

Consecuencias de la inhibición de la bomba de sodio en neuronas y su relevancia en la fisiopatología del daño celular producido por isquemia anóxica

F. Javier Álvarez Leefmans** ♦ Gonzalo Merediz Alonso* ♦ J. Rodolfo Fernández Calderón**

Resumen

Se estudió el efecto que sobre la conductancia total de la membrana (G_m) tiene la alteración del gradiente electroquímico del Na^+ en neuronas de *Helix aspersa*. La sustitución del Na^+ extracelular por un catión impermeante (glucamina) produjo una disminución inicial de G_m (4.6 ± 2.9 por ciento), seguida de un sostenido aumento de la misma (30.3 ± 10.5 por ciento), acompañado por una hiperpolarización de la membrana. Se sugiere que la eliminación del Na^+ extracelular provoca la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, produciendo un aumento en la concentración intracelular de calcio iónico, $[\text{Ca}^{++}]_i$, que incrementa la permeabilidad de la membrana al K^+ . La inhibición de la bomba de Na^+ con mabaina (ImM), también produjo un aumento en G_m , coincidente con un flujo de K^+ previamente descrito.

Se modeló matemáticamente la conducta del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, encontrándose que aumentos modestos en la $[\text{Na}^+]_i$ producen cambios, significativos en la $[\text{Ca}^{++}]_i$, congruentes con resultados previos. Se postula que la inhibición de la bomba de Na^+ provoca un aumento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$, que dispara la permeabilidad al K^+ . La salida de K^+ (junto con aniones y agua), produce una disminución del volumen celular acuoso. Se sugiere que al inhibir la bomba de Na^+ , el Ca^{++} entra a las neuronas vía intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y canales de Ca^{++} . Los resultados se discuten en relación a los cambios que ocurren en el tejido nervioso durante isquemia anóxica.

Palabras clave: Bomba de Na^+ ; intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$; isquemia; anoxia; muerte neuronal.

Summary

*The effect of altering the transmembrane electrochemical Na^+ gradient on total membrane conductance (G_m) of *Helix aspersa* neurons was investigated with intracellular microelectrode recording techniques. Replacement of extracellular Na^+ with an impermeant cation (glucamine) produced a modest and short lived decrease in G_m ($4.6 \pm 2.9\%$) followed by a prominent and sustained increase of it ($30.3 \pm 10.5\%$). The latter effect was accompanied by membrane hyperpolarization. These results suggest that removal of external Na^+ leads to an increase in $[\text{Ca}^{++}]_i$, probably through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger operating in reverse mode. The resulting rise in $[\text{Ca}^{++}]_i$ would be sufficient to produce an increase in membrane permeability to K^+ . Inhibition of the Na^+ pump with ouabain results in a similar increase in G_m , suggesting a rise in $[\text{Ca}^{++}]_i$ through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger and voltage-sensitive Ca^{++} channels.*

Mathematical modelling of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange in these neurons showed that modest increments in $[\text{Na}^+]_i$ produce significant increases in $[\text{Ca}^{++}]_i$, in agreement with $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{Ca}^{++}]_i$ measurements performed with fluorescent indicators and ion-selective microelectrode techniques. The results are discussed in relation with the cellular changes occurring in ischemic-anoxic nervous tissue.

Key words: Sodium pump; $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger; ischemia; anoxic; neuronal death.

* Departamento de Neurobiología de la División de Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría.

** Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV del IPN.

Introducción

Las neuronas, como cualquier otra célula animal, tienden a aumentar su volumen acuoso en condiciones fisiológicas. Esto se debe a la presencia, en el interior celular, de macromoléculas cargadas negativamente a las cuales la membrana plasmática es impermeable. Como esta última es permeable al agua y a pequeños iones, los aniones proteínicos intracelulares generan un gradiente de presión coloidosmótica que actúa como fuerza impulsora para el flujo neto de agua. Desde hace más de tres décadas se cree que las células mantienen su volumen acuoso constante por la acción de la bomba de Na^+/K^+ , una enzima localizada en la membrana plasmática que por cada ciclo expulsa de las células 3 iones Na^+ a la vez que introduce a las mismas 2 iones K^+ , utilizando para ello, la energía derivada de la hidrólisis de ATP. Esta estequiometría determina el que la enzima produzca un flujo neto de iones, que contrarresta al mencionado gradiente de presión coloidosmótica, impidiendo el edema celular.^{1,2,3} Como consecuencia de este esquema hipotético, se acepta casi de manera universal que la inhibición de la bomba de Na^+ , ya sea por medios farmacológicos (vg.: con el glicósido ouabaina) o por agotamiento de las reservas de ATP neuronal, como en la hipoglucemia o en todo proceso que conduzca a la anoxia (vg.: en procesos isquémicos), produce edema citotóxico y eventual lisis celular.⁴ Sin embargo, recientemente encontramos, contrario al dogma imperante, al inhibir la bomba de Na^+ en neuronas, éstas responden principalmente con una disminución del 6.5 ± 0.7 por ciento de su volumen acuoso, que sólo en algunas ocasiones es precedida por un aumento rápido y transitorio del mismo.⁵ Además encontramos⁶ que a estos cambios de volumen subyace un flujo de Na^+ a través de la membrana y un prominente flujo de K^+ vía canales selectivos, que se activa por un incremento en la concentración intracelular de calcio iónico ($[\text{Ca}^{++}]$). Se postuló que la reducción del volumen celular al desactivar a la bomba de Na^+ , se explica cuantitativamente por esta salida de K^+ (acompañada de un anión hasta ahora no identificado y agua) de las neuronas, que sobrepasa a la entrada inicial de Na^+ (y agua) a las mismas. Más recientemente,⁷ utilizando el indicador fluorescente FURA-2, demostramos que la inhibición de la bomba de Na^+ en las neuronas, resulta en el aumento ya mencionado en la $[\text{Ca}^{++}]$, cuya magnitud es suficiente para activar el flujo neto de K^+ . Estos hallazgos sugieren que además de la bomba de Na^+ , las neuronas cuentan con otros mecanismos que coadyuvan al mantenimiento y regulación del volumen celular, previniendo el edema y la lisis celular osmótica a corto plazo en condiciones patológicas, por lo que postulamos que el daño celular subsiguiente a la inactivación de la bomba de Na^+ debe resultar más de la acumulación intracelular de Ca^{++} que de cambios en el volumen celular. En el presente trabajo se ofrecen argumentos teóricos cuantitativos en favor de la hipótesis de que el aumento en $[\text{Ca}^{++}]$, secundario al incremento en $[\text{Na}^+]_i$, que resulta de la inhibición

de la bomba de Na^+ , puede deberse, por un lado, a la entrada de Ca^{++} vía canales que se activan cuando la membrana se despolariza a consecuencia de la inhibición de la bomba de Na^+ , y por otro, a la disminución del flujo de Ca^{++} a través del sistema de transporte conocido como intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, o a la entrada de Ca^{++} a través de dicho intercambiador funcionando en reversa. Este intercambiador normalmente opera como un sistema de extrusión de Ca^{++} acoplado a la entrada de Na^+ , con una estequiometría de 3Na^+ por cada Ca^{++} expulsado de la célula.^{8,9} Este transportador utiliza para su funcionamiento la energía almacenada en el gradiente electroquímico del Na^+ , por lo que es altamente sensible a alteraciones del mismo, como las que ocurren cuando el Na^+ se acumula intracelularmente al inhibirse la bomba que lo expulsa o su concentración extracelular se disminuye experimentalmente. Además del análisis teórico, se presentan medidas de la conductancia total de la membrana (G_m) cuando se alteran las concentraciones intra y extracelulares de Na^+ , con el objeto de provocar un aumento en la concentración interna de Ca^{++} . Los resultados de éste y los trabajos anteriores^{5,6,7} se discuten de manera global para ofrecer una visión integrativa de los cambios que ocurren en las células nerviosas cuando la bomba de Na^+ se inhibe a consecuencia de condiciones patológicas tales como la anoxia postisquémica.

Material y métodos

Los experimentos se realizaron en neuronas identificadas de los ganglios subesofágicos del caracol terrestre *Helix aspersa*. Estas células constituyen un modelo experimental conveniente ya que por su tamaño (150 a 200 μm) permiten realizar experimentos electrofisiológicos que resultarían, hasta ahora, técnicamente imposibles en neuronas de vertebrados. Además, en ellas se encuentran los mismos sistemas de transporte de iones presentes en neuronas de vertebrado, incluyendo las humanas. En trabajos previos hemos publicado descripciones detalladas de la disección.⁵ Una vez aislada, la preparación se montó en una cámara de perfusión por donde fluían soluciones fisiológicas a una tasa de 5 ml/min, manteniendo constantes las concentraciones iónicas extracelulares. Se utilizó la técnica de fijación de corriente con microelectrodos intracelulares, llenos de KCl 3M. El registro intracelular del voltaje de membrana y la inyección de corriente a la célula se hicieron de manera simultánea a través de un mismo microelectrodo por medio de un circuito "puente" (WPI KKS-700). Los datos se almacenaron en cintas magnéticas por medio de una grabadora de FM (Racal Store 4) y en papel, con un graficador (Gould Brush 220).

