

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biofísica

PEDECIBA

Estudio del efecto de amortiguadores de Ca^{2+} extrínsecos a alta concentración citoplasmática sobre la permeabilidad de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico de anfibio. Una reevaluación basada en medidas simultáneas de transitorios de calcio intra-retículo y mioplasmáticos.

Jorge Fernando Olivera De Oscar

Orientador: Gonzalo Pizarro



INDICE

<u>Resumen</u>	4
<u>Introducción</u>	6
<u>Acoplamiento Excitocontráctil</u>	6
<u>Las moléculas del AEC: estructura, función y ubicación anatómica</u>	6
<i>Receptor de dihidropiridina</i>	6
<i>Receptor de rianodina</i>	8
<i>Efecto del Ca²⁺ en las distintas isoformas del RyR</i>	11
<i>Calsequestrina</i>	11
<u>Existe LCIC en el músculo esquelético de anfibio?</u>	14
<u>Medida de Ca²⁺ en el RS</u>	22
<u>Fundamentación e hipótesis</u>	25
<u>Objetivo general</u>	26
<u>Objetivos específicos</u>	27
<u>Material y Métodos</u>	28
Soluciones.....	29
Medidas ópticas	31
<i>Calibración de la señal de Mag fluo4 AM</i>	34
<i>Separación de las señales de Mag fluo4 y Rhod2</i>	37
<i>Cálculo del flujo de liberación a partir de la señal citoplasmática</i>	41
Medidas de corriente intramembrana	41
Estadística	41
<u>Resultados</u>	42
<i>Señales de Ca²⁺ con alta concentración de Mag fluo4 AM en el citoplasma</i>	42
<i>Fotoblanqueo del indicador intra RS por la iluminación intensa</i>	45
<i>Dependencia de la señal de Mag fluo4 AM con el voltaje test</i>	47
<i>Comparación de las señales de Mag fluo4 AM y Fluo5 N AM</i>	49

<i>Curso temporal del transitorio intra RS durante una despolarización prolongada</i>	51
<i>Medidas de la permeabilidad del RS a partir de la señal citoplasmática a diferentes $[Ca^{2+}]$ en el RS</i>	53
<i>Cálculo del flujo de liberación a partir de la señal de RS</i>	57
<i>Efectos de la alta concentración de BAPTA y EGTA en la liberación de calcio ..60</i>	
<u>Discusión</u>	64
<i>La disminución del contenido Ca^{2+} del RS no afecta la permeabilidad de Ca^{2+} promedio de la membrana del RS</i>	64
<i>El poder amortiguador de Ca^{2+} en el RS cambia con la $[Ca^{2+}]_{RS}$.....</i>	67
<i>La permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS es mayor en alta [EGTA] que en alta [BAPTA].....</i>	69
<i>Comparación con estudios previos</i>	72
<u>Conclusiones</u>	75
<u>Apéndice</u>	76
<i>Simulaciones con un modelo de dos compartimentos</i>	76
<u>Bibliografía</u>	86

Resumen

En el músculo esquelético se denomina acoplamiento excitocontráctil a la serie de eventos que se inician con la despolarización de la membrana y culminan con la liberación del calcio desde el retículo sarcoplásmico (RS) y el desarrollo de fuerza por parte del músculo. Una molécula que actúa como sensor de voltaje a nivel de la membrana tubular, denominada receptor de dihidropiridina (RDHP), interactúa con la isoforma enfrentada en la unión triádica del canal de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, denominado receptor de rianodina tipo 1 (RyR 1) en mamíferos y RyR α en anfibios. Existe en anfibios otra isoforma no enfrentada al RDHP, denominada RyR β . Mientras que los RyR α son activados por la despolarización de la membrana (LCID), la isoforma β lo sería a través del mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio (LCIC). En el RS el Ca^{2+} , además de libre, se encuentra unido a una proteína denominada calcecuestrina (CSQ). Esta se encuentra en las cisternas terminales y estaría vinculada a los canales de liberación de calcio a través de dos proteínas denominadas triadina y junctina. Esta unión sería dependiente de contenido de Ca^{2+} dentro del RS, el que a además modificaría las propiedades de polimerización de la CSQ.

Se exploró como afecta a la permeabilidad de calcio del RS la disminución de su contenido de calcio. Para ello se monitorizó el mismo directamente con una medida intraretículo, simultáneamente con una medida de la señal citoplasmática. Se encontró que cuando el contenido de Ca^{2+} del RS cae a aproximadamente un tercio del valor normal, hay una disminución en el pico del flujo de liberación (0.021 ± 0.013 1/ms) con respecto al RS lleno (0.026 ± 0.015 1/ms), pero no en la permeabilidad promedio (0.009 ± 0.003 1/ms con el RS lleno y 0.010 ± 0.003 1/ms) con el RS depletado. Estos resultados son consistentes con un mecanismo que combina LCID y LCIC activada secundariamente. Ante una disminución de la LCIC por RyR β como consecuencia de la menor LCID por caída en la fuerza impulsora, se compensa por disminución en la inactivación calcio dependiente. La ausencia de disminución de la permeabilidad en bajo contenido de calcio del RS sugiere además la falta de regulación luminal por CSQ como se ha demostrado en mamíferos.

Se evaluó el efecto en la liberación de calcio de dos amortiguadores, EGTA y BAPTA, aplicados a alta concentración y a igual poder amortiguador de equilibrio. Al ser

BAPTA 100 veces más rápido que EGTA, se evaluó su posible efecto en la LCIC monitoreando la señal de calcio desde el interior de RS. Se encontró que la permeabilidad es mayor en alto EGTA que en BAPTA. Esto apoya la participación de LCIC en la liberación global.

En base a los resultados obtenidos se concluye que:

- 1) Se descarta que la liberación de Ca^{2+} se deba solamente a un proceso voltaje dependiente*
- 2) Este estudio no muestra evidencia de regulación luminal de la permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS.*
- 3) Un sistema de doble control, LCID que activa la LCIC, daría cuenta de los efectos de la reducción de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ sobre la permeabilidad.*
- 4) El efecto de BAPTA apoya el sistema de doble control.*

Introducción

Acoplamiento Excitocráctil

La función principal del tejido muscular es la de generar fuerza y/o producir movimiento. Un paso esencial en este proceso es la elevación de la concentración de calcio ($[Ca^{2+}]$) en el mioplasma. La secuencia de mecanismos que se inician con el estímulo a nivel de la membrana plasmática y culminan con el aumento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular y su consecuencia, la contracción muscular, se denomina acoplamiento excitocráctil (AEC) (Khan y Sandow, 1950; Sandow A D, 1952). En el músculo esquelético el Ca^{2+} responsable de producir la contracción es liberado desde un organelo intracelular denominado retículo sarcoplásmico (RS), en particular del sector correspondiente a las cisternas terminales del mismo (Caputo y Giménez, 1967). La coordinación entre despolarización de membrana y liberación de Ca^{2+} se produce gracias a la interacción entre una proteína ubicada en la membrana de los túbulos T que actúa como sensor del voltaje de membrana y el canal de liberación de Ca^{2+} ubicado en la cisterna terminal del RS (Ríos y Brum, 1987; Ríos y Pizarro, 1991).

Las moléculas del AEC: estructura, función y ubicación anatómica

Receptor de dihidropiridina

Dada su afinidad por dihidropiridinas, a la proteína que actúa como sensor de voltaje se la denomina receptor de dihidropiridina (RDHP). Estudios de microscopía electrónica determinaron que los RDHP se encuentran dispuestos en doble hilera en arreglos de 4 (en rojo en la figura 1), denominados tétradas, y cada canal de liberación del retículo (azul en la figura 1) interactúa con una tétrada ((Felder y Franzini-Armstrong, 2002). El RDHP es un hetero pentámero que se halla formado por las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ δ -1, β y

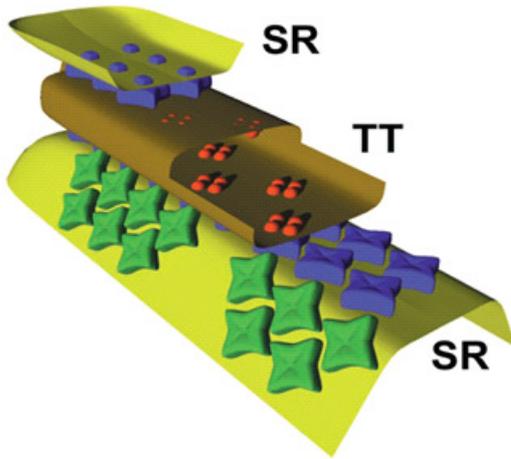


Figura 1. Esquema representativo de la distribución del RDHP (rojo) y los RyR α (azul) β (verde) en la tríada de anfibios. Modificado de Felder y Franzini-Armstrong, 2002.

γ (Calderón y cols., 2014; Bannister y Beam, 2013). La subunidad $\alpha 1$ está compuesta por cuatro repeticiones constituidas por 6 segmentos transmembrana (figura 2). El loop II- III de la subunidad $\alpha 1$ sería el sitio de interacción entre el RDHP con la isoforma enfrentada del canal de liberación (Nakai J y cols., 1998), produciendo su apertura en la forma denominada liberación de Ca^{2+} inducida por despolarización (LCID). Los

segmentos transmembrana del 1 al 4 constituyen el denominado dominio de detección de voltajes (Gandhi y cols., 2002). En el segmento transmembrana 4 (s4) se encuentra

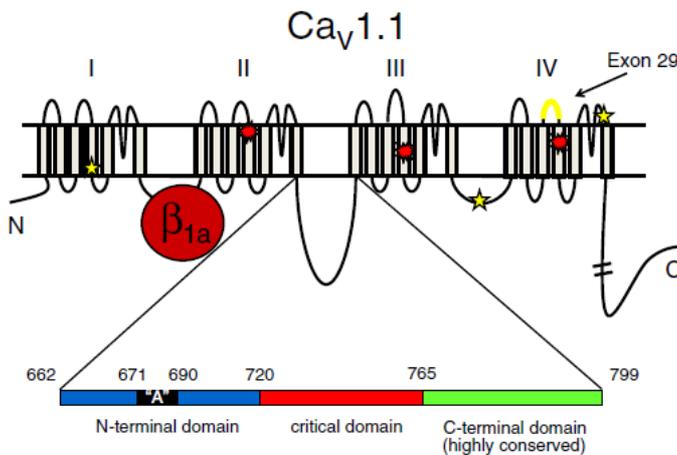


Figura 2. Representación esquemática de la topología de membrana de la sub unidad α del RDHP. Modificado de Bannister y Beam, 2013.

localizado el sensor de voltaje, cuya actividad queda de manifiesto como movimiento de carga en experimentos de control del voltaje. La sub unidad β estaría implicada en el tráfico del canal hacia la membrana y su ausencia implica una desorganización de las tétradas (Schredelseker y cols., 2005). La ausencia de las sub unidades $\alpha 2$ δ -1 y γ tendría efectos menos dramáticos en la función, como enlentecimiento en la activación

o corrimiento de la inactivación hacia voltajes más despolarizados (Obermair y cols., 2005; Freise y cols., 2000).

Receptor de rianodina

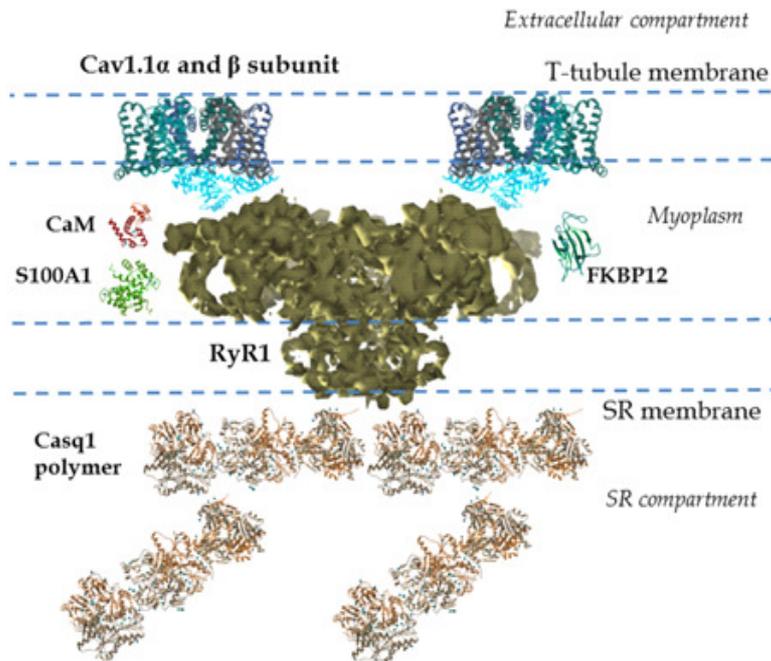


Figura 3. Reconstrucción por criomicroscopía electrónica del RyR1 y su asociación con distintas proteínas intra RS y citoplasmáticas. Modificado de Hernández-Ochoa y cols., 2016.

El canal de liberación de Ca^{2+} del retículo presenta alta afinidad por el alcaloide rianodina, por lo que se le denomina receptor de rianodina (RyR) (Sutko y cols., 1985). Existen en mamíferos tres isoformas del RyR codificadas por tres genes distintos en diferentes cromosomas. La isoforma del RyR que interactúa directamente con el bucle citoplasmático del RDHP se denomina 1 en mamíferos y α en anfibios y aves (en azul en la figura 1) (Block y cols., 1988; Block y cols., 1988a). Esta está localizada en la región estrictamente de juntura de la cisterna terminal y se organiza en doble hilera en registro con la doble hilera de RDHP del TT, con la salvedad que estos tienen una

distancia centro a centro el doble de los RyR. De este arreglo surge que uno de cada dos RyR 1 no está enfrentado a una tétada, lo que plantea dudas a su mecanismo de activación. Al ser la activación directa por el RDHP poco probable, esta podría ser mediada por interacción proteína-proteína por alguno de los RyR contiguos tal vez con la participación de una proteína asociada, o por el Ca^{2+} liberado a través de los RyR enfrentados a sensores.

El RyR 1 está formado por un ensamblado de cuatro subunidades, de aproximadamente 450 k Da por monómero (Imagawa y cols., 1987). En el extremo C terminal se encuentra el poro del canal, sector transmembrana que corresponde al 20% de la proteína total. El extremo N terminal ocupa la porción citoplasmática y corresponde al 80% de la proteína total (figura 3) (Hernández-Ochoa y cols., 2016). Como se puede ver en la figura 3, además de interactuar con el RDHP, el RyR interactúa con una variedad de proteínas, tanto citoplasmáticas (Calmodulina, CaM; FKBP12; S100A1), como intraretículo (Calsecuestrina, Casq1; triadina; junctina). Además, la actividad del RyR puede ser afectada por una variedad de agentes fisiológicos (ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+}) o procesos celulares (oxidación, fosforilación, S nitrosilación).

En el músculo esquelético de anfibio también existe una isoforma extra juntura del RyR denominada β (representada en verde en la figura 1), localizada en la cara lateral de la cisterna terminal la cual no interactúa con los RDHP y se encuentra a 28 nm de la doble hilera de los RyR α (Felder y Franzini-Armstrong, 2002). El mecanismo de apertura de esta isoforma sería la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (LCIC), mecanismo descrito inicialmente por Endo en fibras “peladas”, es decir, fibras donde la membrana fue removida de forma manual (Endo e Iino, 1980; Endo M, 2009). En base a imágenes de criofractura de Franzini-Armstrong (Block y cols., 1988; Block y cols., 1988a) se pudo entender como se relacionan los RyR y DHPR de la zona de juntura. A partir de este

trabajo, Ríos y Pizarro (Ríos y Pizarro, 1988) propusieron que los canales de liberación no enfrentados a sensores eran activados por Ca^{2+} . Los autores además plantearon que estos canales serían los responsables de generar el pico del flujo de liberación, presentando además inactivación por Ca^{2+} . A su vez los canales enfrentados a sensores eran activados por voltaje y serían la principal contribución del nivel estacionario y no presentarían inactivación por Ca^{2+} . Ninguna de estas propiedades tenían una justificación experimental directa concluyente, y se basaban en efectos diferenciales de algunos fármacos (anestésicos locales) sobre el pico y el nivel estacionario. A pesar de esas hipótesis tanto con el modelo original “global” (Ríos y Pizarro, 1988) como la versión de control “local” (Stern y cols., 1997) las simulaciones numéricas de un modelo matemático muestran una contribución no nula del componente activado por Ca^{2+} al nivel estacionario.

La isoforma β se denomina RyR3 en mamíferos, y en estos se encuentra presente en el músculo esquelético durante el desarrollo prenatal, desapareciendo en adultos para quedar su localización limitada en baja proporción al diafragma y al sóleo (Fill y Copello, 2002; Calderón y cols., 2014).

En el músculo cardíaco existe una tercera isoforma del RyR denominada 2, la cual tampoco interacciona con el DHPR. En este tipo de músculo el DHPR constituye el canal de Ca^{2+} tipo L y por cada uno hay 5 a 10 RyR2 cercanos (Sun y cols., 1995). Durante la despolarización de la célula miocárdica, el Ca^{2+} que entra a través de los canales activa a los RyR2 cercanos a través del mecanismo de LCIC. Además de estar presente en el tejido muscular estriado, las tres isoformas del RyR están presentes en el tejido muscular liso, cerebro y cerebelo (Fill y Copelo, 2002).

Efecto del Ca^{2+} en las distintas isoformas del RyR

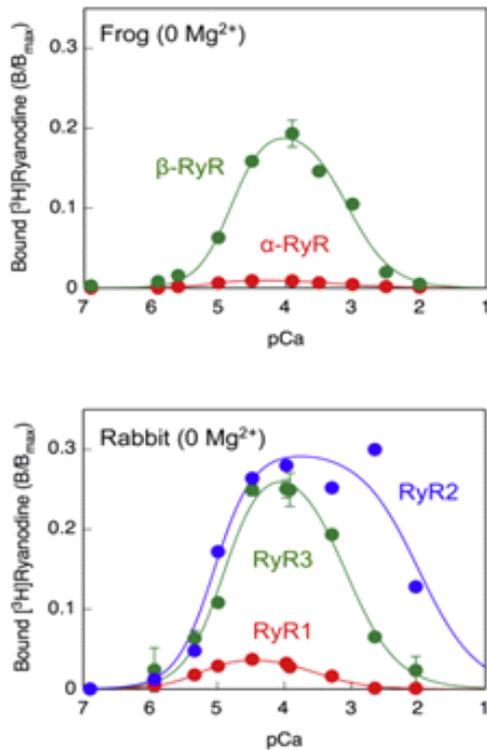


Figura 4. Unión de rianodina marcada dependiente de Ca^{2+} en las distintas isoformas del RyR de anfibios y mamíferos en ausencia de Mg^{2+} citoplasmático. Modificado de Murayama y Kurebayashi, 2011.

La apertura y cierre de los canales es un proceso estocástico que sigue las leyes de la probabilidad (Hille B, 2001). La probabilidad de encontrar un canal abierto o cerrado va a depender de distintos factores, por ejemplo el voltaje o la presencia de segundos mensajeros como el Ca^{2+} (Hille B, 2001). La dependencia de la probabilidad de apertura (P_o) de las distintas isoformas del RyR con la concentración de Ca^{2+} citoplasmático ha sido estudiada tanto en canales reconstituidos en bicapas como in situ. En la figura 4 se muestra esta dependencia con el Ca^{2+} en canales presentes en vesículas de RS de músculo

esquelético de anfibio en la parte superior, y para mamíferos en la parte inferior. En este estudio, la P_o de los RyR se detecta por la unión de rianodina marcada, aprovechando que este fármaco, a baja concentración, se une al estado abierto del canal. Puede observarse que todas las isoformas muestran tanto activación por Ca^{2+} (aumento de P_o) como inactivación (disminución de P_o) a concentración de $[Ca^{2+}]$ más elevada, siendo dicha dependencia más marcada en las isoformas β , 3 y 2, mientras que la isoforma α prácticamente no es activada por Ca^{2+} (Murayama y Kurebayashi, 2011).

