

Efectos de los nucleótidos cíclicos sobre los canales de K^+ dependientes de calcio, en el eritrocito humano

N. Esparza y J. Díez*

Servicio de Nefrología. Clínica Universitaria
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
31080 Pamplona (España)

(Recibido el 17 de mayo de 1987)

N. ESPARZA and J. DIEZ. *The Effect of Cyclic Nucleotides on Calcium Dependent K^+ Channels in Human Erythrocytes*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 57-62, 1988.

K^+ efflux has been analyzed in human erythrocytes incubated in a K^+ free medium containing ouabain, bumetanide, $CaCl_2$, and the Ca^{2+} ionophore A23187. In these conditions, a K^+ efflux, which is exponentially dependent on the concentration of A23187 present in the medium, has been observed. This flux is almost completely abolished by either quinine or EGTA, so that, the above K^+ efflux has been considered Ca^{2+} dependent. The effects of cAMP, and cGMP, have been tested on this flux. Ca^{2+} dependent K^+ efflux decreases in presence of millimolar concentrations of cAMP in the medium. The addition of methyl-isobutyl-xanthine to the incubation medium containing cAMP enhances the inhibitory effect of this compound. cGMP also inhibits the Ca^{2+} dependent K^+ efflux. Our results suggest that cyclic nucleotides may modulate the activation of Ca^{2+} dependent K^+ channels in human erythrocytes.

Key words: Calcium, Potassium, Flux, Erythrocytes, Cyclic nucleotides.

Distintas observaciones experimentales indican que existen múltiples relaciones entre el Ca^{2+} y los nucleótidos cíclicos. El Ca^{2+} puede activar o inhibir tanto a la adenilatociclasa como a la guanilatociclasa (20). Análogamente, cambios en la concentración de AMP cíclico (AMPc) o de GMP cíclico (GMPc) actúan a múltiples niveles del sistema mensajero del Ca^{2+} (20, 22), sugiriendo que el AMPc

podría influir la actividad de la $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPasa de la membrana celular (20).

Con el fin de profundizar en la naturaleza de esta influencia, hemos investigado el efecto del AMPc y del GMPc sobre los canales de salida de K^+ dependientes de Ca^{2+} del eritrocito humano (8, 26), basados en que el eritrocito incorpora nucleótidos cíclicos exógenos en cantidades superiores a las requeridas para saturar proteínas-quinasa dependientes de AMPc o GMPc (12, 10), alcanzando concentraciones intracelulares prácticamente estables a los 15 minutos (2).

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

Material y Métodos

Preparación de los eritrocitos. — Se utilizó sangre venosa de donantes sanos. Se recogieron 10 ml en tubos heparinizados que se centrifugaron a $1.750 \times g$ durante 15 min a $4^\circ C$. El plasma y la capa superior de células (leucocitos y plaquetas) se aspiraron y desecharon y el sedimento eritrocitario se procesó inmediatamente.

Los eritrocitos se lavaron cuatro veces con Cl_2Mg 110 mM y se resuspendieron —hasta un hematocrito del 20 %— en una solución de Mg^{2+} -sacarosa (en mM): Cl_2Mg 75, sacarosa 85, MOPS y TRIZMA BASE (MOPS-Tris) 10 (pH 7,4 a $37^\circ C$) y glucosa 10. La osmolalidad de la solución se mantuvo en 295 ± 10 mons/kg agua. Una alícuota de esta suspensión se destinó a la medida del hematocrito inicial por un método convencional. Otra alícuota se destinó a la medida del flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} . Finalmente, una tercera alícuota fue empleada para la medida del contenido intraeritrocitario de K^+ . Todos los pasos se efectuaron a $4^\circ C$.

Determinación del flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} . — Se empleó un método previamente descrito (4), adaptado, consistente en lo siguiente: 250 μl de la suspensión de eritrocitos se añadieron a 1 ml de una solución compuesta por (en mM): $ClNa$ 140, $ClCs$ 10, Cl_2Mg 1, Cl_2Ca 1, MOPS-Tris 10, glucosa 10, ouabaina 0,1 y bumetanida 0,025. La presencia de ouabaina y de bumetanida se requirió para la inhibición de la bomba de Na^+ , K^+ (9) y del contranporte Na^+ , K^+ (3) respectivamente. El funcionamiento de ambos mecanismos de transporte puede modificar la concentración intracelular de K^+ e interferir los resultados del flujo a medir. Al tiempo $t=0$ los tubos se transfirieron a un baño a $37^\circ C$ para su incubación. Confirmando trabajos previamente publicados (1, 2, 6), en experimentos control no se detectaron cambios en la absorban-

