

Proyecto de Fin de Máster
Máster en Investigación Biomédica
Curso 2016/2017

**“Efecto de la activación/inhibición
farmacológica del canal KCa3.1 sobre la
resistencia osmótica de eritrocitos
humanos y de ratón”**

HÉCTOR FORONDA HERRERA
Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid

DIRECTORES DE PROYECTO:

Ralf Köhler

Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet

Javier García Sancho

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Universidad de Valladolid



Universidad de Valladolid
Inst. de Biología y genética Molecular
Hosp. Universitario Miguel Servet
Inst. de Investigación Sanitaria Aragón

Índice

Resumen	2
Introducción	3
Materiales y Métodos	5
Resultados	7
Tiempo de exposición	7
Efecto de la concentración de Ca²⁺ en el medio	9
Análisis de RA-2	11
Ensayo en ratones	12
Discusión	14
Variaciones de la fragilidad osmótica en eritrocitos humanos	14
Variaciones de la fragilidad osmótica en eritrocitos de ratón	15
Discusión general	16
Bibliografía	18
Conclusiones	17

Resumen

Antecedentes: Una correcta regulación del volumen celular del eritrocito es fundamental para su supervivencia, tanto ante situaciones de estrés osmótico como en aquellas que requieren de flexibilidad morfológica (como la requerida para atravesar capilares de diámetro reducido), y está regulada por el flujo de solutos iónicos a través de la membrana plasmática. El canal KCa3.1 se ha propuesto como una pieza clave en este control, existiendo alteraciones en su funcionamiento debidas a mutaciones y relacionadas con diversas patologías. Un conocimiento adecuado del funcionamiento de este canal y de los efectos que resultan de su activación o inhibición farmacológica es importante de cara a desarrollar tratamientos novedosos para dichas dolencias.

Objetivo: Analizar los efectos de la activación o inhibición farmacológica del canal KCa3.1 sobre la resistencia osmótica de eritrocitos humanos o de ratón.

Metodología: Se llevaron a cabo ensayos de fragilidad osmótica en eritrocitos humanos a dos concentraciones de calcio (1mM y 4,6mM) y tiempos de exposición diferentes (1h y 24h). Además, se emplearon activadores (SKA-121) o inhibidores (Senicapoc y RA-2) a una concentración de 1 μ M. El nivel de lisis se midió a partir de la absorbancia de la hemoglobina liberada al medio.

En los ensayos en eritrocitos de ratón se emplearon los mismos compuestos activadores e inhibidores, a una concentración única de calcio de 1mM y con un tiempo de exposición de 24h.

Resultados: A 1mM de calcio, el activador SKA-121, un modulador positivo del "gating" del canal, disminuyó la fragilidad osmótica tras 24h de exposición. El bloqueante clásico Senicapoc aumentó la fragilidad, mientras que RA-2 (un bloqueante alternativo menos específico) la disminuyó. Estos efectos demostraron ser dependientes de la duración del estrés osmótico (1h vs 24h), la concentración de calcio del medio empleado (1mM; 4,6mM; \approx 0mM), o la especie ensayada (humano vs ratón).

A concentraciones de calcio supra-fisiológicas (4.6mM), tanto SKA-121 como Senicapoc no tuvieron efectos significativos. A concentraciones de calcio casi nulas (<0,1mM) ninguna sustancia mantuvo su efecto.

Respecto de las diferencias debidas a la especie, la fragilidad osmótica de los eritrocitos de ratón se vio modificada de forma similar a los humanos ante SKA-121, pero no varió ante Senicapoc.

Conclusión: En eritrocitos humanos, SKA-121 es capaz de disminuir la fragilidad osmótica ante el estrés osmótico hipotónico a concentraciones extracelulares fisiológicas de calcio de 1mM, mientras Senicapoc la aumenta. En los eritrocitos de ratón, el SKA-121 mantiene los efectos observados en eritrocitos humanos, pero el Senicapoc no tiene efectos significativos, sugiriendo diferencias de la función del canal en eritrocitos de ratón.

Palabras clave: canal iónico, KCa3.1, eritrocito, activador, inhibidor, hemólisis, ratón, humano, SKA-121, Senicapoc

Introducción

El canal KCa3.1 es un canal de potasio independiente de voltaje activado por calcio (IUPHAR/BPS ID: 384), descubierto por primera vez en 1958 por Györdy Gárdos en eritrocitos humanos y en honor al cual es también conocido como Canal de Gardos.

Se localiza en la membrana plasmática celular y consiste en un homotetrámero constituido por cuatro subunidades de la proteína KCa3.1, codificada por el gen KCNN4. Cada una de dichas subunidades posee a su vez seis dominios transmembrana, siendo de entre éstos el quinto y el sexto los encargados de formar el poro. Asimismo, tanto el extremo N-terminal como el C-terminal están localizados en el interior celular, existiendo en éste último regiones constitutivamente unidas a Calmodulina (regiones N-CaM y C-CaM).

El funcionamiento del canal está mediado por la concentración de Ca^{2+} intracelular, que al incrementarse mediante captación desde el medio extracelular o liberándose desde compartimentos intracelulares aumenta la probabilidad de que éste se asocie a la Calmodulina. Esta unión provoca un cambio conformacional que abre el poro del canal, permitiendo así una salida de K^+ e hiperpolarizando la célula, lo que por un lado estimula la entrada de más Ca^{2+} al interior celular. De este modo, el canal KCa3.1 actuaría como un refuerzo positivo sobre aquellas rutas de señalización que ejercen su efecto vía un aumento del Ca^{2+} intracelular utilizándolo como mediador. Por otro lado, la hiperpolarización resultante genera también el gradiente electroquímico requerido para producir un flujo de cloro y de H_2O hacia el exterior. Este efecto ha demostrado ser de gran importancia en los eritrocitos, donde se halla bien documentado y ha podido corroborarse mediante estudios en ratones KCa3.1(-/-), donde la ausencia de función llevaba al desarrollo de macrocitos, esplenomegalia (como consecuencia de la reducción en la vida media del eritrocito y su acelerado metabolismo), y a un menor nivel de resistencia osmótica (Grgic *et al.*, 2009).

Entre sus otros roles estarían la regulación de procesos como la proliferación celular (vía factores de crecimiento, ciclinas, y quinasas activadas en respuesta al mayor Ca^{2+} intracelular), la vasodilatación endotelio-dependiente (donde la hiperpolarización celular inhibiría canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje), la migración celular, o el desarrollo de un fenotipo fibroblástico (Menè & Pirozzi, 2013).