Calsequestrina

Dentro del RS existe una proteína que actúa como amortiguador de Ca^{2+} dentro del mismo, denominada calsequestrina (CSQ) (Franzini-Armstrong C, 1970; Ikemoto y

cols., 1972). La misma se encuentra presente en la cisterna terminal, estando excluida del sector longitudinal del RS. Se encuentra anclada a la membrana a través de dos proteínas, triadina y junctina (Felder y cols., 2002), las cuales también tienen sitios de unión al RyR, lo que produciría un acoplamiento entre la CSQ y el canal de liberación (figura 5). La CSQ tiene la característica de polimerizarse cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta. El monómero de CSQ presenta tres dominios casi idénticos (I, II y III), con una hebra beta rodeada de cuatro hélices alfa (Wang y cols., 1998).

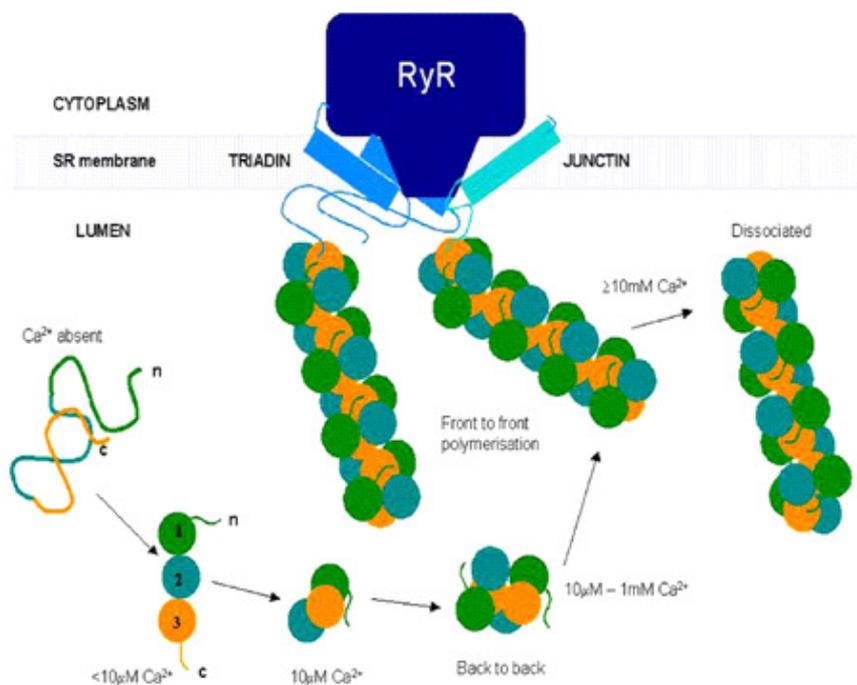


Figura 5. Representación esquemática de la polimerización dependiente de Ca^{2+} de la CSQ y su asociación y disociación del RyR via junctina y triadina. Modificado de Beard y cols., 2004.

Cada dominio presenta un núcleo hidrofóbico con residuos ácidos en la superficie. Los bucles de conexión entre los dominios contienen principalmente residuos ácidos, lo que hacen el centro de la proteína hidrofílico en vez de hidrofóbico. Esto requiere cationes para estabilizar el centro ácido de la proteína, siendo los cationes divalentes en particular, más efectivos que los monovalentes para desarrollar esta tarea (Park y cols.,

2004). En la figura 5 se puede ver el modelo propuesto por Beard (Beard y cols., 2004) en base al trabajo de Wang (Wang y cols., 1998). En este modelo los dominios se condensan en un monómero a medida que la concentración de Ca^{2+} aumenta (hasta valores menores a $10 \mu\text{M}$). A medida que la concentración de Ca^{2+} sigue aumentando los monómeros se dimerizan de forma “back to back” (formando una caja electronegativa que contiene los extremos C terminales). Cuando la concentración de Ca^{2+} supera los $10 \mu\text{M}$ los dímeros se unirían para formar polímeros ahora en una forma de interacción “front to front” (con el extremo N terminal encerrado). Cuando la concentración de Ca^{2+} se encuentra cercana a 1mM (Beard y cols., 2004), el polímero se uniría a la triadina y a la junctina a través del extremo C terminal, mientras que concentraciones de Ca^{2+} superiores a los 10mM producirían la disociación del polímero a la triadina y a la junctina.

Beard y colaboradores, fusionando el RyR en bicapas a partir de vesículas del RS de mamífero y realizando registros de canal único, encontraron que la calsecuestrina inhibe al canal y que su disociación activa al canal. Este efecto estaría mediado por triadina y junctina, ya que cuando los canales reconstituidos pierden estas proteínas, el efecto sería el de activación (Beard y cols., 2004).

¿Existe LCIC en el músculo esquelético de anfibio?

La dinámica del Ca^{2+} intracelular en el músculo esquelético ha sido clásicamente estudiada a través de métodos ópticos (Blinks y cols., 1978; Tsien R Y, 1980; Ríos y Schneider, 1981). Para ello, distintos indicadores de Ca^{2+} pueden ser cargados en el citoplasma. Una vez que el Ca^{2+} es liberado desde el RS, el mismo puede ser detectado como un cambio en las propiedades ópticas del indicador como consecuencia de su unión al Ca^{2+} . A partir de la señal transitoria de Ca^{2+} (aspecto que profundizaremos en Materiales y Métodos) se puede obtener el flujo de liberación de Ca^{2+} desde el RS. El

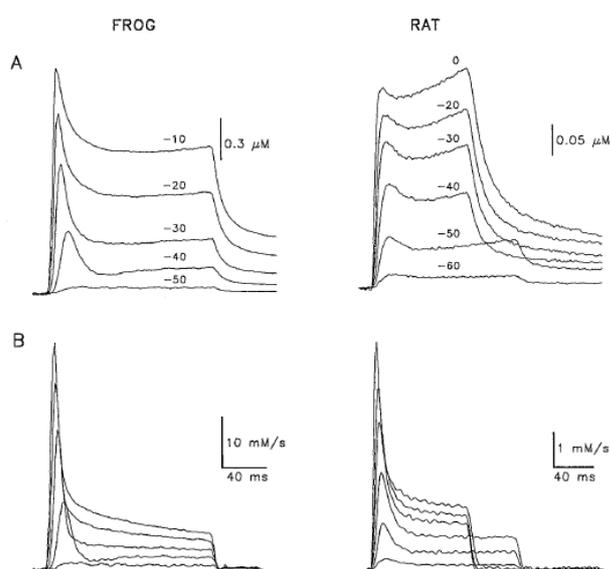


Figura 6. Transitorios de calcio (A) y flujos de liberación de calcio (B) en respuesta a pulsos despolarizantes en rana y rata. Modificado de Shirokova y cols., 1996

flujo de liberación en respuesta a un pulso despolarizante presenta un claro pico inicial que luego decae a un nivel casi estacionario (Figura 6) (Shirokova y cols., 1996). Si se grafica el cociente entre el pico y el nivel estacionario en función del voltaje de membrana se puede observar como existe en el anfibio una dependencia con máximo a despolarización moderada. Esto no ocurre en el músculo esquelético de mamíferos, donde el cociente es

constante en todo el rango de voltaje (Figura 7). Esta diferencia fue interpretada por Shirokova y colaboradores (Shirokova y cols., 1996) como el resultado de la diferente contribución de la LCIC en la rana y el mamífero. Las dobles hileras de RyR tienen una longitud de 14 a 30 canales. Además por razones anatómicas y de distancia, es razonable pensar que las distintas unidades de liberación no interactúan entre sí.

Basados en el modelo propuesto por Ríos y Pizarro, la LCIC constituye un mecanismo de amplificación de la liberación de Ca^{2+} voltaje dependiente. Esto resulta más importante a bajo voltaje, con pocos canales dependientes de voltaje abiertos, lo que produce el máximo local en la dependencia con el voltaje del cociente pico/nivel estacionario.

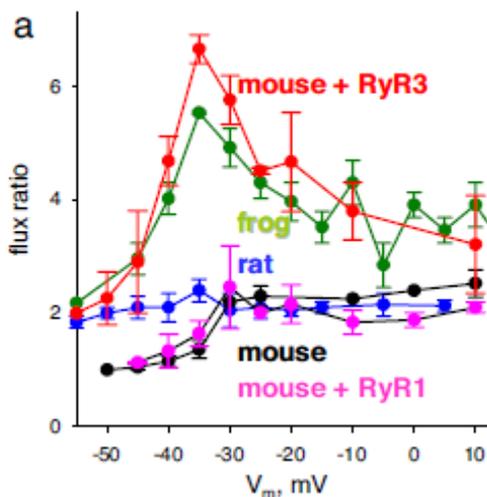


Figura 7. Tomada de Pouvreau y cols., (2007). Dependencia con el voltaje de la relación pico/base del flujo de liberación en rana (verde) y rata (azul), datos de Shirokova y cols., (1996). En negro y fucsia se grafican los cocientes en el ratón salvaje y con expresión de RyR1, respectivamente. En rojo cuando se expresa RyR3.

A voltajes más positivos la activación de más RyRs dependientes de voltaje en cada unidad se vuelve redundante para producir más LCIC, disminuyendo dicho cociente. Si bien esto explica el caso del anfibio, no es claro como modificar el mecanismo para que reproduzca el cociente constante en el caso del mamífero. Por lo que los autores propusieron por primera vez que existían diferencias fundamentales de mecanismos entre ambas especies. Esto ha sido confirmado por estudios posteriores referentes a la expresión de las distintas isoformas y su localización anatómica. De todas formas el rol de la LCIC en la generación de la dependencia de voltaje del cociente pico/nivel estacionario fue confirmado por el estudio de Pouvreau y colaboradores (Pouvreau y cols., 2007). Estos autores expresaron RyR3 en miocitos de mamífero, logrando como

consecuencia que apareciese un fenotipo de anfibio en la razón pico/nivel estacionario (ver fig. 7).

Ante la ausencia de un inhibidor específico de la isoforma β , el estudio del rol específico de la LCIC ha requerido el agregado de amortiguadores de Ca^{2+} extrínsecos agregados al compartimiento mioplasmático para lograr su inhibición. La elección del amortiguador se basa en que la distancia (λ) que recorre el Ca^{2+} antes de unirse al mismo puede calcularse a partir de la solución de la ecuación de difusión desde una fuente puntual en presencia de buffers difusibles a alta concentración (lejos de saturación) (Neher E., 1986; Stern M D, 1992; Pape y cols., 1995), y viene dada por:

$$\lambda = \sqrt{\frac{D_{\text{Ca}}}{k_{\text{on}}[\text{Amortiguador}]}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde $D_{\text{Ca}^{2+}}$ es el coeficiente de difusión de Ca^{2+} , k_{on} el coeficiente de velocidad de unión del buffer a Ca^{2+} . De esta forma, para una misma concentración, un buffer 100 veces más rápido determinará un radio de captura 10 veces menor. Si se comparan 1,2-bis(*o*-aminofenoxy)etano-*N,N,N',N'*- ácido tetra acético (BAPTA) y etilenglicol-bis(β -aminoetil ether)-*N,N,N',N'*- ácido tetra acético (EGTA), al ser este último aproximadamente 100 veces más lento no tiene efectos importantes sobre la inactivación por Ca^{2+} y en caso de estar presente tampoco sobre el LCIC. Los grupos de Chandler (Jong y cols., 1993) y Schneider (Csernoch y cols., 1993) han abordado esta temática con estrategias experimentales comparables pero con resultados e interpretaciones divergentes, como resumimos en la figura 8. Schneider y colaboradores encontraron que luego de la inyección de BAPTA el pico del flujo de liberación está disminuido y decae más lentamente (A). Cuando corrigen el flujo por el contenido de Ca^{2+} (B), luego de la aplicación de BAPTA el pico del flujo es abolido mientras que el nivel estacionario no se modifica. En base a esto concluyeron que el

BAPTA eliminaba el pico como consecuencia de suprimir la LCIC y sus datos parecen coincidir con el mecanismo propuesto por Ríos y Pizarro.

Por su parte Chandler y colaboradores encuentran un aumento del pico del flujo de liberación que luego decae más lentamente que en condiciones control (panel inferior de la figura, parte A), cuando el flujo es corregido por el contenido de Ca^{2+} en el retículo (parte B) el flujo permanece estacionario y aumentado respecto al control. Para ellos la alta amortiguación suprime la inactivación por Ca^{2+} y potencia la liberación que ellos consideran exclusivamente activada por voltaje.

Vale aclarar que el grupo de Schneider utiliza antipirilazo III como indicador para la medida previa a la amortiguación y fura2 para la medida en BAPTA, mientras que el grupo de Chandler utiliza dipurpurato para la medida previa a la amortiguación y fura 2 como indicador y como amortiguador (fura 2 es un derivado del BAPTA). Además de los problemas que implica la consistencia en la calibración de ambos indicadores, está el problema de estimar el valor de la concentración de BAPTA mioplasmática en el sitio donde se realiza la medida, ya que del mismo depende el cálculo del flujo de liberación. En las figuras las concentraciones de BAPTA son 5.8 mM para los experimentos del grupo de Schneider (Csernoch y cols., 1993) y 4.5 mM para el grupo de Chandler (Jong y cols., 1993). Por último los resultados en parte dependen de la corrección por el contenido del RS que se estima indirectamente (sin medir el Ca^{2+} dentro del RS).

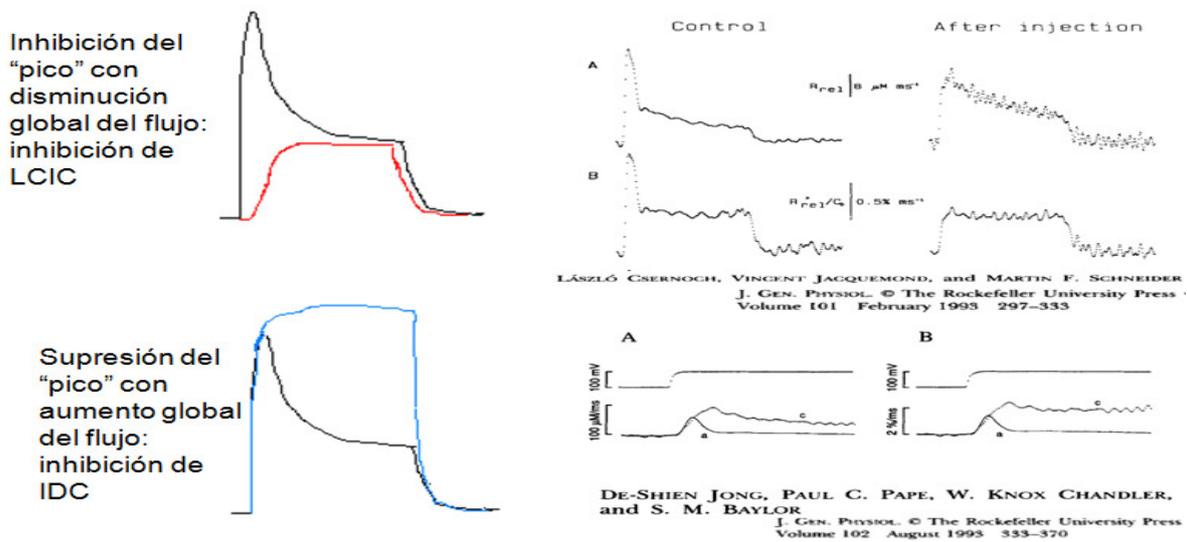


Figura 8. Resumen de los resultados de los grupos de Schneider (panel superior) y Chandler (panel inferior). Ver texto. Modificado de Csernoch y cols. 1993 y Jong y cols. 1993.

Ambos grupos basan la corrección en la hipótesis de que el flujo es directamente proporcional al contenido de Ca^{2+} del RS. Schneider y colaboradores asumen que la permeabilidad adquiere un valor estacionario luego del proceso de inactivación. Es de destacar que el cociente entre el flujo de liberación de Ca^{2+} y el contenido de Ca^{2+} en el RS es una medida de la permeabilidad a Ca^{2+} del mismo. El método de Schneider y colaboradores (Schneider y cols., 1987) consiste en ajustar iterativamente el contenido inicial hasta que la corrección de este por el Ca^{2+} liberado durante un pulso (la integral del flujo de liberación) de como resultado una permeabilidad constante a los 100 ms. Es de señalar que el contenido para Schneider y colaboradores es siempre mayor en BAPTA que en referencia, esto es fundamental para reducir la amplitud del flujo de liberación corregido por depleción en BAPTA.

Por su lado Chandler y colaboradores no imponen la permeabilidad estacionaria constante. Miden el contenido total, cuando la concentración del indicador Fura 2 es lo suficientemente alta como para unir todo el Ca^{2+} liberado desde el RS, asumiendo que lo vacían con un pulso prolongado. Ese valor, medido a un tiempo bastante avanzado durante el experimento, se asume constante durante todo el transcurso del mismo y lo

usan como contenido inicial para re calcular el contenido remanente durante la liberación en respuesta a un pulso. No obstante no asumirlo, la corrección de Chandler da un nivel bastante estacionario.

La hipótesis de linealidad entre flujo de Ca^{2+} y contenido de Ca^{2+} dentro del RS implica que la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre y la $[\text{Ca}^{2+}]$ total en el RS estén a su vez linealmente relacionadas, por lo tanto la amortiguación dentro del mismo operaría como una expansión del volumen, lo que no surge naturalmente de las propiedades que describimos para la calsecuestrina. La hipótesis de permeabilidad constante luego de la inactivación merece ser reexaminada basándose en una medida directa de $[\text{Ca}^{2+}]$ intraretículo.

El resultado de estos estudios es por lo tanto poco concluyente respecto a la participación de LCIC en el AEC del músculo de anfibio. Tal vez el principal respaldo a la idea de que LCIC juega un rol importante viene del descubrimiento de las chispas de Ca^{2+} (Klein y cols., 1996). Estas fueron descritas inicialmente en el músculo cardíaco donde la LCIC es el mecanismo de activación de la liberación de Ca^{2+} desde el RS (Cheng y cols., 1993). Luego fueron descritas en músculo esquelético de rana. Las chispas son elevaciones locales de calcio que ocurren aleatoriamente en el tiempo aunque siempre en las tríadas. Presentan una amplitud con un curso temporal estereotípico. Lo mismo con su duración y su ancho espacial. La causa de estas propiedades ha sido tema de debate pero hoy se acepta como establecido que las chispas son el resultado de la apertura más o menos sincronizada de un grupo de canales. Las chispas pueden ser espontáneas (Klein y cols., 1996) o producidas por despolarización (Klein y cols., 1996). Las espontáneas dependen del Ca^{2+} mioplasmático y son favorecidas por la disminución del Mg^{2+} mioplasmático, ambas propiedades son esperables de la LCIC. Las producidas por voltaje tienen propiedades similares a las espontáneas (amplitud, duración, ancho) pero al ser promediadas en gran número

muestran un aumento inicial de fluorescencia de menor amplitud y bastante abrupto que precede a la chispa y una cola de fluorescencia que la sucede. Estas propiedades faltan en los promedios de chispas espontáneas y han sido interpretadas como la manifestación de la activación voltaje dependiente de probablemente un solo canal RyR que secundariamente activa la chispa por LCIC. Es de destacar que las chispas dependientes del potencial de membrana se estudian a voltajes levemente despolarizados, lo que genera un régimen de baja P_o de los canales activados por voltaje. En estas condiciones constituyen la gran mayoría de la liberación, tanto del pico, que surge de su sincronización, como del nivel estacionario. A voltajes progresivamente más despolarizados las chispas se fusionan y por ende no se pueden estudiar, así que también es imposible afirmar que la liberación consta mayoritariamente de superposición de chispas en este rango de voltaje.

Las chispas están ausentes en el músculo esquelético de mamífero adulto estudiado en condiciones fisiológicas, es decir con la membrana tubular bien polarizada y con soluciones intracelulares normales (Shirokova y cols., 1998). Estos músculos no expresan RyR3 (a excepción del diafragma). Cuando se promueve la expresión de esa isoforma las chispas aparecen. Así que el consenso emergente es que las chispas de anfibio se deben a la isoforma β , análoga de RyR3.

Como se mencionó, la isoforma β es extra juntura y no interactúa con el sensor de voltaje por lo que se presume activado por Ca^{2+} . La conclusión es consistente con la propuesta por Shirokova y colaboradores de que el anfibio tiene un aporte significativo de LCIC mientras que el mamífero no (Shirokova y cols., 1996).

A pesar de la evidencia reseñada previamente dos estudios más recientes cuestionan el rol funcional de RyR β .

