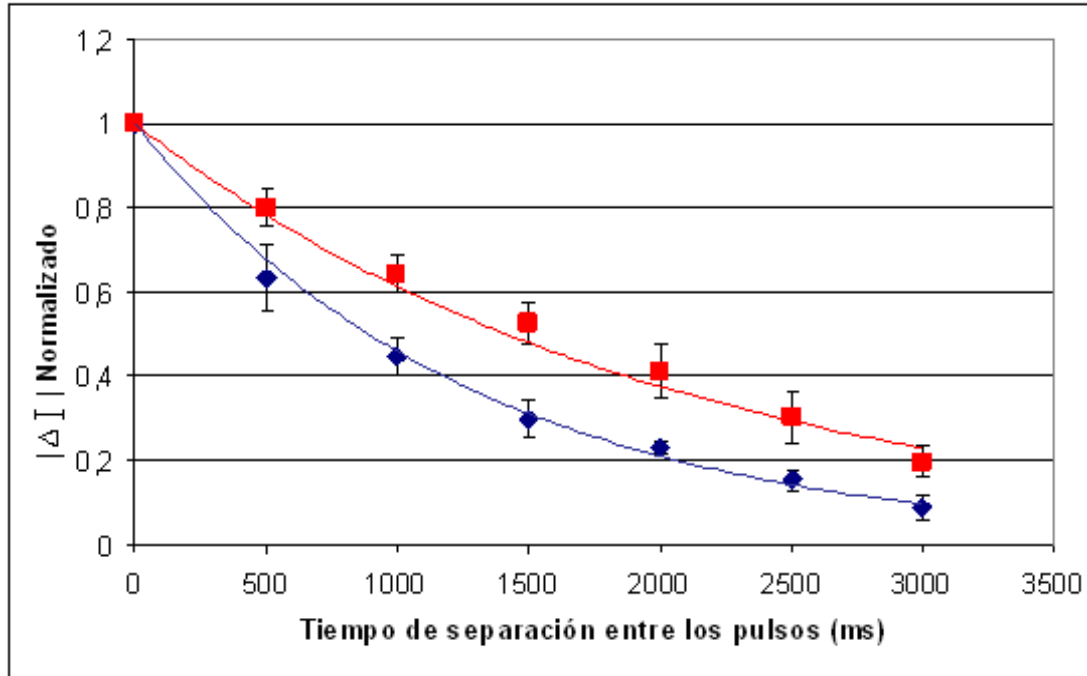


negativos. Observaron que dichas corrientes no están activas a potenciales de reposo del Eritrocito Humano y que son generadas por un mecanismo de contra-transporte electrogénico al cual denominaron **Intercambiador de  $\text{Ca}^{+2}/\text{K}^+$** , este mecanismo es capaz de mover tanto el  $\text{Ca}^{+2}$  como el  $\text{K}^+$  en cualquier sentido a través de la membrana, la corriente es transportada por el movimiento de  $\text{K}^+$ , en condiciones fisiológicas el intercambiador introduce  $\text{Ca}^{+2}$  y saca  $\text{K}^+$  al exterior. (Romero y Romero, 2004).

Matthes (2005) realizó una caracterización parcial del intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{+2}$  en la cual se estudió la estequiometría del mecanismo, donde obtuvo que el intercambiador posee una estequiometría de 12:1, es decir, 12 iones  $\text{K}^+$  contra 1 ión  $\text{Ca}^{+2}$  debido a este resultado supone que podrían ser originadas por la suma de distintas vías de paso para el  $\text{K}^+$ . Adicionalmente estudió también el efecto de iones mono y divalentes sobre las corrientes del intercambiador, para el caso de los iones monovalentes se estudiaron los iones  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$  obteniendo que el intercambiador es impermeable al  $\text{Cs}^+$  y permeable al  $\text{Rb}^+$  aunque este último es 2,5 veces menos permeable que el  $\text{K}^+$ . Con estos resultados se propone una secuencia de permeabilidad de  $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ \gg \text{Cs}^+$ . Para los iones divalentes se estudiaron los iones  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , observándose que el intercambiador es permeable a ambos iones, en el caso del  $\text{Mg}^{+2}$  es 850 veces menos permeable que el  $\text{Ca}^{+2}$  y para el  $\text{Zn}^{+2}$  no se pudo determinar la relación de permeabilidad.

Forsyth (2006) estudió el efecto de implantar gradientes de  $\text{Na}^+$  sobre las corrientes del intercambiador, partiendo de una solución normal en la cual no existían gradientes, cambio a una solución en la cual la proporción fue 2:1 para el gradiente, es decir, la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$  (solución de la pipeta) era dos veces mayor a la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  (solución del baño), una de 100:1, una de 1000:1, una de 10000:1 y una en la cual el gradiente era infinito.

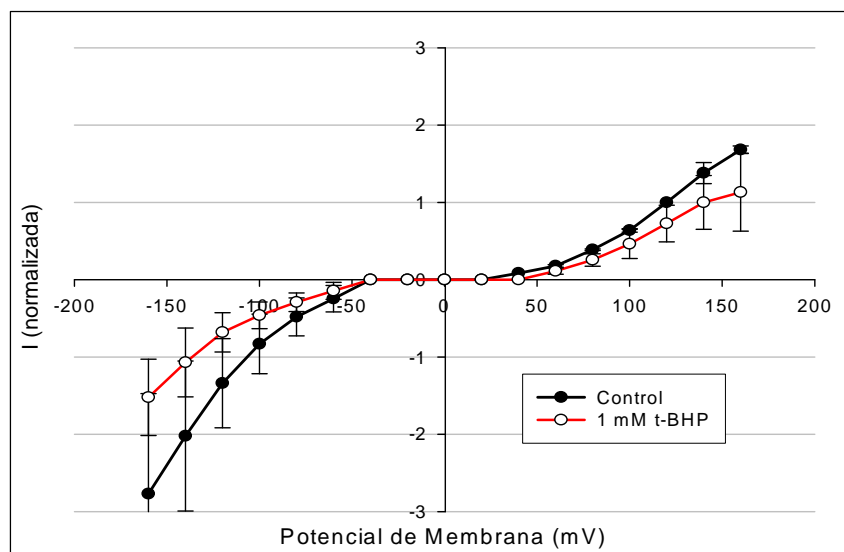
Encontró que el ión  $\text{Na}^+$  no tiene ningún efecto sobre las corrientes del intercambiador, una vez normalizadas las corrientes a un valor de +120mV la tendencia es similar y no existe una diferencia significativa estadísticamente ya que los puntos observados en las diferentes condiciones experimentales están dentro del rango de la desviación estándar. Adicionalmente caracterizaron parcialmente la cinética del intercambiador, observaron que al eliminar la dependencia del potencial de activación las corrientes  $I_{\text{mic}}$  presentan un comportamiento óhmico.



**Fig. 1.- Relación  $\Delta I$  normalizada vs tiempo de separación entre pulsos, para las corrientes obtenidas de experimentos en condiciones simétricas con la solución normal, potenciales positivos (rojo) y potenciales negativos (azul). (Tomado de Forsyth, 2006)**

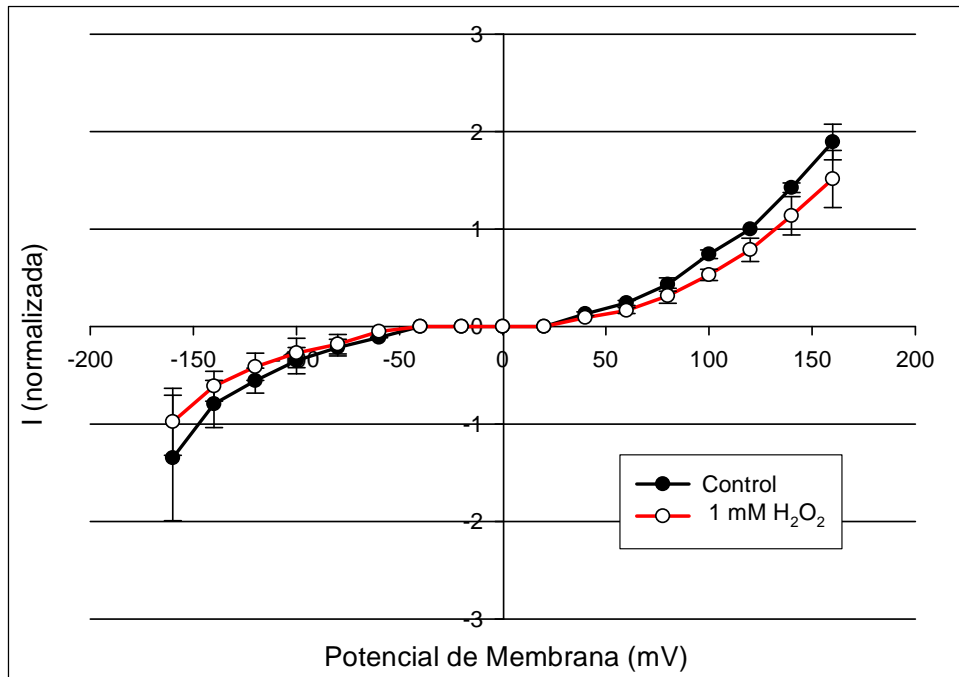
En la fig. 1 teniendo en ambos lados de la membrana una solución que se definió como normal, lo cual permitió tener simetría de ambos lados, observó que la desactivación de las corrientes  $I_{mic}$  desarrolladas a potenciales de membrana positivos y negativos, presentan una dependencia exponencial del tiempo y que el tiempo de desactivación de las corrientes es más corto para potenciales negativos que para potenciales positivos, es decir la pérdida de corriente aumenta con el tiempo de separación entre el pulso activante y el pulso prueba a potenciales positivos siendo más lenta que a potenciales negativos (Forsyth, 2006).

Galue (2007) estudió el efecto del estrés oxidativo sobre las corrientes del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$ , determinó que éste causa disminución en la magnitud de las corrientes, la cual es dependiente de la concentración del agente oxidante, a mayor concentración mayor es la disminución de las corrientes, se utilizaron concentraciones desde  $1\mu\text{M}$  hasta  $1\text{mM}$  de ambos oxidantes.



**Figura 2. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En negro, promedio de las corrientes obtenidas en condición control aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas después de exponer el patch de membrana a 10 minutos de t-BHP 1 mM. (Tomado de Galue, 2007)**

El t-BHP tiene un mayor efecto sobre las corrientes generadas a potenciales negativos que sobre las corrientes generadas a potenciales positivos, mientras que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene un efecto mayor sobre las corrientes generadas a potenciales positivos que sobre las corrientes generadas a potenciales negativos.



**Figura 3. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En negro, promedio de las corrientes obtenidas en condición control aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas después de exponer el patch de membrana a 10 minutos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. (Tomado de Galue 2007)**

En cuanto al efecto sobre el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes  $I_{mic}$  no se observó cambio. El efecto sobre las corrientes  $I_{mic}$  se vio relacionado con el tiempo de exposición al agente oxidante, siendo los primeros minutos de exposición cuando se logra el mayor efecto. El T-BHP óxido en ambos lados de la membrana mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvo efecto oxidativo únicamente en el interior de la membrana.