La resistencia de entrada (R_{in}) se midió periódicamente aplicando pulsos de corriente hiperpolarizante con una frecuencia de 1 Hz, cada uno de 500 ms de duración, y de amplitud tal que no excediese el rango lineal de la relación corriente versus voltaje, o sea menor que 1 nA. La R_{in} se midió tanto en la solución Ringer control (NaCl, 82.5 mM; KCl,

4 mM; CaCl₂, 7 mM; MgCl₂, 5 mM; HEPES, 5 mM; glucosa, 5 mM; pH=7.5 ajustado con NaOH), como en una solución de idéntica composición a la anterior pero en la cual el Na⁺ se sustituyó equimolarmente por el catión impermeante N-metil-D-Glucamina. Para inhibir a la bomba de Na⁺ se utilizó ouabaina (1 mM) disuelta en la solución control.

La R_m se calculó por medio de la expresión:

$$R_m = \frac{V_o}{I_o} \quad (1)$$

donde V_o es el cambio en el potencial de membrana en respuesta a la aplicación de una corriente I_o en un punto del interior del soma neuronal, que en estas células es esférico y tiene solamente una prolongación neurítica. La R_m puede expresarse también como su recíproco, la conductancia de entrada (G_m), de tal manera que, de acuerdo con la ley de Ohm:

$$G_m = \frac{I_o}{V_o} \quad (2)$$

donde I_o y V_o se definen de la misma manera que en la ecuación 1. Como R_m es un parámetro que varía con la geometría celular, para normalizar las medidas se calculó la resistencia por cm² de membrana (R_m). Dado que los cuerpos neuronales son esféricos:

$$R_m = R_m (4\pi r^2) \quad (3)$$

en donde r es el radio de la célula medido con un micrómetro ocular después de cada experimento. El inverso de R_m es la conductancia total por cm² de membrana (G_m = 1/R_m).

Resultados

Efecto del Na⁺ extracelular sobre la conductancia de la membrana

La figura 1 muestra el efecto de la eliminación del Na⁺

extracelular sobre la R_m con respecto al tiempo (R/R_o) en una neurona. Durante los primeros 150 segundos de perfusión con la solución experimental, se observa un incremento, gradual y transitorio en R_m que alcanza un máximo del 13 por ciento seguido de una rápida disminución de la misma de hasta un 28 por ciento por debajo del control. El efecto revirtió al readmitir el Ringer normal en el baño. El Cuadro 1 muestra los resultados de tres experimentos de este tipo, incluyendo el ilustrado en la Figura 1. Sólo en dos células ocurrió el aumento inicial en R_m pero en las tres se presentó la disminución reversible de la misma. Este decremento de la R_m se acompañó de una hiperpolarización de la membrana.

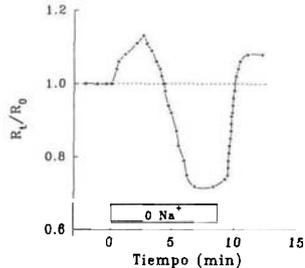


Figura 1. Cambios en la resistencia de entrada relativa con respecto al tiempo (R_m/R_o; R_o = 39.92 MW). La barra representa el tiempo en el que se aplicó la solución libre de Na⁺. La línea punteada indica el valor de la R_m control.

La G_m se calculó a partir de los valores de R_m obtenidos en los experimentos anteriores, utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3. Estos resultados se muestran en el Cuadro 2. G_m disminuyó en los primeros segundos después de la eliminación del Na⁺ extracelular hasta alcanzar un máximo minutos después. Al restituir el Na⁺ externo G_m revirtió a valores control.

Cuadro 1. Cambios en la resistencia de entrada producidos por la eliminación del Na⁺ extracelular.

CÉLULA	AUMENTO INICIAL DE R _m (%)	TIEMPO [§] (seg)	DISMINUCIÓN DE R _m (%)	V _m C-V _m E* (mV)	TIEMPO [§] (seg)
2E	+2.56 ± 0.7	38	-54	-25	202
2D*	+13	152	-28	-40	406
77F	0	--	-10.52 ± 0.6	-25	252

* Experimento graficado en la figura 1.

§ Las columnas de tiempo indican el periodo desde el inicio de la perfusión con la solución libre de Na⁺ hasta que se alcanzó un máximo o un mínimo en la resistencia de entrada.

* V_mC-V_mE es la diferencia entre el V_m control (C) y el experimental (E) y se refiere a la magnitud máxima de la hiperpolarización de la membrana al disminuir R_m.

Cuadro 2. Cambios de la conductancia de membrana ante la eliminación del Na⁺ extracelular.