La expresión de RyR α y RyR β en la línea celular de miotubos 1B5 deficiente de RyR, permitió estudiar la interacción entre ambos en respuesta a despolarizaciones por K^+ y a la aplicación de cafeína y 4 Cl m cresol (Kashiyama y cols., 2010). Al expresar solo la isoforma α se la activa por despolarización aplicando alto K^+ extracelular, también por 4 Cl m cresol, un agonista farmacológico y mucho menos por cafeína. RyR β solo es activado por cafeína y no por despolarización, además es bloqueado por procaína. La coexpresión muestra la activación por despolarización o por cafeína tienen la misma amplitud y la aplicación de procaína a la despolarización no la disminuye. Por esto los autores concluyen que a pesar de coexpresar más o menos con la misma intensidad ambas isoformas, la isoforma β no es activada por el Ca^{2+} liberado a través de la α . Para que ello ocurra ambas isoformas deben de estar correctamente posicionadas, y en ese sentido la evidencia estructural provista por los autores es débil, la inmunofluorescencia en el microscopio confocal muestra poca colocalización.

Otra línea argumental contra el rol del RyR β es el estudio comparativo entre larvas de pez cebra (*Danio rerio*) silenciadas en la expresión de RyR β y larvas salvajes (Perni y cols., 2015). En estas últimas la expresión de la isoforma β es similar al anfibio. Si bien las larvas silenciadas no muestran chispas ni tampoco grupos a nivel de la para juntura, las pruebas de movilidad del animal entero, son normales. Aunque no se pueden descartar mecanismos compensatorios, los resultados cuestionan un rol fundamental de β en la contracción fisiológica.

Dada la evidencia experimental generada por otros autores y presentada en esta introducción concluimos que es necesario re evaluar alguno de los mecanismos antes propuestos.

Medida de Ca^{2+} en el RS

Desde el estudio pionero de Allen y Kabbara (Kabbara y Allen, 2001) la medida del Ca^{2+} en el RS se ha vuelto otra aproximación al estudio del AEC. Este abordaje complementa la medida citoplasmática y ha enfatizado dos aspectos: la regulación de la permeabilidad de calcio a través de la membrana del retículo sarcoplásmico por Ca^{2+} en el lumen de este reservorio, presumiblemente vía CSQ y la amortiguación de Ca^{2+} en el RS por CSQ.

Los grupos de Pape y Ríos han abordado esta problemática con diferentes énfasis. El grupo de Pape (Fènelon y cols., 2012) utilizó el indicador tetrametil murexide (TMX) al cual es permeable el RS, para medir señales intraretículo en fibras de músculo esquelético de anfibio y bajo control de voltaje en la modalidad doble trampa de vaselina. Este indicador también permanece en el citoplasma por lo que para suprimir la señal citoplasmática contaminante trabajaron con alta amortiguación citoplasmática con 20 mM de EGTA. Esta condición de alto EGTA citoplasmático también les permitió medir simultáneamente el transitorio citoplasmático con rojo de fenol, un indicador que capta los protones liberados por el EGTA cuando este une Ca^{2+} , con una estequiometría de 2 protones por Ca^{2+} unido (Harrison y Bears 1989; Ríos y Pizarro, 2004). Dada la alta afinidad del EGTA por Ca^{2+} ($k_d = 0.37 \mu M$) en comparación con el TMX ($k_d = 2$ mM) la unión del Ca^{2+} al TMX es despreciable, por lo que la señal reportada por el mismo será predominantemente intraretículo. Comparando el cambio en $[Ca^{2+}]$ total en el RS (obtenida de la amplitud de la señal de protones, equivalente a la integral del flujo de liberación) y el correspondiente cambio en $[Ca^{2+}]$ libre en el RS obtuvieron la curva de saturación de CSQ in situ. Esta se ajusta bien con un ecuación de Hill con CSQ total = 35 mM, su $k_d = 0.6$ mM y número de Hill de 3. Con estos valores estos autores re analizaron sus resultados previos en los que solo medían señales citoplasmáticas con

Rojo de Fenol- EGTA. A partir de el cambio en Ca^{2+} total calcularon el Ca^{2+} libre en el RS y corrigieron sus flujos de liberación calculados por el cambio en la fuerza impulsora (el Ca^{2+} libre), obteniendo una cantidad proporcional a la permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS. Es sorprendente que estos autores no hicieran este análisis con sus datos de medidas simultáneas. En estas condiciones y en respuesta a una despolarización prolongada a voltajes intermedios (-45 y -20 mV) encontraron que asociado a la caída de Ca^{2+} en el RS había una disminución en la permeabilidad, sobre todo en sus valores posteriores al pico, que atribuyeron a disminución de la LCIC. En suma, para ellos la CSQ cumpliría solo una función de amortiguación sin afectar a los canales de liberación. No es claro para nosotros porque descartan la regulación luminal.

El grupo de Ríos por su parte, estudió esta problemática en mamíferos (Sztretye y cols., 2011b). Para ello utilizaron fibras de músculo esquelético de ratón que expresaban un biosensor basado en CSQ para realizar las medidas intraretículo y el indicador X Rhod1 para realizar la medida citoplasmática (Sztretye y cols., 2011a), utilizando la modalidad whole cell patch-clamp. Al comparar el músculo de un ratón salvaje (que expresa CSQ) con un ratón KO de CSQ concluyeron que existe una disminución de la permeabilidad activada por voltaje mediada por CSQ como consecuencia de la disminución de la concentración de Ca^{2+} intraretículo, efecto que sería groseramente consistente con el reportado por Beard en vesículas RS expresadas en bicapas ya discutido antes (Beard y cols., 2004). Es interesante que estos autores hicieron los experimentos en dos condiciones de amortiguación de Ca^{2+} citoplasmática, con 10 mM EGTA o 10 mM BAPTA. El ratón salvaje muestra una permeabilidad pico aproximadamente doble en BAPTA que en EGTA. Esto se debería según los autores a la supresión por BAPTA de la inactivación por Ca^{2+} de los RyR. La permeabilidad decae después del pico mucho más rápidamente en BAPTA que en EGTA, según los autores porque la depleción del

RS también es más rápida. En presencia de EGTA, en los ratones KO la permeabilidad permanece estacionaria luego de activada.

Todo esto es consistente con la interpretación de que la terminación de la liberación se debe a que los RyR se cierran cuando la $[Ca^{2+}]_{RS}$ disminuye, un efecto que es mediado por CSQ. En los ratones KO en presencia de BAPTA, sin embargo, la permeabilidad parece decaer luego de activada y eventualmente recuperarse algo. Esto basado en el único registro, bastante ruidoso, que los autores muestran. En la discusión los autores comparan sus resultados de mamíferos con estudios previos del mismo grupo en anfibios, y concluyen que en estos últimos no hay regulación luminal, coincidiendo con Pape y colaboradores.

Los efectos opuestos encontrados por ambos grupos en la regulación por CSQ podrían reflejar diferencias entre las especies, aunque realmente nos parece que merecen una segunda mirada.

Fundamentación e hipótesis

Por lo expuesto es claro que el estudio de la aplicación de amortiguadores extrínsecos en el citoplasma con el indicador de calcio en el mismo compartimiento conlleva una serie de problemas metodológicos que relativizan las conclusiones acerca del rol de la LCIC en el músculo esquelético de anfibio.

Nosotros nos proponemos en este trabajo de tesis evaluar la hipótesis de la existencia, en células musculares esqueléticas de anfibio, de un componente importante de LCIC en el flujo de liberación. Este componente es además secundario a la activación voltaje dependiente de acuerdo a lo planteado por Ríos y Pizarro (Ríos y Pizarro, 1988). Dicho estudio será a partir de señales simultáneas de Ca^{2+} provenientes del citoplasma y del RS.

Se estudiarán también los cambios en la permeabilidad a Ca^{2+} del RS a partir del flujo calculado de las medidas de Ca^{2+} intraretículo, obtenidas con un indicador de Ca^{2+} de baja afinidad como el Mag fluo4 AM, en la condición de alta amortiguación con EGTA y BAPTA.

Se explorará la posibilidad de que además de la dependencia del flujo con la concentración de Ca^{2+} dentro del RS exista modulación por CSQ como se mencionó antes.

Objetivo general

Estudiar la dependencia entre el proceso de liberación de calcio y la $[Ca^{2+}]_{RS}$. Para ello se obtendrá una medida de la liberación de calcio del RS, a partir de la determinación de transitorios de calcio intraretículo y mioplasmático, obtenidos de forma simultánea.

Esta dependencia no solo se basa en que la $[Ca^{2+}]_{RS}$ determina la fuerza impulsora del flujo sino que también podría haber modulación directa de la permeabilidad a través de CSQ. Un estudio en anfibio encontró una disminución del flujo y de la permeabilidad durante una despolarización prolongada que fue interpretada como una disminución del mecanismo de LCIC por caída del flujo al caer la $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Fènelon y cols., 2012). Por otro lado en mamíferos la relación entre $[Ca^{2+}]_{RS}$ y el proceso de liberación parecería ser modulada por CSQ (Sztretye y cols., 2011b).

Objetivos específicos

- 1) Variando la $[Ca^{2+}]_{RS}$ con pulsos prolongados aplicados sucesivamente se estudiará la modulación de la permeabilidad por los distintos niveles de $[Ca^{2+}]_{RS}$ obtenidos. El cociente entre flujo de liberación y la concentración de calcio en el RS permitirá obtener la permeabilidad a calcio de la membrana del mismo, proporcional a la probabilidad de apertura de los canales de liberación.
- 2) Calcular el flujo de liberación a partir de la señal de RS de manera que sea consistente con el calculado a partir de la medida simultánea citoplasmática. Esto implica caracterizar el poder amortiguador de Ca^{2+} intra RS (es decir $d[Ca^{2+}]_{tot RS}/dt$).
- 3) Utilizar la medida de calcio intraretículo para estudiar el efecto de los amortiguadores de calcio EGTA y BAPTA aplicados a alta concentración en el mioplasma sobre la activación de los canales de liberación.

Material y Métodos

Los experimentos fueron realizados en fibras de músculo semitendinoso de ranas adultas de la especie catesbeiana, los cuales fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina. El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) siguiendo las normas nacionales de manipulación de animales. Luego de la disección, parte del músculo se incubó en una solución de Ringer con Mag Fluo 4 en su forma AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante unos 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lo dejó desesterificar en solución de Ringer sin indicador por 120 minutos a temperatura ambiente. De esta forma se favorece la salida del indicador citoplasmático permaneciendo solo la forma cargada en el RS. En ese momento, de este músculo se disecaron fibras individuales para ser montadas en una cámara de Lucita donde se realizaron los experimentos de control de voltaje en la modalidad doble trampa de vaselina (Kovacs y cols., 1983) combinados con las medidas ópticas. Las fibras que fueron cargadas con el indicador Fluo5 N (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fueron incubadas también en Ringer pero a una temperatura de 30°C durante una hora. Para prevenir la contracción de la fibra durante la realización del experimento se agregó en la solución extracelular n-Benzil-p-Toluenesulfonamida (BTS). Luego de montada la fibra en la cámara y antes de realizar los sellos de vaselina se realizaron cortes en los extremos de la fibra para equilibrar el interior celular con la solución intracelular y además permitir la entrada difusiva del pigmento Rhod2 en su forma sal tripotasio (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) para realizar la medida citoplasmática del transitorio de calcio y de los buffers agregados a alta concentración.

Soluciones

*Para mantener el músculo en condiciones fisiológicas y para realizar la carga con los indicadores en la forma AM Mag fluo4 o Fluo5N se utilizó una solución de Ringer (115 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 1mM de Trisma-maleato y 1,8 mM de CaCl₂). Para la disección de las fibras y para montarlas en la cámara de trabajo se utilizó solución de Relajación (120 mM de glutamato de potasio, 2 mM de MgCl₂, 5mM de Trisma-maleato y 0,1 mM de EGTA). Durante la realización del experimento la solución extracelular de referencia contiene 132,5 mM de hidróxido de tetraetilamonio, 132,5 mM de ácido metansulfónico, 5 mM Trisma-maleato, 1 mM de 3,4 diaminopiridina, 1mM de 9-antraceno, 8 mM de Co₂SO₄. La solución interna de referencia contiene 120 mM glutamato de cesio, 20 mM trismaleato-Cs, 5 mM EGTA, 5 mM ATP-Mg²⁺. Se agregó a partir de un stock de CaCl₂ la cantidad suficiente de Ca²⁺ para llevar la [Ca²⁺] libre a 50 nM asumiendo un kd aparente de 0.47 μM para el EGTA. A la solución interna se le agregó durante el experimento la concentración final de BAPTA (20 mM) o EGTA (40 mM) requerida, así como el indicador Rhod2 (0.4 mM) para las medidas del transitorio citoplasmático. Todas las soluciones fueron tituladas a pH 7.

Los indicadores en su forma AM fueron preparados a partir del agregado de 5 μl de un stock de ácido plurónico en dimetil sulfoxido (DMSO) al 20 % y 1 ml de solución de Ringer a 50 μg de indicador, siendo la concentración final del mismo 0.06 mM para Mag Fluo4 AM y 0.04 mM para Fluo 5 N AM.

La cafeína se utilizó a una concentración de 10 mM, combinada con el ácido ciclopiazónico a una concentración de 30 μM. Cuando se utilizó el 4 Cl m-cresol se aplicó el mismo a una concentración de 0.1 mM a partir de un stock de 1 mM preparado en solución externa. El ácido ciclopiazónico se utilizó a partir de un stock en DMSO a 30 mM.

BTS se utilizó a una concentración de 100 μM agregada a la solución extracelular a partir de un stock de 1 mM en DMSO al comienzo del experimento.

Medidas ópticas

Un esquema de nuestro dispositivo experimental se muestra en la figura 9.

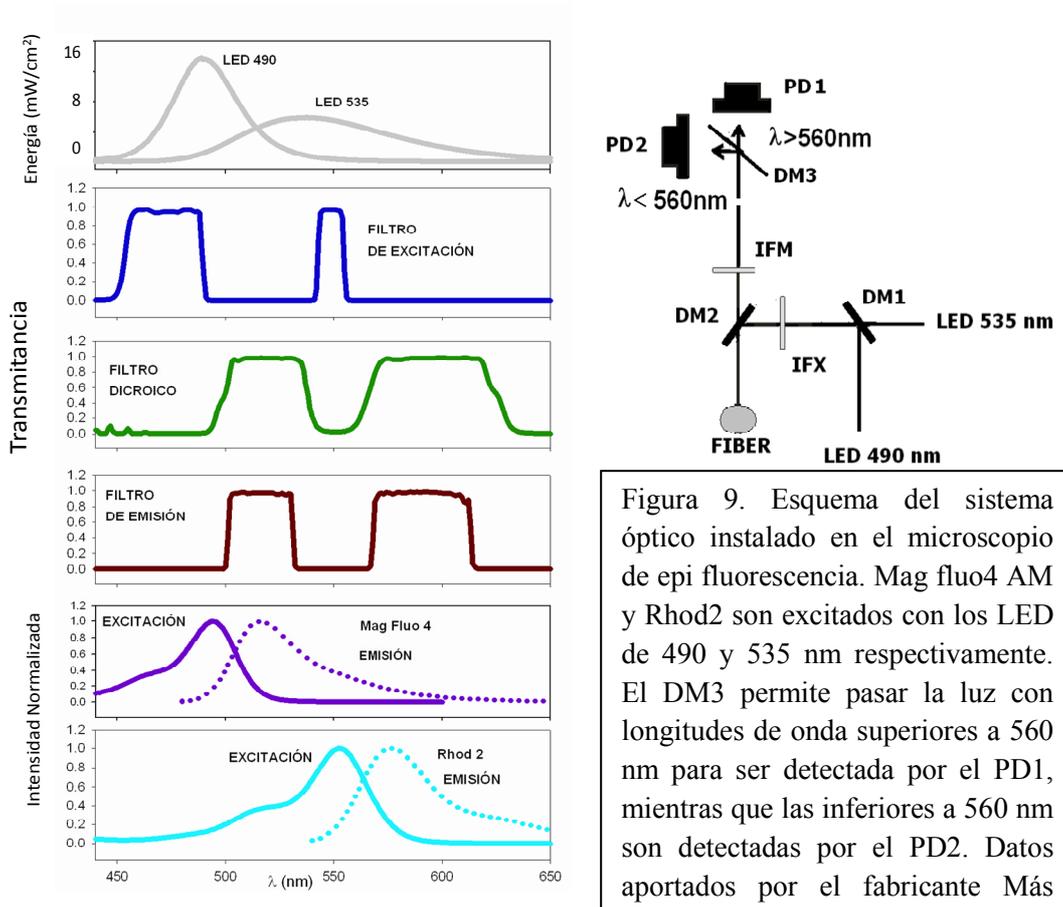


Figura 9. Esquema del sistema óptico instalado en el microscopio de epi fluorescencia. Mag fluo4 AM y Rhod2 son excitados con los LED de 490 y 535 nm respectivamente. El DM3 permite pasar la luz con longitudes de onda superiores a 560 nm para ser detectada por el PD1, mientras que las inferiores a 560 nm son detectadas por el PD2. Datos aportados por el fabricante Más

En el mismo se puede excitar con epi-iluminación a dos longitudes de onda con LED de 490 para excitar al indicador Mag fluo4 y de 535 nm para excitar al indicador Rhod2, ya sea de forma secuencial o simultánea. La luz de la fuente de 490 nm pasa por un espejo dicroico (DM1) que refleja la luz proveniente de la fuente de 535 nm hacia el sistema de epi-iluminación (Cool Led, UK). La luz pasó a través de un filtro de interferencia de doble banda (IFX, 480 y 550 nm) colocado entre las fuentes de luz y un espejo dicroico de doble banda (DM2). La luz emitida que atravesó DM2 y se filtró a 530 nm y 590 nm por un segundo filtro de interferencia de doble banda, IFM (Chroma Technology, USA). El dicroico (DM3) ubicado entre el filtro de emisión de doble

banda y los foto detectores (PD) (HUV-2000, EG&G, Quebec, Canadá) permite pasar hacia el FD superior la emisión mayor a 560 nm y refleja hacia el FD lateral la emisión menor de 560 nm. Las señales fueron registradas por dos fotodiodos de alta sensibilidad (PD1 y 2).

Las características espectrales de las fuentes de luz LED (panel superior), de los distintos componentes ópticos (tres paneles intermedios) y de los espectros de excitación y emisión de los dos pigmentos utilizados (dos paneles inferiores), todos provistos por los fabricantes, pueden observarse en el panel de la izquierda. Como puede verse en la Figura 8, por encima de 560 nm hay emisión de Mag Fluo4 AM y por debajo también hay emisión de Rhod2, y las mismas pueden ser detectadas por los PD1 y 2 respectivamente. Claramente el “cross-talk” es más importante para la emisión de Mag Fluo4 por encima de 560 nm, en el caso de Rhod2 por debajo de 560 nm es casi despreciable. Además la intensidad de las fuentes es distinta. Se trabajó en el 10 % del máximo en ambas, lo que evita el “ripple” y también el foto blanqueo de los pigmentos. La intensidad de la fuente de 490 nm es más del doble de la de 535 nm. Esto además es agravado porque el ancho de la banda pasante del filtro de excitación centrada en 490 nm es el triple que la centrada en 535 nm. Si bien se podría haber trabajado a menor intensidad a 490 nm (a costa de reducir la señal de emisión en todo su rango) preferimos confiar en nuestro proceso de substracción. Este aspecto se retomará más adelante en un capítulo dedicado a la separación de las señales. El indicador Rhod2, al ser un indicador no ratiométrico, requiere la medida de su concentración durante el transcurso del experimento para poder calibrar la señal de Ca^{2+} reportada por dicho indicador. Para ello se realizan medidas seriadas de absorbancia a 540 nm (denominada espectro de reposo) utilizando un coeficiente de extinción de $\epsilon_{540} = 5.92 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Las constantes de Rhod2 son $k_{\text{off}} = 110 \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{on}} = 90 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, como se describe en Olivera y Pizarro 2016.

En algunas células se utilizó el indicador citoplasmático de baja afinidad Rhod ff (Teflabs, CA USA), utilizando el Kd (19 μM) del fabricante para el cálculo de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} .