cia de hemoglobina ni evidencia de lisis de los eritrocitos durante su incubación en el medio, por lo que se descartan cambios significativos en el volumen celular y/o relación de Na^+ -contenido de agua. La concentración externa de K^+ se midió en los sobrenadantes diluidos al 1/10 en agua bidestilada y tras diferentes tiempos de incubación (5, 15 y 30 min), previa transferencia de los tubos a hielo y posterior centrifugación a $1.750 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$.

La concentración extracelular de K^+ se midió por duplicado, en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer.

Determinación del contenido intraeritrocitario de K^+ . — A 4 ml de una solución de Acatión-ox 0,2 % se añadieron 200 μl de la suspensión inicial de eritrocitos. Tras 10 minutos, los tubos se centrifugaron a $1.750 \times g$ durante 10 min, a $4^\circ C$ y se determinó la concentración de K^+ en los sobrenadantes, mediante un espectrofotómetro de absorción atómica.

Efecto de las sustancias estudiadas. — De las sustancias utilizadas (A23187, quinina, EGTA, AMPc, Metil-Isobutil-Xantina (MIX), GMPc (Sigma) se estudiaron sus efectos sobre el flujo de K^+ añadiéndolas al medio de incubación disueltas en una cantidad mínima de disolvente, para no modificar el volumen ni la concentración del medio de incubación. En experimentos control se comprobó que ninguno de los disolventes empleados (dimetil-sulfóxido, etanol, Tris) modificaba el flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} .

Estudio estadístico. — Todos los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos. Para el análisis de la significación estadística se ha empleado el test de la «t» de Student para datos no pareados. Se ha considerado estadísticamente significativa una $P < 0,05$.

Resultados

En ausencia de A23187, el flujo de K⁺ de eritrocitos incubados en presencia de Ca²⁺ 1mM disminuye con el tiempo de incubación a partir de los 5 min (tabla I). Al añadir A23187 al medio de incubación el flujo de K⁺ alcanza un valor máximo de 800 mmoles/l células/h para concentraciones de ionóforo entre 10 y 25 μ M, y se inhibe significativamente con quinina y con EGTA (fig. 1).

El hecho de que en experimentos control en ausencia de A23187, el flujo de K⁺, a los 5 min de incubación, es aproximadamente de 25 mmoles/l células/h y que su cuantía depende de la concentra-

ción de ionóforo del Ca²⁺ presente en el medio, sugiere que el flujo de K⁺ medido en presencia de A23187 depende de la cantidad intraeritrocitaria de Ca²⁺. Por ello, a este flujo se le ha denominado flujo de K⁺ dependiente de Ca²⁺.

Efecto del AMPc sobre el flujo de K⁺ dependiente de Ca²⁺. — El AMPc inhibe de manera dosis-dependiente el flujo de K⁺ de eritrocitos incubados durante 15 min en un medio con Ca²⁺ y con A23187 (2 μ M). La concentración de AMPc para la que se obtiene un 50 % de inhibición se encuentra entre 1 y 2mM. A 8 mM ya alcanza su valor máximo, aproximadamente un 75 %, (fig. 2).

Tras 5 minutos de incubación, el efecto inhibidor del AMPc sobre el flujo de K⁺ es mayor a concentraciones bajas (2 μ M) de A23187 (75-80 %) que a concentraciones elevadas (25 μ M) (25-30 %), lo que sugiere que el AMPc es menos activo

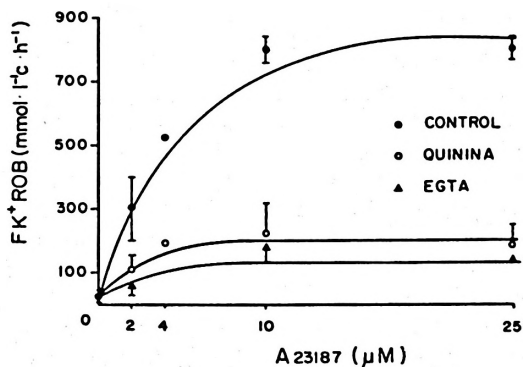


Fig. 1. Caracterización del flujo de salida de K⁺ resistente a la ouabina y a la bumetanida (FK-ROB) en un medio con Ca²⁺ (1 mM) en presencia de ionóforo del Ca²⁺ (A23187) a dosis crecientes. Efecto de la quinina (1 mM) y del EGTA (1 mM).

