

CALCIO Y ERITROCITOS*

Martha Angélica Quintanar Escorza¹ y José Víctor Calderón Salinas²

RESUMEN

El calcio es un elemento esencial que participa no solo en la contracción muscular o en la formación de huesos, sino también en la regulación metabólica, actuando como un efector de señales o como segundo mensajero, siendo muy importante en la respuesta celular a estímulos de excitación. Hoy en día, el estudio del calcio intracelular se ha convertido en un tema necesario para comprender la fisiología de múltiples sistemas celulares, sobre todo en células excitables. Sin embargo, poca atención se le ha dado a la participación del calcio en los eritrocitos, tradicionalmente catalogados como células no excitables eléctricamente. En esta célula, el calcio es un elemento crucial para la regulación, la función y la programación de muerte y remoción de los eritrocitos del sistema circulatorio. Como en otras células, el calcio intracelular libre en el eritrocito es regulado en forma muy precisa por un complejo sistema de homeostasis del calcio. Particularmente en los eritrocitos esta homeostasis requiere una regulación estrecha, debido a que pequeños incrementos en esta concentración citoplasmática de calcio ocasionan cambios que incluyen su muerte celular programada (eriptosis). Es por esta razón que en los últimos años se ha despertado mucho el interés por el estudio de las enfermedades metabólicas, circulatorias e intoxicaciones asociadas a una alteración de la homeostasis de este catión divalente. El hecho de que los eritrocitos no tengan orgánulos y por ende no tenga fuentes internas de calcio, simplifican el modelo y permiten estudiar la participación directa de los transportadores de calcio de la membrana plasmática como los fenómenos que regulan la homeostasis de calcio en el eritrocito. Este modelo experimental es de fácil y segura obtención lo que permiten que muchos de estos estudios se puedan realizar en humanos que particularmente presenten una enfermedad de interés para ser investigada.

PALABRAS CLAVE: ATPasa, canales, eriptosis, membranas, calcio intracelular libre.

ABSTRACT

The calcium is an essential element that participates not alone in the muscular contraction or in the formation of bone, but also in metabolic regulation, acting as an effector's cellular signals and/or as a second messenger and it is quite important in the cellular response to excitable stimuli. Nowadays, the study of intracellular calcium has turned into a necessary topic to understand the physiology of multiple cellular systems, especially in excitable cells. But in the case of erythrocytes a traditionally categorized as electrically unexcitable cell little attention has given to the participation of calcium ions in this system. Nevertheless, calcium is a crucial element for regulation, function and the programming of death and removal of erythrocytes from the circulatory system. As in other cells the intracellular free calcium concentration is precisely regulated by the complex process of calcium homeostasis. Particularly in erythrocytes this homeostasis needs a narrow regulation, due to very small increases in cytoplasm calcium concentration leads to important changes in these cells, including their programmed cell death (eryptosis). For this reason in the last years a lot of interest has woken up the study metabolic and circulatory diseases, as well as poisonings associated with the alteration of the homeostasis of this divalent cation. The fact that erythrocytes do not have organelles and do not have internal calcium reservoirs, simplify a lot the model and allows to study the direct participation of molecular calcium carriers through the plasma membrane, as the phenomena that regulates the homeostasis in erythrocytes. This experimental model is easy and sure, so many of these assays should be reliable to perform in humans that have a particular disease of research interest.

KEY WORDS: ATPase, channel, eryptosis, membrane, intracellular free calcium, regulation.

*Recibido: 5 de enero de 2007 Aceptado: 13 de marzo de 2007

¹Facultad de Medicina, Universidad de Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad y Fanny Anitúa S/N. Durango, Dgo.

²Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Av. IPN 2508, Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, AP 14-740 México 07000 D.F. Tel (01-55) 50613955. Correo E: aquintanar69@hotmail.com, jcalder@cinvestav.mx

¿QUÉ ES EL CALCIO?

El calcio es un elemento químico, un metal alcalinotérreo con número atómico de 20; es el quinto elemento y el tercer metal más abundante en la corteza terrestre, sus compuestos constituyen el 3.64% del total de los compuestos de la tierra. El calcio como ión divalente es utilizado por las células para realizar y regular múltiples funciones.

El estudio de la función del calcio en el organismo humano adquirió gran relevancia desde finales del siglo XIX y principios del XX, cuando se reconoció su participación en la contracción muscular, sobre todo en la contracción cardíaca, confirniéndole al calcio una importancia adicional a su evidente participación estructural en el hueso. Aunado a lo anterior, esto permitió explicar las terribles consecuencias neurológicas, cardíacas y musculares debidas a la disminución o exceso de calcio en la sangre.