Calibración de la señal de Mag fluo4 AM

Para calibrar la señal de Mag fluo4 son necesarios tres parámetros: la fluorescencia mínima (F_{\min} , indicador libre de Ca^{2+}), el cociente o razón (r) entre esta y la fluorescencia máxima (F_{\max} , indicador saturado por Ca^{2+}) y la constante de disociación del indicador para Ca^{2+} . La F_{\min} va a depender de la cantidad de indicador es decir de su concentración así como del volumen en el que esta está distribuida dentro del campo óptico. Por lo tanto debe ser medida en cada célula. Para ello se aplica alta concentración de EGTA (o BAPTA) al citoplasma, una vez que nos encontramos en la situación de alta amortiguación de Ca^{2+} intracelular se expone la fibra a agonistas del canal de liberación (cafeína o 4 Cl m-cresol), sólo o combinado con un inhibidor de la recaptación de Ca^{2+} del RS, como el ácido ciclopiazónico (CPA) de forma tal de

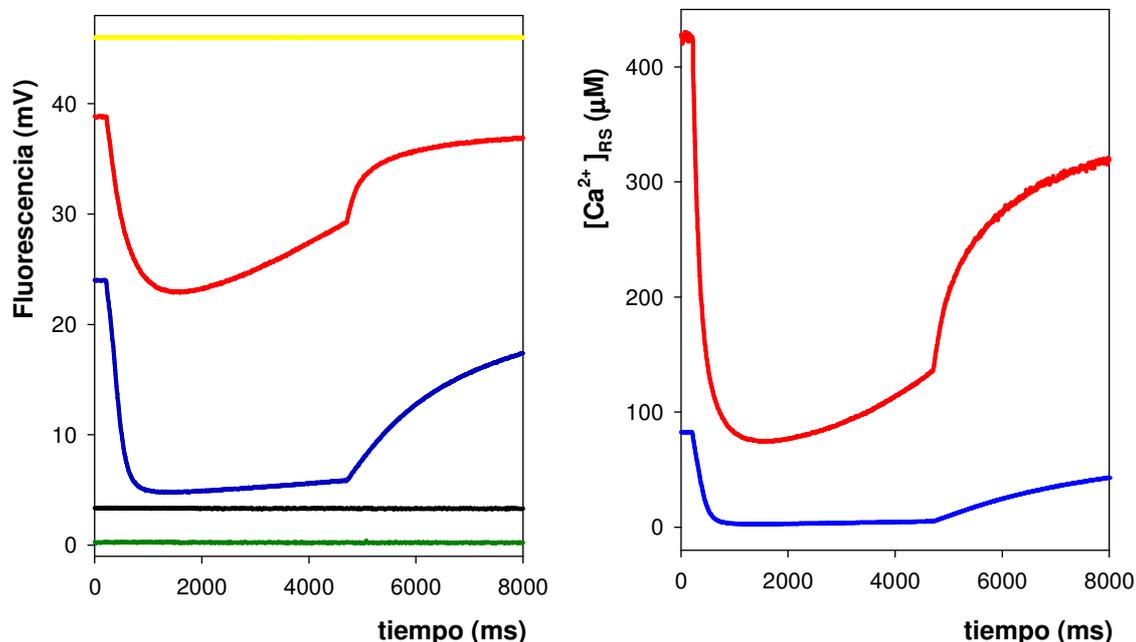


Figura 10. Calibración de la señal de Mag fluo4 AM. Panel izquierdo fluorescencia medida en mV a la salida del fotodiodo. En el panel derecho la señal calibrada según se explica en el texto. En los registros en rojo 1 mM de EGTA en la solución intracelular y en azul 40 mM de EGTA. En verde fluorescencia de background, en negro fluorescencia remanente en el RS luego de la depleción con cafeína (F_{\min}) y en amarillo la fluorescencia máxima (F_{\max}).

movilizar la totalidad de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma. De esta forma el Ca^{2+} liberado al permanecer unido a EGTA o a BAPTA permite medir la fluorescencia remanente proveniente del RS, la cual correspondería al pigmento unido a Mg^{2+} . Esta fluorescencia remanente constituye el parámetro F_{\min} para el indicador en esa célula (representado en negro en la figura). El registro en verde corresponde a la fluorescencia de background. A los valores de fluorescencia medidos se les sustrae esta fluorescencia de background.

A partir del cociente (r) entre F_{\max} y F_{\min} medido en nuestro sistema de registro en un capilar de 112 μm de diámetro a la misma sensibilidad instrumental a la que se hacen los experimentos y utilizando un K_d para el Mag Fluo4 de 90 μM se pueden calibrar las señales como $[\text{Ca}^{2+}]$ libre con la ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min}) \quad (\text{Ec. 2})$$

con, $F_{\max} = r \times F_{\min}$ (Ec. 3)

En el panel izquierdo de la figura 10 tenemos representado las señales de Mag fluo4 AM sin calibrar. En rojo tenemos la señal en respuesta a un pulso a 0 mV con una concentración citoplasmática de 1 mM EGTA, mientras que en azul la señal al mismo voltaje pero aproximadamente 45 minutos después del agregado de 40 mM EGTA. Es de destacar que luego de varios minutos en esta condición de alta amortiguación se observa una importante caída en la fluorescencia de reposo que se corresponde con una caída en el calcio de reposo dentro del RS. En el panel de la derecha de la figura podemos ver las señales calibradas con dicha ecuación para la condición de baja y alta amortiguación (rojo y azul respectivamente). Cabe mencionar que el valor de K_d de Mag Fluo4 de 90 μM fue obtenido por nosotros con la forma de sal tetra potasio en nuestro sistema experimental y con soluciones intracelular con 5 mM de Mg^{2+} ATP

(aproximadamente 0.6 mM de Mg^{2+} libre), es mayor al reportado por el fabricante (22 μM , Invitrogen), pero similar al reportado por Hollingworth y colaboradores (70 μM) (Hollingworth y cols., 2009).

Separación de las señales de Mag fluo4 y Rhod2

Como vimos en la Figura 9, por encima de 560 nm hay emisión de Mag Fluo4 AM y por debajo hay emisión de Rhod2. Por tanto al trabajar con los dos indicadores las señales colectadas por los PD van a presentar cierto grado de superposición y es necesario realizar la corrección de la correspondiente señal contaminante. Al trabajar con un solo indicador a la vez, encontramos que la fluorescencia de Mag fluo4 AM por encima de 560 nm fue del 75 % de la medida por debajo de 560 nm, mientras que si trabajamos con Rhod2, la fluorescencia por debajo de 560 nm fue del 1% de la señal registrada por encima de la misma.

La señal obtenida por encima de 560 nm, la cual denominaremos S1 va a ser igual a la señal de Rhod2 (R) más la señal de Mag fluo4 (F) que se mezcla y corresponde como dijimos al 75 % de la fluorescencia de Mag fluo4. La señal obtenida por debajo de 560 nm y que llamaremos S2 va a ser igual a la fluorescencia de Mag fluo4 medida más la señal de Rhod2 que se mezcla y corresponde como dijimos al 1 %.

$$S1 = (0.75 \times F) + R \quad (\text{Ec. 4})$$

$$S2 = F + (0.01 \times R) \quad (\text{Ec. 5})$$

A partir de estas dos ecuaciones con R y F como incógnitas se pueden despejar R y F y obtener el valor de R y F para corregir las señales.

$$R = S1 - (0.75 \times F) \quad (\text{Ec. 6})$$

$$F = S2 - (0.01 \times R) \quad (\text{Ec. 7})$$

$$R = (S1 - (0.75 \times S2)) / (1 - (0.75 \times 0.01)) \quad (\text{Ec. 8})$$

$$F = \frac{S2 - (0.01 \times S1)}{1 - (0.75 \times 0.01)} \quad (\text{Ec. 9})$$

En la figura 11 tenemos un ejemplo de esta corrección. En A y C se muestran las señales sin la corrección, siendo A la señal por debajo de 560 nm y C por encima de 560 nm, registradas a una baja concentración del indicador Rhod2 y en presencia de 5 mM de EGTA. B corresponde a la señal mostrada en A luego de la corrección y D se corresponde a la señal C luego de la corrección. La señal en A se corresponde básicamente a la señal de Mag fluo4 cuando comparamos con B. En cambio en C vemos claramente los dos componentes citoplasmático e intraretículo, desapareciendo este último luego de la corrección.

A medida que transcurre el experimento ocurren dos hechos, por un lado la concentración del indicador Rhod2 aumenta (de 55 μM a 439 μM), y por otro, en los experimentos en los que se aplica alto buffer citoplasmático disminuye el Ca^{2+} libre en el RS, lo que se discutirá detalladamente más adelante. Esto quedaría de manifiesto por una disminución en la fluorescencia de Mag fluo4 proveniente del RS, como se puede apreciar en los registros E y F. En el registro E obtenido por debajo de 560 nm con una alta concentración de Rhod2 se puede observar una deflexión positiva antes de la señal de RS, la cual desaparece en la substracción mostrada F, luego de escalar la sustracción de la señal en G. El registro obtenido en G en presencia de alta concentración de Rhod2 se muestra corregido en H.

Como explicamos anteriormente, el factor de escala fue determinado en un conjunto de experimentos independientes y con un indicador a la vez. Como en los experimentos con los dos indicadores comenzamos con el indicador Mag fluo4 cargado en la célula,

medimos en cada una la relación entre las señales para compensar los errores que pudieran surgir por el desalineado de los foto detectores.

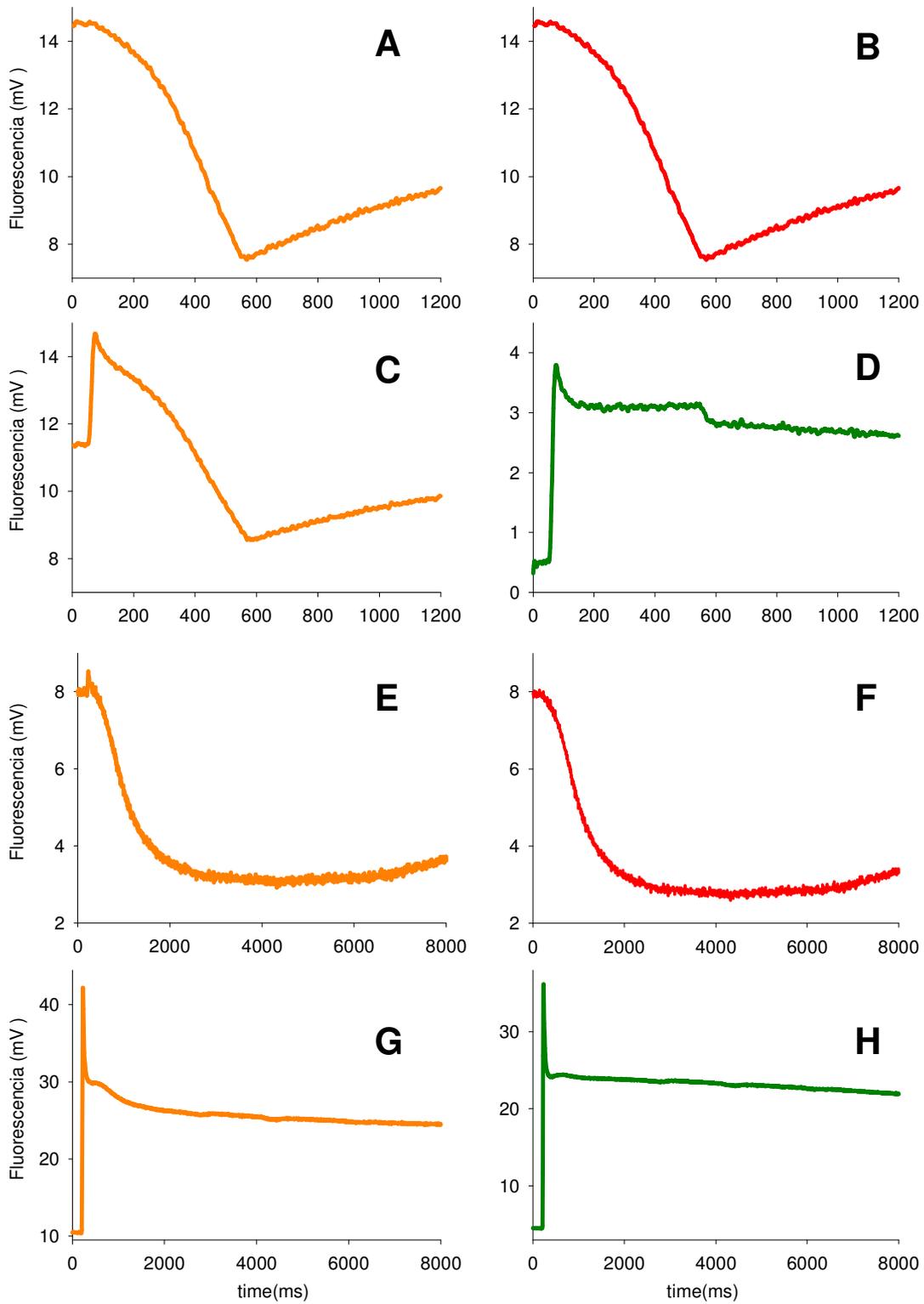


Figura 11. Substracción de las señales de Mag fluo4 AM y Rhod2. Ver texto.

Cálculo del flujo de liberación a partir de la señal citoplasmática

A partir del transitorio de calcio citoplasmático calculamos el flujo de liberación con el método de Melzer (Melzer y cols., 1987). Asumiendo que en el citoplasma el cambio del calcio libre en el tiempo es igual al flujo de liberación desde el RS menos el flujo de remoción, el flujo puede calcularse como la suma de la derivada de la señal de calcio libre y el flujo de remoción. Este último se obtiene ajustando la caída del transitorio de calcio luego de finalizado el pulso, para un conjunto de registros de distinta amplitud y duración. Este método incluye los amortiguadores fisiológicos de calcio en el citoplasma (troponina y parvalvúmina) más los agregados (ej EGTA, indicadores).

Medidas de corriente intramembrana

La medida de la corriente asimétrica se obtiene como la diferencia entre la corriente obtenida durante un pulso test y la corriente capacitiva lineal promediada y escalada, obtenida en pulsos controles (De Armas y cols., 1998). Al transitorio de corriente obtenido se le sustrae una línea de base en el ON y en el OFF y se calcula la carga movida por el sensor como la integral de dicho transitorio. Los pulsos test se aplicaron desde un voltaje de mantenimiento de -80 mV, mientras que los controles se aplicaron desde -120 mV a -100 mV. Antes de realizar los pulsos de larga duración para obtener las señales intra RS se realiza una medida de la carga, adquirida a una velocidad de 0.2 ms por punto durante un pulso de 100 ms a 0 mV, lo que permite tener una línea de base fiable.

Estadística

El estudio de significación estadística se realizó con mediante test de t bilateral, pareado o no, con $p \leq 0.05$.

Resultados

Señales de Ca^{2+} con alta concentración de Mag fluo4 AM en el citoplasma

Al inicio de este proyecto intentamos vaciar el citoplasma del indicador presente en el mismo esperando que este difundiese hacia los compartimientos laterales. Esta expectativa resulto excesivamente optimista. En la figura 12 se muestra el registro de una célula que luego de disecada fue cargada individualmente con Mag fluo4 AM

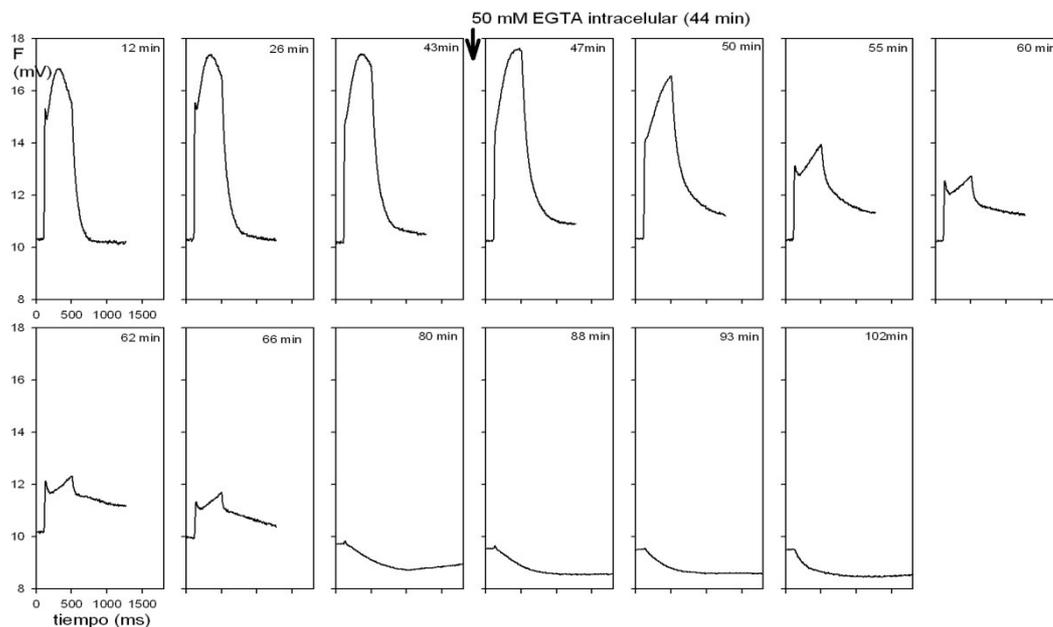


Figura 12. Eliminación de la señal contaminante de Mag fluo4 AM citoplasmática presente en 0.1 mM de EGTA mediante la aplicación de 50 mM de EGTA.

durante 40 minutos, dejando un breve período de tiempo para la desesterificación y la salida del indicador del citoplasma. Al montar la fibra en la cámara experimental y comenzar el experimento en una condición de bajo EGTA (0.1 mM) en el citoplasma nos encontrábamos con señales citoplasmáticas de Mag fluo4 AM al excitar a 490 nm (Ver figura 12). En dicha condición la amplitud de la señal citoplasmática así como la fluorescencia de reposo se mantenían relativamente constantes en el tiempo, de media a una hora, a pesar de realizar pulsos repetidos a 0 mV de 500 ms de duración. A los 44

minutos fueron agregados 50 mM de EGTA a la solución intracelular. A medida que este difunde hacia el compartimiento central, donde se registran las señales ópticas, la amplitud y la cinética de dicha señal comienza a modificarse. Pasados los 80 minutos de experimentación, 36 minutos desde la aplicación de EGTA, apenas queda un pequeño componente citoplasmático y comienza a predominar el componente del RS. Estos experimentos muestran que la difusión desde el citoplasma es mucho más lenta que lo esperada, por ejemplo, al compararla con el tiempo de difusión desde los compartimientos laterales al sitio de registro del mismo indicador en su forma de sal de potasio. Esto sugiere que el indicador está unido a componentes citoplasmáticos que si bien disminuyen su coeficiente de difusión aún permite su reacción con Ca^{2+} . Es de señalar que si la célula es tratada con el detergente saponina en el compartimiento central para destruir la membrana superficial la fluorescencia de la célula disminuye rápidamente a la mitad sugiriendo que la hipotética unión es reversible. Mirando retrospectivamente estos experimentos iniciales, a la luz del protocolo óptimo de carga desarrollado posteriormente, se concluye que la media hora de desesterificación a temperatura ambiente no es suficiente para que el indicador presente en el citoplasma sea transportado hacia el exterior celular a través de la membrana intacta. Esto sugiere un bajo flujo. Más aún, la estabilidad de la señal citoplasmática en la célula montada en la cámara de registro durante períodos de tiempo comparables a los utilizados para vaciar el citoplasma con el procedimiento óptimo sugiere que el transporte tiene un alto Q_{10} , dado que la principal diferencia entre ambas condiciones es que en la cámara la célula se enfría entre 12 y 15 °C, mientras que está mantenida a temperatura ambiente antes de ser montada durante el período sin indicador en el medio extracelular. Este alto Q_{10} sugiere un proceso de transporte mediado. Todo esto es conjetural y no lo hemos estudiado específicamente. Si bien en alta concentración de EGTA, este compete

con el Mag fluo4 por el Ca^{2+} liberado por el RS y la señal citoplasmática se vuelve despreciable, lo que permitiría medir exclusivamente la señal proveniente del RS esta no se puede calibrar porque la presencia de indicador citoplasmático impide medir F_{min} en el RS.