A nivel genético, mutaciones en el gen KCNN4 han demostrado estar asociadas con diversas enfermedades. Entre ellas se encuentra la estomatocitosis hereditaria deshidratada, un tipo de anemia extremadamente raro que se caracteriza por un aumento en la fragilidad osmótica de los eritrocitos (Andolfo *et Al.*, 2015) Esto se debería, en la forma de la enfermedad debida a mutaciones en KCNN4, a una ganancia de función por parte del canal que llevaría a una expulsión de K^+ excesiva por parte de éste, con la consecuente deshidratación de la célula.

Por otra parte, se ha hallado una conexión entre una desregulación epigenética a nivel del promotor en el gen KCNN4, aumentando su nivel de expresión, y una mayor mortalidad del cáncer de pulmón (Bulk *et Al.*, 2015). La explicación para esto sería que una mayor expresión del canal en la membrana aumentaría la intensidad de la señalización vía Ca^{2+} , lo que favorecería la expansión tumoral al estimular la señalización del ciclo circular, la proliferación y la migración celular.

Respecto a los activadores e inhibidores cuyos efectos se testan en este trabajo, es importante conocer que el SKA-121 (5-methylnaphtho[2,1-d]oxazol-2-

amine) es un modulador positivo del “gating”, actuando así como activador del canal KCa3.1 y poseyendo además un nivel de selectividad para con éste es muy elevado (Coleman *et Al.*, 2014). Ha demostrado ser capaz de potenciar los efectos vasodilatadores de la bradiquinina, disminuyendo la presión sanguínea en ratones sin afectar al ritmo cardíaco, gracias a lo cual podría tener potenciales aplicaciones en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión o la isquemia.

El RA-2 (1,3-phenylenebis[methylene]bis[3-fluoro-4-hydroxybenzoate]) por su parte es una molécula pequeña de carácter lipofílico capaz de inhibir al canal KCa3.1 al actuar como modulador negativo del “gating” (Oliván-Viguera *et Al.*, 2016). Es un inhibidor nuevo, recientemente descubierto, y a pesar de tener cierta selectividad hacia KCa3.1 también es capaz de inhibir la acción de canales similares de tipo KCa2. Sus efectos a nivel orgánico incluyen la inhibición de la vasodilatación dependiente de endotelio, con efectos antagónicos a los de SKA-121 en ese sentido. Debido a esto podría tener potenciales aplicaciones en el tratamiento de la hipotensión o angiopatías proliferativas.

Finalmente, el Senicapoc (bis[4-fluorophenyl]phenyl-acetamide) es una molécula bloqueante altamente específica para el canal KCa3.1, actuando como bloqueante directo del poro, y se ha testado clínicamente como tratamiento para la anemia falciforme. Senicapoc actuaría limitando la pérdida de solutos y agua en eritrocitos, ayudando así a preservar su hidratación y aumentando su índice de supervivencia (Kenneth I. Ataga, *et Al.*, 2008). Asimismo, tendría también potencial en el tratamiento de la malaria (Tubman *et Al.*, 2016), que en su fase intra-eritrocitaria produce una entrada de Na⁺ y una salida de K⁺ en los eritrocitos que acaban conduciendo a su lisis. El bloqueo de KCa3.1 impediría la expulsión de K⁺ a través de éste ayudando a contrarrestar así los efectos del Plasmodium.

El **objetivo** de este trabajo es analizar la importancia del canal KCa3.1 en la resistencia osmótica de eritrocitos humanos y de ratón, y los efectos de su activación o inhibición farmacológica. Para ello se han testado las siguientes **hipótesis**:

- 1) El uso de activadores del canal permitirá una mayor salida de K⁺ desde el interior de la célula, facilitando la disminución del volumen celular y aumentando la resistencia osmótica ante una situación de estrés hipotónico. Los inhibidores por el contrario obtendrán el resultado opuesto.
- 2) Una reducción del Ca²⁺ presente en el medio externo suprimirá cualquier efecto debido al uso tanto de activadores como de inhibidores del canal. El uso de concentraciones supra-fisiológicas atenuará también estos efectos.
- 3) Las sustancias ensayadas inducirán efectos similares tanto sobre eritrocitos humanos como de ratón.

Materiales y Métodos

Muestras de sangre

Se obtuvieron 20 muestras de sangre humana procedentes de voluntarios sanos pertenecientes a la Unidad de Investigación Traslacional (UIT), en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

La sangre extraída era recogida en el proceso de extracción en tubos EDTA ($\approx 2\text{mM}$ EDTA), como anticoagulante. Tras esto, las muestras eran trasladadas al laboratorio para su utilización inmediata en el ensayo.

La sangre procedente de los ratones modelo fue extraída en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) e inmediatamente refrigerada en hielo para su transporte al Miguel Servet (20'-30') y su uso inmediato en el ensayo.

Modelo de ratón

En la realización del ensayo se emplearon 17 individuos de ratón, mezcla de machos y hembras. El objetivo principal perseguido con el uso de la sangre de los ratones era identificar posibles diferencias en los efectos inducidos por la activación/inhibición del canal. Sin embargo, se buscó también evaluar los efectos de la administración de doxiciclina sobre esa misma respuesta, de cara a un posible uso futuro de ésta como inductora de la expresión génica del canal en ratones modificados.

Los ratones fueron para ello repartidos entre dos grupos. Por un lado el grupo "experimental" (9 ratones), al cual se administró Doxiciclina, y por otro el grupo control (8 ratones), al cual se administró sacarosa.

Diluciones salinas

Para poder evaluar las variaciones de la resistencia osmótica se emplearon diferentes disoluciones salinas, a fin de cubrir un amplio rango de ambientes hipo e hipertónicos.

La disolución stock, conteniendo 1mM CaCl_2 , 10mM HEPES, 2mM MgCl_2 , 5mM KCl, y siendo su pH de 7,4, se utilizaría como base para la preparación de todas las soluciones salinas. Fue almacenada a -4°C , y se tomaron de ésta diversas alícuotas a las cuales se añadió NaCl concentrado, hasta alcanzar en cada una de ellas la osmolaridad deseada.

Para las pruebas experimentales a $4,6\text{mM}$ y 0mM de Ca^{2+} la solución stock fue modificada mediante la adición de más calcio (en forma de CaCl_2 concentrado) o del quelante EDTA ($\approx 2\text{mM}$), respectivamente. Tras la adición de éstos se procedió a revisar el pH de la solución a fin de detectar posibles variaciones, siendo éstas corregidas si así fuera.

Activadores e inhibidores del canal

A partir de los stocks de los inhibidores (Senicapoc, RA-2) y activadores (SKA-121) del canal KCa3.1 se prepararon varias alícuotas a una concentración de 1mM , utilizando para ello DMSO como diluyente. Tanto las alícuotas como las soluciones stock originales se mantuvieron almacenadas a -20°C , descongelándose las alícuotas correspondientes diariamente para su utilización inmediata.