Cambios en el pH intracelular regula un amplio número de procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, migración y transformación celular. Sin

embargo, aún es limitado el conocimiento de cómo cambios en el pH afectan la conformación de proteínas y el ensamblaje de macromoléculas que conducen a diferentes procesos celulares. Por ejemplo, una disminución en el pH citosólico promueve la apoptosis dependiente de la ruta de las caspasas, pequeñas variaciones del pH intracelular induce drásticas diferencias en el entorno celular.

El pH es una de las propiedades más importantes en fluidos biológicos. Un clásico ejemplo de cómo el pH tiene una función reguladora en algunas proteínas, es como cambios de pH conducen a cambios en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, los protones inducen una regulación alostérica en la proteína, teniendo un efecto directo sobre el puente salino formado entre un residuo de His y otro de Asp; en presencia de un aumento de pH el residuo de His es desprotonado modificando las interacciones electrostáticas (Barber y col, 2007).

Alonso y col (1993) observan que en presencia de una disminución del pH celular en eritrocitos, se incrementa la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en pacientes hipertensos. Adicionalmente observan una hiperactividad del intercambiador aniónico  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  asociado con una disminución en el pH celular de eritrocitos en un sub grupo de los pacientes a los cuales se les practicó el estudio, en su mayoría hipertensos.

De Carvalho-Alves y col (1993) observan que en ausencia de activadores, la afinidad por el  $\text{Ca}^{+2}$  de la  $\text{Ca}^{+2}\text{ATPasa}$  de eritrocitos es incrementada en presencia de pH alcalino (pH 8) a pesar de que su velocidad máxima es disminuida, los autores proponen que una posible explicación de este efecto sería la desprotonación de algún aminoácido de la bomba o la interacción entre el péptido auto-inhibitorio que une calmodulina y el dominio de control de unión de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Libera y col (1997) sugieren que el pH intracelular en un intervalo de 7,4 a 5,8 afecta el movimiento de aminofosfolípidos del lado interno de la membrana del eritrocito mediado por flipasas, mientras que cambios en un rango de 7,4 a 8,5 no afectaron la actividad de la proteína. En su hipótesis plantean posibles razones de este efecto como: un cambio de pH podría afectar el número de sitios de unión disponibles de fosfolípidos, la protonación de aminoácidos ionizables de la proteína modulan la afinidad de los sitios de unión del ATP o de los fosfolípidos, afectando directamente la conformación de la proteína ya que cambios en unos pocos residuos podría generar disminución en la estabilidad de la proteína nativa.

Estos ejemplos como muchos otros, evidencian que cambios en el pH intracelular afecta el funcionamiento de los componentes de la membrana. Es por esta razón que en este trabajo, planteamos estudiar el efecto que puede generar el pH sobre las corrientes del intercambiador  $\text{K}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  del eritrocito humano.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

- Estudiar el efecto del cambio de pH intracelular sobre las corrientes del Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  de eritrocitos humanos



### Objetivos Específicos:

- Estudiar el efecto sobre la amplitud de las corrientes del Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  al establecer gradientes de protones ( $H^+$ ) del interior al exterior celular.
- Estudiar el efecto del pH sobre las corrientes Instantáneas del Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$ .
- Determinar el efecto del pH sobre el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$ .
- Determinar el efecto del pH sobre la dependencia de potencial de la activación de las corrientes del Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$ .

## **MATERIALES Y METODOS**

### Material Biológico:

Se utilizaron eritrocitos sanos, que se obtuvieron por punción epidérmica, tomando la muestra en conjunto con 10 $\mu$ L de una solución a pH 7,3 mediante el uso de una micropipeta, seguidamente se colocaron en la cámara con 800 $\mu$ l de la

misma solución (solución a pH 7,3), no se realizó ningún tratamiento a la muestra con el fin de minimizar los cambios que puedan suceder en las células por efecto de manipulación.

#### Soluciones:

Para la caracterización de las corrientes del intercambiador  $K^+/Ca^{+2}$  se realizaron cambios en la solución de la cámara, partiendo de la condición normal por soluciones a pH ácido. A continuación se presenta la composición de cada solución.

Tabla 1. Soluciones utilizadas.

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Normal (pH 7,3)	Contiene 10mM de NaCl, 140 mM. de KCl, 1mM de $CaCl_2$ y 10 mM. de Buffer Fosfato-Citrato a pH 7,3.
Sol. 1 (pH 5,3)	Contiene 10mM de NaCl, 140 mM. de KCl, 1mM de $CaCl_2$ y 10 mM. de Buffer Fosfato-Citrato a pH 5,3.

#### Medidas Electrofisiológicas:

##### **T.U.G.O. Patch Clamp**

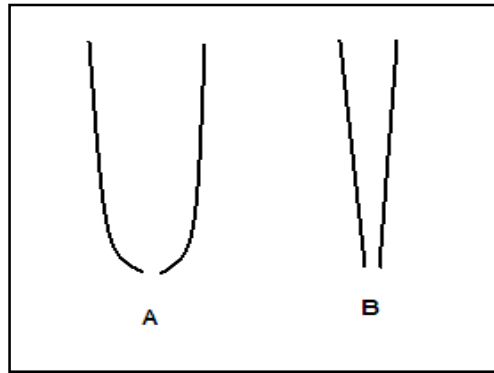
Para la realización de este trabajo se utilizó la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp (*The U-shaped Giga Ohm Patch Clamp*) desarrollada en nuestro Laboratorio (Romero, 2003). Al igual que en la técnica del Patch Clamp clásico, el T.U.G.O. Patch Clamp es una técnica que consta en tomar una pequeña porción de la membrana celular, con una pipeta de vidrio elaborada a partir de capilares, en la

cual se mantiene constante la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana, lo que permitirá la medición de corriente.

Las dos principales diferencias entre ambas técnicas son:

1. En el T.U.G.O. Patch Clamp la forma de la pipeta permite simular el paso de los eritrocitos por un capilar sanguíneo desde el punto de vista mecánico.

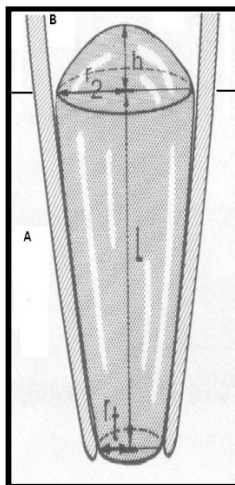
En las pipetas utilizadas para el Patch Clamp clásico, el diámetro externo de la punta es reducido de manera de garantizar que el área de la membrana celular aislada dentro de la pipeta sea lo suficientemente pequeña para tener uno o pocos canales, por otro lado el área interna de la punta de la pipeta se busca que sea lo más grande posible de manera de disminuir la resistencia eléctrica en serie. Para el T.U.G.O. Patch Clamp, las pipetas utilizadas presentan en la punta una abertura lo suficientemente grande como para permitir que el eritrocito pueda entrar, pero que éste no sea succionado por completo, quedando una parte importante de la célula en el interior de la pipeta, lo que trae como consecuencia que gran parte de la membrana celular quede en contacto con las paredes del capilar, esta parte de membrana constituye la zona donde se forma un sello de alta resistencia eléctrica (en el orden de  $10^9 \Omega$  o Gigaohm). Esto gracias a que las paredes son más paralelas en la punta como se muestra en la Fig. 4



**Fig. 4- Diferencia entre la punta de la pipeta utilizada para el Patch Clamp “clásico” (A) y pipetas utilizadas para el T.U.G.O Patch Clamp (B).**

2.La cantidad de membrana aislada en la pipeta en el T.U.G.O. Patch Clamp es mayor y adopta una forma cónica.

En el caso del Patch Clamp clásico la cantidad de membrana que se aísla dentro de la pipeta es poca y la forma adquirida por la membrana una vez dentro de la pipeta simula un “Ω” debido al ángulo entre las paredes que en la punta se hace más agudo. En el caso del T.U.G.O. Patch Clamp debido a las características particulares de esta técnica, simula un eritrocito al pasar por los capilares sanguíneos, la cantidad de la membrana que entra en el interior de la pipeta es de 3 a 8µm medidos desde la punta de la pipeta, teniendo así una cantidad de membrana mayor. En cuanto a la forma que adopta tenemos como lo muestra la fig. 5, la parte de la membrana asociada al vidrio se presume que adopta una forma cónica y en la parte superior donde la membrana no está adherida a las paredes de la pipeta se forma una semiesfera.



**Fig. 5.-Esquema de la región de membrana en el interior de la Pipeta con la técnica del T.U.G.O. Patch Clamp. A) Región Cónica. B) Región Semiesférica**

### **Elaboración de pipetas**

Para la elaboración de pipetas se utilizaron capilares de Borosilicato, con diámetro externo de 1,5mm, diámetro interno de 0,86mm y 10cm de largo (Sutter Instrument CO., Novato CA, USA). Las pipetas se halaron en dos pasos con un halador vertical por gravedad modelo 700C (David Kopf, USA). La elaboración de dichas pipetas se llevó a cabo como se describe en (Romero, 2004). La resistencia de las pipetas estaba entre 9 y 14 M $\Omega$  en solución normal.

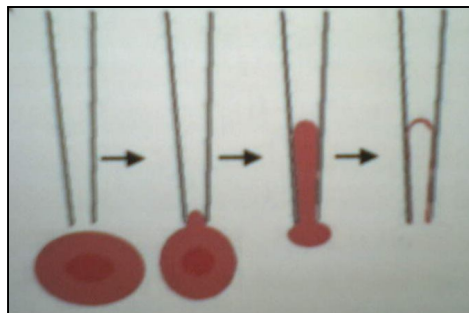
### **Visualización de las células**

Para la visualización de las células en el proceso de formación del sello se utilizó un microscopio invertido de contraste de fase Nikon Diaphot (Nikon CO, LTD, Tokio, Japón) con oculares de 10X CFW y objetivos 20 y 40 DL. Para la manipulación

de las células se utilizó un micromanipulador hidráulico modelo MO- 203 (Narishige CO, LTD, Tokio, Japón).