Entre 1930 y 1940 se propuso que el calcio podría ser no sólo efector de la contracción, sino también un regulador intracelular del propio proceso contráctil. Ya en los años 50 se propuso el papel regulador de la contracción cardíaca por el calcio, así como la participación de los transportadores con la entrada y salida de calcio, como parte de la regulación fina de los fenómenos involucrados en estos mecanismos. Adicionalmente, se empieza a reconocer el relevante papel funcional de reservorios intracelulares de calcio en la regulación del calcio intracelular libre.

Sin embargo, no es sino hasta los años 70 que el calcio adquiere una verdadera importancia como un sistema efector y regulador de múltiples respuestas celulares, tanto en células excitables como no excitables. Esto desata una gran cadena de estudios en donde se demuestra que el calcio cumple un papel fundamental en la respuesta y en la estimulación

neuronal, en la secreción tanto de glándulas salivales, en células adrenales y en otras células secretorias; además de su participación en el metabolismo y en la regulación de diferentes funciones en múltiples tipos de células.

Actualmente, se reconoce la participación fundamental del calcio en prácticamente todas las células y se le identifica plenamente como un control de sistemas a nivel intracelular (regulador), un segundo mensajero y un factor fundamental que puede iniciar o estar involucrado en diversas funciones celulares como efector, entre ellas: la formación de la matriz ósea, la contracción y la relajación muscular, la compensación del pH extra e intracelular, la regulación de múltiples enzimas y por ende efectos metabólicos complejos, en el potencial de membrana, en la despolarización celular, en la neuroconducción, en la activación e inactivación de factores que inician diversas acciones celulares, así como la transducción de señales que pueden influir en diversas y complejas funciones que incluyen a la diferenciación, la replicación y la muerte celular programada.

Los efectos del calcio dependen básicamente de sus concentraciones como ión libre, las cuales a su vez dependen de los sistemas de entrada y salida de calcio y de la capacidad amortiguadora de la célula, los cuales principalmente son regulados por la presencia de orgánulos como el retículo endoplásmico y las mitocondrias que son capaces de secuestrar calcio, así como a la existencia de macromoléculas y contraiones con alta afinidad por calcio (1, 2).

¿QUÉ ES EL CALCIO LIBRE?

Por sus características químicas el calcio tiene una gran tendencia a formar sales de manera que solo una pequeña proporción del mismo puede encontrarse como ión libre y es en esta forma iónica como puede entrar y sa-

lir de las células y también como puede interaccionar con diferentes macromoléculas para ejercer sus acciones en las células. En el plasma la fracción iónica de calcio es de 1.10-1.25 mM y constituye aproximadamente entre el 45 y el 50% del calcio plasmático total (2.20-2.50 mM). Por otra parte, debido a las concentraciones existentes de proteínas, fosfatos, carbonatos, ácidos orgánicos y a la baja concentración de calcio total (10-100 μ M) que existen en el interior de las células, la forma iónica del calcio intracelular es notablemente baja, alcanza solo una concentración de 10 a 150 nM, lo que hace necesario un rápido y eficiente sistema de salida y/o de secuestro en orgánulos para evitar tanto su precipitación formando sales insolubles de calcio en el propio citoplasma, así como evitar su acumulación.

La membrana plasmática mantiene un gradiente de calcio, donde la concentración externa de calcio es del orden milimolar y la concentración del compartimiento intracelular está en el rango nM, esto es hasta seis órdenes de magnitud mayor en el líquido extracelular, generando un enorme gradiente de concentración hacia el interior, lo que provoca gran dificultad para su salida y una gran tendencia y facilidad para su entrada (3).

Por lo anterior es necesario conocer las concentraciones de calcio intracelular libre para entender y estudiar los posibles efectos regulatorios que el calcio ejerce en la célula, debido a que la evaluación del calcio total no proporciona la información necesaria sobre su papel regulador en una célula en particular. La concentración en el orden nanomolar de calcio intracelular libre en el interior de la célula, se explica también por la alta afinidad que por el calcio muestran las proteínas que requieren ser reguladas por este ión. Aun cuando algo similar ocurre con las proteínas sensibles al

calcio en el plasma, su afinidad por calcio es menor, debido a que en este compartimiento la concentración de calcio es mucho mayor y consecuentemente la fracción iónica en el plasma también.

En general, los aniones que forman las sales de calcio constituyen por sí mismos una parte importante de los sistemas amortiguadores de calcio libre, que junto con los sistemas de transporte en membranas permiten controlar no solo las concentraciones del calcio útil para la regulación, sino que a su vez permiten que el calcio no precipite en el interior o exterior de las células.