Fotoblanqueo del indicador intra RS por la iluminación intensa

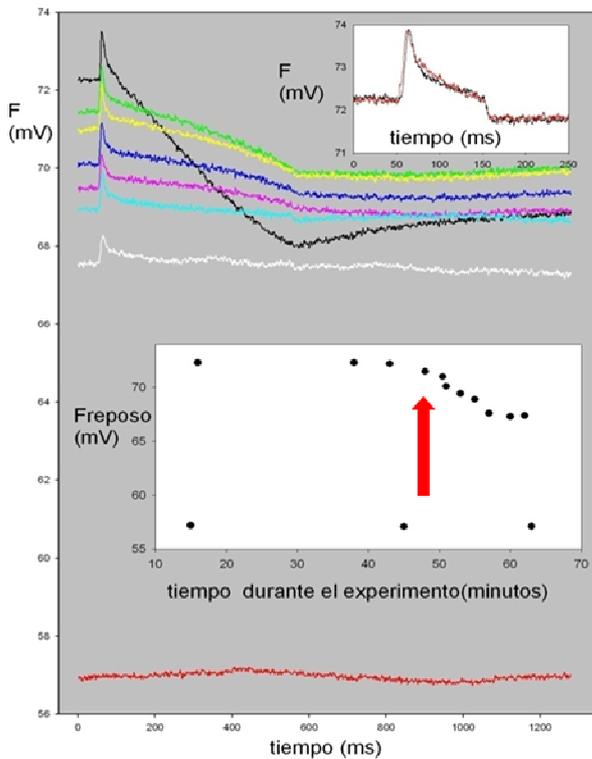


Figura 13. Efecto de la iluminación a alta intensidad en la señal de Mag fluo4 AM durante pulsos de larga duración. Se observa la disminución de la señal de RS y de la fluorescencia de reposo. En rojo abajo se muestra la fluorescencia de background. En el recuadro superior se superponen dos señales obtenidas con pulsos de corta duración separadas por un intervalo de 20 minutos sin iluminar. Se aprecia como las mismas son prácticamente iguales. En el recuadro central se grafica la evolución de la fluorescencia de reposo y de background durante el experimento. La flecha indica el inicio del inicio de la iluminación de alta intensidad.

Accidentalmente, intentando aumentar el tamaño de la señal en células con poca fluorescencia, se observó que la iluminación de alta intensidad progresivamente hacía desaparecer la señal proveniente de RS. En la figura 13 se aprecia la evolución temporal de la señal de Mag fluo4 iluminada al doble de la intensidad usual. Vemos como antes de comenzar a iluminar con alta intensidad se aprecia una señal mioplasmática superpuesta a la de RS (trazo negro). Al comenzar a iluminar a alta intensidad se comienza a perder la señal de retículo, predominando la señal citoplasmática. También se puede apreciar como la fluorescencia de reposo, representada en el recuadro en función del tiempo durante el experimento, cae durante la intensa iluminación. En rojo tenemos la fluorescencia de background. La iluminación intensa produce foto blanqueo (bleaching) del pigmento, el cual es mucho más acentuado en presencia de alto Ca^{2+} , dado que el pigmento emite más. Esto lo estudiamos cargando capilares de 150 micras de diámetro con una solución con Mag

fluor4 sal tetra potasio a una concentración de Ca^{2+} saturante. Cuando iluminamos durante tiempos prolongados a alta intensidad se produce una reducción de más del 90 % de la emisión, mientras que en ausencia de Ca^{2+} el blanqueo es menor al 20 %. Como la señal citoplasmática apenas se ve modificada en su amplitud, es altamente probable que la desaparición de la señal de RS y la disminución en la fluorescencia de reposo se deban al blanqueo del pigmento dentro del RS y no a depleción del contenido de Ca^{2+} del mismo. Más aún, sería imposible que si el vaciamiento del RS fuese tal que la señal desapareciese, la señal citoplasmática persista. Estos experimentos permiten estimar aproximadamente cuanta fluorescencia proviene del citoplasma y cuanta del RS con el protocolo de carga breve, sub óptimo. El RS origina entre el 30 y el 50 % de la fluorescencia total inicial. Esta estimación es consistente con los experimentos de saponización mencionados previamente pero no documentados. Es de destacar que los experimentos de saponización, una vez vaciado el citoplasma, permitirían la medida de F_{min} . En la práctica esto resultó imposible porque la pérdida de fluorescencia observada tuvo dos componentes, uno rápido que dio cuenta del 70 al 50 % de la fluorescencia inicial y otro más lento que pensamos es debido a la pérdida del indicador en el RS debido a la saponización de la membrana del mismo.

Dependencia de la señal de Mag fluo4 AM con el voltaje test

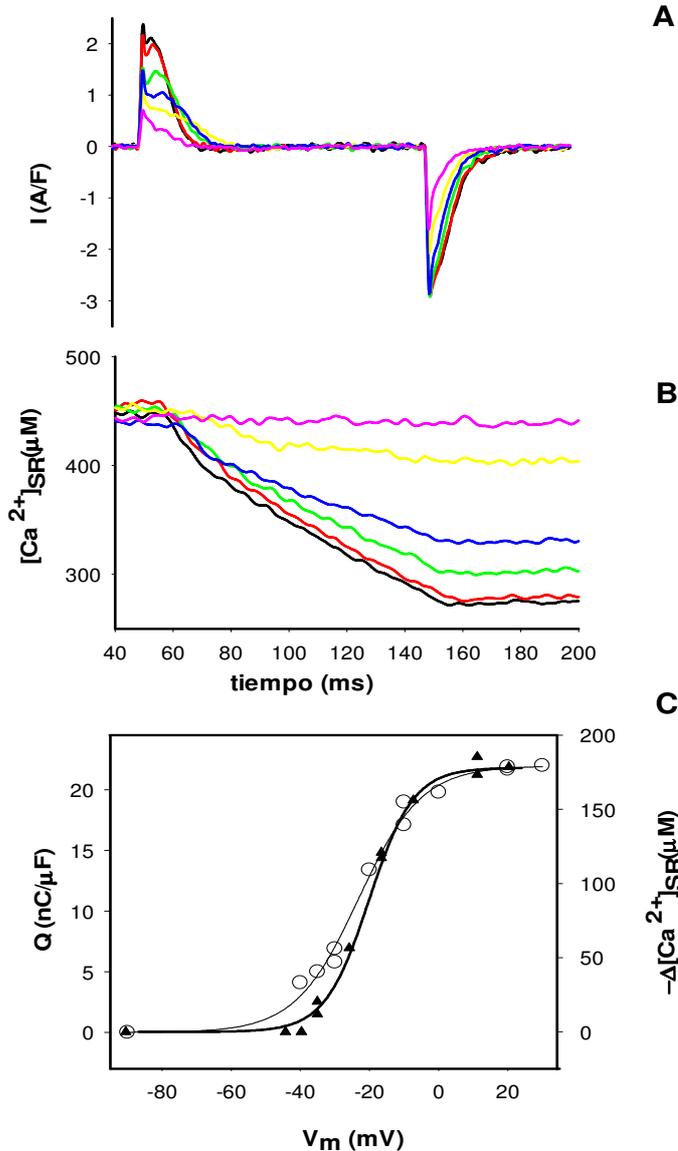


Figura 14. Dependencia de la señal de Mag fluo4 AM con el voltaje test. En A registros de la corriente de membrana en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes. En B las señales de Ca^{2+} intra RS resultantes de dichos pulsos con el mismo código de colores. En C ajustes de una función de Boltzmann de dos estados para la carga, Q (O), y la señal de Ca^{2+} intra RS, $-\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ (\blacktriangle). Parámetros del ajuste: para la carga $Q_{m\acute{a}x} = 21.97$ nC/ μF ; $K = 9.11$ mV; $V_{1/2} = -23$ mV. Para la señal de Ca^{2+} , $\Delta[Ca^{2+}]_{m\acute{a}x} = 177.91$ μM , $K = 6.92$, $V_{1/2} = -13.12$ mV.

Es lícito preguntarse si cuando aplicamos nuestro protocolo óptimo de carga es cierto que solo nos deja indicador en el RS. Ello lo exploramos de dos maneras, una experimental y otra en base a simulaciones con un modelo matemático que se describen en el apéndice. La experimental se presenta en esta sección y consiste en estudiar las propiedades de las señal en condiciones de baja o moderada amortiguación de Ca^{2+} citoplasmático. Si hubiese pigmento en citoplasma debería medirse una señal con ese origen que siempre sería un aumento de fluorescencia. La ausencia de la misma sugiere muy baja concentración de indicador en el citoplasma. Más aún si la señal medida

proviene del RS su amplitud debe tener una dependencia con el voltaje consistente con el movimiento de carga que la dispara. En la figura 14 se pueden apreciar los registros de la corriente de membrana (A) en respuesta a pulsos de voltaje crecientes y las señales de Mag fluo4 AM (B) correspondientes a dichos pulsos con la misma escala de colores, obtenidas en presencia de 5 mM EGTA. En C se grafican la carga (Q), representado con 0, y la señal de RS ($-\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) representada con ▲, en función del voltaje. Tanto a la carga como a la señal de RS se les ajustó una función de Boltzmann de dos estados. Los parámetros se muestran en la figura. La amplitud de la señal reportada por Mag fluo4 AM se hace progresivamente mayor a medida que aumenta el voltaje, siendo dicha dependencia más sensible entre -40 y -10 mV, y por encima de los 0 mV la señal satura, mostrando la conocida dependencia de la liberación de Ca^{2+} con el potencial de membrana, lo que nos indica que las señales registradas se corresponden al proceso de liberación visto desde el RS.

Comparación de las señales de Mag fluo4 AM y Fluo5 N AM.

Como se mencionó previamente el Mag Fluo4 AM es el indicador que cargamos con más éxito. Este indicador también detecta Mg^{2+} por lo que un problema posible sería que la señal registrada tuviese un componente debido a flujos del mismo, por ejemplo, como contra ión del Ca^{2+} . Por ello intentamos tener una medida con otro indicador que no reportase Mg^{2+} . Para ello utilizamos el Fluo 5N AM siguiendo el protocolo de Kabbara y Allen (Kabbara y Allen, 2001) cargando el retículo con ese indicador a $30^{\circ}C$, confirmando que en esas condición se carga el pigmento exclusivamente en el RS de fibras de músculo esquelético de anfibio.

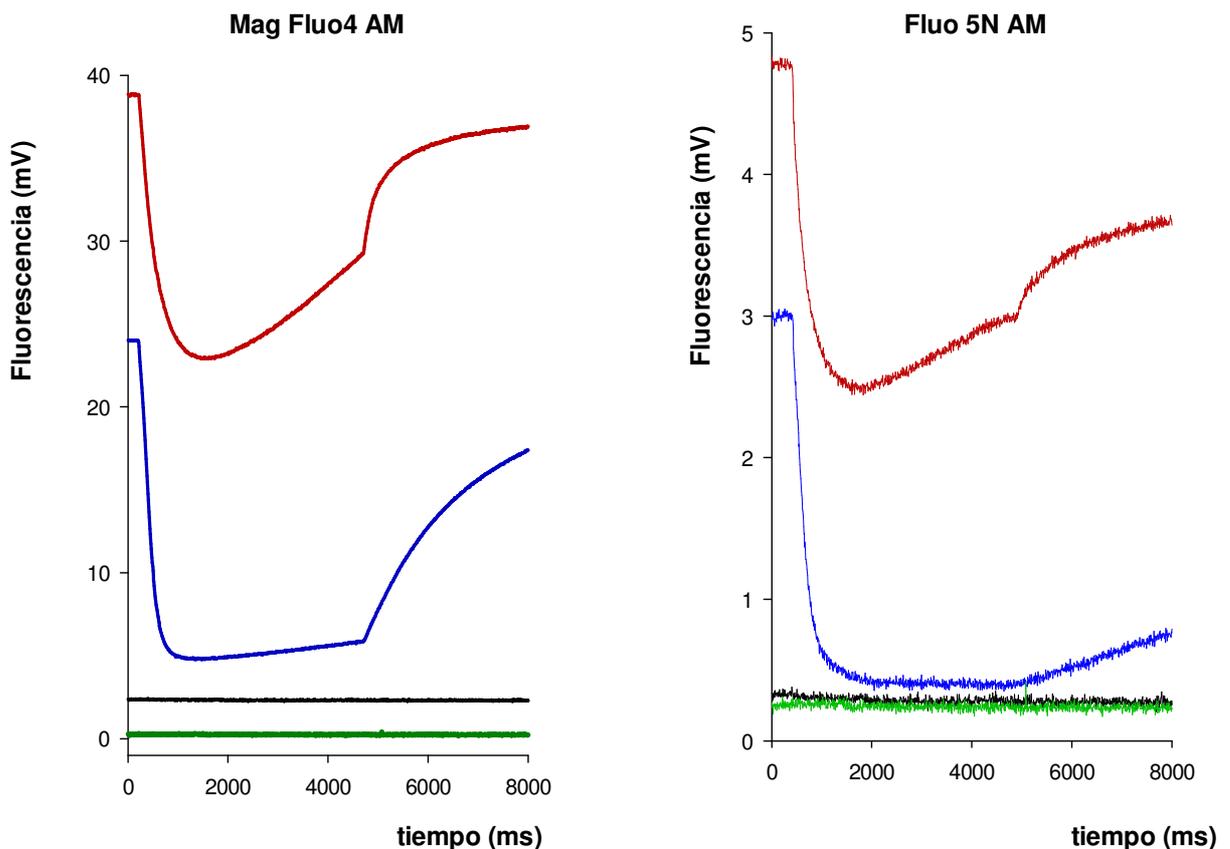


Figura 15. Comparación de las señales de Mag fluo4 AM y Fluo5 N AM. Registros en rojo en presencia de 1 mM de EGTA y en azul en 40 mM de EGTA. Trazo negro Fmin. Trazo verde fluorescencia de background. Puede apreciarse la caída en la $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo en alto EGTA.

En la figura 15 tenemos un ejemplo de dos fibras cargadas con dichos indicadores, Mag fluo4 AM en el panel de la izquierda y Fluo 5N AM en el panel de la derecha. Como se puede ver, en dicha figura tenemos las señales con los dos indicadores en dos condiciones, baja amortiguación (1 mM) y alta amortiguación (40 mM) con EGTA (en la figura en rojo y azul respectivamente). El efecto de la alta amortiguación es evidente con los dos indicadores, con una clara disminución en la fluorescencia de reposo, aumento de la pendiente inicial y disminución en la recaptación. Nosotros tendemos a favorecer la estimación de Mag Fluo4 porque la fluorescencia de cero Ca^{2+} es más fiable debido a la fluorescencia por Mg^{2+} dentro del RS. Esto se puede apreciar cuando comparamos las fluorescencias de background (verde) y las fluorescencias mínimas (negro) para ambos indicadores. En el caso del Fluo 5N estas se encuentran muy próximas lo que complica la calibración. Tanto porque la calibración es más fiable y porque la condición de carga fue más eficiente usamos Mag Fluo4 AM rutinariamente. Las medidas con Fluo5N AM sin embargo son importantes porque muestran que la sensibilidad a Mg^{2+} del MagFluo4 no parece determinar ninguna de las características de la señal reportada por ese indicador, dado que los dos pigmentos producen señales prácticamente idénticas.

Curso temporal del transitorio intraretículo durante una despolarización prolongada

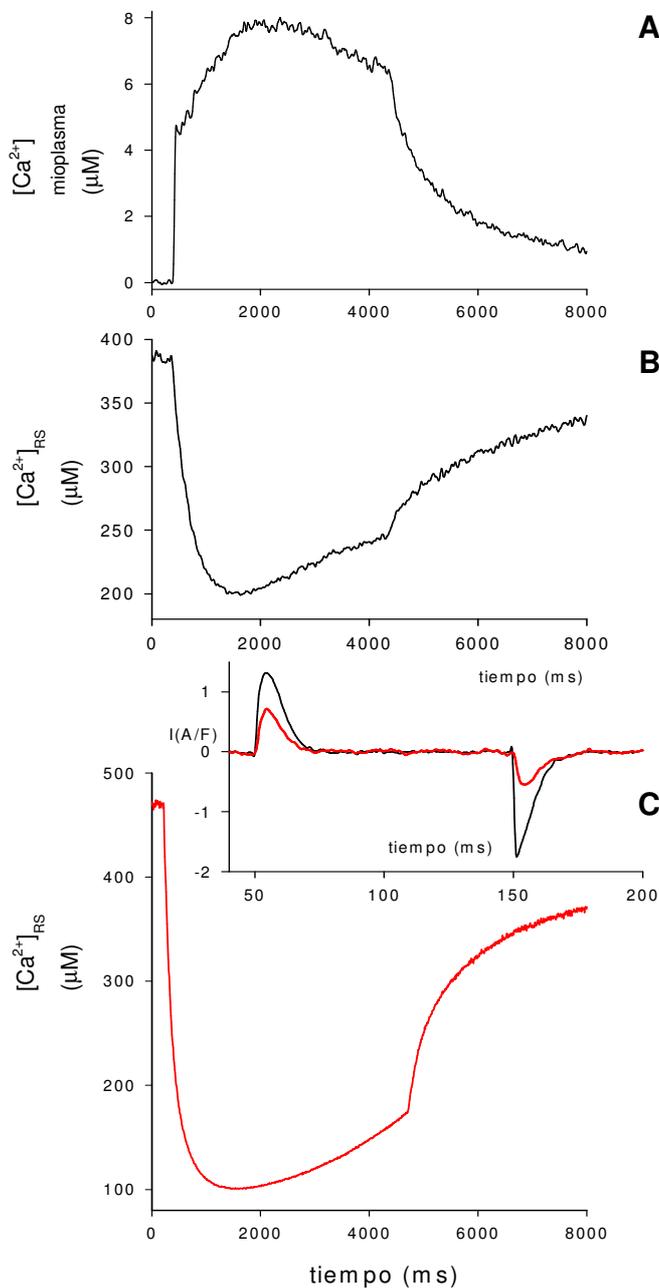


Figura 16. Registros simultáneos de Rhod2 FF (A) y Mag fluo4 AM (B). En C se muestra el registro intra RS de otra célula y en el recuadro la carga durante un pulso de 100 ms de duración a 0 mV antes (negro) y después (rojo) de un pulso condicionante de larga duración como el que produce la señal de RS. Valor de la carga referencia 16.4 nC/ μF (negro) y luego del pulso condicionante 6.1 nC/ μF (rojo). Capacidad lineal 6.1 nF.

Un aspecto importante de nuestro estudio es que con el protocolo óptimo de carga podemos estudiar la liberación de Ca^{2+} vista desde el RS sin necesidad de utilizar alta amortiguación citoplasmática. Esto permite además correlacionarla con la señal citoplasmática medida simultáneamente en esas condiciones. Para ello utilizamos el indicador Rhod FF de menor afinidad que Rhod2 porque este tiende a saturar en pulsos prolongados cuando $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citoplasmático}}$ se eleva de forma importante. En la figura 16 vemos registros simultáneos de la señal de intra RS de Mag fluo4 AM (B) y citoplasmática (A), durante un pulso de 5 segundos de duración a 0 mV. Al igual que la señal intra RS, la señal citoplasmática llega a un máximo y a partir de ahí decae hasta el

final del pulso. Se podría concluir que el balance entre liberación y recaptación estaría favoreciendo este último a expensas de una disminución en la

permeabilidad, aunque reconocemos que el bombeo por la bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA) también aumenta al elevarse el Ca^{2+} citoplasmático. Los mecanismos de disminución de permeabilidad pueden ser varios. Está descrita la inactivación por Ca^{2+} . Este es un fenómeno rápido, que ocurre durante los primeros 20 a 50 ms del pulso, por lo que no puede dar cuenta de la caída de las señales que ocurre más tardíamente. Hay dos mecanismos que merecen estudio. Uno es la regulación de la permeabilidad por el Ca^{2+} luminal, se ha propuesto que al bajar $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ los canales RyR se cierran (Stretye y cols., 2011b). También existe la posibilidad de que como consecuencia de la despolarización prolongada se produzca inactivación del sensor de voltaje, como ya se ha demostrado anteriormente (Brum y cols., 1988b; Ríos y Pizarro, 1991). Para explorar esta posibilidad se realizó un experimento de carga con un pulso condicionante de 4 segundos de duración a 0 mV. En la parte inferior (C) de la figura se observan los registros del movimiento de carga obtenidos en pulsos de 100 ms de duración a 0 mV antes (trazo negro) y luego de un pulso condicionante de larga duración (en rojo). Como se puede apreciar el pulso de larga duración provoca una caída de la carga (6.1 nC/ μF) comparada con la situación control (16.4 nC/ μF), la cual interpretamos como inactivación producto de la despolarización prolongada, y que daría cuenta al menos de una parte importante de la disminución de la permeabilidad durante un pulso de voltaje prolongado. Es por esta razón que para estudiar la regulación por Ca^{2+} luminal debe hacerse con pulsos de duración menor a 1 s para evitar la inactivación del sensor. Además es importante monitorizar la carga periódicamente durante el experimento con pulsos de 100 ms, como se explicó en Material y Métodos.