### **Formación del sello**

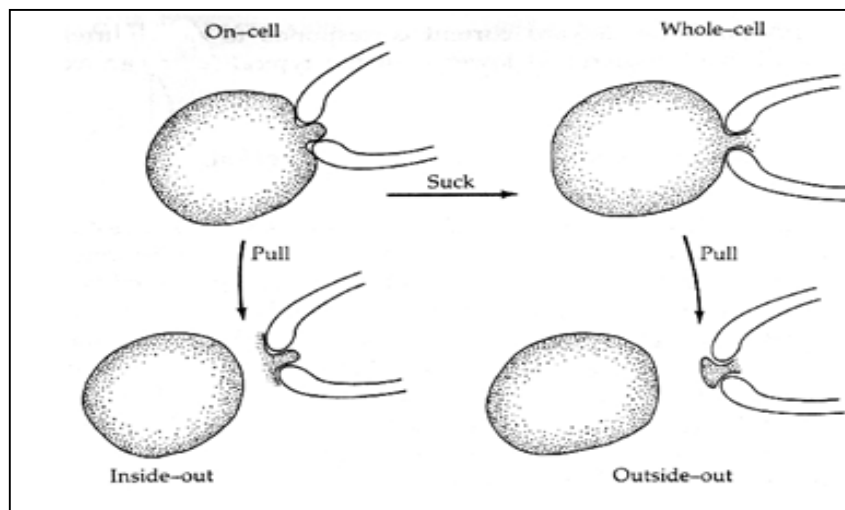
Las células se colocaron en la cámara suspendidas en la solución normal, una vez que se ubiquen en el fondo de la cámara se procedió a introducir la pipeta hasta el fondo de la cámara cerca del eritrocito seleccionado para realizar el sello. Después de ubicar la punta de la pipeta cerca de la célula (aproximadamente 2 o 3  $\mu\text{m}$  del eritrocito), se aplicó presión negativa al Holder mediante el uso de una inyectora, de esta manera se succionó el eritrocito y solo una parte del eritrocito entra en la punta de la pipeta, donde se formara el sello de alta resistencia o Giga sello con las paredes internas de la pipeta. En la Fig. 6 se muestra un esquema aproximado del proceso de formación de Gigaesello.



**Fig. 6- Esquema del posible proceso de formación del Gigaesello. Tomada de: Romero, 2003.**

Debido a la gran cantidad de membrana aislada dentro de la pipeta se plantea que la formación del sello de alta resistencia se debe a la suma de todas las interacciones débiles, posiblemente interacciones electrostáticas, que se generan entre la membrana celular y el vidrio de la pipeta.

Una vez formado el Giga sello se procedió a realizar el rompimiento de la célula que queda en el exterior de la pipeta, para esto se toca el resto del eritrocito fuera de la pipeta con el fondo de la cámara, pasando así de la configuración *Cell-Attached* (ó *On-cell*) a la configuración *Inside - Out*, donde el lado interno de la membrana del eritrocito queda expuesto a la solución del baño de la cámara (ver fig. 7).



**Fig. 7.- Diferentes configuraciones del Patch Clamp. Tomada de: Organization of Nervous System; Basic Functions of Synapses and Transmitter Substances**

Debido a las características intrínsecas del método, se pueden observar diferencias en las corrientes medidas entre distintos experimentos, lo que represento dificultades para poder comparar resultados entre diferentes experimentos realizados. Una forma de poder comparar resultados sería expresando los resultados en unidades de densidad de corriente, pero con esta técnica es imposible poder saber con exactitud cuanta membrana está presente en cada experimento, es por ello que a falta de un método efectivo en el cual se puedan expresar los resultados como valores de densidad de corriente o como valores absolutos, los datos obtenidos se normalizaron con respecto a un valor específico, permitiendo así estandarizar los datos, haciendo posible la comparación de datos que fueron obtenidos bajo las mismas o diferentes condiciones experimentales, bien sea con el mismo Patch o diferentes.

### **Intercambio de soluciones**

Este procedimiento se llevó a cabo para determinar el efecto de cambios de pH sobre las corrientes asociadas al Intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$ . En primer lugar se realizó el montaje en condiciones simétricas, y se caracterizaron las corrientes del control pH 7,3. Posteriormente para evaluar el efecto del cambio de pH a 6,7 se adicionaron 200 $\mu$ l de la solución a pH 5,3 (sol.1) y se realizaron las mediciones correspondientes, para evaluar el efecto del cambio de pH a 6,3 se extrajeron 200 $\mu$ l de la solución de la cámara y se adicionaron 200 $\mu$ l de las Sol. 1 para llevar el pH de la cámara a 6,3 y



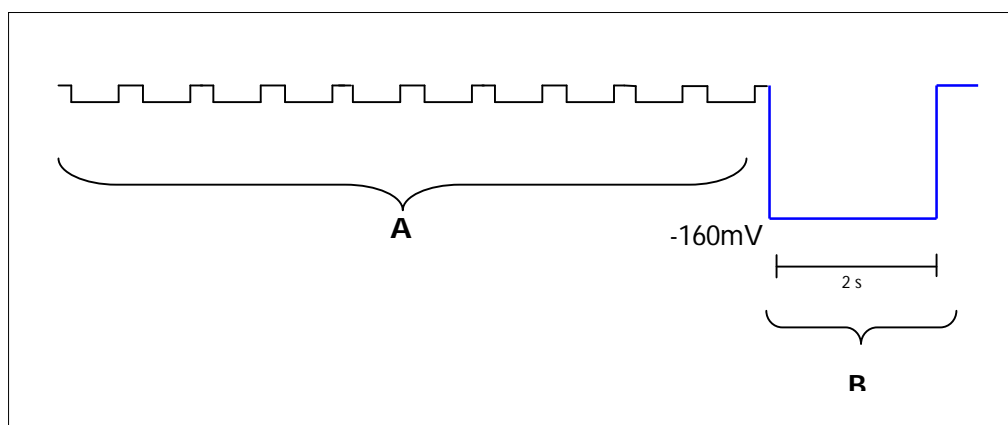
mantener constante el mismo volumen inicial. De la misma manera se realizo el cambio para pH 5,9.

### Protocolo de estimulación

Para la medición de corrientes iónicas se utilizo el programa "Pulse Generator", en donde se establecieron las condiciones de tiempo y voltaje que se desea aplicar al Patch, cada protocolo utilizado se repitió un mínimo de 3 veces, lo que permitió tomar el valor promedio de corriente para cada condición experimental. A continuación se describen los protocolos utilizados:

#### 1. Protocolo de sustracción de fuga P/N

Este protocolo se aplico previo a cualquier protocolo de estimulación, con la finalidad de poder restar las corrientes de fuga. En la fig. 8, se muestra un esquema de dicho protocolo.



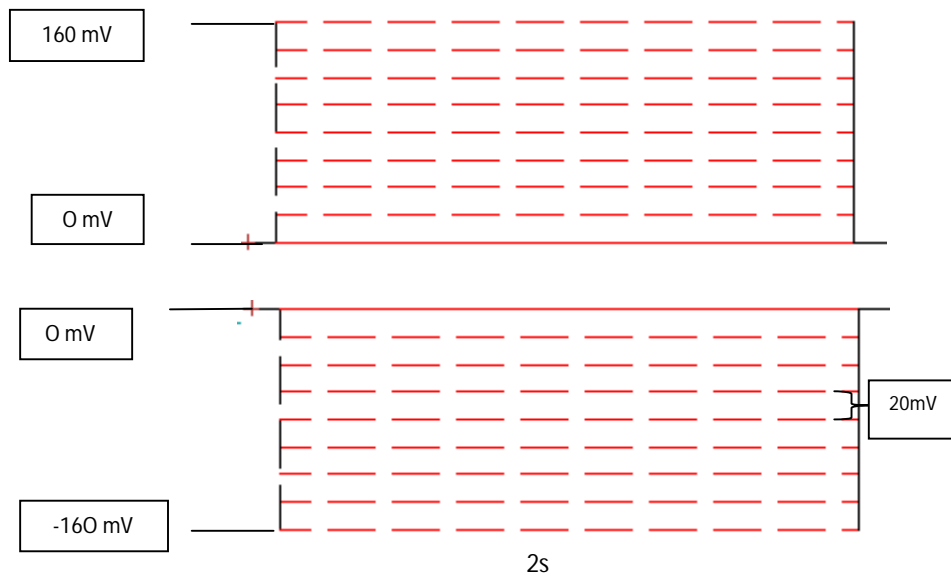
**Fig. 8- Esquema del protocolo P/N (B) y diez prepulsos de sustracción de un decimo del pulso final tipo P/N previos al pulso prueba (A)**

El protocolo P/N consiste en aplicar diez (10) prepulsos con una magnitud de un décimo del valor del estímulo que se desea aplicar, dicha magnitud se debe a que por ser un potencial bajo no se desarrollan corrientes debidas a la activación del intercambiador. Este protocolo se aplico con la finalidad de poder sustraer las corrientes capacitivas de la membrana y poder medir, una vez que se aplique el estímulo, las corrientes desarrolladas por el intercambiador.

## *2. Protocolo IV*

Para obtener los registros de corrientes necesarios para la construcción de curvas de corriente vs. voltaje se aplico este protocolo, a continuación se muestra un esquema del mismo (Fig. 9)





**Fig. 9- Esquema utilizado para la aplicación del protocolo de estimulación para la realización de la curva IV.**

El protocolo consiste en aplicar pulsos consecutivos de dos (2) segundos de duración cuya amplitud va desde +160mV a -160mV en pasos de 20mV. Para la realización de curvas IV se tomo en cuenta los valores de corriente que se obtuvieron al medir el punto máximo alcanzado.

Para el estudio del efecto de pH se aplico este protocolo tanto en la condición control como con los diferentes pH experimentales.

### **Protocolos de estimulación para estudios cinéticos**

A continuación se presentan los protocolos que se utilizaron para realizar los estudios cinéticos del intercambiador, en ambos casos el esquema general del

protocolo está conformado por dos pulsos consecutivos: el primer pulso suministrado al cual se le denomina **Pulso Activante** permanece invariable y al segundo pulso al cual dependiendo del caso, se le varía alguna de sus características se le denomina **Pulso Prueba**. Cabe resaltar que previo a cada protocolo de estudio cinético se aplico un protocolo IV con el fin de obtener valores de referencia en cada experimento.

### 3. Protocolo I

Este protocolo consta de dos partes, ambas consistieron en suministrar dos pulsos con una duración de dos (2) segundos, en la primera parte (A) se aplica un primer pulso de -160mV seguido de pulsos que variaron de +160mV a -160mV en intervalos de 20mV. Para la segunda parte (B) se aplico un pulso de +160mV seguido de pulsos que variaron de -160mV a +160mV con incrementos de 20mV entre pulsos (Fig. 10).