Tabla I. Efecto del tiempo de incubación sobre el flujo (mmol/l células × h) de salida de K⁺ en presencia de Ca²⁺ (1 mM).

Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de 5 experimentos.

	Tiempo de incubación (min)		
	5	15	30
FLUJO	24,86 $\pm$ 5,30	11,49 $\pm$ 3,40	5,19 $\pm$ 0,03

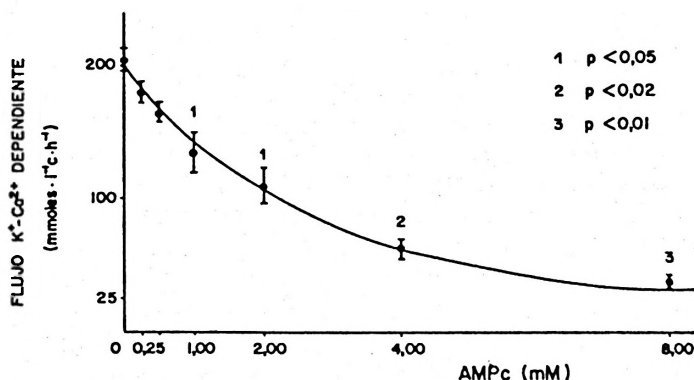


Fig. 2. Curva dosis-respuesta del efecto del AMPc sobre el flujo de K⁺ dependiente de Ca²⁺.

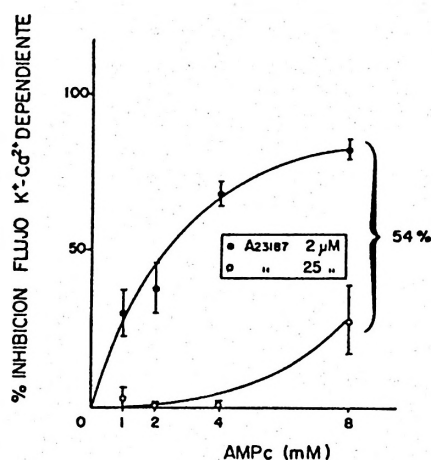


Fig. 3. Porcentaje de inhibición del flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} en presencia de concentraciones crecientes de AMPc.

Efecto de la concentración de A23187 en el medio.

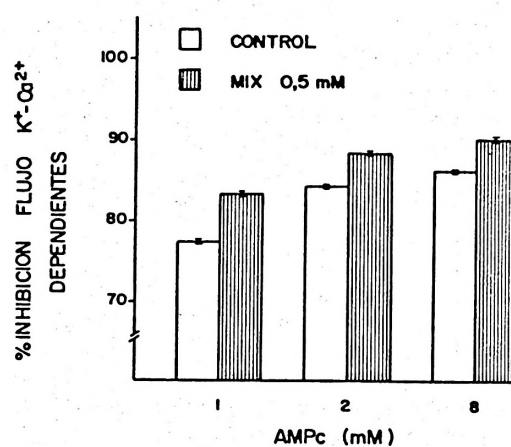


Fig. 4. Porcentaje de inhibición del flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} en presencia de concentraciones crecientes de AMPc.

Efecto de la MIX 0,5 mM.

sobre el flujo de K^+ cuando éste alcanza su nivel de saturación (fig. 3).

En presencia de MIX (inhibidor de la fosfodiesterasa que degrada el AMPc) 0,5 mM se observa un incremento ligero del efecto inhibitor del AMPc sobre el flujo de K^+ tras 15 min de incubación (fig. 4). El efecto de la MIX se mantiene constante a distintas concentraciones de AMPc, para una concentración de A23187 de 2 μ M. Todo ello sugiere que la inhibición observada es debido al AMPc y no a un producto de degradación.

Efecto del GMPc sobre el flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} (Tabla II) — A los 15 minutos de incubación el GMPc también inhibe, de manera dosis-dependiente, el flujo de K^+ . Sin embargo, a diferencia de lo observado con el AMPc, la inhibición no se modifica apreciablemente con el incremento de la concentración de A23187. Cuantitativamente, el efecto inhibitor del GMPc es inverso al del AMPc, siendo más débil a concentraciones bajas de ionóforo y más potente a concentraciones elevadas.