Finalmente, y previamente a su utilización, cada compuesto era diluido nuevamente hasta una concentración de 10 μ M, utilizando en este caso como diluyente el stock salino a fin de limitar el impacto del DMSO. La concentración final de los compuestos en el pocillo era así de 1 μ M, y la proporción de DMSO de un 0.1-0.2%.

En el caso de los controles, a los cuales no se les suministraba activador o inhibidor alguno, se utilizó en su lugar DMSO diluido en solución salina stock, en proporción 1:100 al igual que en el caso de los compuestos ensayados.

Ensayo de hemólisis

Para la medida de los niveles de hemólisis en nuestras muestras se utilizó como dato de referencia el nivel de hemoglobina en el medio, liberada a éste tras la ruptura de los eritrocitos, y para lo cual se utilizó un lector de placas espectrofotométrico, midiéndose la absorbancia a 419 y 540 nm (según la intensidad de la señal).

En la realización del ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos (*Thermo Scientific, Nunclon Delta Surface*), manteniéndose en todo momento un duplicado para cada una de las condiciones experimentales a ensayar. El volumen añadido de cada compuesto siguió en todos los casos el mismo patrón: 160 μ L de la solución salina deseada, 20 μ L del activador/inhibidor/DMSO diluido, y 20 μ L de sangre, añadidos siempre en ese orden y asegurando una mezcla homogénea al añadirse.

Ha de tenerse en cuenta que el EDTA presente en la muestra de sangre como anticoagulante reduce el nivel de calcio en el pocillo, modificando ligeramente la concentración final respecto a la presente en el medio (de 1mM a 0,8mM; y de 4,6mM a 4,23mM). Asimismo, el EDTA añadido en la prueba de calcio "nulo" disminuye la concentración de éste hasta un 0,1mM.

Tras esto se mantuvieron las placas a una T^a de 22°C durante un periodo de 1h o 24h, en función de la fase del ensayo. Transcurrido ese tiempo, las placas fueron centrifugadas a 1600 RCF durante 20 minutos a temperatura ambiente, extrayéndose a continuación 50 μ L de sobrenadante de cada pocillo y trasladándolo a una nueva placa para la posterior medida de su absorbancia.

Análisis estadístico

Los datos presentes en las gráficas se corresponden con los valores medios obtenidos para cada categoría, representados junto con su error estándar de la media (SEM) en forma de corchetes.

Para la comparación entre grupos se empleó el Test de Student apareado para evaluar el efecto de los compuestos, y el Test de Student despareado para la comparación entre grupos de ratones. En ambos casos se consideraron como estadísticamente significativos aquellos valores menores a 0,05.

Resultados

Tiempo de exposición al estrés hipotónico: 1h vs 24h

En ambas modalidades experimentales se obtuvieron resultados coherentes para un ensayo de osmorresistencia, presentando un patrón de hemoglobina liberada correspondiente a una curva sigmoidea ajustable de acuerdo a una distribución de Boltzmann (Figuras 1 y 2). No obstante, la dispersión de los resultados obtenidos y el efecto resultado de la adición de SKA-121 sí que mostraron diferencias.

En los ensayos de hemólisis con un tiempo de exposición de 1h el activador del canal, SKA-121, no mostró ningún efecto significativo respecto del control (Figura 1). La medida de la absorbancia en este caso se realizó a 419nm, dada la mayor sensibilidad que ofrece respecto a 540nm a pequeñas concentraciones de hemoglobina (necesario al ser tomados los datos tras únicamente 1h de exposición). En los posteriores ensayos a 24h sí se tomaron como referencia las medidas de absorbancia a 540nm al ser los niveles de hemoglobina en el medio mucho mayores (la medida a 419nm se encontraba ya saturada).

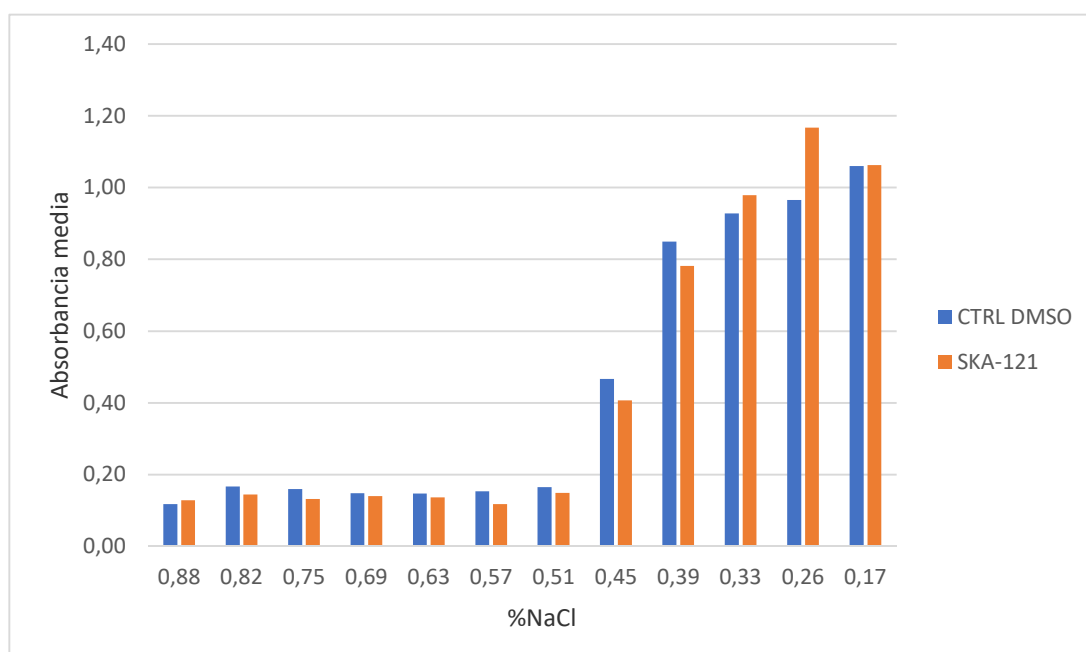


Figura 1

Nivel de hemólisis tras 1h de experimentación, medido en base a la absorbancia de la hemoglobina liberada (a 419 nm), producido tras la adición del control DMSO y el activador SKA-121. Los datos corresponden a la media del conjunto de muestras.

Por el contrario, en el ensayo de hemólisis con 24h de duración SKA-121 sí que fue capaz de ejercer un efecto significativo sobre la fragilidad osmótica, disminuyendo el nivel de hemólisis (Figura 2).

Este efecto de SKA-121 se detectó a una concentración salina de 0,448% NaCl, perteneciente al sector de la curva sigmoidea donde la hemólisis tiene lugar (los niveles son superiores al nivel basal, pero sin alcanzar el punto máximo).