Medidas de la permeabilidad del RS a partir de la señal citoplasmática a diferentes $[Ca^{2+}]$ en el RS

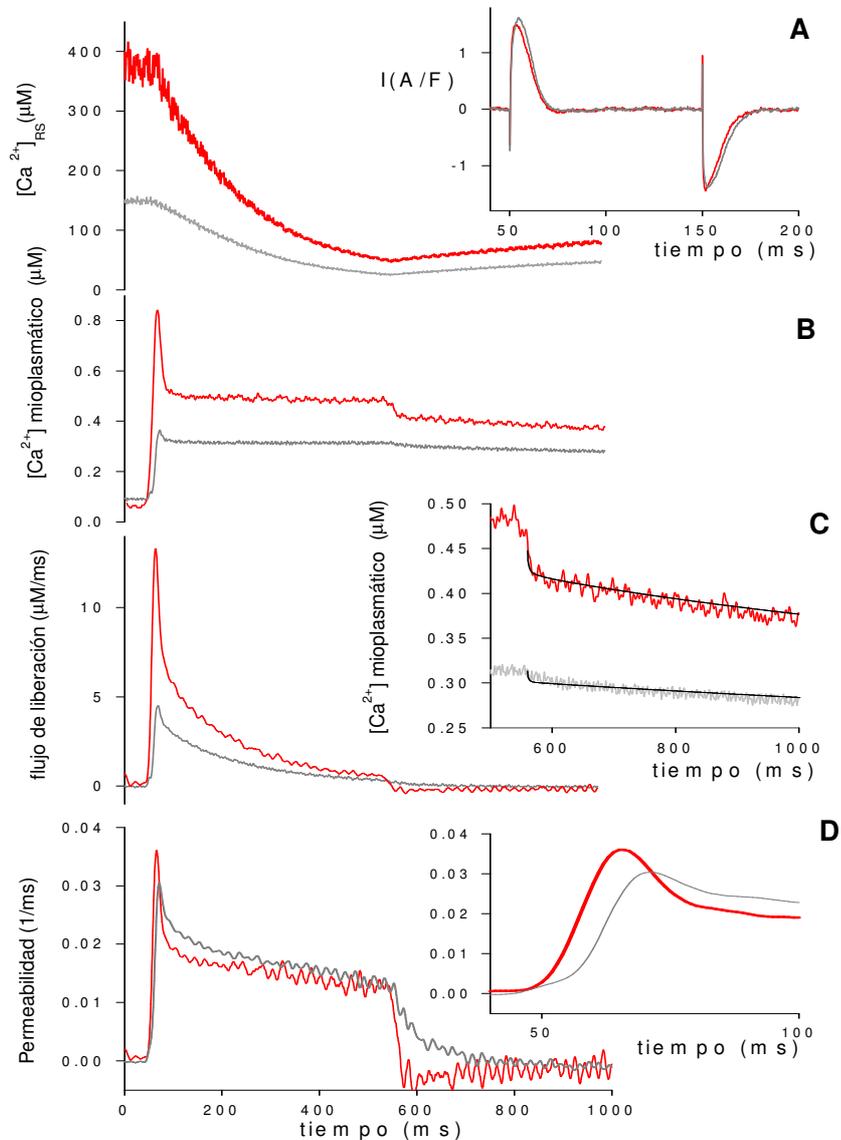


Figura 17. Dependencia de la permeabilidad de Ca^{2+} del RS con la $[Ca^{2+}]_{RS}$. En todos los registros se muestra en rojo la condición de referencia y en gris luego de depletar parcialmente el contenido de Ca^{2+} del RS con un tren de pulsos. Se observa en A los transitorios intra RS, en B los transitorios citoplasmáticos, en C los flujos calculados a partir de la señal citoplasmática y en D la permeabilidad obtenida como el cociente entre el flujo y el $[Ca^{2+}]_{RS}$. El recuadro en A muestra registros controles de la carga en las dos condiciones. Valores de la carga: 18.3 nC/ μ F (rojo) y 17.9 nC/ μ F (gris). Capacidad lineal 5.5 nF (rojo) y 5.7 nF (gris). En el recuadro C se muestra en negro el ajuste a la caída del transitorio citoplasmático luego del pulso con los mejores parámetros del modelo de remoción. En el recuadro D se aprecia expandida la permeabilidad para comparar la cinética en las dos condiciones. [EGTA] = 5 mM, KonEGTA = 3 mM/seg, KoffEGTA = 5/seg, [Parvalbúmina] 1 mM para el trazo rojo y 0.3 mM para el gris. Velocidad de la bomba 1000 mM/seg.

Como se mencionó previamente la aplicación de amortiguadores de Ca^{2+} citoplasmáticos a alta concentración tiene el efecto no buscado de disminuir $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$. Esto determina que debemos caracterizar el eventual efecto de este factor, el $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ sobre la permeabilidad, independientemente de la concentración del quelante agregado. Para ello trabajamos a concentración de EGTA constante, 5 mM, durante todo el experimento. Se midieron simultáneamente las señales citoplasmática y dentro del RS con Rhod2 y Mag Fluo4 como se describió en Métodos. El cálculo del flujo de liberación a partir de las señales citoplasmáticas se hizo con la misma concentración de EGTA y con los mismos parámetros cinéticos. Como este es cuantitativamente el principal amortiguador la estimación de los flujos está afectada de la misma manera y estos son directamente comparables. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ se modificó por la actividad mantenida como se describe más abajo.

En la figura 17 se estudia el efecto de la aplicación de un tren de pulsos sobre el contenido del RS, en presencia de 5 mM EGTA en el compartimiento intracelular. Aplicando un tren de pulsos que deplete el RS sin llegar a inactivar la carga, se puede estudiar con pulsos de duración intermedia (500 ms en la figura), la relación entre permeabilidad y contenidos variables de Ca^{2+} dentro del RS. Esto se puede ver en la figura 17, donde tenemos la señal de Ca^{2+} del RS (A), la señal de Ca^{2+} citoplasmática (B), el flujo de liberación calculado a partir de la señal citoplasmática (C) y la permeabilidad (D). Los registros en rojo indican la condición de referencia, mientras que en gris el RS fue depletado por un tren de 20 pulsos de 200 ms de duración a 0 mV, separados por 50 ms. Durante el mismo no se realizó registro óptico para no blanquear el indicador. En el recuadro en A se muestran los registros de la carga antes y después del tren de pulsos. Puede verse como la carga después del tren de pulsos se mantiene constante (valores de carga 18.3 nC/ μF y 17.9 nC/ μF para la condición de referencia y

luego del tren de pulsos respectivamente). En el recuadro en C se muestra ampliada la caída de la $[Ca^{2+}]$ luego del pulso. La línea superpuesta al registro está calculada con los mejores parámetros de ajuste del modelo de remoción asumiendo que el flujo es nulo inmediatamente después del pulso. En la misma figura se puede ver como en la condición de depleción (trazo gris) están disminuidos el pico del flujo de liberación y la velocidad de caída del mismo. La permeabilidad mostrada en D fue calculada como el cociente entre el flujo de liberación de calcio y el correspondiente contenido de Ca^{2+} en el RS, siendo el factor de proporcionalidad la relación entre la superficie del RS y el volumen del mioplasma. Para este cálculo se asume una relación lineal entre el flujo a través de los canales de liberación y la fuerza impulsora. La hipótesis de linealidad implica que los canales operen lejos de la saturación. La fuerza impulsora será la diferencia de concentración de Ca^{2+} entre el RS y el mioplasma, siendo este último mucho menor que $[Ca^{2+}]_{RS}$. También se asume que la diferencia de potencial eléctrico entre el RS y el mioplasma es nula. La permeabilidad obtenida refleja el curso temporal de la probabilidad de apertura de los canales de liberación durante el pulso de voltaje y cómo podemos ver en D, es básicamente independiente de la $[Ca^{2+}]_{RS}$. Para las $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo de 380 μM y 150 μM el pico de la permeabilidad está moderadamente reducido en la condición de bajo Ca^{2+} , y al igual que lo que se aprecia en el flujo, se ve una reducción en la velocidad de caída de la permeabilidad pico en dicha condición, probablemente como consecuencia de una reducción en la inactivación por Ca^{2+} . Por otra parte, si medimos la permeabilidad promedio, obtenida como la integral de la permeabilidad durante el pulso dividida por la duración del mismo, esta no se modifica. En la tabla 1 se muestran los resultados para cuatro fibras. La media de la permeabilidad pico fue de 0.026 ± 0.015 a 0.021 ± 0.013 1/ms, mientras que la media de la

permeabilidad promedio fue de 0.009 ± 0.003 a 0.010 ± 0.003 1/ms, para las condiciones de RS lleno y depletado, respectivamente.

Mientras que los picos fueron significativamente diferentes ($p=0.035$) los promedios no lo fueron ($p=0.32$). En el recuadro en D se puede ver que en la condición de bajo Ca^{2+} la cinética de la permeabilidad es más lenta, con un retardo de 6 ms entre los picos. Este fenómeno se observa en las fibras de la tabla 1, siendo el tiempo al pico en la condición de referencia de 13 ± 1.8 ms y de 19.2 ± 2.6 ms luego de la depleción del RS. Esta diferencia entre los picos es estadísticamente significativa ($p=0.01$). El tiempo medio de caída de la permeabilidad medido desde el pico fue de 11 ± 3.3 ms en la condición de referencia y 33.5 ± 3.8 ms con bajo Ca^{2+} en el RS, diferencia también estadísticamente significativa ($p=0.001$).

TABLA 1

Fibra	Pico flujo de liberación		$\Delta[Ca]_{Total}$		permeabilidad pico		permeabilidad promedio		$[Ca^{2+}]_{SR}$ reposo		$\Delta[Ca^{2+}]_{SR}$	
	Ref.	Depletado	Ref.	Depletado	Ref.	Depletado	Ref.	Depletado	Ref.	Depletado	Ref.	Depletado
	($\mu M/ms$)		(μM)		(1/ms)		(1/ms)		(μM)		(μM)	
211016	13.1	4.3	1207	548	0.035	0.031	0.017	0.019	377	153	320	126
070716	6.7	1.1	696	213	0.017	0.012	0.008	0.007	371	92	242	62
291116	13.2	2.2	719	241	0.033	0.024	0.008	0.009	381	94	220	57
171116	6.8	2.4	494	162	0.019	0.017	0.005	0.004	360	140	299	68
media	9.9	2.5	779	291	0.026	0.021	0.009	0.010	372	120	270	78
+E.S.M.	+1.8	+0.7	+151	+87	+0.015	+0.013	+0.003	+0.003	+5	+16	+24	+16

Tabla 1. Se muestran los resultados para cuatro células con mediciones simultáneas de $[Ca^{2+}]$ en RS y citoplasma con 5 mM de EGTA en la solución interna. La depleción se obtuvo mediante la aplicación de trenes de pulsos como se explica en el texto. Todos los pulsos fueron de 500 ms a 0 mV. La $\Delta[Ca^{2+}]$ total se midió como la integral del flujo de liberación durante el pulso. La permeabilidad promedio es la integral de la permeabilidad transitoria durante el pulso dividida por la duración del pulso. La permeabilidad pico fueron significativamente diferentes en alta y baja $[Ca^{2+}]$ SR (test de t pareado, $p = 0.035$), mientras que la permeabilidad promedio no ($p = 0.32$).

Cálculo del flujo de liberación a partir de la señal de RS

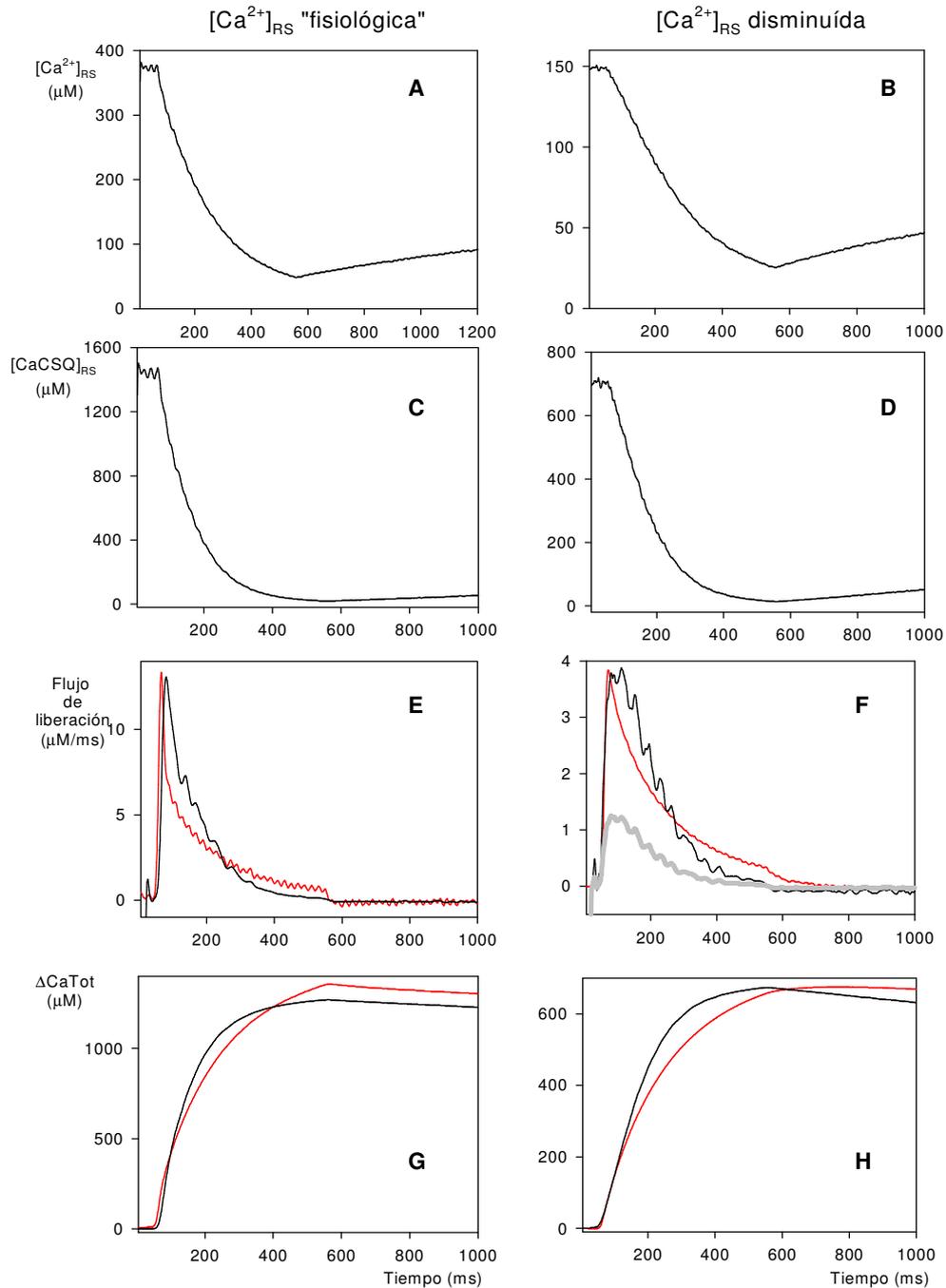


Figura 18. Cálculo del flujo de liberación a partir de la señal de Ca^{2+} del RS y su comparación con el obtenido a partir de la señal citoplasmática. Paneles de la izquierda corresponden a registros partiendo de un valor de Ca^{2+} de reposo cercano al fisiológico. Paneles de la derecha registros obtenidos partiendo de un RS depletado. A y B transitorio de Ca^{2+} intraretículo obtenido a partir de la señal de Mag fluo4 AM. C y D Ca unido a CSQ. E y F en rojo flujos de Ca^{2+} obtenidos a partir de la señal de Rhod 2 citoplasmática, en negro y en gris flujos obtenidos a partir de la señal intra RS de la forma explicada en el texto. G y H cambios en el Ca^{2+} total obtenidos a partir de la señal citoplasmática (rojo) e intra RS (negro).

En la parte superior de los paneles A y B de la figura 18 se observan las señales provenientes del RS en respuesta a un pulso a 0 mV de 500 ms de duración, en A con un contenido de Ca^{2+} a nivel “fisiológico” y en B luego de haber sido depletado con un tren de pulsos de 20 pulsos de 200 ms de duración a 0 mV, separados por 50 ms, a poco más de un tercio del valor inicial de referencia. A partir de la señal de Mag fluo4 se obtiene el Ca^{2+} libre en el RS y a partir de este podemos calcular el Ca^{2+} unido a CSQ utilizando una ecuación de Hill:

$$[CaCSQ] = \frac{CSQ_{tot} \times [Ca^{2+}]_{RS}^n}{(kCSQ^n) + [Ca^{2+}]_{RS}^n} \quad (Ec. 10)$$

donde CSQ_{tot} es la concentración de sitios de CSQ en el RS, k es la constante de disociación y n el número de Hill. Los valores de $[CaCSQ]$ obtenidos a partir de A se muestran en C y los obtenidos a partir de B en D. Los valores de los parámetros se muestran más adelante.

Asumiendo que el calcio total es igual a la suma del calcio libre más el unido a CSQ:

$$[Ca^{2+}]_{totRS} = [Ca^{2+}]_{RS} + [CaCSQ] \quad (Ec. 11)$$

Podemos calcular entonces el flujo a partir de la señal de Ca^{2+} del RS como:

$$Flujo_{RS} = \left(\frac{d[Ca^{2+}]_{totRS}}{dt} \right) / r_v + flujo_{SERCA} \quad (Ec. 12)$$

Donde r_v es la relación de volúmenes entre RS y citoplasma.

Es claro que esta aproximación desprecia el rol de otros ligandos de Ca^{2+} dentro del RS, en particular el pigmento. La razón por la cual excluimos este es porque no conocemos su concentración en el organelo. Indirectamente estimamos que no puede ser mayor a

200 μM por lo que su contribución al poder amortiguador total es justificadamente despreciable.

Otra aproximación consiste en asumir que la recaptación es nula. Claramente esto no es así porque el Ca^{2+} se re acumula en el RS luego del pulso, aunque más lentamente que lo que se libera durante el mismo. La comparación del flujo de liberación y el flujo de la bomba calculada durante el ajuste de las señales citoplasmáticas también justifica esto como aproximación. Los parámetros de CSQ se modifican iterativamente hasta lograr que el flujo calculado a partir de la señal del RS se aproxime al calculado a partir de la señal citoplasmática.

En el panel E tenemos representado en rojo el flujo de liberación de Ca^{2+} calculado a partir de la señal citoplasmática adquirida simultáneamente con la señal de RS y en negro tenemos el flujo obtenidos a partir de esta última de la forma explicada. Para hacerlo se utilizó una CSQ_{tot} igual a 4300 μM , un número de Hill igual a 2.5 y un k_d de CSQ de 500 μM . Al comparar los flujos, a pesar de tener un valor pico casi igual, difieren en la cinética y en un retardo en el flujo calculado a partir de la señal de RS, que también está presente en la señal de retículo y cuyo origen desconocemos.

Cuando realizamos el estudio en la condición en la que el contenido del RS fue depletado, panel F, al intentar reproducir el análisis con los mismos parámetros utilizados en la condición previa a la depleción se obtiene el registro representado en gris. Es claro que el mismo grupo de parámetros no sirve en estas condiciones. Si se repite el procedimiento descrito más arriba hasta obtener un registro similar, al menos en amplitud, al obtenido a partir de la señal citoplasmática (trazo rojo) se obtiene un nuevo grupo de parámetros. Para una CSQ_{tot} igual a 3200 μM , un número de Hill de 2.5 y un K_d de 280 μM obtenemos el registro representado en negro.

En los paneles G y H comparamos el cambio en el calcio total (ΔCa_{Tot}) obtenido a partir de la integral del flujo de liberación calculado a partir de las señales citoplasmáticas (rojo) y de RS (negro).

Como podemos ver, no solo no podemos reproducir exactamente el flujo obtenido a partir de la señal citoplasmática con la señal de RS, lo cual no es muy grave dado las aproximaciones hechas, sino que los mismos parámetros no funcionan en todo el rango de $[Ca^{2+}]_{RS}$. Esto sí es un problema insalvable para obtener el objetivo propuesto de independizar el cálculo del flujo de la amortiguación citoplasmática.