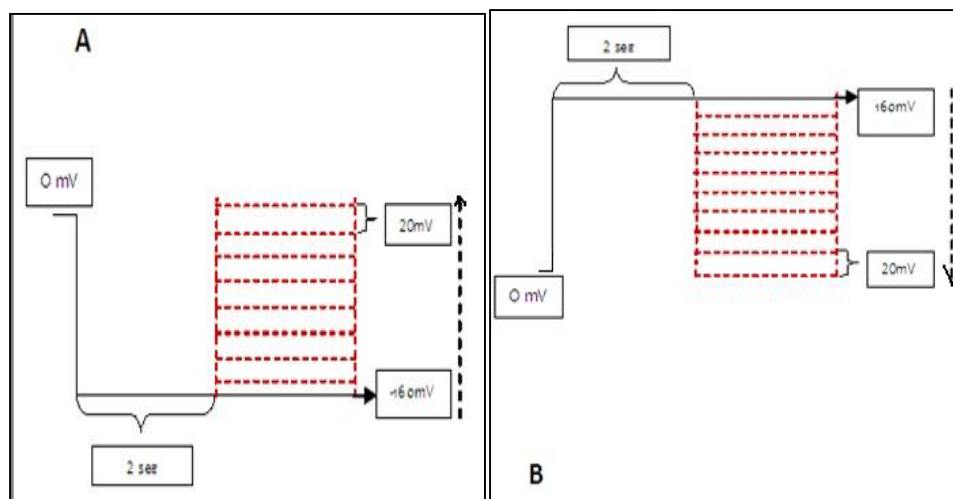
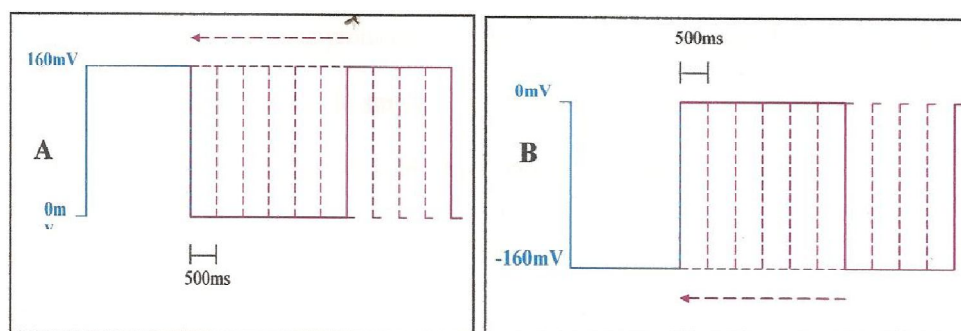


Fig. 10.- Esquema del protocolo para el estudio de las corrientes instantáneas. (A) Pulso Activante a -160mV y (B) pulso Activante a +160mV.

El objetivo de utilizar este protocolo fue el estudio de las corrientes instantáneas desarrolladas por el intercambiador, donde se pudiera eliminar el valor de las corrientes dependientes del potencial, permitiendo así evaluar sólo el efecto generado al implantar una fuerza electromotriz conocida. Seguidamente a la obtención de estos resultados se elaboraron gráficas donde se representaron las corrientes medidas en función del potencial de membrana fijado.

#### 4. Protocolo II

Este protocolo consta de dos partes, ambas consistieron en suministrar dos pulsos con una intensidad en la primera parte (A) de 160mV y para la segunda parte (B) se aplicó un pulso de -160mV, en este protocolo en el pulso prueba lo que variamos es la duración del pulso desde cero (0) hasta tres (3) segundos todos con la misma intensidad.



**Fig.11.- Esquema del protocolo para la determinación del desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes salientes (A) (+160mV) y de las corrientes entrantes (B) (-160mV) a la célula.**

El objetivo de utilizar este protocolo fue observar el tiempo necesario para presenciar la inactivación del intercambiador.

### **Adquisición de datos**

Las corrientes fueron obtenidas en modo voltage-clamp, con una ganancia de 100mV/pA, con un filtro pasa-bajos a 1KHz, un amplificador AXOPATCH-1C (Axon Instrument, Burlingame, CA, USA). Adicionalmente se utilizó un filtro de línea HumBug (50/60Hz Noise eliminator, Queso Scientific, North Vancouver, BC, Canadá) para eliminar el ruido proveniente de la línea de 60 (sesenta) ciclos. La digitalización de los datos se realizó mediante el uso de la interfase IT-16 (Instrutech, Port Washington, NY, USA), empleando un programa de control y adquisición PULSE (Heka, Lambrecht, Alemania).

## **RESULTADOS**

Con la utilización de los métodos ya explicados, hemos obtenido los siguientes resultados en el estudio del efecto del pH intracelular sobre las corrientes desarrolladas por el intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  del eritrocito humano. En el laboratorio se han denominado como corrientes entrantes a la célula las corrientes negativas en las cuales tenemos salida de  $Ca^{2+}$  al exterior celular y entrada de  $K^+$  al interior, y

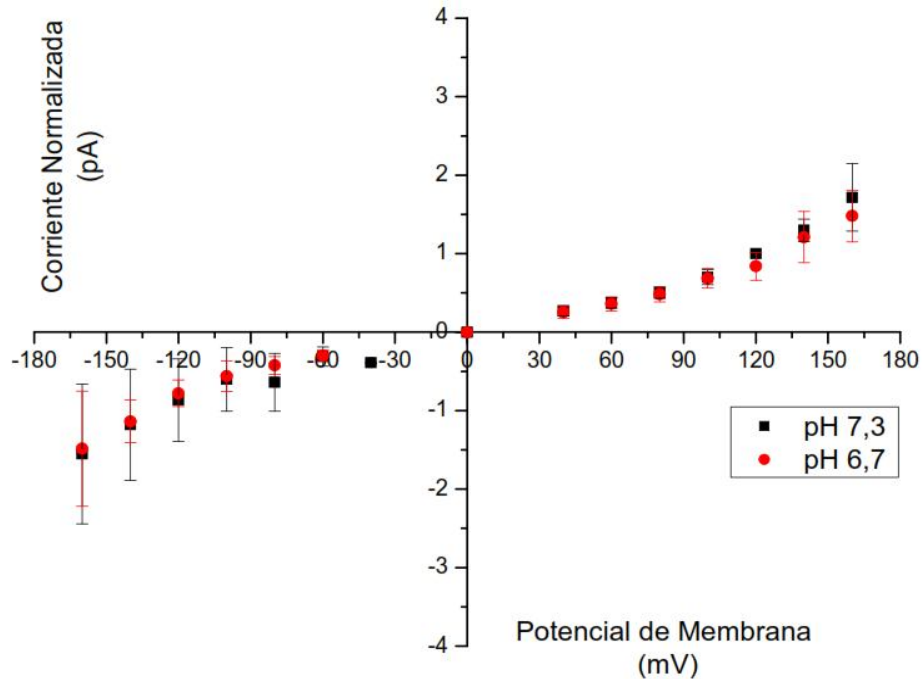
como corrientes salientes a las corrientes positivas en las cuales el movimiento de iones ocurre en sentido contrario, es decir, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y salida de  $\text{K}^+$ .

Los resultados presentados a continuación no fueron procesados estadísticamente debido a que los datos obtenidos fueron normalizados a un valor de potencial de +120mV. Por lo tanto, no se cumplen los requerimientos para el uso de estadística. Las figuras que presentamos fueron comparadas con base a las tendencias observadas. Se cuantificó el aumento o disminución de la magnitud de las corrientes.

#### EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LAS CORRIENTES TOTALES DEL INTERCAMBIADOR $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ DEL ERITROCITO HUMANO

Se estudiaron las variaciones sobre la amplitud de las corrientes del Intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  estableciendo gradientes de protones ( $\text{H}^+$ ) del interior al exterior celular. Para ello se realizaron curvas corriente vs. Potencial de membrana (IV). Para comenzar podemos observar la Fig. 12, en donde presentamos las

corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) y a pH 6,7 (condición experimental).

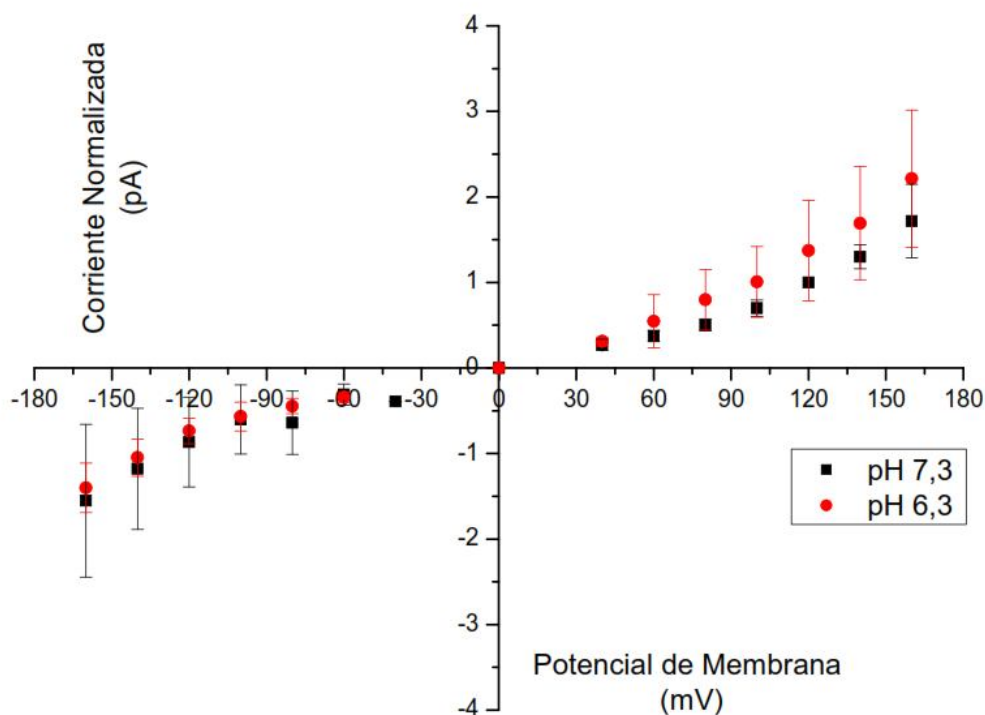


**Figura 12. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En negro, promedio de las corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas al intercambiar por la solución de pH 6,7. Todos los datos fueron normalizados con el valor de la corriente a 120mV del experimento control correspondiente. Dichos puntos son el promedio de trece experimentos en la condición control y nueve experimentos para la condición experimental.**

En la figura 12 podemos observar como el comportamiento de ambos grupos de datos es muy parecida, teniendo que cuando las corrientes son salientes del eritrocito no tenemos variación de las corrientes obtenidas a pH 6,7 con respecto al control (pH 7,3), mientras que cuando las corrientes son entrantes a la célula si observamos una variación en la magnitud de las corrientes obtenidas a pH 6,7, se puede apreciar una pequeña disminución en las mismas con respecto a las magnitudes de las corrientes medidas en la condición control.