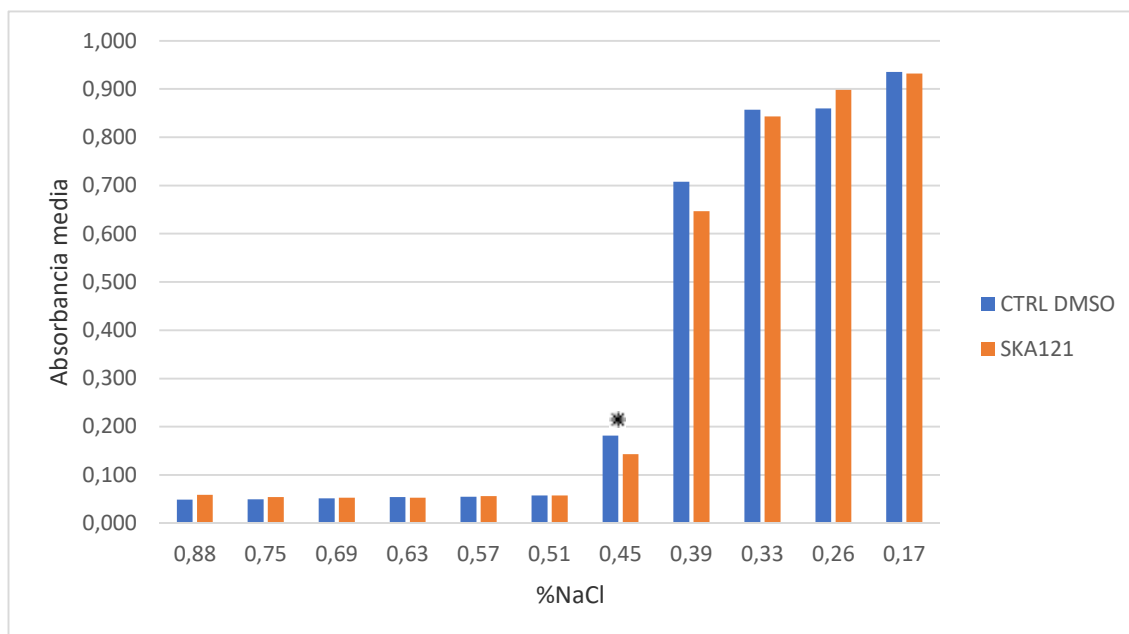


Figura 2

Nivel de hemólisis medio tras 24h de experimentación, medido en base a la absorbancia de la hemoglobina liberada (a 540 nm), para cada una de las condiciones experimentales ensayadas (Control DMSO, activador SKA-121) a las diferentes concentraciones salinas empleadas. Aquellos valores con significancia estadística ($<0,05$) están marcados con un asterisco.

Por otra parte, los valores de error estándar de los conjuntos de muestras estudiados fueron mayores en todos los casos en el ensayo de 1 hora (Tabla 1).

En base esta reducción del error estadístico y a la mayor sensibilidad de la prueba ante el efecto de SKA-121, se eligió un periodo de 24h como tiempo de exposición por defecto para las siguientes fases del estudio.

Tabla 1

Resultados del análisis estadístico del error estándar para cada una de las condiciones del ensayo de hemólisis (duración del ensayo, concentración salina y sustancia testada).

%NaCl		0,88	0,75	0,69	0,63	0,57	0,51	0,45	0,39	0,33	0,26	0,17
24H	CTRL	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	0,007	0,048	0,058	0,025	0,031	0,046
	SKA-121	0,011	0,009	0,009	0,008	0,009	0,009	0,038	0,051	0,019	0,022	0,021
1H	CTRL	0,011	0,034	0,027	0,033	0,034	0,040	0,074	0,096	0,078	0,084	0,114
	SKA-121	0,014	0,012	0,021	0,018	0,013	0,033	0,090	0,048	0,117	0,168	0,119

Efecto de la concentración de Ca^{2+} en el medio

En esta fase se evaluó el efecto de SKA-121 y Senicapoc sobre la fragilidad osmótica a tres concentraciones diferentes de Ca^{2+} en el medio externo: 1mM, 4,6mM y 0mM.

SKA-121 fue capaz de disminuir la fragilidad osmótica, a una concentración salina de 0,448% NaCl, en medio a 1mM Ca^{2+} (Figura 3). Este efecto sin embargo dejó de estar presente a una concentración de calcio de 4,6mM (Figura 4).

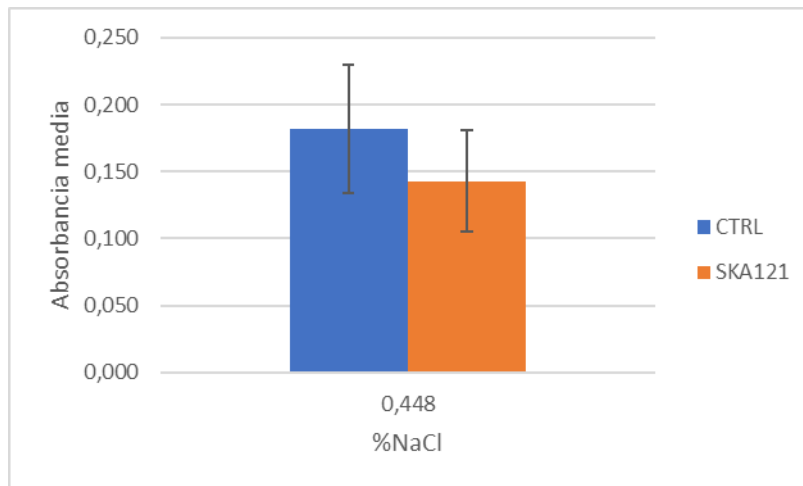


Figura 3

Nivel de hemólisis tras 24h de exposición a SKA-121 en medio 1mM Ca^{2+} , a la concentración salina con resultados significativos. Los datos son medias y los corchetes indican el error estándar.

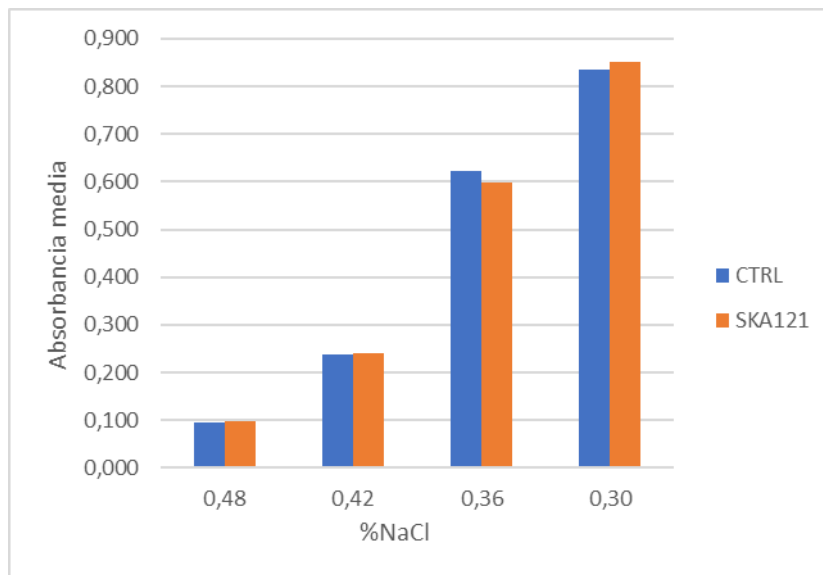


Figura 4

Nivel medio de hemólisis tras 24h de exposición a SKA-121 en medio enriquecido en Ca^{2+} hasta 4,6mM.