IMPORTANCIA DEL CALCIO INTRACELULAR LIBRE EN LAS CÉLULAS

El calcio tiene una importancia fundamental desde el punto de vista bioquímico y fisiológico de todas las células. La abundancia de las funciones intracelulares en las que participa el calcio, se debe a que este ión actúa como un modulador de varios procesos celulares, así como segundo mensajero intracelular. El término modulador se refiere a la capacidad de un átomo, molécula o ión para modificar un proceso celular que ocurre en un momento determinado. Así por ejemplo, el calcio facilita o inhibe el transporte transmembranal de algunos solutos, la actividad de varias enzimas y la permeabilidad de diversos iones de una gran variedad de células. Por otra parte, el término segundo mensajero se refiere a la capacidad de un ión o una molécula para actuar como intermediario entre una señal específica en la superficie de la célula que puede ser la unión de una hormona a su receptor, o la misma despolarización de la membrana y la inducción de un determinado proceso celular, lo que se logra promoviendo un aumento transitorio en la concentración del mensajero secundario en respuesta a la señal.

En este contexto, el calcio participa como segundo mensajero y como efector en diversas vías de transducción de señales o de vías efectoras, en la regulación de la formación de otros segundos mensajeros y diversos mecanismos. También es importante en la organización del citoesqueleto, la interacción con moléculas de adhesión celular, en los mecanismos de remodelación tisular, en la producción y la liberación de hormonas, en la regulación directa de enzimas metabólicas, en la activación de genes de respuesta inmediata y mediata, en la comunicación intra e intercelular y en la regulación de la expresión génica. Así mismo, el calcio ejerce un papel preponderante en los procesos de diferenciación celular y muerte celular programada (apoptosis) que en los últimos años han sido reconocidos y ampliamente estudiados (4).

IMPORTANCIA DEL CALCIO INTRACELULAR LIBRE EN CÉLULAS EXCITABLES

Además de las funciones que el calcio realiza en todas las células, en particular en las células excitables el calcio realiza otras funciones de gran importancia. En estas células el calcio está involucrado en funciones tales como: exocitosis de neurotransmisores en las neuronas, la contracción muscular y la excitación-contracción de células cardíacas además de la excitación-liberación de neurotransmisores de neuronas sensoriales, siendo en las terminales sinápticas donde el calcio induce la liberación de neurotransmisores. Una célula excitable es aquella célula que puede generar cambios en su potencial de membrana en respuesta a un estímulo físico o químico y responder a estos cambios a través de proteínas sensibles a los cambios en el voltaje de membrana, generando cambios en la polarización de la misma, logrando hiperpolarizaciones transitorias y/o depolarizaciones, es decir ha-

cen respectivamente menos o más negativo el valor del potencial de membrana con respecto a su valor en el reposo. Estos cambios transitorios se generan en las células excitables gracias a sus complejos y específicos sistemas de transporte, para finalmente generar las señales eléctricas que viajan hacia su sitio efector.

El carácter transitorio de los incrementos en el calcio intracelular además de implicar los sistemas de remoción de calcio requiere que los canales se inactiven y se vuelva a la condición de reposo. La dependencia al calcio de las células excitables hace que las mismas sean más sensibles a los cambios en su concentración tanto en el plasma como en citoplasma. Si estos cambios se sostienen temporalmente pueden generar consecuencias mortales, ya que tanto el incremento como la disminución de calcio en el plasma, afectan de manera extrema a las células excitables del sistema nervioso central y periférico, a las células cardíacas y a las células musculares. Un incremento de calcio en el plasma o líquido extracelular genera una flacidez muscular, irritabilidad neuronal del sistema nervioso central y falla cardíaca entre otras alteraciones; mientras que la disminución del calcio plasmático nos lleva a tetania muscular y como consecuencia de esto en el músculo del diafragma puede producir paro respiratorio.

MECANISMOS QUE MANTIENEN EL CALCIO INTRACELULAR

El incremento de calcio intracelular libre puede generarse por varios mecanismos que modifican el influjo de calcio transmembranal: i) Canales de calcio operados por voltaje, (VOC del inglés "voltage open channels"), los cuales permiten el rápido influjo masivo de calcio hacia el citosol tras una despolarización de la membrana plasmática. ii) Canales de calcio operados por ligandos (ROC del inglés

"receptor open channels"), controlados por varios agonistas (por ejemplo, adrenalina), que también abren el canal y permiten el influjo de calcio al interior. iii) Liberación de calcio de los reservorios intracelulares, en los que el influjo de calcio a través de la membrana plasmática, puede a su vez disparar la liberación de calcio almacenado en una serie de reservorios intracelulares como lo es el retículo endoplásmico, la mitocondria y el aparato miofibrilar.