Tabla II. Efecto del GMPc sobre el flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} en presencia de distintas concentraciones del ionóforo A23187.

Los resultados indican % de inhibición respecto a experimentos control y se expresan como media $\pm$ EEM de 4 experimentos.

GMPc (mM)	A23187 (μ M)			
	2	4	10	25
1	12,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 2,0	7,5 $\pm$ 1,0
8	54,5 $\pm$ 6,5	43,0 $\pm$ 3,0	52,5 $\pm$ 3,0	55,5 $\pm$ 10,0

Discusión

En la primera parte de este trabajo se ha medido en eritrocitos humanos un flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} el cual se produce cuando la cuantía intraeritrocitaria de Ca^{2+} está entre 1 y 4 μM (18, 27). En condiciones fisiológicas la concentración intraeritrocitaria de Ca^{2+} es diez veces menor y su mantenimiento es función de una baja permeabilidad a la entrada de Ca^{2+} , y la actividad de la $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (19). Por ello, en nuestro trabajo, se ha aumentado la concentración intraeritrocitaria de Ca^{2+} mediante el empleo del A23187. En relación con el ionóforo del Ca^{2+} el flujo de salida de K^+ presenta dos componentes, uno exponencial para bajas concentraciones de A23187, y otro estable a partir de una concentración de 10 $\mu moles/l$. Según algunos autores (11), la activación de los canales a través de los cuales se produce el flujo de K^+ -dependiente de Ca^{2+} requiere la presencia de K^+ extracelular (11). Aunque en nuestro medio de incubación no había K^+ , se ha comprobado que, en ausencia de ionóforo, a los 5 min de incubación ya se detectaba K^+ en el medio extracelular.

El flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} aquí medido no depende de la bomba de Na^+ , K^+ (9) ni del sistema de cotransporte Na^+ , K^+ (3), al ser resistente a la acción de la ouabaina y de la bumetanida, respectivamente. Tampoco depende de la activación de un mecanismo que saca acopladamente Cl^- y K^+ del eritrocito cuando disminuye la osmolalidad del medio (13); la osmolalidad del medio de incubación se mantuvo siempre en los límites de la isotonía fisiológica. Por el contrario, parece depender de la formación de canales proteicos en la membrana para el K^+ , puesto que disminuye en presencia de quinina (14).

El flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} disminuye, de manera dosis-dependiente,

en presencia de concentraciones milimolares de AMPc y de GMPc. Aunque se desconoce el mecanismo por el que los nucleótidos cíclicos son responsables de este efecto, las posibilidades a considerar podrían ser varias: 1) interaccionando directamente con el ionóforo del Ca^{2+} o con el propio canal para el K^+ ; 2) fosforilando las proteínas de la membrana que finalmente constituyen los canales para la salida de K^+ , y 3) contraponiéndose al incremento del contenido intraeritrocitario de Ca^{2+} a expensas de estimular algún sistema de transporte de Ca^{2+} hacia el exterior del eritrocito. La primera posibilidad puede excluirse teniendo en cuenta que el isoproterenol (que actúa sobre receptores adrenérgicos que forman parte de un complejo proteico situado en la membrana al que pertenece la enzima adenilatociclasa), no modifica el flujo de salida de K^+ estimulado por el A23187 en eritrocitos humanos (25). Aunque no puede descartarse la segunda posibilidad, observaciones previas en macrófagos muestran que en presencia de AMPc disminuye la quimioluminiscencia inducida por el A23187 (15), sugiriendo que el AMPc puede oponerse a incrementos en el contenido del Ca^{2+} libre citosólico a través de la estimulación de algún sistema de transporte de Ca^{2+} . Habida cuenta de que en el eritrocito no existe ningún sistema de transporte de Ca^{2+} distinto de la $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPasa (5), nuestros resultados sugieren que los nucleótidos cíclicos podrían estimular la actividad de la $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPasa de la membrana eritrocitaria.

Aunque se requieren experimentos adicionales para evaluar esta hipótesis, no se puede descartar que fisiológicamente los nucleótidos cíclicos actúen como moduladores de la activación de los canales de K^+ -dependientes de Ca^{2+} . Modulación que tal como se ha propuesto por diversos autores, se ejerce a través de cambios en la actividad metabólica celular, concretamente cambios en la relación

ATP/ADP (23) y/o en la relación NADH/NAD (7, 16).