Por su parte, Senicapoc actuó a una concentración de calcio de 1mM incrementando la fragilidad osmótica de los eritrocitos, a una concentración salina del 0,387% NaCl (Figura 5). Dicho efecto desaparecía por completo a concentraciones superiores de calcio de 4,6mM.

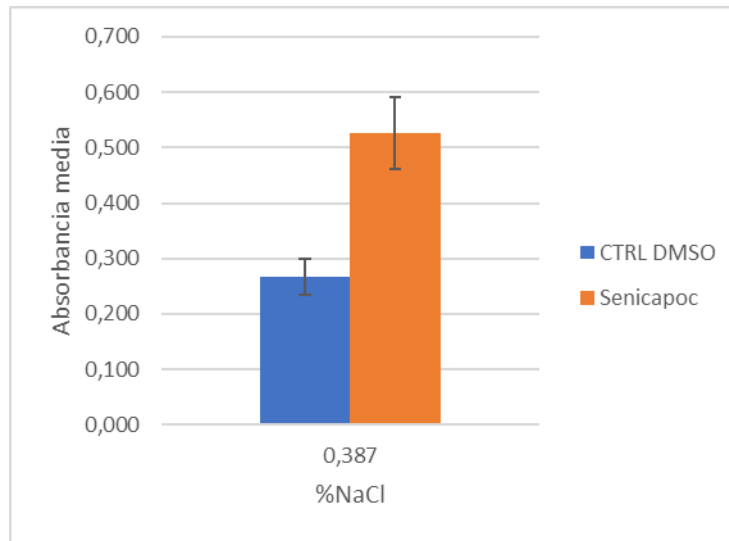


Figura 5

Nivel de hemólisis tras 24h de exposición a Senicapoc, en medio 4,6mM Ca²⁺, a la concentración salina con diferencias estadísticamente significativas. Los datos son medias y los corchetes indican el error estándar.

Cuando se empleó un medio a concentraciones de Ca²⁺ casi nulas, tras emplearse EDTA como quelante para eliminar éste del medio, ninguna de las sustancias ensayadas mostró efecto alguno.

Análisis de RA-2

Como bloqueante alternativo del canal se utilizó el compuesto RA-2, de reciente descubrimiento y aún no totalmente caracterizado.

Los resultados obtenidos mostraron que RA-2 disminuía significativamente la fragilidad osmótica de los eritrocitos a una concentración fisiológica de calcio de 1mM (Figura 6), efecto que se mantuvo a concentraciones mayores de 4,6mM (Figura 7) y que desapareció al eliminar el calcio del medio tras quelar con EDTA.

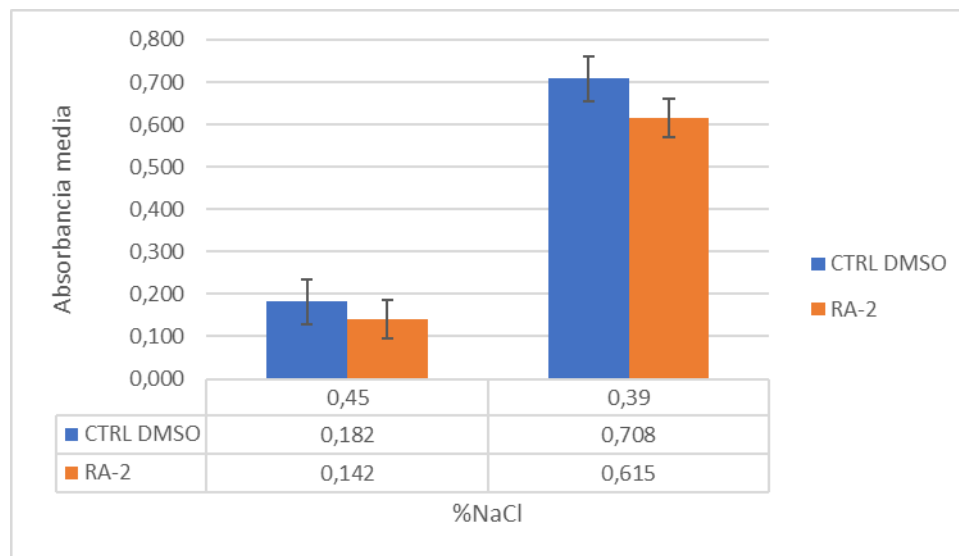


Figura 6

Comparación del nivel de hemólisis inducido por RA-2 tras 24h a 1mM Ca^{2+} a las concentraciones salinas con diferencias estadísticamente significativas (0,448% y 0,387% NaCl). Los datos son medias y los corchetes indican el error estándar. La absorbancia para cada condición se muestra en forma numérica en la tabla inferior.

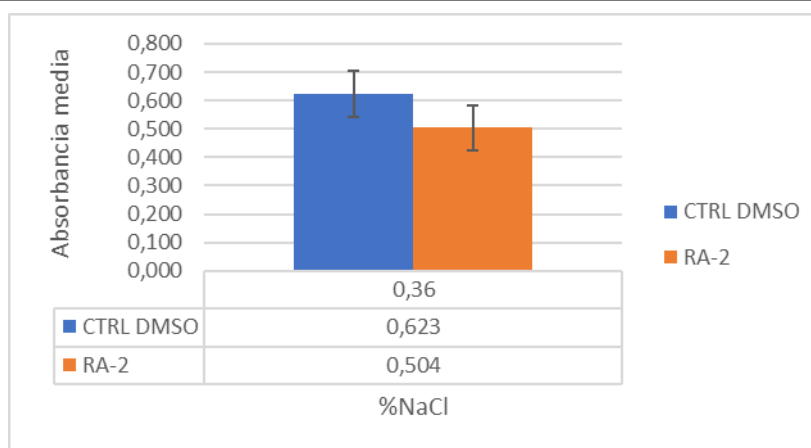


Figura 7

Comparación del nivel de hemólisis inducido por RA-2 tras 24h a 4,6mM Ca^{2+} a la concentración salina de 0,359% NaCl, a la cual mantuvo los efectos observados en la Figura 6. Los datos son medias y los corchetes indican el error estándar. La absorbancia para cada condición se muestra en forma numérica en la tabla inferior.