Este resultado nos impide utilizar la señal de RS para calcular el flujo y a partir de este la permeabilidad. Por lo tanto para estudiar la relación entre permeabilidad y contenido de Ca^{2+} en el RS tuvimos que utilizar señales citoplasmáticas para calcular el flujo y la permeabilidad, mientras que para estudiar el efecto de la alta amortiguación por BAPTA y EGTA tuvimos que desarrollar otra estrategia experimental.

Efectos de la alta concentración de BAPTA y EGTA en la liberación de calcio

Ante la imposibilidad de lograr el cálculo de flujo de liberación a partir de la señal de RS en la condición de bajo contenido de calcio dentro del mismo, para de esta forma obtener la permeabilidad y poder estudiar el efecto de la alta amortiguación citoplasmática desde el RS, desarrollamos una nueva estrategia.

La misma consistió en utilizar dos amortiguadores extrínsecos a igual poder amortiguador de equilibrio con la idea de que entonces depletarían el RS más o menos en la misma medida. Así compararíamos el tamaño de las señales $\Delta[Ca]_{RS}$ en respuesta a pulsos iguales y empezando desde un $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo a un valor comparable en ambas condiciones. De esta forma la fuerza impulsora para la liberación de Ca^{2+} desde

el RS sería aproximadamente igual en ambos casos y el poder amortiguador de Ca^{2+} dentro del RS, cualquiera sea su valor, también.

Además las células incluidas en el estudio deberían satisfacer la condición de que el movimiento de carga estuviera conservado a lo largo del experimento.

En la figura 19 vemos los resultados para dos fibras representativas, en una se utilizó 40 mM EGTA (A) y la otra con 20 mM de BAPTA (B). Los registros de referencia previos a la alta amortiguación se muestran en negro para cada célula. Como se observa la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de reposo, la amplitud ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$) y la cinética de la señal son comparables en ambos casos, en particular durante los primeros 200 ms, rango de tiempo que consideramos adecuado para comparar las señales. Luego del agregado del amortiguador a los compartimientos laterales y de esperar a que las soluciones se equilibren obtuvimos las señales en EGTA (rojo) y BAPTA (azul). Como ya vimos antes, en ambas condiciones de alta amortiguación hay una disminución importante del calcio de reposo (aproximadamente a un 25% del valor inicial), pero en la condición de alto BAPTA y durante los primeros 200 ms, la amplitud y la pendiente de la señal son menores que en presencia de EGTA. En la figura también se pueden observar los registros del movimiento de carga realizados durante un pulso de 100 ms de duración, con el fin de monitorizar su estabilidad a lo largo del experimento y en las condiciones de baja y alta amortiguación. En negro se representa la carga en la condición de referencia y superpuestos, en azul en presencia de alto BAPTA y en rojo en alto EGTA.

Como se puede apreciar la carga se conserva, por lo que el efecto observado no estaría vinculado a una disminución de la misma.

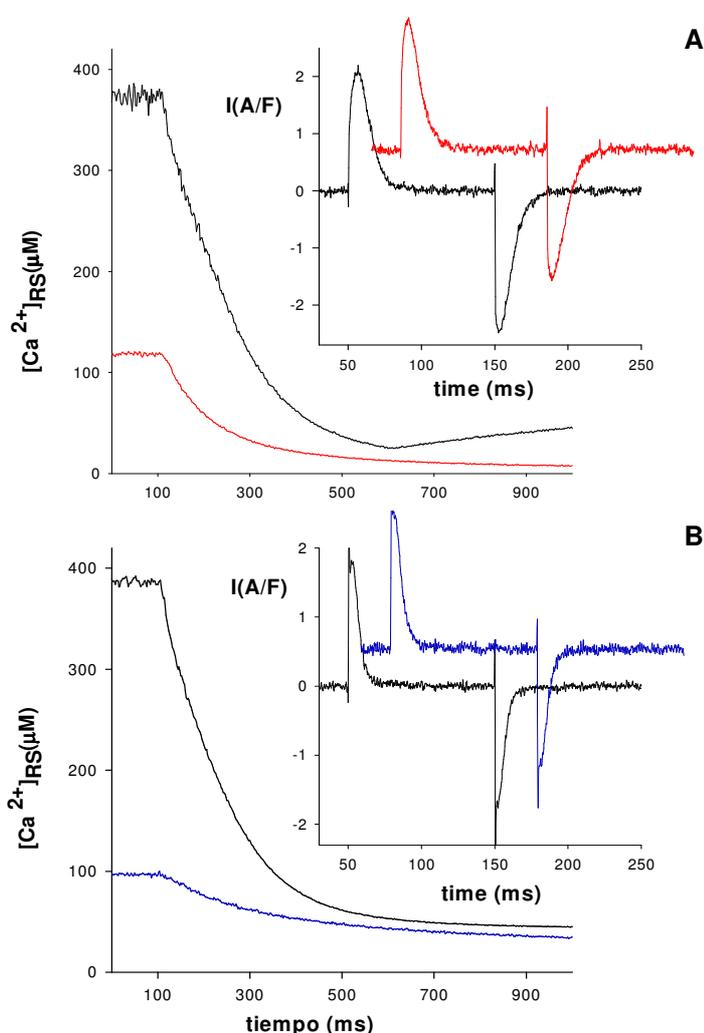


Figura 19. Comparación del efecto de 40 mM de EGTA (panel A) y 20 mM BAPTA (panel B) en el transitorio de Ca^{2+} intra RS. En ambas células se parte de la condición referencia de 5 mM EGTA (registros en negro) y luego de la aplicación del alto buffer se produce la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo tanto en EGTA (registro rojo) como en BAPTA (registro azul). El cambio de pendiente inicial en la señal de Ca^{2+} en presencia de 40 mM EGTA fue mayor que en presencia de 20 mM BAPTA. En los recuadros se muestran los controles de carga medidos durante pulsos de 100 ms a 0 mV aplicados inmediatamente antes de los pulsos para obtener la señal de RS en la condición de referencia (negro) y de alto buffer (rojo o azul). Para la célula en el panel A el valor de la carga fue de 29.8 nC/µF en 5 mM EGTA y de 29.4 nC/µF en 40 mM EGTA, mientras que la capacidad lineal pasó de 9.3 a 9.4 nF en el mismo período. En el panel B la carga fue de 18.4 nC/µF en 5 mM de EGTA y de 18.1 nC/µF en 20 mM BAPTA y la capacidad pasó de 8.3 a 8.6 nF.

En la figura 20 se resumen los resultados para un grupo de células en cada condición, cuatro células para EGTA y cinco para BAPTA. Como se observa, en la condición de referencia los valores de calcio de reposo en ambos grupos de células no presentan diferencias estadísticamente significativas, al igual que la amplitud de la señal durante los primeros 200 ms en la misma condición. Cuando comparamos las mismas variables en la condición de alto buffer podemos ver que el calcio de reposo del que se parte es el

mismo, pero la amplitud de la señal durante los primeros 200 ms es significativamente inferior (aproximadamente un 50%) en presencia de BAPTA. Puede verse también como los tiempos de aplicación de los buffers y los valores de la carga no muestran diferencias estadísticamente significativas.

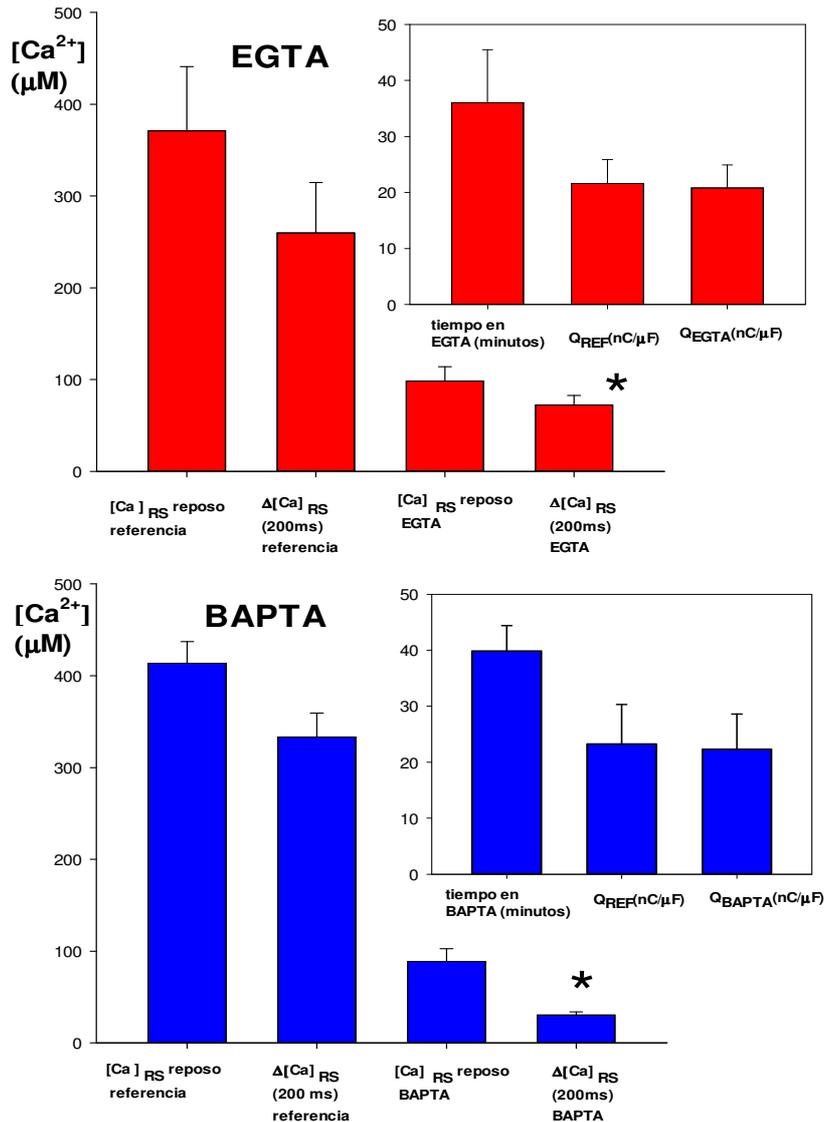


Figura 20. Comparación de los resultados promedios para cuatro células en 40 mM EGTA y cinco células en 20 mM BAPTA. El criterio de elección para la comparación se basó en que todas partieran de una $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo similar y que la carga estuviera conservada. Como resultado, ni la $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo en alto buffer ni el movimiento de carga antes y después del tratamiento fueron significativamente diferentes. Sólo la $\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ fue significativamente más pequeña en 20 mM BAPTA que en 40 mM EGTA.

Discusión1

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la alta amortiguación de la $[Ca^{2+}]$ citoplasmática sobre la liberación de Ca^{2+} , combinando la medida de señales de indicadores de Ca^{2+} provenientes del citoplasma y del propio RS, con el objetivo de establecer la contribución de la LCIC a este proceso en el músculo esquelético de anfibio. Inicialmente se había propuesto hacerlo utilizando la medida del flujo de liberación de Ca^{2+} calculado a partir de la señal proveniente del RS. Como resultado del cambio en la capacidad de amortiguación dentro del reservorio con la modificación del Ca^{2+} libre esto resultó impráctico. Se desarrolló una aproximación alternativa, la que permitió establecer que en presencia de 20 mM BAPTA la permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS es menor que en 40 mM EGTA, consistente con inhibición de la LCIC.

La disminución de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ no afecta la permeabilidad de Ca^{2+} promedio de la membrana del RS.

Como se muestra en la figura 17 y en la tabla 1 como consecuencia de la reducción de la $[Ca^{2+}]_{RS}$, la amplitud del flujo de liberación disminuye y se hace más lenta la caída desde el pico. La reducción en amplitud es debida, aunque sea en parte, a la reducción de la fuerza impulsora. La reducción en la velocidad de caída después del pico ha sido observada anteriormente en condiciones similares e interpretada como reducción en la inactivación por Ca^{2+} (Pizarro y Ríos 2004, Olivera y Pizarro, 2010). La medida simultánea de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ permite la estimación de la permeabilidad, calculada como el cociente entre el flujo de liberación y la $[Ca^{2+}]_{RS}$. Esta muestra también una pequeña pero estadísticamente significativa reducción del pico y de la velocidad de caída desde el mismo. La razón entre la permeabilidad medida en el pico y en el nivel cuasi

estacionario a los 500 ms es aproximadamente 2 en la condición de depleción y ligeramente mayor en la condición de contenido “fisiológico”. Partiendo tanto de un valor de $[Ca^{2+}]_{RS}$ fisiológico como depletado, el nivel cuasi estacionario de la permeabilidad se mantiene en un valor elevado a medida que baja la $[Ca^{2+}]_{RS}$ y no tiende a declinar, sugiriendo la ausencia de control luminal por cambios en la $[Ca^{2+}]_{RS}$, como se demostró en el músculo esquelético de mamífero (Sztretye y cols., 2011b).

Además de la reducción en la amplitud del pico, al partir de una baja $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo también se puede observar una disminución en la cinética de activación de la permeabilidad, aumentando su tiempo al pico. Como vemos en el recuadro D de la figura 17, la cinética de la permeabilidad es más lenta en la condición de depleción, con un claro retardo de tiempo entre los picos y en el tiempo de caída desde el mismo. A los 10 ms de iniciado el pulso la permeabilidad es 3 veces mayor cuando el RS está lleno. A ese tiempo aproximadamente el 75 % de la carga fue movida en las dos condiciones, por lo que esta diferencia no podría ser explicada por cambios en la activación por voltaje. Además a ese tiempo vamos a tener prácticamente el mismo valor de la permeabilidad que tenemos al final del pulso, cuando la $[Ca^{2+}]_{RS}$ es muy baja. Esto también refuerza la idea de la ausencia de control luminal.

La permeabilidad promedio se mantiene constante a pesar de la reducción de la $[Ca^{2+}]_{RS}$, debido a que la reducción del pico y de la velocidad de activación estaría compensada por la reducción en la velocidad de inactivación.

Si la liberación de Ca^{2+} fuera exclusivamente dependiente del voltaje y presentara inactivación rápida por el mismo ión, se esperaría que una reducción en la concentración de Ca^{2+} en el RS tuviera como consecuencia la potenciación de la permeabilidad. Esta potenciación se produciría como consecuencia de que el bajo

$[Ca^{2+}]_{RS}$ reduciría el flujo a través de los RyR lo que produciría una menor $[Ca^{2+}]$ en el sitio de inactivación ubicado en el lado citoplasmático de los canales. Los resultados presentados no serían entonces enteramente consistentes con una liberación de Ca^{2+} dependiente puramente del voltaje, con inactivación rápida por Ca^{2+} . Cabe la posibilidad de que si la $[Ca^{2+}]_{RS}$ regula la permeabilidad, de forma que al disminuir esta los RyR se inhiben, un sistema puramente activado por voltaje podría explicar el resultado. La fracción inhibida por bajo $[Ca^{2+}]_{RS}$ se compensaría por una disminución de la inactivación de los no inhibidos. De todas formas es improbable que si la inhibición por bajo $[Ca^{2+}]_{RS}$ es importante está no se detecte durante la liberación de Ca^{2+} . Como mencionamos, la observación de que el nivel cuasi estacionario que sigue al pico no muestra una tendencia a disminuir, incluso a valores muy bajos de $[Ca^{2+}]_{RS}$ sugiere que no hay regulación luminal por $[Ca^{2+}]_{RS}$.

Por otro lado si tuviésemos un sistema dual, liberación primaria por voltaje y un componente secundario a este de LCIC, el efecto esperado dependería de los tamaños relativos de ambos componentes así como de sus propiedades, como por ejemplo si ambos se inactivan por Ca^{2+} o no.

En el caso extremo del mecanismo propuesto por Ríos y Pizarro (Ríos y Pizarro, 1988), aparentemente corroborado por Schneider y colaboradores (Csernoch y cols., 1993), se esperaría una inhibición de LCIC por el mismo mecanismo que se inhibe la inactivación por Ca^{2+} , a menor $[Ca^{2+}]_{RS}$, menor flujo, menor $[Ca^{2+}]$ en el lado citoplasmático del RyR. Por su lado la permeabilidad voltaje dependiente permanecería igual porque se asume que no se inactiva por Ca^{2+} . El resultado sobre la permeabilidad total dependería de cuán inhibido se encuentre el componente de LCIC, lo que dependerá de su sensibilidad al Ca^{2+} , básicamente del kd del sitio activador. Su abolición total produciría una inhibición, si es parcial tal vez la inhibición podría ser compensada en parte por

menor inactivación Ca^{2+} dependiente, aunque igual es más probable que predominase un efecto de inhibición .

La falta de inactivación del componente activado por voltaje no se justifica demasiado a esta altura del conocimiento. El flujo de liberación del mamífero se inactiva aproximadamente como el de rana, por lo que podríamos suponer que el componente voltaje dependiente en la rana tuviese similares propiedades, dada la equivalencia entre los RyR1 y α . Si se abandona la hipótesis de no inactivación entonces un sistema dual explicaría naturalmente nuestra observación. Si el componente LCIC está presente, esperaríamos que ante una caída en el Ca^{2+} de reposo del RS, este se encuentre disminuido, pero no necesariamente abolido. A su vez una reducción de la LCIC podría estar compensada por una potenciación de la LCID como consecuencia de la disminución de la inactivación por Ca^{2+} . Esto explicaría que en nuestros experimentos la permeabilidad promedio se mantenga constante.

Por lo tanto, un mecanismo de control dual, con inactivación por Ca^{2+} en ambos componentes y similar amplitud sería más consistente con nuestros resultados. Sería importante establecer cuanta LCIC persiste en bajo $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ para aproximadamente caracterizar el rango de activación del mismo in situ.

El poder amortiguador de Ca^{2+} en el RS cambia con la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$

Analizando la tabla 1 se ve que la razón entre $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ y $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ en condiciones de referencia y de RS depletado no es la misma. Más aún, el cociente es consistentemente mayor en el caso depletado. En promedio es 3.6 ± 0.45 contra 2.9 ± 0.45 (depletado y referencia respectivamente), la diferencia es estadísticamente significativa

(test de t pareado, $p = 0.005$). El significado de esto es muy claro el poder amortiguador de Ca^{2+} en el RS aumenta si disminuye la $[Ca^{2+}]_{RS}$. El cociente de marras mediría el poder amortiguador lineal, la ya mencionada expansión de volumen, ciertamente una aproximación grosera. Para un amortiguador cooperativo que responde a la ecuación (10) su poder amortiguador viene dado por:

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{RS}}{d[Ca^{2+}]_{RS}} = n \times CSQ_{tot} \times \frac{K_{CSQ}^n [Ca^{2+}]_{RS}^{n-1}}{(K_{CSQ}^n + [Ca^{2+}]_{RS}^n)^2} \quad (Ec. 13)$$

y tiene un máximo en:

$$[Ca^{2+}]_{RS} = K_{CSQ} \times \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^{\frac{1}{n}} \quad (Ec. 14)$$

o sea que cuanto mayor el número de Hill más cerca del K_{CSQ} se encuentra la $[Ca^{2+}]_{RS}$ donde el poder amortiguador es máximo. Para un $[Ca^{2+}]_{RS}$ mayor o menor el poder buffer disminuiría.

Si la K_{CSQ} está próxima a la $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo “fisiológico” (Pape y cols., 2007) como surge de nuestro cálculo del flujo en la figura (18) al bajar la $[Ca^{2+}]_{RS}$ debería bajar el poder amortiguador. Por ejemplo en esa fibra (Tabla 1. Fibra 211016) los parámetros de CSQ del mejor ajuste para obtener el flujo de liberación a partir de una $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo de 380 μM resultaron ser $CSQ_{TOT} = 4300 \mu M$, $K_{CSQ} = 500 \mu M$ y $n = 2.5$. Con esos valores el máximo poder amortiguador está a una $[Ca^{2+}]_{RS} = 356 \mu M$ y es de 6.3. Para aproximar el flujo a partir de la señal citoplasmática calculando el flujo de la señal de RS luego de depletado el RS y partiendo de un valor de reposo de $[Ca^{2+}]_{RS} = 150 \mu M$ los parámetros fueron $CSQ_{TOT} = 3200 \mu M$, $K_{CSQ} = 285 \mu M$ y $n=2.5$ y el máximo poder amortiguador está en $[Ca^{2+}]_{RS} = 195 \mu M$ y es de 8.4. El valor medio del poder amortiguador en el rango de los respectivos transitorios de $[Ca^{2+}]_{RS}$ resultó 5.13 y 4.1 para el RS depletado y referencia, respectivamente. La aproximación lineal calculada a

partir de la Tabla 1 para la fibra 211016 es 4.3 y 3.8, para el caso depletado y de referencia.