La entrada de calcio al citoplasma se realiza principalmente a través de los canales de calcio presentes en la membrana plasmática, y la concentración del calcio intracelular libre se mantiene normalmente a tan bajos niveles mediante la interacción del calcio con otras proteínas acarreadoras o amortiguadoras de calcio. De tal forma que, alteraciones en esta precisa regulación del calcio intracelular libre que sobrepasen esta capacidad amortiguadora de calcio en las células, pueden alterar drásticamente la fisiología celular. La salida de calcio de los orgánulos al citoplasma también está mediada por canales de calcio y aprovecha la diferencia de concentración entre el retículo y el citoplasma (1 mM en el retículo y 100 nM en el citoplasma). En general, el incremento de calcio en el citoplasma es un efecto concertado de los dos fenómenos, es decir la salida de calcio del retículo y la entrada de calcio del líquido extracelular al citoplasma y predominará uno u otro dependiendo de la célula o del estímulo que induce el incremento de calcio intracelular como se muestra en la figura 1.

Por otro lado, los reservorios intracelulares del calcio pueden estar relacionados con el retículo endoplásmico mediante la acción de otros segundos mensajeros tales como el inositol trisfosfato (InsP_3) y el mismo calcio, los cuales se unen con alta afinidad a sus respectivos receptores. De

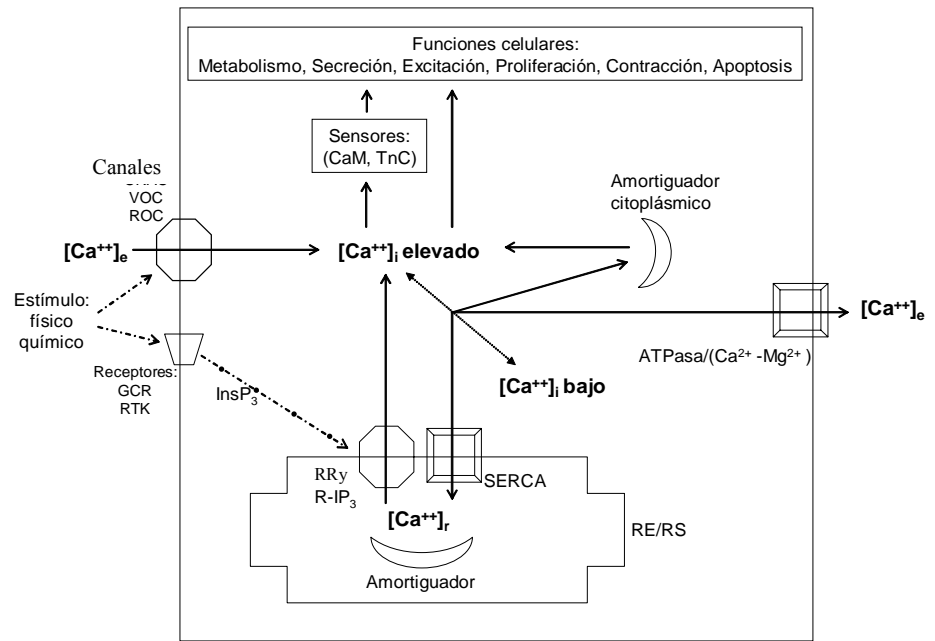


Figura 1. Esquema de los mecanismos que regulan la concentración de calcio intracelular libre en las células. La entrada de calcio al citoplasma es principalmente a través de los canales de calcio operados por ligando (ROC del inglés "receptor operated channels") operados por voltaje (VOC del inglés "voltage operated channels") La concentración de calcio intracelular libre es mantenida a bajos niveles mediante la interacción del calcio con otras proteínas acarreadoras y/o amortiguadoras de calcio. El calcio intracelular libre es coordinadamente regulado por varias proteínas membranales como los intercambiadores sodio/calcio de la membrana plasmática y varias ATPasas de calcio tanto de membrana plasmática como de retículo endoplásmico/sarcoplásmico (RE/RS): ATPasa/(Ca^{2+} - Mg^{2+}) de membrana plasmática, ATPasa de retículo endoplásmico (SERCA del inglés "sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase"). Receptores que se acoplan a proteínas G (GCR), receptores modulados por tirosinafosforilasas (RTK). Los reservorios intracelulares del calcio están relacionados con el RE/R mediante la acción de segundos mensajeros tales como el inositol trisfosfato (InsP_3) y el mismo calcio, que se unen con alta afinidad a sus sitios receptores. El RE/RS posee dos tipos diferentes de canales liberadores de calcio estructuralmente relacionados entre sí: el receptor de R- IP_3 y el receptor a rianodina (RRy). La concentración elevada de calcio libre en citoplasma está mediada por sensores como la calmodulina (CaM) o la troponina C (TnC) para la regulación de una gran variedad de actividades celulares. Las líneas discontinuas indican que metabolito actúa como segundo mensajero para generar una respuesta (--->---).

modo tal que cuando el calcio intracelular libre se incrementa al liberarse calcio del retículo endoplásmico, éste es liberado por los canales de calcio que son operados por ligandos, los cuales son estructural y funcionalmente muy diferentes a los canales de calcio presentes en la membrana plasmática. El retículo endoplásmico posee dos tipos diferentes de canales liberadores de calcio los cuales están estructuralmente relacionados entre sí. Uno de ellos es el receptor a InsP_3 y el otro es el canal liberador de calcio que es sensitivo a la rianodina, comúnmente conocido como receptor a rianodina (RRy), el cual fue primeramente iden-

tificado en el músculo como un mediador en el mecanismo de liberación de calcio inducida por el propio calcio (5).