CÉLULA	RADIO (mM)	G _m CONTROL (μS/cm ²)	EXP. 1* (μS/cm ²)	EXP. 2 [§] (μS/cm ²)	LAVADO (μS/cm ²)
2E	51.0	68.3 ± 1.1	66.8 ± 0.5	146.9	78.0 ± 1.9
2D	57.5	60.3	53.3	84.1	56.1
77F	89.6	25.6	25.6	28.2	25.6 ± 0.5

* Conductancia de membrana durante la fase inicial de incremento en R_{in}§ Conductancia de membrana durante la fase de decremento en R_{in}

Efecto de la inhibición de la bomba de Na⁺ sobre la conductancia de la membrana neuronal.

La figura 2 muestra una célula típica en la que la uabaína produjo una disminución promedio del 32 por ciento en la R_{in}. El efecto fue reversible minutos después de la restitución del Ringer normal. En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos en cinco experimentos. En todos los casos, la inhibición de la bomba de Na⁺, produjo una clara disminución en R_{in}, que en su caso extremo, alcanzó hasta un 77 por ciento con respecto a los valores control. El tiempo en el que ocurrió el efecto máximo fue variable incluso entre neuronas del mismo tipo, como es el caso para la célula 77F.

Cuadro 3. Efecto de la uabaína sobre la resistencia de entrada.

CÉLULA	% DE DISMINUCIÓN DE R _{in}	TIEMPO* (seg)
77F	14.2 ± 0.2	1204
1F	26	400
77F [§]	31.7 ± 1.2	100
76F	44.5 ± 0.7	278
1D	77	902

* Tiempo desde el inicio de la aplicación de la uabaína.

§ Experimento graficado en la figura 2.

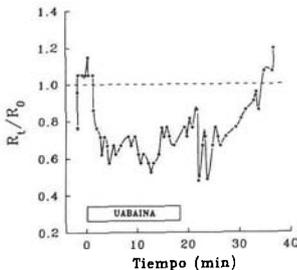


Figura 2. Cambios en la resistencia de entrada relativa con respecto al tiempo, antes, durante y después de la aplicación de uabaína (indicada con la barra). La línea punteada representa a la R_{in} control (R₀ = 8.69 MW).

Discusión

Efecto del Na⁺ extracelular sobre la conductancia de la membrana neuronal

La sustitución del Na⁺ extracelular por glucamina, un ión no permeante, produjo una disminución inicial en G_m (4.6 ± 2.9%), que representa la fracción de G_m correspondiente a la conductancia al Na⁺ en reposo. El aumento en G_m que sigue a la disminución inicial de la misma, se acompañó de una hiperpolarización de la membrana, sugiriendo la posible activación de canales de K⁺. Resultados recientes obtenidos por nuestro grupo 6, utilizando la técnica de fijación de voltaje, muestran que la hiperpolarización y el aumento en G_m aquí descritos, representan una corriente saliente de K⁺, probablemente activada por Ca⁺⁺.

Sabemos que la energía que utiliza el intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ para su operación se deriva de la magnitud del gradiente electroquímico del Na⁺. Al eliminar el Na⁺ externo, el gradiente electroquímico de este ión se invierte, dirigiéndose hacia el exterior celular. En estas circunstancias el intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ funciona en modo reverso, es decir, metiendo Ca⁺⁺ a la célula y sacando Na⁺ de la misma (ver las consideraciones teóricas del intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ más adelante), lo cual resulta en un incremento en la [Ca⁺⁺] submembranal, con la consecuente activación de canales de K⁺.¹⁰

La bomba de Na⁺ y la conductancia de la membrana neuronal

La inhibición de la bomba de Na⁺ con uabaína provocó un rápido aumento en G_m, similar al observado con la sustitución extracelular del Na⁺. Ambos resultados pueden explicarse por un incremento en la conductancia al K⁺ activado por una elevación en [Ca⁺⁺].

En un trabajo reciente⁶ demostramos que la inhibición de la bomba de Na⁺ en neuronas, resulta como era de esperarse, en una acumulación de Na⁺ intracelular. Esta acumulación de Na⁺ genera una disminución de su gradiente electroquímico, lo cual reduce la capacidad del intercambiador para expulsar Ca⁺ y por ende, este último se acumula en el citosol. Nuestros resultados concuerdan con los de Casteels y cols.¹⁹ quienes encontraron que al inhibir la bomba de Na⁺ en células musculares lisas se provoca un aumento en G_m subyacente a la pérdida de K⁺ intracelular. Schlue²⁰ también proporcionó evidencia sugerente en favor de que la inhibición de la bomba

con uabaina en neuronas de sanguijuela produce una disminución en la actividad intracelular de K^+ al tiempo que se incrementan las actividades internas de Na^+ y Ca^{++} .