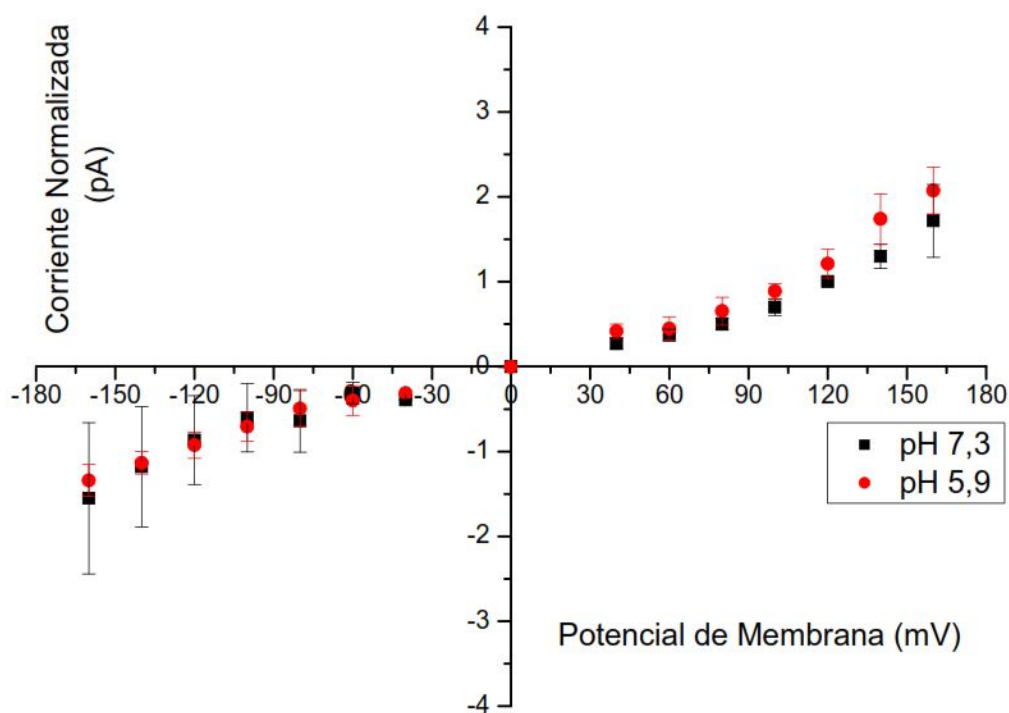


En la figura 13 tenemos la magnitud de las corrientes totales normalizadas obtenidas en la condición control y a pH 6,3 (condición experimental), podemos observar un comportamiento similar en ambos grupos de datos, cuando las corrientes son salientes de la célula a pH 6,3 son mayores que las corrientes a pH 7,3, para el caso de las corrientes entrantes a las células observamos que las corrientes a pH 6,3 son menores a las medidas a pH 7,3.



**Figura 13. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En negro, promedio de las corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas al intercambiar por la solución de pH 6,3. Todos los datos fueron normalizados con el valor de la corriente a 120mV del experimento control correspondiente. Dichos puntos son el promedio de trece experimentos para la condición control y 6 experimentos para la condición experimental.**

En la figura 14 podemos observar que cuando las corrientes son entrantes tenemos que la magnitud de las corrientes totales normalizadas para pH 5,9 son menores a las obtenidas a pH 7,3 aunque se aproximan a estas. Cuando las corrientes son salientes vemos que la magnitud de las corrientes totales son mayores a pH 5,9 en comparación con las medidas a pH 7,3.



**Figura 14. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En negro, promedio de las corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas al intercambiar por la solución de pH 5,9. Todos los datos fueron normalizados con el valor de la corriente a 120mV del experimento control correspondiente. Dichos puntos son los promedios obtenidos de trece experimentos para la condición control y de cuatro experimentos en la condición experimental.**

En la siguiente tabla (tabla 2) presentamos la cuantificación del efecto del cambio de pH sobre las corrientes totales desarrolladas por el intercambiador.

	<b>pH 6,7</b>	<b>pH 6,3</b>	<b>pH 5,9</b>
+160mV	-18,74%	+6,69%	+16,56%
-160mV	-2,84%	-0,86%	-2,32%

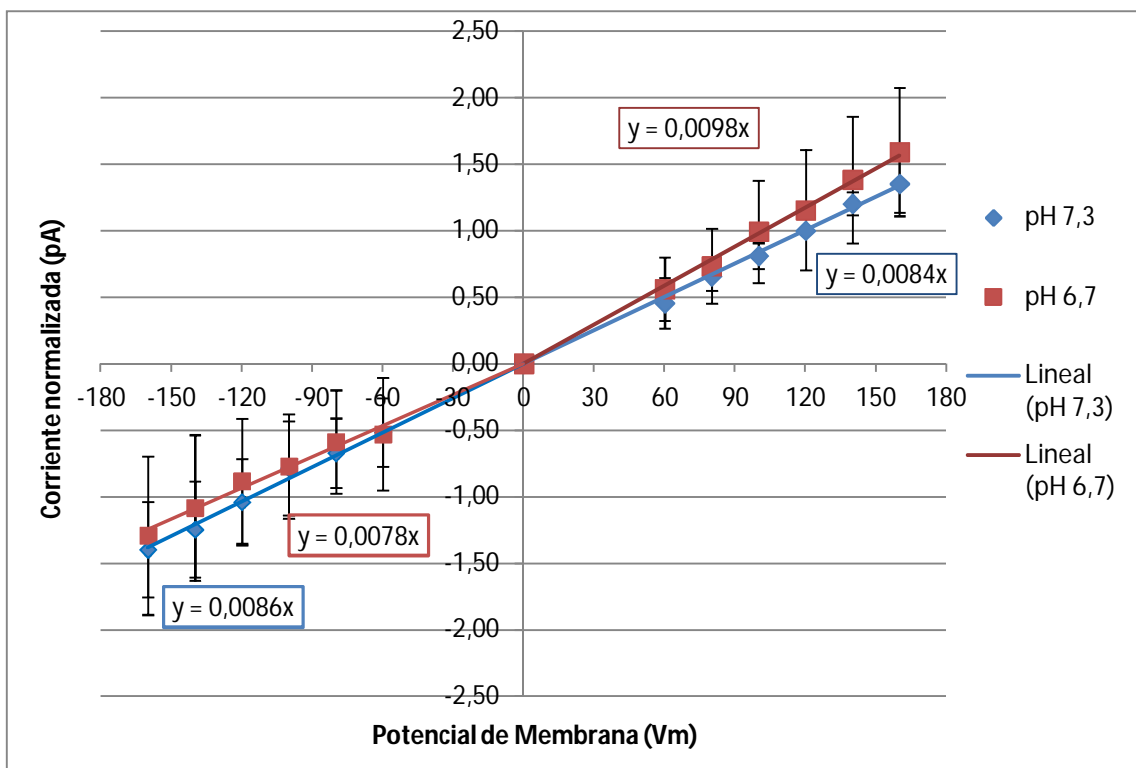
**Tabla 2. Porcentajes de disminución y/o aumento de corriente después del tratamiento experimental con los diferentes pH.**

Esta tabla resume como los cambios de pH intracelular tienen un efecto sobre las corrientes totales del intercambiador, como hemos observado en las figuras (12, 13 y 14) presentadas anteriormente, cuando el sentido de corriente es saliente solo para pH 6,7 vimos una disminución en las corrientes, mientras que a pH 6,3 y 5,9 vemos un aumento, siendo el aumento a 5,9 mucho mayor. Mientras que cuando las corrientes son entrantes en todos los casos observamos disminución de las corrientes, teniendo que el efecto es prácticamente igual en los tres casos, a excepción de la condición a pH 6,3 en donde el porcentaje de disminución es muy poco.

#### EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LAS CORRIENTES INSTANTANEAS DEL INTERCAMBIADOR $K^+/Ca^{2+}$ DEL ERITROCITO HUMANO.

Para la medición de las corrientes instantáneas utilizamos el protocolo de estimulación I, en el cual se elimina la dependencia de la activación del mecanismo y medir el efecto sobre el flujo al realizar los cambios de pH.

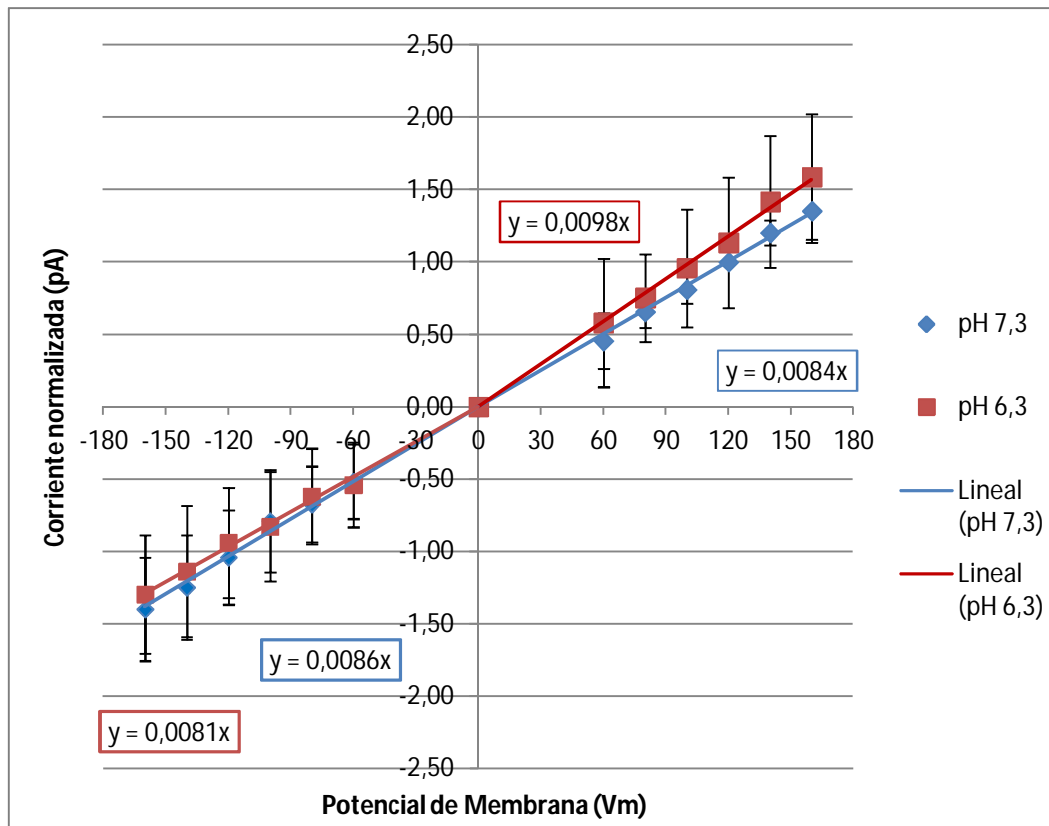
En la figura 15 observamos en los puntos azules la magnitud de las corrientes instantáneas a pH 7,3 y en los puntos rojos tenemos la magnitud de las corrientes instantáneas a pH 6,7. Como en este caso eliminamos la dependencia del potencial para la activación del mecanismo y solo medimos el flujo podemos ver una tendencia lineal (Óhmica) en el comportamiento de dichas corrientes.



**Figura 15. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En azul, promedio de las corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas al intercambiar por la solución de pH 6,7. Todos los datos fueron normalizados con el valor de la corriente a 120mV del experimento control correspondiente. Las corrientes son el promedio de ocho experimentos para la condición control y cinco experimentos en la condición experimental.**

En la figura 15 arriba presentada tenemos que cuando las corrientes son salientes a pH 6,7 fueron mayores que las medidas en la condición control y al realizar el ajuste lineal la pendiente de 6,7 es mayor a la obtenida a pH 7,3. Mientras que en la condición de corrientes entrantes tenemos un comportamiento diferente en el cual la magnitud de la corriente obtenida es menor a las observadas en la condición control y en cuanto a la pendiente del ajuste lineal tenemos que es menor a pH 6,7 que a pH 7,3.