El incremento de la concentración de calcio no puede ser un evento sostenido en el tiempo, es necesario que a una señal dada se genere un incremento temporal (de 100 a 1000 nM), lo que implica necesariamente que una vez que estos alcanzan el máximo del incremento, se produzca una rápida reducción de los niveles de calcio intracelular libre, por ello es esencial que casi de manera simultánea a la apertura de los canales de calcio de membrana se activen los sistemas que

lo reducen, sacándolo de la célula o secuestrándolo en los orgánulos correspondientes.

La reducción del calcio citoplásmico se lleva a cabo por bombas (transportadores activos primarios-dependientes de ATP) llamadas calcio-ATPasas por su capacidad de romper ATP para obtener la energía y poder llevar el calcio a un compartimiento de mayor concentración, es decir, transportar al calcio en contra de su gradiente. Hay dos tipos generales, la calcio-ATPasa de membrana plasmática (PMCA por sus siglas en inglés "pump membrane calcium ATPase") y la calcio-ATPasa de retículo endoplásmico (SERCA del inglés "sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase"). Ambos sistemas de transporte tienen una alta afinidad por calcio, que está en el rango de $1 \mu\text{M}$ y una capacidad de transporte de 0.5 nM Ca/mg de proteína/seg, lo que permite cambiar el estado estacionario intracelular de calcio y hacer que la concentración de calcio se reduzca notablemente hasta regresar a $10\text{-}100 \text{ nM}$, esto es esencial para revertir los efectos inducidos por su incremento. Adicionalmente, algunas células presentan un intercambiador sodio/calcio en la membrana plasmática, es un transporte activo secundario que tomando la energía del transporte de sodio pueden transportar calcio en contra de su gradiente, este suele tener menor eficiencia de transporte, con una K_m mayor ($10\text{-}15 \mu\text{M}$) y una capacidad de transporte menor (0.1 nmol Ca/mg de proteína/seg) que las ATPasas y participar solo parcialmente para alcanzar el estado estacionario de calcio en el reposo.

La concentración de calcio intracelular libre también depende de sistemas amortiguadores intracelulares e intrarreticulares; los amortiguadores de calcio más importantes son las proteínas que pueden unir calcio y no responder a esta interacción, es decir

macromoléculas que pueden unirlo y modificar la concentración de calcio intracelular libre, pero sin funciones debido a esta unión. Tales sistemas pueden ser especializados para el secuestro y la regulación de calcio, como por ejemplo la calsecuestrina (kd de $600 \mu\text{M}$) y la calreticulina (kd de $250 \mu\text{M}$) que se encuentran en el retículo sarcoplásmico y el endoplásmico. Evidentemente existen proteínas que pueden unir calcio y con ello participar en la reducción del calcio intracelular libre, sin embargo, si estas proteínas al unir calcio desarrollan una función a nivel celular, no se consideran en el sistema amortiguador, tal es el caso de calmodulina o la troponina-C que puede unir eficientemente calcio (kd aproximado de $1 \mu\text{M}$), pero que una vez formado el complejo activa a otros sistemas proteicos, como el propio sistema de salida de calcio, la contracción muscular o diversos efectores intracelulares (2, 5).

CALCIO INTRACELULAR LIBRE EN ERITROCITOS

En el caso del eritrocito, como célula no excitable sin núcleo y sin orgánulos, la importancia del calcio intracelular libre fue ignorada por mucho tiempo, solo recientemente se le ha dado importancia al estudio de este ión en los fenómenos regulatorios de estas células. Los experimentos con ionóforos de calcio (A12387 y ionomicina), que permiten incrementar las concentraciones de calcio intracelular libre, han mostrado la gran importancia que tiene este catión divalente en el eritrocito, no solo en sus funciones específicas dentro del mismo, sino que es esencial para mantener la forma, la estructura y la estabilidad. En este contexto, las células tratadas con ionóforos de calcio, adquieren en cuestión de minutos una forma esférica caracterizada por espiculaciones, que dependiendo del tamaño, la forma y la distribución se podrán nombrar como

equinocitos, es decir eritrocitos con proyecciones más cortas y regulares o como acantocitos, eritrocitos que muestran espículas irregulares y puntiagudas. Estas alteraciones de su morfología celular son evidentemente muy poco estables y generan una rápida hemólisis que se puede poner en evidencia con pruebas de hemólisis osmótica, mecánica, química o térmica.