Ensayo en ratones

Los animales fueron repartidos en dos grupos, manteniéndose uno de ellos como control (administración de sacarosa) y el otro como grupo “experimental” (administrando Doxiciclina).

Transcurridos 7 días desde el inicio del tratamiento se extrajo sangre de los ratones, repitiéndose con ella la prueba de hemólisis de 24h a una concentración de calcio de 1mM. Los resultados mostraron que SKA-121 mantenía el efecto protector observado previamente en el ensayo con sangre humana en estas mismas condiciones experimentales. RA-2 fue capaz también de disminuir la fragilidad osmótica, tal y como se había observado en los ensayos en eritrocitos humanos. Por el contrario, Senicapoc no mostró efecto alguno sobre la fragilidad osmótica en ninguno de los grupos (Figuras 8 y 9).

Estos efectos fueron observables tanto en el grupo tratado con Doxiciclina como en el mantenido como control.

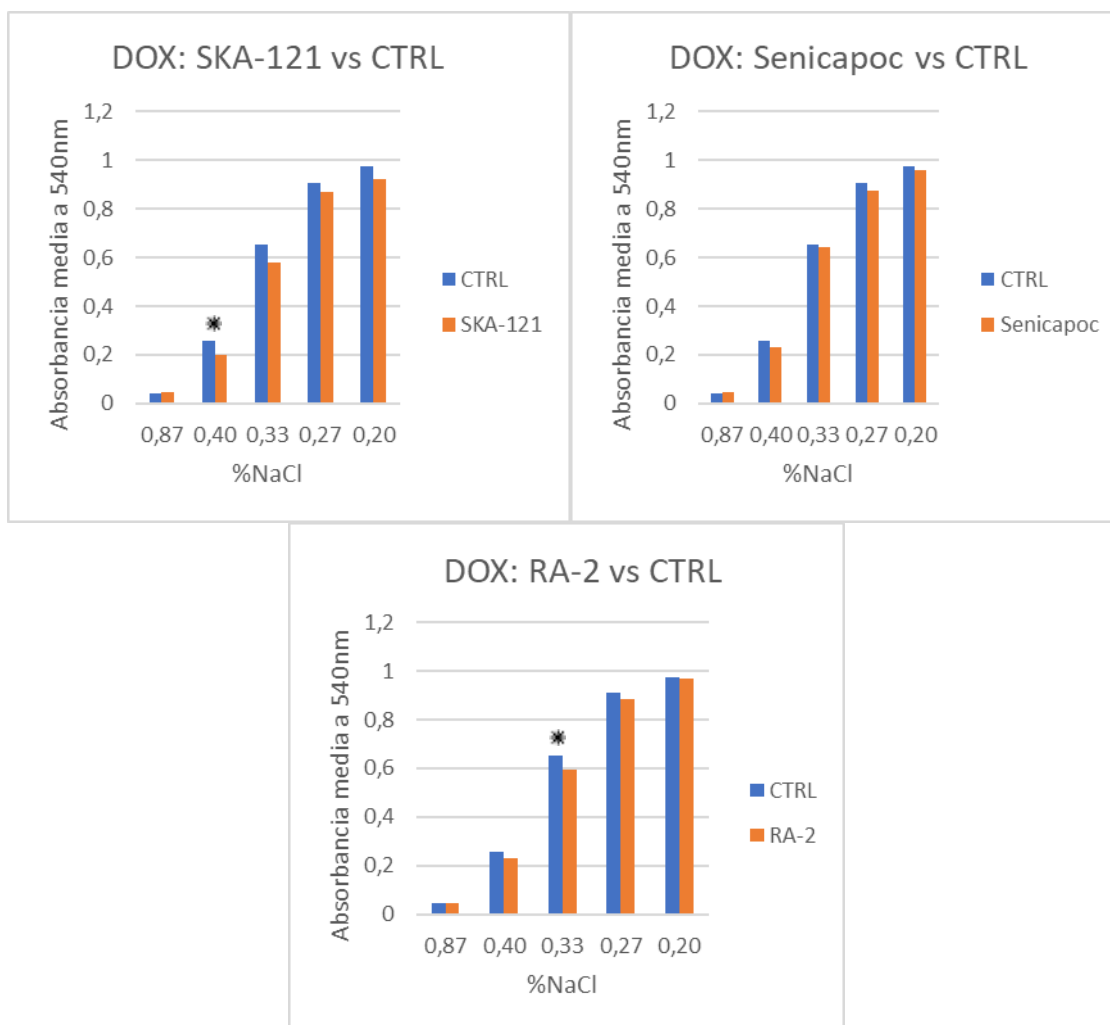


Figura 8

Comparación del nivel medio de hemólisis en la sangre del grupo de ratones tratado con Doxiciclina tras 24h a 1mM Ca^{2+} , entre el control y los diferentes agentes activadores/bloqueantes. Aquellos valores con significancia estadística ($<0,05$) están marcados con un asterisco.