Consideraciones teóricas acerca del intercambiador Na^+/Ca^{++}

El intercambiador Na^+/Ca^{++} es una proteína que transporta Ca^{++} a través de la membrana de manera acoplada e inversa al movimiento de Na^+ , siguiendo la dirección y magnitud del potencial electroquímico de este último.¹¹ La mayoría de los autores aceptan que el intercambio de ambos iones ocurre con una estequiometría de $3Na^+ : 1Ca^{++}$ por lo cual, es electrogénico,^{9,12-14} es decir, genera una corriente a través de la membrana. Este proceso de contrartransporte puede describirse termodinámicamente de acuerdo con la siguiente expresión:

$$nzF(E_{Na^+} - E_m) > zF(E_{Ca^{++}} - E_m) \quad (4)$$

La ecuación 4 presupone que la dirección en que se mueve el Ca^{++} depende de la dirección y magnitud del gradiente del Na^+ . En esta ecuación, n es el cociente de acoplamiento del intercambiador Na^+/Ca^{++} cuyo valor, dada la estequiometría 3:1, es igual a 3; z es la valencia de los iones; F la constante de Faraday; E_{Na^+} y $E_{Ca^{++}}$, los potenciales de equilibrio del Na^+ y el Ca^{++} respectivamente y E_m el potencial de membrana. En estado de equilibrio termodinámico tenemos que:

$$nzF(E_{Na^+} - E_m) = zF(E_{Ca^{++}} - E_m) \quad (5)$$

Cuando el intercambiador alcanza el estado de equilibrio, suponiendo que es el único mecanismo de transporte de Ca^{++} y que no hay amortiguamiento intracelular del mismo, $[Ca^{++}]_i$ puede predecirse por medio de la siguiente ecuación, cuya derivación a partir de la ecuación 5 se encuentra en el apéndice:

$$[Ca^{++}]_i = \frac{[Ca^{++}]_o ([Na^+]_i)^3}{([Na^+]_o)^3 e^{-E_m F / RT}} \quad (6)$$

en donde $[Ca^{++}]_i$, $[Ca^{++}]_o$, $[Na^+]_i$ y $[Na^+]_o$ son las concentraciones intra y extracelulares de Ca^{++} y Na^+ respectivamente; E_m es el potencial de membrana y F , R y T son las constantes anteriormente descritas.^{8,15}

Resolviendo la ecuación 6 para el caso particular de las neuronas de *H. aspersa*, bajo nuestras condiciones experimentales iniciales: $[Ca^{++}]_o = 7$ mM; $[Na^+]_o = 82.5$ mM; $[Na^+]_i = 5$ mM; $E_m = -50$ mV, es posible predecir que cuando $[Na^+]_o$ disminuye por debajo de ciertos valores se produce un incre-

mento en la $[Ca^{++}]_i$, la cual se eleva explosivamente cuando la $[Na^+]_o$ se aproxima a cero (Figura 3). En la figura 4 se ilustra esquemáticamente cómo la eliminación del Na^+ extracelular produce un incremento en $[Ca^{++}]_i$ a través del intercambiador Na^+/Ca^{++} . (Figuras 3 y 4).

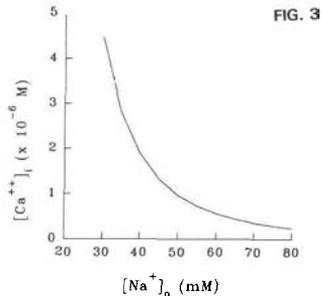


Figura 3. Curva teórica de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{++} ($[Ca^{++}]_i$), mediados por el intercambiador Na^+/Ca^{++} , al disminuir la concentración extracelular de Na^+ ($[Na^+]_o$). Es suficiente con una disminución relativamente pequeña en la $[Na^+]_o$ para que se produzca un aumento importante en la $[Ca^{++}]_i$. La curva se obtuvo por medio de la ecuación 6 considerando que: $[Ca]_o = 7$ mM; $[Na]_i = 5$ mM; $E_m = -50$ mV.

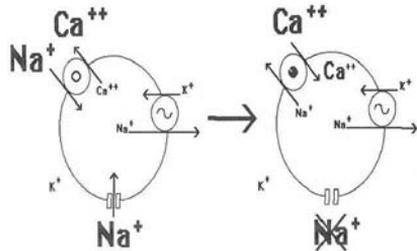


Figura 4. Esquema que ilustra el incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} mediado por el intercambiador Na^+/Ca^{++} , cuando se elimina el Na^+ extracelular. El esquema izquierdo muestra una célula en condiciones fisiológicas en las que la bomba de Na^+ mantiene al gradiente electroquímico de ese catión permitiendo la expulsión de Ca^{++} a través del intercambiador Na^+/Ca^{++} . La eliminación del Na^+ extracelular provoca la inversión de este intercambiador induciendo un aumento en la $[Ca^{++}]_i$, como se ilustra en el esquema de la derecha.