Recientemente la concentración de calcio intracelular libre también se ha involucrado fuertemente como parte esencial del inicio, propagación y sistema efector de la apoptosis de los eritrocitos (eritosis) (6).

REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR LIBRE EN ERITROCITOS

En los eritrocitos los valores de la concentración de calcio intracelular libre, son de 10 a 60 nM dependiendo de la técnica empleada. Las técnicas más utilizadas son las de fluorescencia, empleando diversos fluoróforos (Fluo, Fura, Indo, Quin, Rhod, BAPTA) que tienen una afinidad entre 0.1 a $6 \mu\text{M}$ y cambian su fluorescencia al interactuar con el calcio. Sin embargo, la variación en la sensibilidad de los diferentes fluoróforos depende de la constante de unión a calcio y de las condiciones de fluorescencia de la célula, lo que lleva a este rango de concentración considerada como normal (10 a 60 nM), aun cuando cada prueba se realiza con curvas de calibración particulares. Sin embargo, a pesar de la gran sencillez de los eritrocitos en cuanto a su abundancia, facilidad de obtención y posibilidades de manejo, se dificulta estudiarlos por la presencia de la hemoglobina, proteína que además de ser muy abundante, tiene color en un amplio rango del espectro visible, manifiesta fluorescencia intrínseca y cuenta con gran capacidad de apagamiento de la luz, además de ser capaz de res-

ponder a condiciones oxido-reductoras y a cambios de pH.

Otra prueba que frecuentemente se usa en eritrocitos para estudiar la concentración de calcio intracelular libre es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de compuestos fluorinados, los cuales se calibran y ajustan empleando un quelante de calcio para conocer la diferencia en el espectro, debida a la interacción del calcio con el flúor. Esta técnica elimina las dificultades antes mencionadas con los fluoróforos, pero es más cara y se requiere de un equipo más sofisticado.

Aún con las dificultades indicadas para conocer la concentración de calcio intracelular libre en el eritrocito, es posible encontrar parámetros normales generales y experimentos comparativos, que permiten conocer bajo una misma condición experimental los cambios en la concentración del calcio intracelular libre en un bloque de estudio o trabajo, o bajo ciertas condiciones experimentales de manera confiable y cuantitativa (7).

MECANISMOS QUE INFLUYEN EN LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR LIBRE EN LOS ERITROCITOS

Los mecanismos que mantienen la concentración de calcio intracelular libre en los eritrocitos, son en general similares a los empleados por células no excitables, incluyendo la entrada, la salida y el amortiguamiento. Sin embargo, es importante recordar que los eritrocitos no cuentan con orgánulos intracelulares, lo cual lo imposibilita para emplear los reservorios intracelulares en el control del calcio intracelular libre, hecho que simplificaría el manejo y el estudio de los efectos del calcio intracelular libre en estas células.

Los sistemas de entrada de calcio en los eritrocitos no han sido totalmente caracterizados. Se ha demostrado la

entrada de calcio al eritrocito por canales catiónicos no selectivos dependientes del estado de óxido-reducción del eritrocito, ya que se ha observado que el daño oxidativo, es decir el incremento de la condición oxidante sobre la antioxidante en el eritrocito, caracterizada básicamente por una disminución de la concentración de glutatión reducido, lo cual abre permeabilidades no específicas a cationes, permitiendo el incremento de calcio intracelular libre y empleando este incremento como un sistema efector del daño oxidativo para inducir respuestas en la célula. Por otro lado para mantener el estado estacionario de la concentración de calcio intracelular libre en el eritrocito se requiere la salida del mismo de manera eficiente, para ello el eritrocito cuenta con la ATPasa de calcio dependiente de magnesio, tipo PMCA4 (debido a que se encuentra en la membrana plasmática y es una isoforma tipo 4 la que se encuentra en eritrocitos humanos) y es activada por calmodulina. El incremento de calcio intracelular libre permite de inmediato que el calcio libre se una a la calmodulina y se active la ATPasa de calcio, la cual a su vez expulsa calcio del interior de eritrocito en contra de gradiente hacia el plasma. En los eritrocitos, al igual que en otras células no excitables no se ha demostrado la participación del intercambiador sodio/calcio en la salida de calcio.