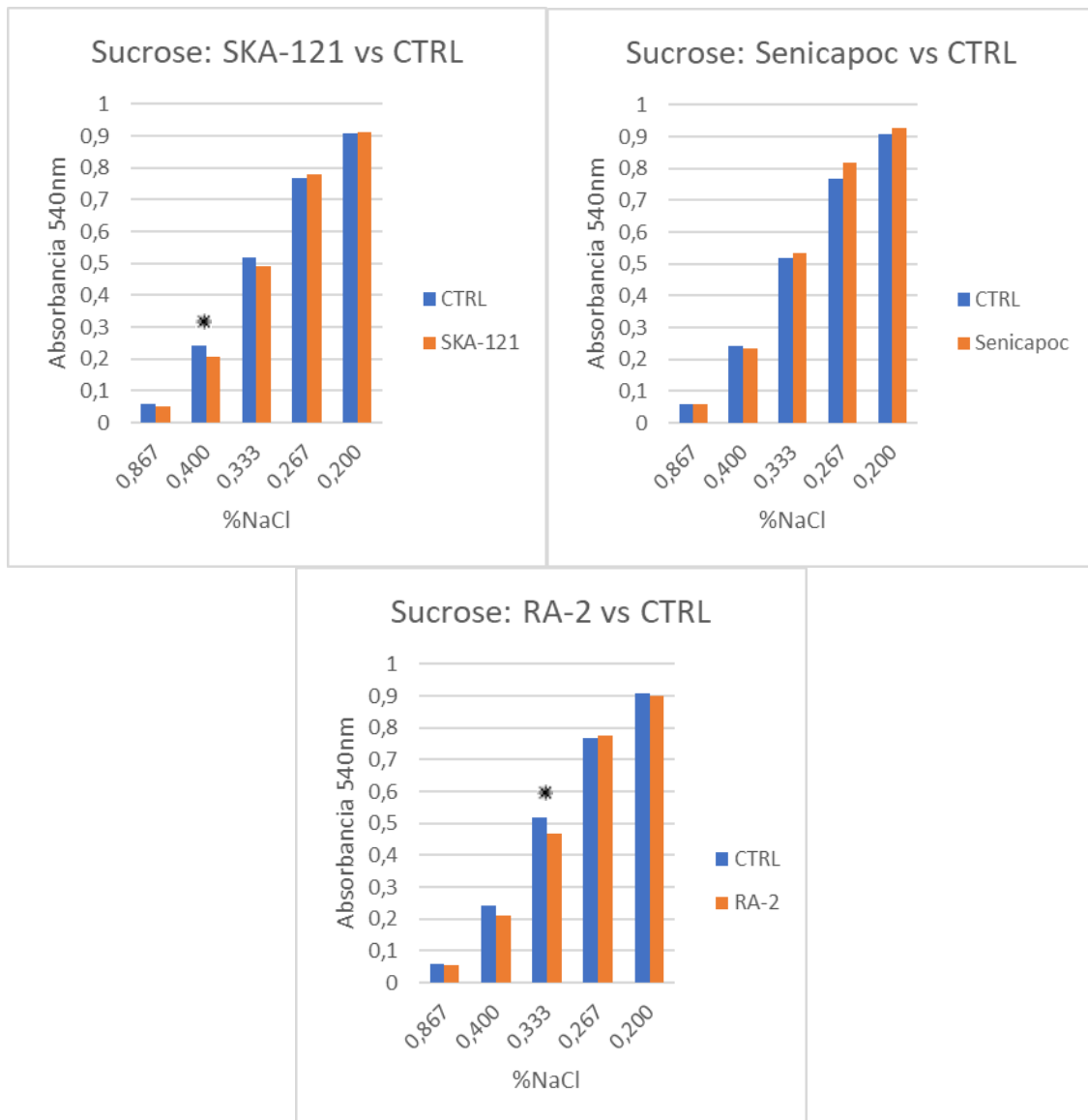


Figura 9

Comparación del nivel medio de hemólisis en la sangre del grupo de ratones control tras 24h a 1mM Ca^{2+} , entre el control y los diferentes agentes activadores/bloqueantes. Aquellos valores con significancia estadística ($<0,05$) están marcados con un asterisco.

En cuanto a la comparación de efectos entre ambos grupos, no se observaron diferencias significativas entre éstos en el nivel de respuesta frente a las diferentes sustancias ensayadas.

Discusión

Variaciones de la fragilidad osmótica en eritrocitos humanos

Efecto del tiempo de exposición al estrés osmótico

En un primer momento, a fin de seleccionar la metodología más adecuada de cara a fases posteriores del ensayo, se llevó a cabo un estudio para determinar el efecto del tiempo de exposición al estrés hipotónico sobre el nivel de hemólisis. Los resultados obtenidos indican que el tiempo de exposición en las pruebas de hemólisis no solo es determinante en cuanto a la menor variabilidad estadística presentada, sino que su influencia es determinante para la detección de los efectos inducidos por las diferentes sustancias.

El error estándar obtenido para cada medida fue mucho menor en los ensayos de 24h que en los de 1h, lo que los convierte en una fuente de información más sólida y con menor variabilidad (Tabla 1). Asimismo, mientras que los ensayos de 24h de duración fueron capaces de detectar un efecto estadísticamente significativo de SKA-121 disminuyendo la fragilidad osmótica, no fue así en los 1h de duración (Figuras 1 y 2).

Esta diferencia parece sugerir que o bien las pruebas de 1h de duración son menos sensibles en la detección de dicho efecto, o bien que el efecto protector de SKA-121 se manifiesta con un cierto retardo que lo hace indetectable en pruebas de escasa duración.

Como consecuencia de estos hechos, se escogió el periodo de exposición de 24h como el más idóneo para la realización de los ensayos de hemólisis, tanto por su mayor sensibilidad como por la mayor solidez estadística de los datos obtenidos.

Efecto de la concentración de calcio en el medio externo

Una vez escogido el periodo de 24h, se realizaron los correspondientes ensayos de hemólisis (a una concentración fisiológica de calcio de 1mM) para testar los efectos de SKA-121, Senicapoc y RA-2 sobre la fragilidad osmótica de los eritrocitos. Los resultados obtenidos confirmaron la capacidad de SKA-121 para reducir la fragilidad osmótica, y la de Senicapoc para aumentarla (Figuras 3 y 5). Estos resultados encajan con la hipótesis inicial respecto a los efectos esperados para activadores e inhibidores de $KCa3.1$.

Por otra parte, el ensayo en condiciones de calcio elevado (4,6mM) mostró la desaparición de los efectos tanto de SKA-121 (Figura 4) como de Senicapoc. Esta falta de efectos por parte de SKA-121 era esperable, pues la elevada concentración de calcio en el medio es capaz por sí sola de aumentar el número de canales abiertos, lo que reduce las posibilidades de SKA-121 de ejercer un efecto diferenciador respecto del control. Por otra parte, la desaparición de los efectos de Senicapoc ante concentraciones elevadas de Ca^{2+} es debida probablemente a la excesiva apertura de éstos que el Ca^{2+} permite, y que no logra ser contrarrestada efectivamente por el bloqueante. De nuevo, estos efectos encajarían con lo previsto en las hipótesis de trabajo iniciales, que preveían una desaparición o atenuación de los efectos observados al aumentar el calcio presente en el medio.

Los efectos observados por la acción del bloqueante alternativo, RA-2, no se ajustan sin embargo a los resultados esperados. En lugar de actuar como Senicapoc

umentando la fragilidad osmótica, la disminuye, efecto que se manifiesta tanto a concentraciones de calcio fisiológicas de 1mM (Figura 6) como en un exceso de éste a 4,6m (Figura 7).

Este inesperado efecto por parte de RA-2 se puede explicar por el hecho de no ser aún un compuesto bien caracterizado, consecuencia de su desarrollo relativamente reciente, así como por su menor selectividad hacia KCa3.1, siendo capaz de actuar también sobre canales del tipo KCa2. Además, el hecho de que ejerza su efecto inhibitor mediante la asociación a los dominios de unión a Calmodulina lo convierte en un compuesto potencialmente inespecífico, que pudiera tener efectos desconocidos sobre otras proteínas o canales aún no testados que posean también dichos dominios.

Por el contrario, Senicapoc es una molécula muy bien caracterizada, cuyo dominio de unión esta mejor identificado y que se halla localizado en el propio poro del canal, lo que le confiere una especificidad hacia KCa3.1 casi absoluta.

Es por todo ello que la conclusión del trabajo es que la hipótesis inicial mantiene su validez pese a los anómalos resultados presentados por RA-2, que muy probablemente se deben a la acción de éste sobre “targets” secundarios no identificados.