Resumen

Se analiza el flujo de salida de K^+ en eritrocitos humanos incubados en un medio sin K^+ con ouabaina, bumetanida, Cl_2Ca y ionóforo del Ca^{2+} A23187. El flujo de salida de K^+ resulta dependiente de la concentración de A23187 presente en el medio y es casi completamente abolido en presencia de quinina o EGTA, por lo que se considera como un flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} . El flujo de K^+ dependiente de Ca^{2+} disminuye en presencia de concentraciones milimolares de AMPc en el medio. Un efecto inhibidor similar se observa con el GMPc. La adición de MIX al medio de incubación que contiene AMPc aumenta el efecto inhibidor de este compuesto. Los resultados sugieren que los nucleótidos cíclicos, pueden modular la activación de los canales de K^+ -dependientes de Ca^{2+} en el eritrocito humano.

Palabras clave: Calcio, Potasio, Flujos, Eritrocitos, Nucleótidos cíclicos.

Agradecimientos

Agradecemos a C. Miqueo su valiosa ayuda técnica, a E. Elizalde la realización del trabajo gráfico y a A. Larraga su labor de mecanografía.

Bibliografía

1. Díez, J., Hannaert, P. y Garay, R. P.: *Am. J. Physiol.*, 252, H1-H6, 1987.
2. Garay, R. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 688, 786-792, 1982.
3. Garay, R. P., Adragna, N., Canessa, M. y Tosteson, D.: *J. Membr. Biol.*, 62, 169-174, 1981.
4. Garay, R. P., Hannaert, P. y Rodrigue, F.: *Reg. Pept.*, Suppl., 4, 97-100, 1985.
5. Garay, R. P., Price, M., Hannaert, P., et al.: En «Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions» (G. Spach, ed.). Elsevier, Amsterdam, 1983, pp. 645-653.
6. Garay, R. P., Nazaret, C. y Díez, J.: *Biochem. Pharmacol.*, 33, 2013-2020, 1984.
7. García-Sancho, J., Sánchez, A. y Herreros, B.: *Biochem. Biophys. Acta*, 556, 118-130, 1979.
8. Gardos, G.: *Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 14, 1-5, 1958.
9. Glynn, I. y Karlsh, S.: *Ann. Rev. Physiol.*, 37, 13-55, 1975.
10. Hosey, M. M. y Tao, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 252, 102-109, 1977.
11. Knauf, P. A., Riordan, J. R. y Schuhman, J. R., et al.: *J. Membr. Biol.*, 25, 1-22, 1975.
12. Kubin, C. S., Erlichman, J. y Rasmussen, H.: *J. Biol. Chem.*, 247, 6135-6139, 1972.
13. Lauff, P. K., Adragna, N. y Garay, R. P.: *Am. J. Physiol.*, 246, 385-390, 1984.
14. Lew, V. L. y Beague, L.: En «Membrane Transport in Biology» (G. Giebisch, D. Tosteson y H. H. Ussing, eds.). Springer-Verlag, Nueva York, 1979, pp. 81-115.
15. Lim, L. K., Hunt, N. H. y Weidemann, M. J.: *J. Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 114, 549-555, 1983.
16. Lindemann, B. y Passow, H.: *Pflügers Arch.*, 271, 497-510, 1960.
17. Postnov, Y. y Orlov, S.: *Physiol. Rev.*, 65, 904-945, 1985.
18. Porzig, H.: *J. Physiol.*, 249, 25-50, 1975.
19. Rasmussen, H.: *Ann. Intern. Med.*, 98, 809-816, 1983.
20. Rasmussen, H. y Barret, P.: *Physiol. Rev.*, 64, 1984.
21. Reuter, H.: *Nature*, 301, 569-574, 1983.
22. Rinaldi, M. L., Lepeuch, C. J. y Demaille, J. G.: *Febs. Lett.*, 129, 277-281, 1981.
23. Romero, P. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 507, 178-181, 1978.
24. Romero, P. J. y Whittam, R.: *J. Physiol.*, 214, 481-507, 1971.
25. Rosati, Cl., Hannaert, P. y Dausse, J. P., et al.: *J. Cell. Physiol.*, 129, 310-314, 1986.
26. Sarkadi, B., Szasz, I. y Gerloczy, A., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 464, 93-107, 1977.
27. Simons, T. J. B.: *J. Physiol.*, 256, 227-244, 1976.