Los únicos sistemas moleculares amortiguadores que existen en los eritrocitos son las proteínas y las sales que contienen estas células, sin embargo aun estos son limitados ya que la proteína más abundante en el eritrocito es la hemoglobina (90 % de las proteínas intracelulares) y la misma no tiene gran afinidad por calcio y no cuenta con sitios estereoespecíficos, por lo que la única forma de unión sería a través de la unión electrostática, cuya afinidad está muy por debajo de

la afinidad de la ATPasa para su salida, por lo cual la retención de calcio por amortiguadores intracelulares sólo depende de la capacidad de formación de algunas sales con cloro y fosfato y la unión a algunas proteínas, que a su vez están limitadas por la propia concentración de calcio (1, 8).

FUNCIONES DEL CALCIO INTRACELULAR LIBRE EN LOS ERITROCITOS

El calcio intracelular libre afecta la elasticidad, la estabilidad, la forma, el volumen, la estructura y algunas funciones intracelulares del eritrocito. Estabiliza al citoesqueleto a través del complejo calcio-calmodulina, manteniendo la estructuración espectrina-actina y espectrina-anquirina. De este modo, un incremento del calcio intracelular libre induce una serie de cambios tales como: i) reducir el volumen celular, ii) aumentar la fragilidad de la membrana, iii) alterar la estructura y organización del citoesqueleto, activando proteasas específicas para el citoesqueleto (Fig. 2), todo lo cual altera la morfología de los eritrocitos, generando los llamados equinocitos en los que se reduce la elasticidad haciendo mas rígida la estructura, aumentando así la posibilidad de ruptura en las presiones capilares. A concentraciones de calcio intracelular mayores a $0.1 \mu\text{M}$ la constante de unión de calcio-calmodulina reduce la afinidad de la proteína 4.1 a la región espectrina-actina, lo cual conlleva a un debilitamiento de la red del citoesqueleto del eritrocito. También se ve afectado el dominio citoplasmático de la banda 3 y su unión al complejo espectrina-anquirina, debilitando aun más la trama de citoesqueleto y afectando la elasticidad y estructura del eritrocito (9). Estos cambios conformacionales que se generan con un incremento de calcio intracelular libre, se han observado en patologías de importancia médica como anemia, diabetes e hipertensión.

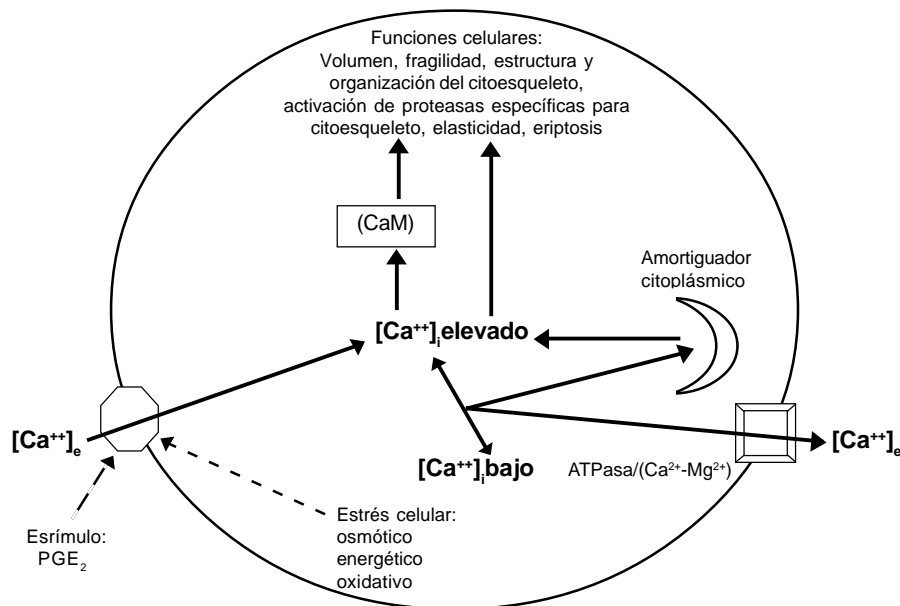


Figura 2. Esquema de los mecanismos que regulan la concentración de calcio intracelular libre en los eritrocitos. Canales de calcio intracelular libre $[Ca^{2+}]_i$, calcio extracelular libre $[Ca^{2+}]_e$ y ATPasa de calcio de la membrana plasmática $ATPasa/(Ca^{2+}-Mg^{2+})$.

La correlación que presenta el incremento de la concentración de calcio intracelular libre con los cambios descritos, también se presentan en eritrocitos envejecidos como un mecanismo que permite la remoción de los mismos de la circulación, realizando como se ha descrito, un proceso de eritrosis (6).

Así mismo, es posible encontrar incremento de la concentración de calcio intracelular libre tanto en procesos tóxicos, en infecciones virales y parasitarias, así como en alteraciones metabólicas, como ya se mencionó.