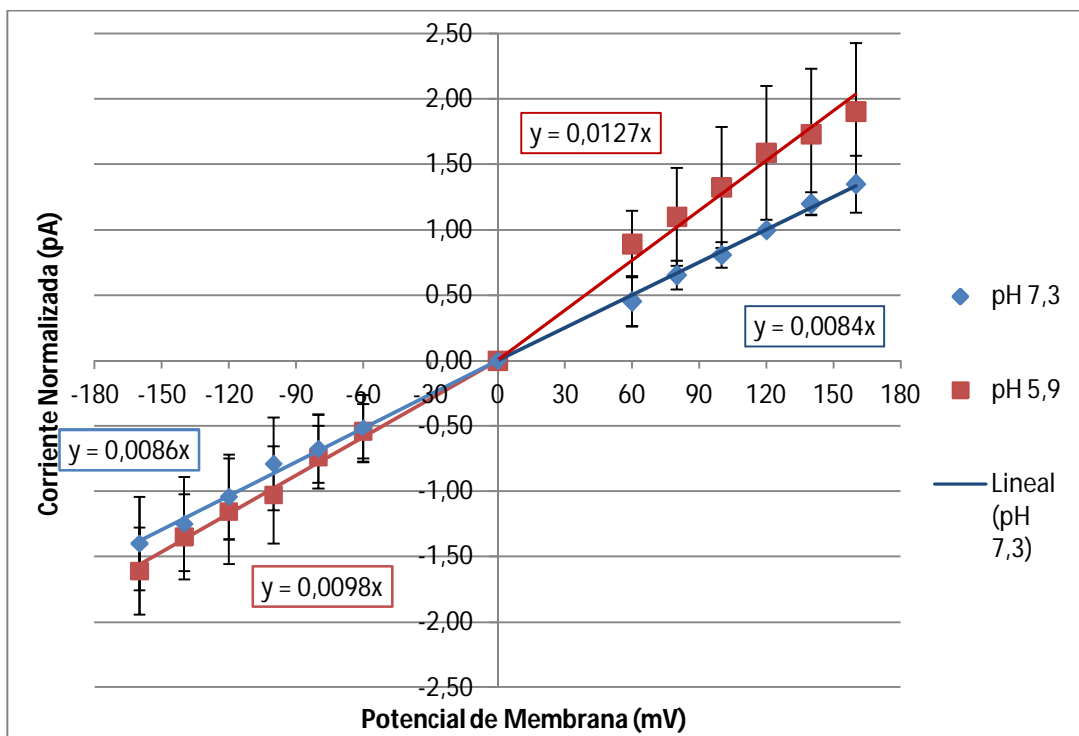
En la figura 16 presentamos las corrientes instantáneas medidas al realizar el cambio de pH a 6,3 comparadas contra las corrientes a pH 7,3. En el sentido en que las corrientes son salientes de la célula son mayores en la condición experimental al igual a la pendiente del ajuste de tendencia de los puntos en esta condición, sin embargo cuando la corriente es entrante a la célula observamos que a pH 6,3 son menores las magnitudes de las corrientes instantáneas que las obtenidas en la condición control, al igual que la pendiente del ajuste lineal a pH 6,3 es menor a la de la condición control.



**Figura 16. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En azul, promedio de las corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas al intercambiar por la solución de pH 6,3. Todos los datos fueron normalizados con el valor de la corriente a 120mV del experimento control correspondiente. Dichos valores son el promedio de ocho experimentos para la condición control y cinco experimentos a pH 6,3.**

Podemos resaltar que en la figura 16 antes presentada hay una mayor diferencia entre las pendientes en la condición de salida de corriente de la célula mientras que cuando el sentido de la corriente es hacia el interior celular la diferencia entre las pendientes es menor.

En la figura 17 presentamos la corriente normalizada a pH 7,3 y 5,9 en donde tenemos que cuando la dirección de la corriente es hacia el exterior celular observamos un aumento en dichas corrientes a pH 5,9, mientras que cuando el sentido de la corriente es hacia el interior celular observamos un comportamiento diferente al que hemos venido teniendo en donde la magnitud de la corriente a pH 5,9 es mayor que la medida a pH 7,3 (control). Es importante resaltar que las pendientes de las líneas de tendencia en ambos sentidos de la corriente son mayores las pendientes de las líneas obtenidas a pH 5,9 que las obtenidas a pH 7,3.



**Figura 17. Relación Corriente normalizada vs. Potencial de membrana. En negro, promedio de las corrientes obtenidas a pH 7,3 (condición control) aplicando protocolo IV. En rojo, promedio de las corrientes obtenidas al intercambiar por la solución de pH 5,9. Todos los datos fueron normalizados con el valor de la corriente a 120mV del experimento control correspondiente.**

Cuando el sentido de la corriente es saliente es evidente que a medida que disminuye el pH las pendientes tienden a ser mayores, aunque a pH 6,7 y 6,3 observamos la misma pendiente pero para pH 5,9 tenemos un aumento sobre las anteriores. Para corrientes entrantes a pH 6,7 (primera condición experimental) tenemos una disminución en la pendiente y para pH 6,7 y 5,9 aumenta la pendiente siendo la del último pH mayor que la pendiente de la condición control pH 7,3.

	<b>Pendiente de ajuste Corrientes salientes</b>	<b>Pendiente de Ajuste Corrientes entrantes</b>
pH 7,3	0,0084	0,0086
pH 6,7	0,0098	0,0078
pH 6,3	0,0098	0,0081
pH 5,9	0,0127	0,0098

**Tabla 3. Valores de las pendientes de las líneas de tendencia de las corrientes instantáneas normalizadas en condición control y condición experimental.**

Resumiendo podemos agregar que hay efecto sobre las corrientes instantáneas aunque al aplicar la prueba estadística el resultado es todo lo contrario, esto podría deberse al número de experimentos utilizados y a que las desviaciones estándar para algunos puntos son grandes.



En la tabla 4 cuantificamos el efecto sobre las corrientes instantáneas medidas a +160mV y -160mV, elegimos este potencial ya que es en el cual obtuvimos la corriente máxima.

	<b>pH 6,7</b>	<b>pH 6,3</b>	<b>pH 5,9</b>
+160mV	4,3901%	17,5012%	40,9617%
-160mV	-7,5727%	-7,3564%	15,0657%

**Tabla 4. Porcentajes de disminución y/o aumento de las corriente instantáneas después del tratamiento experimental con los diferentes pH a +/-160mV.**

En la tabla 5 presentamos la variación de las magnitudes de las corrientes de las condiciones experimentales contra la magnitud de la corriente en la condición control en los puntos de voltaje donde obtuvimos la corriente máxima, teniendo que para las corrientes salientes la variación de la corriente siempre es positivo y con un aumento ligado a la variación de pH (mientras más ácido el pH mayor es el aumento) mientras que cuando las corrientes son salientes observamos que a pH 6,7 y 6,3 la variación es negativa, la magnitud de las corrientes en la condición experimental es menor a la magnitud de la corriente en la condición control y para el pH 5,9 tenemos una variación positiva, es decir, la magnitud de la corriente a pH 5,9 es mayor que la obtenida a pH 7,3.

	<b><math>\Delta I</math> pH 6,7</b>	<b><math>\Delta I</math> pH 6,3</b>	<b><math>\Delta I</math> pH 5,9</b>
160mV	0,0593pA	0,2366pA	0,5537pA
-160mV	-0,1058pA	-0,1028pA	0,2105pA

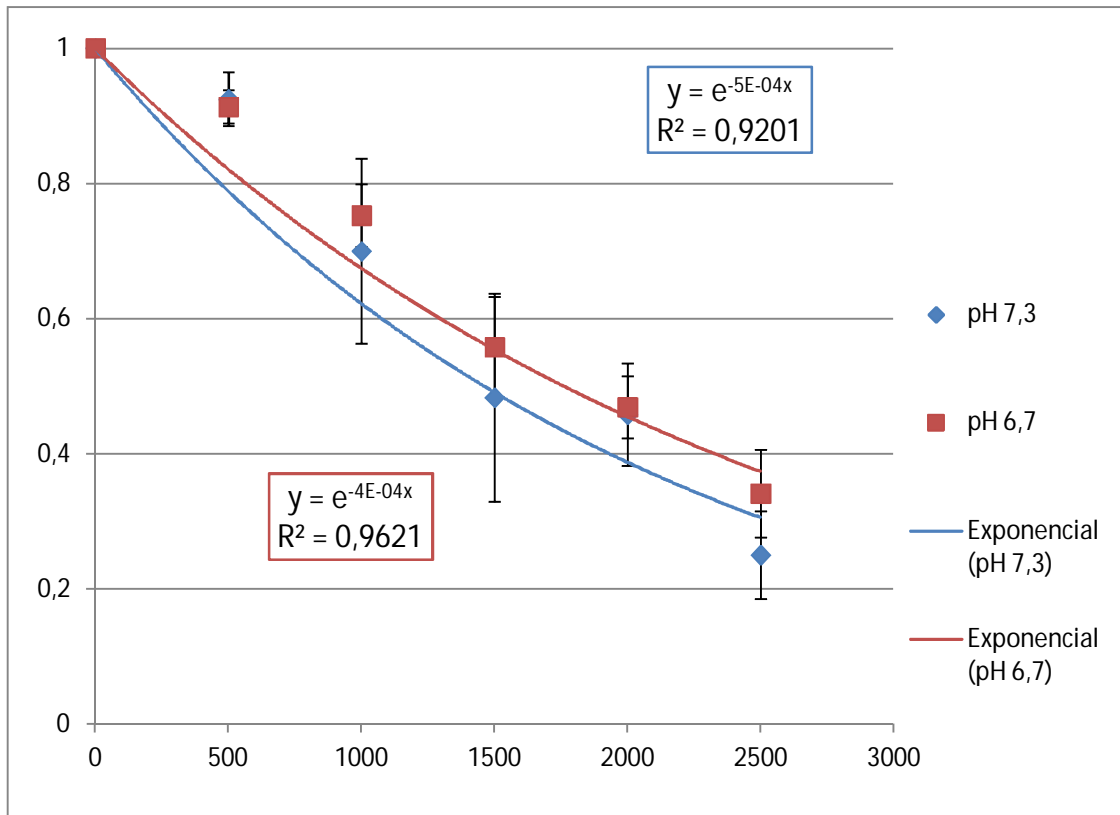
**Tabla 5. Cuantificación de  $\Delta I$  para la magnitud de las corriente instantáneas después del tratamiento experimental con los diferentes pH a +/-160mV.**

EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR  $K^+/Ca^{2+}$  DEL ERITROCITO HUMANO.

El estudio del desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$ , se realizó aplicando el protocolo II, en el cual se aplicaron dos pulso seguidos el primero con una duración de 2seg y el segundo con una duración de 1seg de la misma magnitud (+160mV y -160mV) con intervalos de separación de 500ms entre pulso y pulso partiendo desde 2500ms de separación hasta 0ms (cero). Solo se experimentó con pH 6,7, debido a que el tiempo durante el cual se exponía cada patch eran muy largos, y a potenciales de membrana muy altos, lo cual generaba la ruptura del sello e imposibilitaba la medición de la corriente para más de un cambio de pH.