Finalmente, la realización de un ensayo a concentraciones de calcio libre nulo (tras aplicar EDTA como agente quelante) no mostró diferencias significativas respecto del control para ninguna de las sustancias ensayadas, lo que demuestra que todas ellas ejercen sus efectos mediante mecanismos calcio-dependientes.

Variaciones de la fragilidad osmótica en eritrocitos de ratón

En los ensayos realizados con sangre de ratón, SKA-121 y RA-2 fueron capaces de disminuir la fragilidad osmótica tanto en los ratones tratados con Doxiciclina (Figura 8) como en aquellos mantenidos como control tratados con sacarosa (Figura 9). Senicapoc sin embargo no parece ejercer efectos relevantes en ninguno de los grupos.

El hecho de que la sensibilidad a SKA-121 sea idéntica en ambos grupos (los efectos son de similar relevancia estadísticamente y se producen frente a los mismos porcentajes salinos) indicaría que la administración de Doxiciclina no es capaz de alterar la respuesta del canal a los diferentes compuestos. Puede concluirse así que la sobreexpresión condicional de KCa3.1 mediante el uso de promotores sensibles a Doxiciclina sería un método adecuado para el análisis de la actividad del canal frente a los compuestos testados en este TFM.

Es también llamativa la inexistencia de variaciones en la fragilidad osmótica de los eritrocitos tratados con Senicapoc, resultado que posiblemente se deba a la existencia de diferencias entre ambas especies. Estas diferencias podrían ser debidas a cambios en la estructura del canal o a la existencia de mecanismos compensatorios en el ratón que disminuyan la importancia relativa de KCa3.1 en la respuesta del eritrocito al estrés hipotónico, lo que alteraría el potencial de Senicapoc para influir sobre la resistencia osmótica.

Discusión general

En resumen, este trabajo demuestra que la activación farmacológica del canal iónico KCa3.1 es capaz de incrementar la resistencia osmótica de los eritrocitos a concentraciones fisiológicas de calcio. Además, este efecto se presenta por igual en las dos especies ensayadas, humanos y ratones.

Con respecto a la inhibición de canal mediante Senicapoc, se demuestra que éste actúa incrementando la fragilidad osmótica a concentraciones fisiológicas de calcio. Este efecto sin embargo no se da en los eritrocitos de ratón, lo que sugiere potenciales diferencias entre ambas especies en la relevancia del canal, y subraya a su vez la importancia de evaluar la actividad de un compuesto farmacológico en varias especies para poder confirmar sus efectos.

Conclusiones

1. La duración ideal del ensayo de hemólisis es de 24h, pues permite una mayor sensibilidad a los efectos de las sustancias testadas y ofrece datos más sólidos con un menor índice de variabilidad.
2. SKA-121 ha demostrado ser capaz de reducir el nivel de lisis en eritrocitos tanto humanos como de ratón a concentraciones fisiológicas de calcio de 1mM, si bien su efecto parece darse con un cierto retardo que impide su detección en ensayos rápidos de 1h.
3. El efecto protector de SKA-121 desaparece a concentraciones mayores de calcio (4,6mM), que permitirían por sí solas una mayor apertura de los canales enmascarando así la acción del activador.
4. El bloqueante Senicapoc actúa incrementando el nivel de lisis en eritrocitos humanos a concentraciones fisiológicas de calcio (1mM), pero no en los de ratón. Una concentración superior de calcio de 4,6mM elimina también su efecto.
5. La falta de respuesta de Senicapoc ante concentraciones altas de Ca^{2+} es debida probablemente a la existencia de otros mecanismos de osmo-regulación. Por otro lado, la falta de respuesta presentada en los ratones podría ser debida a diferencias en el modo en que ambas especies regulan el funcionamiento del canal, o a la importancia relativa que éste tiene en la respuesta al estrés osmótico.
6. Los efectos de todas las sustancias ensayadas desaparecen cuando se elimina de forma casi total el calcio del medio con la adición de un quelante (EDTA), subrayando que KCa3.1 contribuye a una osmo-regulación estrictamente dependiente de calcio.
7. La administración de Doxiciclina no modifica los efectos sobre la resistencia osmótica inducidos por las sustancias ensayadas, lo que confirma su utilidad como inductor de la expresión génica de cara a posteriores ensayos de sobreexpresión condicional con promotores sensibles a ella.

Bibliografía

Grgic I, Kaistha BP, Paschen S, Kaistha A, Busch C, Si H, Köhler K, Elsässer HP, Hoyer J, Köhler R. (2009). "Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly". *Pflugers Archiv* 458: 291–302

Paolo Menè & Nicola Pirozzi. (2013). "Potassium Channels, Renal Fibrosis, and Diabetes". *Diabetes* 62(8): 2648–2650

Andolfo I, Russo R, Manna F, Shmukler BE, Gambale A, Vitiello G, De Rosa G, Brugnara C, Alper SL, Snyder LM, Iolascon A. (2015). "Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis)". *American Journal of Hematology* 90(10): 921-926

Bulk E, Ay AS, Hammadi M, Ouadid-Ahidouch H, Schelhaas S, Hascher A, Rohde C, H.Thoennissen N, Wiewrodt R, Schmidt E, Marra A, Hillejan L, H.Jacobs A, Klein HU, Dugas M, E.Berdel W, Muller-Tidow C, Schwab A. (2015). "Epigenetic dysregulation of KCa3.1 channels induces poor prognosis in lung cancer". *International Journal of Cancer* 137: 1306–1317

Coleman N, Brown BM, Oliván-Viguera A, Singh V, Olmstead MM, Valero MS, Köhler R, Wulff H. (2014). "New positive Ca²⁺-activated K⁺ channel gating modulators with selectivity for KCa3.1". *Molecular Pharmacology* 86(3): 342-357

Oliván-Viguera A, Köhler R. (2016). "Ca²⁺/Calmodulin-Gated Small- and Intermediate-Conductance KCa Channels in Cardiovascular Regulation: Targets for Novel Pharmacological Treatments". *Vascular Ion Channels in Physiology and Disease*: 101-127

Kenneth I. Ataga, Wally R. Smith, Laura M. De Castro, Paul Swerdlow, Yogen Saunthararajah, Oswaldo Castro, Elliot Vichinsky, Abdullah Kutlar, Eugene P. Orringer, Greg C. Rigdon, Jonathan W. Stocker. (2008). "Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia". *Blood* 111: 3991-3997

Venée N, Tubman, Pedro Mejia, Boris E. Shmukler, Amy K. Bei, Seth L. Alper, James R. Mitchell, Carlo Brugnara, Manoj T. Duraisingh. (2016). "The Clinically Tested Gardos Channel Inhibitor Senicapoc Exhibits Antimalarial Activity". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(1): 613-616