Consideremos ahora el caso en el que la $[Na^+]_i$ se incrementa monótonicamente, como ocurre al inhibir la bomba de Na^+ . Resolviendo la ecuación 6 para valores crecientes de $[Na^+]_i$, se

obtiene la gráfica de la Figura 5. Nótese que pequeños aumentos en la $[Na^+]_i$ afectan considerablemente a la $[Ca^{2+}]_i$, llevándola incluso a valores del orden micromolar. Considerando un $E_m = -60$ mV, la tasa de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se reduce notablemente, debido a que el potencial de membrana se hace más negativo que el potencial de inversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . El efecto de la inhibición de la bomba de Na^+ sobre la operación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} se ilustra en la figura 6. (Figuras 5 y 6).

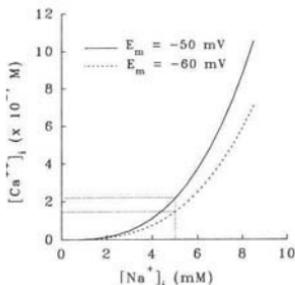


Figura 5. Cambios teóricos en la concentración intracelular de calcio libre ($[Ca^{2+}]_i$) al elevarse la concentración intracelular de Na^+ ($[Na^+]_i$) ante la inhibición de la bomba de Na^+ . Los cálculos se realizaron considerando dos potenciales de membrana (E_m). Pequeños cambios en el Na^+ intracelular son suficientes para incrementar sensiblemente los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Cuando E_m es igual a -50 mV (curva punteada), la tasa de aumento del Ca^{2+} es mayor que con un E_m de -60 mV (curva continua). Las líneas punteadas indican la $[Ca^{2+}]_i$ con una $[Na^+]_i$ fisiológica.

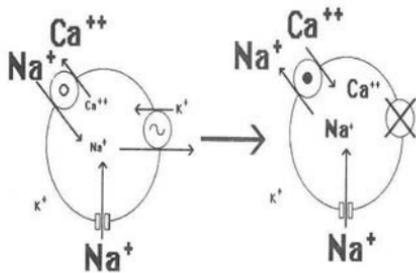


Figura 6. Esquema que ilustra los cambios que ocurren en $[Na^+]_i$ y $[Ca^{2+}]_i$ al inhibir la bomba de Na^+ . En condiciones fisiológicas (esquema izquierdo), la bomba expulsa al Na^+ que entra a la célula por canales y transportadores. La inhibición de la bomba produce una acumulación de Na^+ en el interior celular, alterando su gradiente electroquímico lo cual invierte al intercambiador Na^+/Ca^{2+} como se aprecia en el esquema de la derecha. Este proceso induce al aumento en $[Ca^{2+}]_i$.

Cambios de volumen celular durante la inhibición de la bomba de Na^+ , en neuronas: una visión integral de los mecanismos de producción de daño neuronal

La Figura 7 ilustra los cambios que, con base en los resultados expuestos en éste y en los trabajos anteriores,^{5,6,7} suponemos ocurren en las células nerviosas cuando se inhibe la bomba de Na^+ , sea por medios farmacológicos (ej: con uabaína), a consecuencia de cuadros hipoglucémicos o por procesos que produzcan anoxia, tales como la isquemia o los traumatismos. En el esquema de la extrema izquierda se muestra la condición fisiológica de una neurona. En esta situación la bomba de Na^+ remueve de la célula al Na^+ que tiende a entrar a la misma, manteniendo el gradiente electroquímico de este ión. Para ello, la bomba consume ATP, cuya síntesis depende de la disponibilidad de oxígeno y glucosa. La energía almacenada en el gradiente electroquímico del Na^+ es utilizada por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} para mantener una $[Ca^{2+}]_i$ 10,000 más baja que en el exterior. En estas condiciones no hay ni flujos netos de agua, ni gradientes de presión osmótica a través de la membrana. El esquema de la parte media superior muestra que al inhibir la bomba de Na^+ , la $[Na^+]_i$ aumenta pues el Na^+ sigue entrando a la célula pero ya no hay un sistema que lo expulse. Esto altera su gradiente electroquímico, lo que hace que el intercambiador Na^+/Ca^{2+} funcione de manera inversa (círculo negro), produciéndose un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ capaz de disparar la salida de K^+ (y probablemente de Cl^- de algún otro anión v.g.: glutamato) a través de canales específicos para estos iones. Además, dado que la bomba de Na^+ es electrogénica, su inhibición se acompaña de una despolarización de la membrana, capaz de activar la entrada de Ca^{2+} vía canales sensibles al voltaje de transmembrana.⁷ El eflujo de K^+ y de aniones trae como consecuencia la salida osmótica de agua y la disminución del volumen celular. Al decrecer este último, se produce un aumento adicional en las concentraciones de Ca^{2+} y Na^+ como se muestra en el esquema de la parte media inferior. Finalmente, el aumento en $[Ca^{2+}]_i$ activa proteasas con la consecuente necrosis celular.¹⁶ En ocasiones, el balance osmótico producido después de que se inhibe la bomba es tal, que se produce un aumento transitorio en el volumen celular seguido de una disminución del mismo (esquema de la extrema derecha). Esto ocurre porque el Na^+ intracelular aumenta más rápidamente que el Ca^{2+} y no es sino hasta que este último catión alcanza una cierta concentración que se activan las conductancias al K^+ y a los aniones produciéndose el eflujo de estos iones. Esto implica que el daño celular no está relacionado con una lisis osmótica, como se postula reiteradamente en la literatura, sino más bien, con una acumulación de Ca^{2+} intracelular que se sabe es letal para la célula.^{16,17} Cabe mencionar que el eflujo de K^+ en las neuronas sometidas a la inhibición de la bomba, por isquemia o cualquier otra causa, produce un aumento en el K^+ extracelular, que ha sido registrado por otros autores¹⁸ y que sería responsable de la liberación neuronal de glutamato con la consecuente activación de receptores tipo NMDA que