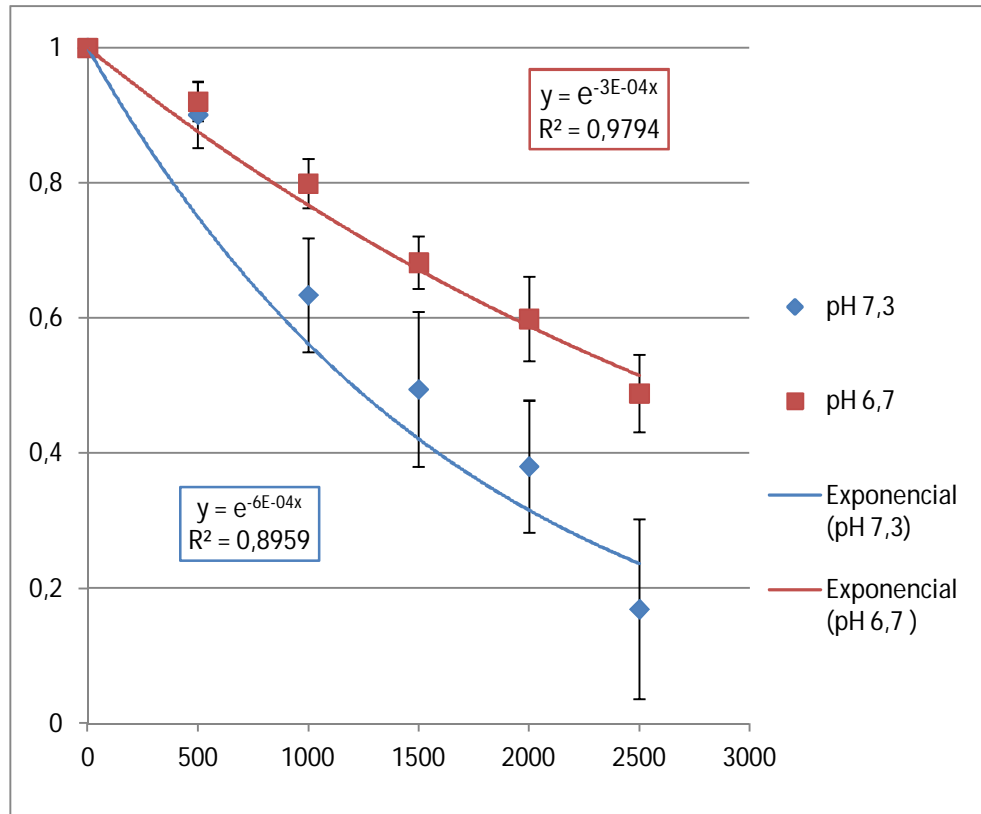
En la figura 18 presentamos el desarrollo temporal de la desactivación de las corrientes obtenidas con pulsos de magnitud de +160mV en donde tenemos que los puntos en azul corresponden a las corrientes a pH 7,3 y los puntos en rojos a pH

6,7. Podemos observar como a pH 6,7 tenemos una desactivación más lenta que la obtenida para la condición control (pH7,3).



**Figura 18.- Relación de la disminución de corriente versus tiempo de separación entre los pulsos, para las corrientes obtenidas en la condición control (azul) y para la condición experimental a pH 6,7 (rojo), al aplicar el protocolo de estimulación II, a potencial de +160mV. Los puntos son los promedios de cinco experimentos diferentes para la condición control y cuatro experimentos para la condición experimental.**

En la figura 19 presentamos el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  al aplicar pulsos de -160mV a pH 7,3 (azul) y pH 6,7 (rojo).



**Figura 19.- Relación de la disminución de corriente versus tiempo de separación entre los pulsos, para las corrientes obtenidas en la condición control (azul) y para la condición experimental a pH 6,7 (rojo), al aplicar el protocolo de estimulación II, a potencial de -160mV. Los puntos son los promedios de cinco experimentos diferentes para la condición control y cuatro experimentos para la condición experimental.**

Tenemos como resultado en la figura 19 que el efecto observado cuando las corrientes son salientes a la célula como al variar el pH a 6,7 la desactivación del mecanismo es más lenta que la obtenida para el pH 7,3, es decir, el tiempo de desactivación a pH 6,7 es mayor que en la condición control.

Calculamos los valores de tau del ajuste exponencial ( $\tau$ ) para poder compararlas entre sí, los cuales presentamos en la tabla 13.

	$\tau$ (+160mV)	$\tau$ (-160mV)
pH 7,3	2000ms	1666,6ms
pH 6,7	2500ms (+25%)	3333,3ms (+100%)

**Tabla 6. Tiempos en los cuales las corrientes normalizadas para las figuras 18 y 19 disminuye a un 36,78% de su valor inicial. Valores correspondientes a  $\tau$  de las exponenciales de ajuste.**

Podemos observar en la tabla 6 las variaciones para las  $\tau$  entre las obtenidas tanto a pH 7,3 como a pH 6,7. Cuando se fija el potencial a +160mV obligando la salida de  $K^+$  el aumento de la  $\tau$  es de un 25%, mientras que cuando el movimiento de  $K^+$  es inverso, es decir, hacia el interior celular el aumento es de un 100% mas sobre el valor obtenido del ajuste exponencial de la condición control.

## DISCUSION

### EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LAS CORRIENTES TOTALES DEL INTERCAMBIADOR $K^+/Ca^{2+}$ DEL ERITROCITO HUMANO

Como mencionamos anteriormente en los antecedentes es limitado el conocimiento de cómo cambios en el pH afectan la conformación de las proteínas y el ensamblaje de macromoléculas. Al realizar los cambios de pH intracelular y medir la magnitud de las corrientes totales observamos que para ambos sentidos de la corriente se evidencian diferencias entre las obtenidas a pH 7,3 y las obtenidas a pH 6,7; 6,3 y 5,9.

El efecto observado es complejo y se podría separar en dos partes una cuando la corriente es entrante y la otra cuando la corriente es saliente.

Habíamos definido como corrientes salientes aquellas generadas al salir  $K^+$  y entrar  $Ca^{2+}$  a la célula (este movimiento de iones ocurre al fijar el potencial de membrana a valores positivos que varían de 0 a +160mV, ya que entre ambos compartimientos la cámara y la pipeta no tenemos gradientes en las concentraciones iónicas) en esta condición observamos que al realizar el primer

cambio de pH 6,7 (figura 12) observamos efecto solo para los 3 tres puntos finales (+120, +140 y +160mV) en los cuales tenemos una disminución en la magnitud de la corriente total, para el segundo cambio pH 6,3 (figura 13) es evidente un aumento en la magnitud de las corrientes generalizado en cada uno de los puntos de potencial medidos. Para el tercer cambio pH 5,9 (figura 14) tenemos el mismo comportamiento de la condición experimental anterior en la cual se muestra un aumento en la magnitudes de las corrientes totales. Como definición de corrientes salientes tenemos salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y entrada de  $\text{K}^+$  a la célula (condición que se consigue al fijar el potencial de membrana a valores negativos de 0 a -160mV) en donde en las tres condiciones experimentales (pH 6,7; 6,3 y 5,9) las magnitudes de las corrientes son menores a las obtenidas en la condición control y bastante similar el efecto entre sí.

Desde nuestro punto de vista, la acidificación del medio intracelular genera un cambio en un posible dominio intracelular del intercambiador  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  que facilita la salida de  $\text{K}^+$  de la célula como por ejemplo el vestíbulo del intercambiador, ya que, como pudimos mostrar gráficamente el efecto se ve más marcado cuando se fija la dirección del  $\text{K}^+$  hacia el exterior celular con un aumento en la magnitud de las corrientes totales, efecto que no se ve cuando la dirección de dicho ion es al contrario, es decir, del exterior al interior celular. Al observar la tabla 5 que muestra el porcentaje (%) de aumento o disminución de la magnitud de la corriente a un potencial de membrana de +160mV a medida que se acidifica el medio es mayor el

efecto sobre el aumento de las corrientes, con lo cual podríamos afirmar que al aumentar la concentración de hidrogeniones pudiera estar ocasionando alguna modificación en algún posible dominio intracelular que facilita la salida de  $K^+$  por una protonación o modificación de la estructura aumentando así la entrada al mecanismo de transporte de dicho ión hacia el exterior celular generando el aumento en la magnitud de las corrientes a potenciales positivos.

Por otra parte, estos resultados permiten inferir que los mecanismos de entrada de los iones ( $Ca^{2+}$  o  $K^+$ ) no son similares, ya que, observamos que el efecto de aumento sobre las corrientes totales ocurre cuando fijamos el potencial de membrana a valores positivos. Al fijar el potencial de membrana a valores negativos se genera un efecto distinto, en el que la magnitud de la corriente a pH 6,7 y 6,3 es muy similar a la condición control a pH 7,3. Sin embargo a pH 5,9 pudimos ver un aumento con respecto al control. Por lo tanto, hay un efecto diferencial dependiente de la dirección del flujo que podría ser producto de la modificación de alguna estructura intracelular del intercambiador que interactúa diferencialmente con ambos iones, o de la existencia de dos vías diferentes de permeación para los iones ( $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ).

El efecto contrario fue observado por Heinz y Hoffman (1990) cuando al realizar cambios de pH intracelular y extracelular para estudiar su efecto sobre el canal



Gardos en presencia de DIDS para evitar que se equilibrara el pH entre ambos compartimientos y manteniendo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  constante suficiente para el funcionamiento del canal y variando las concentraciones de  $\text{K}^+$  intracelular y extracelular observaron que a pH ácidos del lado extracelular (desde 6,0 a 7,5) y a concentración de  $\text{K}^+$  bajas una inhibición completa y que cuando la concentración de  $\text{K}^+$  aumentaba el efecto era menor aun a pH ácidos. Resaltan como su conclusión más importante por encima del efecto inhibitorio de la concentración  $\text{H}^+$  es el efecto antagonista del  $\text{K}^+$  y los  $\text{H}^+$  por ambos lados de la membrana en donde proponen la posible existencia de dos sitios por el lado extracelular de la membrana en donde uno sea el encargado de mantener abierto el canal una vez unido el  $\text{K}^+$  y un segundo sitio encargado de promover cierre del canal o impedir su apertura en el cual los  $\text{H}^+$  de alguna manera si influyen, plantean que este segundo sitio está presente por ambos lados de la membrana.

#### EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LAS CORRIENTES INSTANTANEAS DEL INTERCAMBIADOR $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ DEL ERITROCITO HUMANO

Cuando las corrientes son salientes a la célula el efecto observado en presencia de los tres diferentes pH es un aumento paulatino en la magnitud de las corrientes instantáneas (tabla 11), es decir, a medida que se acidifica el medio el aumento de la corriente es mayor. En el caso de las corrientes entrantes a la célula observamos dos efectos: un primer efecto al realizar el primer cambio (pH 6,7) de disminución

de la corriente que se mantiene con el segundo cambio (pH 6,3) un segundo efecto al realizar el tercer cambio (pH 5,9) lo que observamos es un aumento de la magnitud de las corrientes instantáneas, es decir, el efecto observado cuando las corrientes son entrantes a la célula parece ser dependiente al flujo iónico y al valor de pH, diferente a lo que ocurre cuando las corrientes son salientes que observamos un efecto monotónico. Podríamos inferir que el efecto generado sobre las corrientes vendría dado por la protonación de algún aminoácido ubicado en la estructura de la proteína, aunque aún no se conoce la secuencia de aminoácidos de la estructura de esta proteína, tenemos que el pKa próximo a los pH utilizados en nuestros experimentos sería el de la Histidina (His) la cual posee un pKa en su cadena lateral de 6,0 nosotros proponemos la presencia de más de una His ubicada en diferentes posiciones a lo largo de toda la estructura del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  generando que estos residuos estén ubicados en microambientes diferentes ocasionando que el punto de pH al cual se protonan estos residuos sea a diferentes pH, decimos que deben estar presentes más de un residuo de His ya que el efecto que observamos es dicotómico cuando las corrientes son entrantes lo que sería imposible de explicar si solo tenemos un residuo presente por el contrario teniendo más de uno a lo largo de la estructura tendríamos que al probar diferentes pH protonamos alguno de ellos. Es interesante observar que el efecto observado varía con la dirección del flujo teniendo un efecto monotónico cuando el  $K^+$  sale y el  $Ca^{2+}$  entra, mientras que cuando el  $K^+$  entra y el  $Ca^{2+}$  sale es un efecto dicotómico como habíamos mencionado anteriormente el

efecto sobre el mecanismo encargado de introducir los iones al intercambiador (por ejemplo el vestíbulo) generaría la diferencia observada sobre la magnitud de las corrientes dependientes del flujo. Cymes y colaboradores (2005) observan que al cambiar los residuos de aminoácidos del poro transmembrana de un receptor acetilcolínico nicotínico, por lisinas, histidinas y argininas individuales en la configuración abierta del canal, los estudios cinéticos sugieren estados de protonación para algunos de los residuos de origen ionizables, que dependen de las propiedades dieléctricas del poro, proporcionando un amplio conjunto de valores de pKa para un mismo residuo los cuales dependerán del microambiente en el cual se encuentran, resaltan que los valores de pKa son funciones complejas del microambiente local; algo muy similar a lo que suponemos que ocurre con los cambios de pH sobre el intercambiador. Nosotros proponemos que al tener más de una His en diferentes posiciones del intercambiador las cuales se encuentran en microambientes diferentes que modifiquen su pKa el efecto sobre la estructura o función del mecanismo al protonarse variara dependiendo de la cantidad de His protonadas o no en el momento de la medición.

#### EFFECTO DEL pH INTRACELULAR SOBRE LA DESACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR $K^+/Ca^{2+}$ DEL ERITROCITO HUMANO.

Cuando analizamos los valores de  $\tau$  obtenidos para la condición experimental (pH 6,7) tenemos que son mayores a las obtenidas en la condición control (figuras

18 y 19). Esto indica que al realizar el cambio de pH a 6,7 el desarrollo de la desactivación es más lento que a pH 7,3; podemos decir que una parte de la corriente total generada por el intercambiador persiste en el tiempo y depende de la dirección del flujo de los iones ( $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ). Esto podría ser consecuencia de la protonación de una o más His involucradas en el mecanismo encargado del proceso de desactivación.

## **CONCLUSION**

De los resultados obtenidos al estudiar el efecto del pH intracelular sobre las corrientes del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  podemos concluir que:

1. La acidificación del medio intracelular pudiera estar generando un posible cambio en un dominio citoplasmático del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  que facilita la salida de  $K^+$  de la célula.
2. La acidificación del medio intracelular genera un aumento progresivo en la magnitud de las corrientes salientes de la célula del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$
3. El efecto de la acidificación del medio intracelular sobre las corrientes entrantes del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  no mostró cambios progresivos en la magnitud de las corrientes. El efecto encontrado es dicotómico según los cambios de pH.
4. El efecto de la acidificación del medio intracelular sobre el desarrollo temporal de la desactivación del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  fue al menos 3 veces mayor cuando el flujo de  $K^+$  era en dirección al interior celular
5. Proponemos la presencia de más de una His en la estructura del intercambiador  $K^+/Ca^{2+}$  que afectan el flujo iónico y se encuentran en microclimas distintos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alinovi, C., De Rosa, M., Galtieri, A., Giardina, B. and R. Scatena. 2007. *The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron.* GENE. 398:162-171.

2. Agre, P. & Parker, J.C. 1989. *Red blood cell membrane: structure, function, clinical implication*. Marcel Dekker, Inc. New York.
3. Alberts, B., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. and J.D, Walter. 1994. *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing. New York.
4. Alonso, A., Arrazola, Diez, J., Garciandia, A., Esparza, N. and C. Gomez-Alamillo. 1993. *Erythrocyte anion exchanger activity and intracellular pH in essential hypertension*. *Hypertension*. 22: 348-356.
5. Barber, D., Jacobson, M. and J. Srivastava. 2007. *Intracellular pH sensors: design principles and functional significance*. *Physiology* 22: 30-39.
6. Bouyer, G., Thomas, S. and S. Egée. *Patch-clamp analysis of membrane transport in erythrocytes*. *Patch clamp technique*. Francia. Pag 171-202.
7. Canessa, M. and N. Escobales. 1986. *Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> transport in human red cells: evidence for a Na/H exchange system*. *J. Membrane Biology*. 90: 21-28.
8. Canessa, M., Morgan, K., Goldszer, R., Moore, T., and A. Spalvins. 1991. *Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive patients*. *Hypertension* 17:340-348.
9. Cymes, G. and C, Grosman. 2005. *Probing ion-channel pores one proton at a time*. *Nature*. 438: 975-980
10. Darnell, J., et al. 1995. *Molecular cell biology*. Scientific America Book, Inc. 3d. ed. Pag: 30-32.
11. De Carvalho-Alves, P., Freire, M., Barrabin, H. and H, Scofano. 1994. *Regulation of the erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase at high pH*. *Eur. J. Biochem*. 220, 1029-1036.

12. Dunham, P., Ellory, J. and G. Stewart. 1980. *Chloride-activated passive potassium transport in human erythrocytes*. Proc. Natl. Acad. Sc. Vol. 77, No. 3, pp. 1711-1715. USA.
13. Dunham, E. and I. Glynn. 1961. *Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions*. Journal Physiology. 156:274-293.
14. Engelmann, B. 1991. *Calcium Homeostasis of Human Erythrocytes and Its Pathophysiological Implications*. Klinische Wochenschrift. 69:137-142
15. Ellory, J. and A. Hall. 1986. *Effects of high hydrostatic pressure on "passive" monovalent cation transport in human red cells*. J. Membrane Biol. 94: 1-17.
16. Ellory, J. and A. Hall. 1986. *Evidence for the presence of volume-sensitive KCl transport in young human red cells*. Biochem. Biophys Acta 858(2): 317-320.
17. Forsyth, P. 2006. *El intercambiador  $K^+/Ca^{+2}$ : Efectos del ión Na y Caracterización Cinética Parcial*. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas
18. Galue, D. 2007. *Efecto de la oxidación de la membrana del eritrocito humano sobre las corrientes del intercambiador  $K^+/Ca^{+2}$* . Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
19. Guyton, A. and J. Hall. 2001. *Tratado de Fisiología Médica*. Decima edición. Pág. 422.
20. Hamill, O., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and F. Sigworth. 1981. *Improved Patch-Clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. European Journal of Physiology. 391:85-100.

21. Heinz, A. and J. Hoffman. 1990. *Membrane sidedness and the interaction of H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> transport in human red blood cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 1998-2002.
22. Hille, B. 2001. *Ion channels of excitable membrane*. Sinauer Associates, Inc. Suntheland, MA, USA.
23. Kaji, D. 1986. *Volume-sensitive K<sup>+</sup> transport in Human Erythrocytes*. J. Gen. Physiol. 88: 719-738.
24. Kucherenko, Y. and D, Mörsdorf. 2009. *Acid- sensitive outwardly rectifying anion channels in human erythrocytes*. J Membrane Biol. 230:1-10.
25. Libera, J., Herrmann, A., Müller, P. and T. Pomorski. 1997. *Influence of pH on Phospholipid Redistribution in Human Erythrocyte Membrane*. Blood. 90(4): 1684-1693.
26. Lew, V., Hockaday, A., Sepulveda, M., Somlyo, A., Ortiz, O. and R. Bookchin. 1985. *Compartmentalization of sickle-cell calcium in endocytic inside-out vesicles*. Nature. 315: 586-589.
27. Maher, A. and P., Kuchel. 2003. *The Gárdos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 35:1182-1197.
28. Matthes, E. 2005. *Caracterización parcial del contratransporte K<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> del eritrocito humano: estequiometria y efecto de iones mono y divalentes*. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas.



29. Murphy, E., Berkowitz, L., Orringer, E., Levy, L., Gabel, S. and R. London. 1987. *Cytosolic free calcium levels in sickle red blood cells*. Blood. 69: 1469-1474.
30. Proverbio, F., Shoemaker, D. and J. Hoffman. 1988. *Functional consequences of the membrane pool of ATP associated with the human red blood cell Na/K pump*. Prog. Clin Biol Res. 268A: 561-567.
31. Romero, J. 2004. *Diseño y aplicación de un símil físico de capilar sanguíneo para la caracterización biofísica de canales iónicos del eritrocito humano en condiciones fisiológicas*. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
32. Romero, P. and E. Romero. 2004. *Determine factors for an apparent increase in oxygen affinity of senescent Human erythrocytes*. Acta Científica Venezolana. Vol. 55, n.1.
33. Romero, P. and E. Romero. 1997. *Differences in Ca<sup>2+</sup> pumping activity between sub-populations of human red cells*. Cell Calcium. 21(5): 353-358.
34. Romero, J. And A. Zambrano. 2008. *El canal de potasio del eritrocito humano (HEMKCA) es el disparador de la senescencia y su regulación por Ca<sup>2+</sup> es el mecanismo de seguridad*. Memorias del Instituto de Biología Experimental. Vol. 5:93-96.
35. Sperelakis, N.2001. *Cell Physiology Sourcebook*. Academic Press. San Diego, California, USA.
36. Starr, C. and R. Taggart. 2008. *Biología: la unidad y la diversidad de la vida*. Thomson Editores. Undécima edición. Cap.40. pág. 700-714.

37. Thews, G.; Mutschler, E. and P, Vaupel. 1983. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre. Manual para farmacéuticos y biólogos. Editorial reverté, SA. España.
38. *The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*. 1993. Axon Instruments, Inc. USA.
39. Yawat, Y. 2003. *Cell membrane: The red blood cell as a model*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Germany.