RELACIÓN ENTRE EL CALCIO INTRACELULAR LIBRE Y LAS ENFERMEDADES

Ya hemos mencionado para el caso de los eritrocitos, los cambios que suceden en ellos si se introduce artificialmente calcio por medio de un ionóforo de calcio, hacen que las células inicien la eritrosis y provoca que sean hemolizadas. Estos cambios a su vez, pueden estar involucrados con diver-

sas enfermedades como es en el caso del daño renal crónico, en el que se correlaciona el incremento en la remoción de eritrocitos por eritrosis o la hemólisis en sangre, con diferentes grados de daño en el sistema renal debida a la sobrecarga de proteínas, básicamente por la formación de cilindros de hemoglobina en los glomérulos renales, los cuales pueden condicionar al organismo para desarrollar enfermedad renal crónica, que puede evolucionar y llevarla a una insuficiencia renal crónica, con consecuencias graves e irreversibles en el organismo (4, 8).

Por todo lo expuesto anteriormente, la evaluación del calcio intracelular libre puede, en este sentido ser un indicador del impacto y la evolución de las enfermedades en el contexto de la fisiología celular e indicarnos el grado de daño y la forma como evolucionan los diversos tratamientos establecidos para enfermedades como la diabetes, la hipertensión, los daños oxidativos, los daños por agentes tóxicos, las en-

fermedades parasitarias o virales, así como indicadores del correcto desarrollo sistémico o en particular como indicadores del proceso de maduración y desarrollo del sistema sanguíneo (4, 10, 11).

Así mismo, por experimentos *in vitro* se ha propuesto que el uso de bloqueadores de canales de calcio o quelantes de calcio extra e intracelulares, pueden tener efectos benéficos y revertir o evitar los efectos del incremento de calcio intracelular en diversos daños celulares. Por tanto, en enfermedades tales como la hipertensión arterial los mecanismos moleculares que subyacen al empleo de bloqueadores de canales de calcio pueden estar ejerciendo sus efectos favorables, en esta extremadamente fina regulación del calcio intracelular libre (12, 13). Esta nueva perspectiva de enfoque abre caminos importantes en el uso de bloqueadores de calcio (nuevos y conocidos) para estudiar los posibles mecanismos fisiopatológicos de daño de otros padecimientos que cursen con incrementos de calcio intracelular libre.

Seguramente estamos al inicio de la nueva óptica de estudio del calcio intracelular libre, al considerarlo directamente como un efector importante en diversas enfermedades, por lo que se precisa cuantificación, estudios diagnósticos y su control para el tratamiento irán tomando forma cada vez con mayor claridad en una gran cantidad de padecimientos de diversas índole que como factor común tienen el incremento del calcio intracelular libre. Y es precisamente en este contexto, que su estudio en los eritrocitos será un modelo simplificado y de fácil acceso, propio de cada uno de los pacientes que ayudarán a comprender y ayudar a resolver varias de las enfermedades que presentan cambios sutiles o desajustes en la regulación del calcio intracelular libre.

REFERENCIAS

1. Benaim G (2004) La Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores. *Acta Cien Ven.* 55:304-314.
2. Carafoli E, (2002) Calcium signaling: A tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(3):1115-1122.
3. Díaz Horta O (2003) El ion calcio: su regulación y función en la célula β pancreática *Rev Cuba Endocrinol.* 14(3).
4. Mansilla-Olivares A (2004) El calcio, átomo detonante de la vida y la función celular. *Cir Ciruj.* 72(2):139-151.
5. Saris NEL, Carafoli E (2005) A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Moscow).* 70(2):187-94.
6. Quintanar-Escorza MA, Calderón-Salinas JV (2006) Eriptosis: La apoptosis del eritrocito. *REB.* 25(3): 85-89.
7. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter J, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* 79:4.
8. Calderón-Salinas JV, Quintanar-Escorza MA, González-Martínez MT, Hernández-Luna CE (1999) Lead and calcium transport in human erythrocyte. *Hum Exp Toxicol.* 18(5):146-153.
9. Quintanar-Escorza MA (2006) Efectos de la exposición a plomo sobre la homeostasis del calcio intracelular libre en eritrocitos humanos. Tesis de doctorado. Departamento de Bioquímica CINVESTAV.
10. Liu F, Mizukami H, Sarnaik S, Ostafin A (2005). Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy. *J Struct Biol.* 150: 200-210.
11. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Durantón C, Wieder T, Huber SM, Lang F (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 15 (5):195-202.
12. Quintanar-Escorza MA, González-Martínez MT, Navarro L, Maldonado M, Arévalo B, Calderón-Salinas JV (2006) Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocyte of lead-exposed workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* doi:10.1016/j.taap.2006.10.016.
13. Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 36(2):107-260.