incrementan aún más el influjo de Ca^{++} y Na^+ a la célula, disparando un proceso patológico que involucra a neuronas localizadas en zonas circunvecinas a aquellas en las que se inició el fenómeno isquémico.¹⁷

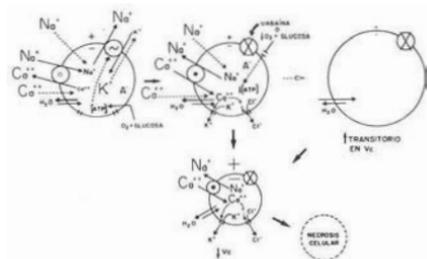


Figura 7. Mecanismo implicado en los cambios de volumen celular secundarios a la inhibición de la bomba de Na^+ en neuronas. Contrario a lo generalmente aceptado, la inhibición de la bomba de Na^+ , sea por fármaco o por depleción de ATP, resulta en una disminución de volumen celular en ocasiones precedida por un aumento del mismo.

Apéndice

En el estado de equilibrio:

$$E_{\text{Na}^+} - E_m = 0 \quad (7)$$

Ya que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ funciona con una estequiometría de $3\text{Na}^+:\text{Ca}^{++}$, de acuerdo con la ecuación 5:

$$3(E_{\text{Na}^+} - E_m) = 0 \quad (8)$$

es decir,

$$3E_{\text{Na}^+} = 3E_m \quad (9)$$

en donde E_{Na^+} es el potencial electroquímico del Na^+ y E_m el potencial de membrana.

De acuerdo con la ecuación de Nernst para E_{Na^+} , es posible expresar a la ecuación 9 como:

$$3 \left(\frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Na}^+]_o}{[\text{Na}^+]_i} \right) = 3E_m \quad (10)$$

por lo que:

$$3 \ln \frac{[\text{Na}^+]_o}{[\text{Na}^+]_i} = \frac{3FE_m}{RT} \quad (11)$$

En la expresión anterior, $z = 1$, por ser el Na^+ un catión monovalente.

Al sacar antilogaritmos a ambos lados de la ecuación 11, tenemos que:

$$\frac{([\text{Na}^+]_o)^3}{[\text{Na}^+]_i} = e^{\frac{3FE_m}{RT}} \quad (12)$$

Multiplicando la expresión 12 por la unidad, se obtiene:

$$\frac{([\text{Na}^+]_o)^3}{[\text{Na}^+]_i} = e^{\frac{3FE_m}{RT}} \quad (13)$$

de donde:

$$\frac{([\text{Na}^+]_o)^3}{[\text{Na}^+]_i} e^{-\frac{3FE_m}{RT}} = 1 \quad (14)$$

Para el caso del Ca^{++} , y en el estado de equilibrio:

$$E_{\text{Ca}^{++}} - E_m = 0 \quad (15)$$

$$E_{\text{Ca}^{++}} = E_m \quad (16)$$

De acuerdo con ecuación de Nernst para $E_{\text{Ca}^{++}}$ se obtiene que:

$$\frac{RT \ln [\text{Ca}^{++}]_o}{zF [\text{Ca}^{++}]_i} = E_m \quad (17)$$

Multiplicando ambos lados de esta ecuación por $2F/RT$ dado que $z = 2$ por ser el Ca^{++} un catión divalente, tenemos que:

$$\frac{[\text{Ca}^{++}]_o}{\ln [\text{Ca}^{++}]_i} = \frac{2FE_m}{RT} \quad (18)$$

si se saca el antilogaritmo a la expresión 18 y se reacomoda de la misma manera que como se hizo con la ecuación 13, se llega a la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Ca}^{++}]_o}{[\text{Ca}^{++}]_i} e^{-\frac{2FE_m}{RT}} = 1 \quad (19)$$

Igualando las expresiones 14 y 19 de acuerdo con la ecuación 5:

$$\frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i} e^{-\frac{zFE_m}{RT}} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^3 e^{-\frac{zFE_m}{RT}} \quad (20)$$

Despejando el cociente de las concentraciones de Ca^{++} resulta que:

$$\frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^3 e^{-\frac{zFE_m}{RT}} \quad (21)$$

De acuerdo con las propiedades de los exponentes, $e^x/e^y = e^{x-y}$, la ecuación 21 puede expresarse como:

$$\frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^3 e^{-\frac{zFE_m}{RT}} \quad (22)$$

Despejando $[Ca^{++}]_i$ de la ecuación 22 se obtiene la ecuación 6.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias a donativos otorgados a F.JAL por el National Institute of Neurological Disorders and Stroke de los EUA (Grant NS29227) y CONACYT México, donativo D111-903836. Agradecemos el magnífico apoyo técnico del señor Sergio Márquez Baltazar y los comentarios del doctor Luis Reuss, del doctor Humberto Cruzblanca, del biólogo Julio Altamirano y del biólogo Andrés Nani. La fotografía estuvo a cargo del señor Raúl Cardozo.

Referencias

1. Tosteson DC, Hoffman JF. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. gen. Physiol.* 1960; 44: 169.
2. Tosteson DC. Regulation of cell volume by sodium and potassium transport. *En: the cellular functions of membrane transport*. Ed.

- Hoffman, J. F. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 1964; 322.
3. Stein WD. Channels, carriers, and pumps: An introduction membrane transport. Academic Press, California. 1990.
4. Rosenberg GA. Brain fluids and metabolism. Oxford University Press. 1990.
5. Álvarez-Leafmans FJ, Gamiño SM, Reuss L. Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol. Lond* 1992; 458: 603.
6. Cruzblanca H, Nani A, Altamirano J, Márquez GS, Merediz G, Álvarez-Leafmans FJ. Ion movements underlying cell volume changes following sodium pump inhibition in *Helix* neurones. *Biophys. J.* 1992; 61: A385.
7. Gamiño SM, Altamirano J, Reuss L, Álvarez-Leafmans FJ. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ during Na^+ pump inhibition in Fura-2 loaded *Helix* neurons. *Biophys. J.* 1993; 64: A347.
8. Mullins LJ. Ion transport in heart. Capítulo 4: Na^+/Ca^{++} exchange. Raven Press, New York, 1981: 20.
9. Reeves JP, Philipson KD. Sodium-calcium exchange activity in plasma membrane vesicles. *En: Allen, Noble, Reuter (ed.) Sodium-calcium exchange*. Oxford University Press, 27-48, 1989.
10. Meech RW. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1978; 7:1.
11. DiPolo R. The sodium-calcium exchange in intact cells. *En: Allen, Noble & Reuter (ed.) Sodium-calcium exchange*. Oxford University Press, 1989: 15.
12. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Capítulo 5: Na^+/Ca^{++} exchange and the sarcolemmal Ca^{++} -pump. Kluwer Academic Publishers, 1991:71.
13. Reuter H. Introduction. *En: Allen, Noble, Reuter (ed.) Sodium-calcium exchange*. Oxford University Press, 1989:1.
14. Matsuoka S. y Hilgemann DW. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange: Ion and voltage dependencies of the transport cycle. *J. Gen. Physiol.* 1992; 100:963.
15. Mullins LJ. The generation of electric currents in cardiac fibers by Na^+/Ca^{++} exchange. *Am. J. Physiol.* 236(3): C103-C110, 1979.
16. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992; 32:449.
17. Choi DW. Cerebral hypoxia: Some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* 1990; 10:2493.
18. Hansen AJ. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* 1985; 65:101.
19. Casteels R, Droogmans G, Hendrickx H. Membrane potential of smooth muscle cells in K^+ -free solutions. *J. Physiol. Lond.* 1971; 217: 281.
20. Schlue WR. Effects of ouabain on intracellular ion activities of sensory neurones of the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.* 1991; 65(3):736.