Por lo tanto nuestra observación no es trivial y sugiere que hay un cambio fundamental en las propiedades amortiguadoras de CSQ, probablemente vinculadas a su despolimerización. Los estudios in vitro muestran que la despolimerización disminuye la concentración de sitios de unión. Esto debería disminuir, no aumentar, el poder amortiguador, a menos que haya una disminución importante en la constante de disociación. Esto es probablemente así porque la polimerización es promovida por la unión de Ca^{2+} , en ese rango relativamente bajo. La extrapolación de in vitro a in situ debe hacerse cautelosamente, por ello no hay mucho más que se pueda concluir de esos estudios. El estudio de este problema es un proyecto en sí mismo y necesitará más experimentos. La consecuencia práctica, como ya se mencionó, fue que abandonamos el plan original de calcular el flujo a partir de la señal proveniente del RS.

La permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS es mayor en alta [EGTA] que en alta [BAPTA]

Como se describió previamente, la comparación del efecto de los amortiguadores aplicados a alta concentración se restringió a las fibras que presentaron valores similares en el Ca^{2+} de reposo luego de la aplicación de los mismos. De esta forma podemos asumir que el poder amortiguador del RS es similar en las dos condiciones, al igual que la fuerza impulsora. Asumiendo una relación aproximadamente lineal entre $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ y $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Total}}$, la amplitud de la $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ en el tiempo considerado (primeros 200 ms) puede tomarse como una medida del flujo promedio, el cual será proporcional a la permeabilidad promedio. Esta aproximación fue estudiada en base a modelación presentada en el Apéndice y resulta razonablemente justificada.

Para evaluar y comparar el efecto de BAPTA y EGTA buscamos una condición donde ambos se encuentren a igual poder amortiguador de equilibrio. A pH=7 el Kd de unión a Ca²⁺ para BAPTA es de 0.2 μM y para EGTA de 0.4 μM, para trabajar a igual poder buffer hay que tener entonces una concentración de BAPTA que sea la mitad la de EGTA. En esta condición el radio de captura, calculado con la ecuación (1), será 7 veces menor para el primero. Si vemos como varía la concentración de Ca²⁺ en función de la distancia r desde una fuente puntual de liberación, esta vendrá dada por (Neher E. 1986; Stern M D, 1992; Pape y cols., 1995):

$$[Ca^{2+}] = Ca_{2+0} + \frac{\Phi \times e^{-\frac{r}{\lambda}}}{r \times 2 \times \pi \times D_{Ca}} \quad (\text{Ec. 15})$$

donde Φ es la intensidad de la fuente, y Ca₀ es la [Ca²⁺] estacionaria.

Utilizando esta ecuación se puede calcular el perfil de [Ca²⁺] a distintas distancias desde la fuente con distintos amortiguadores y a distintas intensidades de la fuente, reflejando los cambios en ésta debido a variaciones en el contenido de calcio del RS. En la figura 21 tenemos representado el perfil del calcio en cuatro condiciones. En negro a una intensidad de la fuente del 100 % para una concentración de 5 mM de EGTA y en azul para la misma concentración de EGTA a una intensidad del 30 %. En rojo tenemos el perfil a una intensidad de la fuente del 30 % a una concentración de 40 mM de EGTA, mientras que en verde a la misma intensidad pero para 20 mM de BAPTA.

La distancia entre los RyR α y RyR β es de 28 nm, podemos ver en la figura que para un flujo de igual intensidad en 40 mM EGTA tendremos el 70 % de [Ca²⁺] que en 5 mM EGTA. Es razonable concluir que cualquiera sea la contribución del componente de LCIC presente en 5 mM de EGTA, será aproximadamente el mismo en 40 mM

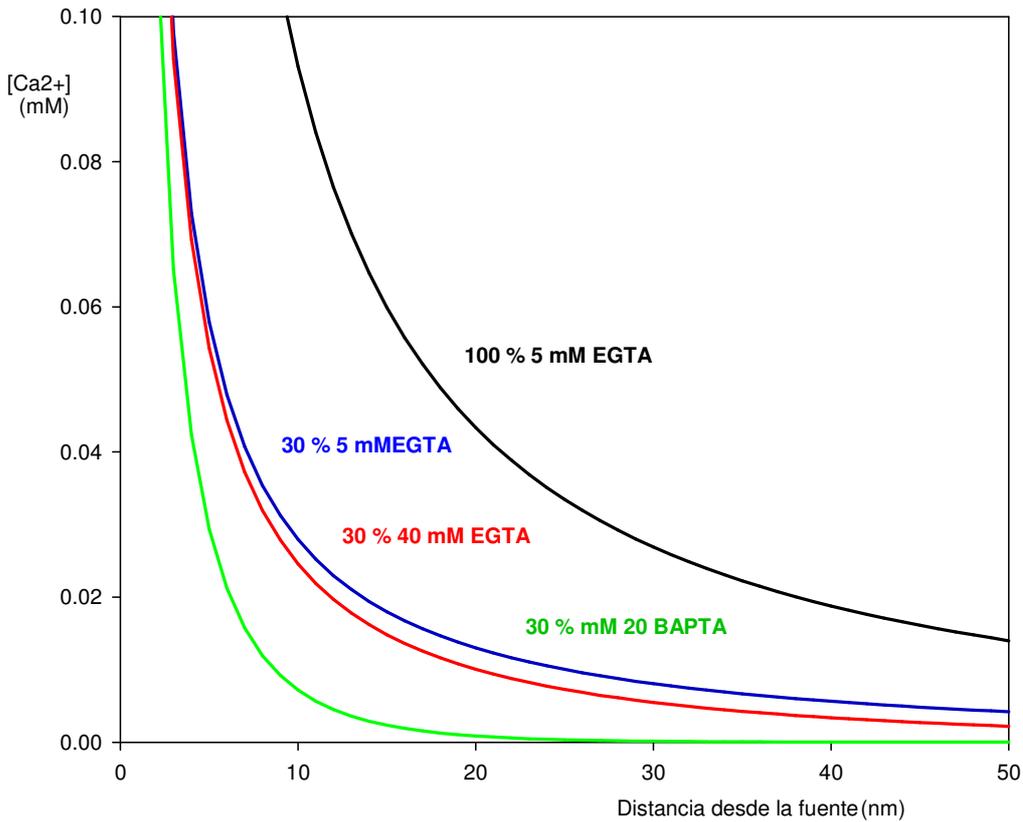


Figura 21. Perfil de la $[Ca^{2+}]$ en función de la distancia desde una fuente puntual en presencia de distintas concentraciones de buffers difusibles y a distintas intensidades de la fuente. En negro intensidad de la fuente del 100 % para una concentración de 5 mM de EGTA. En azul a una intensidad del 30 % con 5 mM de EGTA. En rojo a una intensidad del 30 % con 40 mM de EGTA. En verde intensidad del 30% con 20 mM de BAPTA. La fuente se asumió de 0.2 pA, $D_{Ca} = 200 \mu m^2/s$, $K_{onBAPTA} = 100/\mu M s$ y $K_{onEGTA} = 1/\mu M s$.

EGTA, siendo este componente fuertemente disminuido por 20 mM de BAPTA.

Cabría la posibilidad de que exista LCIC a través de los RyR α no enfrentados a los RDHP, dado que la distancia entre ellos en la doble hilera es la misma que la distancia con los RyR β (Felder y Franzini-Armstrong, 2002). Si esto ocurriera, con 20 mM de BAPTA este componente debería estar también disminuido o abolido.

La discusión previa es aproximada dado que a 0 mV hay seguramente muchos canales simultáneamente abiertos que sumarían sus contribuciones a cada sitio activador.

Basado en las consideraciones previas, pensamos que la mejor interpretación de las diferencias presentadas en presencia de 20 mM de BAPTA y 40 mM de EGTA es que la permeabilidad es menor en la primera condición respecto la segunda, y que dicha disminución es a expensas de la LCIC.

También estos experimentos apoyan la idea de que aún en baja $[Ca^{2+}]_{RS}$ persiste un importante componente de LCIC por lo que se concluye que este opera con una gran sensibilidad (bajo k_d) a Ca^{2+} .

Comparación con estudios previos

El efecto que observamos en BAPTA es groseramente consistente con el trabajo del grupo de Schneider (Jacquemonod y cols., 1991), a pesar de que no podemos detectar las diferencias entre el pico y el estado cuasi estacionario de la permeabilidad, además de que basados en nuestros datos no podemos cuantificar la reducción en la permeabilidad al no poder trasladar directamente la reducción en el 50 % de la $\Delta [Ca^{2+}]$ en cambios en la permeabilidad. Difieren de los del grupo de Chandler que reportan potenciación por BAPTA (Jong y cols., 1993). Sin embargo el rango de concentración del quelante en los dos estudios no es el mismo, es más reportan que cuando la [fura2] sube por encima de 5 mM observan un efecto inhibitor.

Un tema que merece una discusión especial es el de la inactivación dependiente de Ca^{2+} del componente voltaje activado. Como ya mencionamos sería razonable asumir que funciona igual al mamífero que presenta inactivación. Ahora bien, esta inactivación parece ser global, es decir, es impulsada por la $[Ca^{2+}]$ debida a la contribución de muchas fuentes simultáneamente abiertas. Esto lo decimos porque los eventos elementales de liberación, probablemente debidos a un solo canal abierto, se inactivan

mucho más lentamente que la liberación macroscópica (Csernoch y cols., 2004). Esto la haría más susceptible a ser antagonizada también por EGTA. Sin embargo los estudios en mamíferos con medidas simultáneas de RS y citoplasma muestran que la permeabilidad decae por un efecto de inhibición por bajo calcio mediado por CSQ. Más aún, el efecto de BAPTA consiste en potenciar el pico de la permeabilidad que luego decae por inhibición luminal. Esa fenomenología no es compatible con nada de lo observado en este estudio por lo que se concluye que la regulación mediada por CSQ está ausente en el anfibio (Sztretye y cols., 2011b).

Nuestros resultados también difieren de los reportados por el grupo de Pape (Fènelon y cols., 2012) discutidos anteriormente, pero podría ser explicado en parte por la diferencia en los voltajes de prueba aplicados. A los voltajes utilizados por ellos (-45 a -20 mV) habría una mayor contribución relativa de la LCIC que a 0 mV. Apoyando esta hipótesis está el hecho de que las “chispas de calcio” (calcium sparks), presentes en el músculo esquelético de anfibio por la activación de los RyR β por el mecanismo de LCIC, constituyen la mayor parte del flujo de liberación a voltajes bajos e intermedios, en el mismo rango de voltaje donde la razón pico/nivel estacionario, atribuida a LCIC, tiene el máximo.

Por otro lado, la importancia del RyR β y de la LCIC ha sido cuestionada recientemente (Kashiyama y cols., 2010; Perni y cols., 2015). En el trabajo de Kashiyama, coexpresando RyR α y RyR β en la línea de miotubos 1B5 (línea celular derivada de ratón), encontraron por una lado que la señal disparada en respuesta a la despolarización por K $^{+}$ no fue estadísticamente significativa cuando se la compara con la obtenida expresando RyR α solo. Además, cuando expresan RyR α y RyR β , el tratamiento con procaína, (un inhibidor de la liberación disparada por cafeína en los RyR β) no afecta la liberación de calcio cuando esta es disparada por la despolarización por alto K $^{+}$. En base

a esto concluyeron que la contribución del RyR β y de la LCIC sería prácticamente nula durante la despolarización en su preparación. Vale aclarar que este trabajo no cuenta con información morfológica que muestre que la ubicación de las isoformas expresadas se encuentran a la misma distancia que las nativas en anfibio. En ese sentido las imágenes confocales de inmunofluorescencia muestran moderada superposición, lo que abona la hipótesis de pobre colocalización.

En el trabajo de Perni se estudió el rol de la isoforma β en el músculo esquelético de larvas de pez cebra (*Danio rerio*). Para ello lograron silenciar su expresión (knockout, KO) y a pesar de que encontraron la desaparición casi completa de sparks en el KO, los test de movilidad aplicados las larvas no difirieron del control. En base a esto concluyeron que la liberación a través de los RyR β no está vinculada de forma importante durante el potencial de acción, ya que si fuera así la movilidad de la larva KO estaría francamente disminuida. Para ellos el calcio liberado durante un potencial de acción sería suficiente para inactivar a los RyR β , y como la activación de estos depende de la activación previa de los RyR α , los β contribuirían como un componente retardado del flujo de liberación en células musculares esqueléticas de especies distintas al mamífero. Este componente los autores lo infieren por la menor velocidad de caída del transitorio en la rana vs el ratón. No es claro como este mecanismo se vería en el flujo de liberación en respuesta a un pulso de control de voltaje pero es razonable concluir que contribuirá al nivel cuasi estacionario.

Evidentemente estos estudios divergen de nuestras observaciones, tal vez por diferencias de especies o condiciones experimentales.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se concluye que:

- 1) Se descarta que la liberación de Ca^{2+} se deba solamente a un proceso voltaje dependiente
- 2) Este estudio no muestra evidencia de regulación luminal de la permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS.
- 3) Un sistema de doble control, LCID que activa la LCIC, daría cuenta de los efectos de la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ sobre la permeabilidad.
- 4) El efecto de BAPTA apoya el sistema de doble control.
- 5) La LCIC contribuiría aproximadamente a la mitad de la permeabilidad total y operaría en un régimen de alta sensibilidad a Ca^{2+} y fuertemente regenerativo.

Apéndice

Simulaciones con un modelo de dos compartimientos

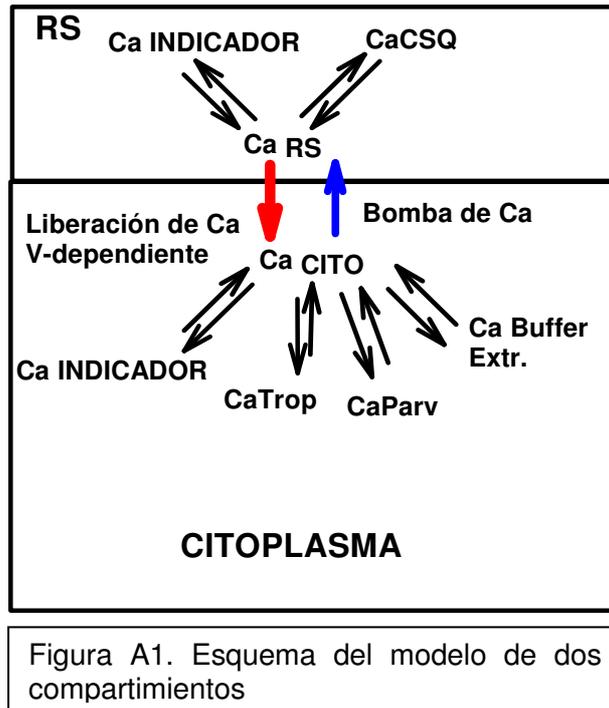
Con el propósito de explorar teóricamente algunas ideas relativas a los resultados experimentales comunicados en el cuerpo central de esta Tesis se construyó un modelo matemático mínimo de la situación experimental en la que las señales de RS fueron registradas. La célula muscular se modeló como un sistema de dos compartimientos, el mioplasma y el RS. Se asume que solo hay transporte de Ca^{2+} entre ambos, despreciando por ejemplo el transporte de este ión entre el mioplasma y el exterior celular. Además los dos compartimientos se asumen bien mezclados, sin retardos difusivos entre distintas regiones de los mismos, así como tampoco se consideran ninguna segregación espacial de los sistemas de transporte. Por todo lo expuesto en la Introducción de la Tesis estas hipótesis están alejadas de la realidad, pero en primera aproximación dos compartimientos homogéneos nos parece lo más parsimonioso dado que el análisis de nuestras señales implícitamente asume esas propiedades.

Cada compartimiento tiene los ligandos de Ca^{2+} más importantes, de acuerdo a la literatura. En el mioplasma el calcio podrá unirse a los amortiguadores fisiológicos (parvalbúmina y troponina), al indicador citoplasmático y a uno de los amortiguadores extrínsecos agregados (EGTA o BAPTA). Dentro del RS se unirá al indicador y a la CSQ.

El transporte a través de la membrana del RS es debido a una permeabilidad variable, una permeabilidad de reposo constante y un transporte con saturación que representa la bomba SERCA. La fuga de Ca^{2+} en reposo (el producto de la permeabilidad de reposo por el Ca^{2+} RS de reposo) se iguala al transporte activo hacia el RS al Ca^{2+} de reposo

mioplásmico por el expediente de fijar una permeabilidad de reposo que satisfaga la igualdad.

Un esquema del modelo se muestra en la figura A1 y a continuación las ecuaciones diferenciales de cada especie química involucrada.



Ecuaciones del modelo.

Indicador = Ind

Troponina = Trop

Parvalbúmina = Parv

Flujo de liberación = FL

Permeabilidad = Perm

Flujo Bomba = FB

Calcio en el RS = $[Ca^{2+}]_{RS}$

Calcio en el citoplasma = $[Ca^{2+}]_{CITO}$

$$\text{Calcio de Reposo} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSO}}$$

$$\text{Permeabilidad de reposo} = \text{Perm}_o$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{CITO reposo}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{CITO } o}$$

$$\text{FL} = \text{Perm} * [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$$

$$\text{FB} = \text{Flujo máx} * [\text{Ca}^{2+}]_{\text{CITO}}^n / (\text{K bomba} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{CITO}})^n$$

$$\text{Fuga} = \text{Perm}_o * [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSO}} = \text{FB} * [\text{Ca}^{2+}]_{\text{CITO } o}$$

$$\text{Calcio unido a calsequestrina} = \text{CaCSQ}$$

$$\text{CSQ total} = \text{CSQ}_{\text{TOT}}$$

Retículo sarcoplásmico (RS)

$$[\text{CaCQS}] = \frac{\text{CSQ}_{\text{tot}} \times [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}^n}{(k\text{CSQ}^n) + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}^n} \quad (\text{Ec. A1})$$

$$E\text{CSQ} = \frac{d[\text{CaCQS}]}{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}} = n \times \text{CSQ}_{\text{tot}} \times \frac{k\text{CSQ}^n [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}^{n-1}}{(k\text{CSQ}^n + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}^n)^2} \quad (\text{Ec. A2})$$

$$[\text{CaInd}]_{\text{RS}} = [\text{Ind}_{\text{tot}}]_{\text{RS}} \times \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}}{K\text{IndRS} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}} \quad (\text{Ec. A3})$$

$$E\text{IndRS} = \frac{d[\text{CaInd}]_{\text{RS}}}{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}} = \text{Ind}_{\text{Tot}} \times \frac{K\text{IndRS}}{(K\text{IndRS} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}})^2} \quad (\text{Ec. A4})$$

$$[\text{CaRSTOT}] = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}} + [\text{CaCSQ}] + [\text{CaInd}]_{\text{RS}} \quad (\text{Ec. A5})$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSTOT}}}{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}} = 1 + E\text{CSQ} + E\text{IndRS} \quad (\text{Ec. A6})$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSTOT}}}{dt} = (-\text{FL} - \text{Fuga} + \text{FB}) \times \left(\frac{V_{\text{cito}}}{V_{\text{RS}}} \right) \quad (\text{Ec. A7})$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSTOT}}}{dt} = \frac{\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSTOT}}}{dt}}{\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}}{dt}} \quad (\text{Ec. A8})$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}}{dt} = \frac{\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSTOT}}}{dt}}{1 + E\text{CSQ} + E\text{IndRS}} \quad (\text{Ec. A9})$$

Citoplasma (CITO)

$$[CaInd]_{CITO} = \frac{[IndTOT]_{CITO} \times [Ca^{2+}]_{CITO}}{KInd_{CITO} + [Ca^{2+}]_{CITO}} \quad (Ec. A10)$$

$$EInd_{CITO} = \frac{d[CaInd]_{CITO}}{d[Ca^{2+}]_{CITO}} = [IndTOT]_{CITO} \times \frac{KInd_{CITO}}{(KInd + [Ca^{2+}]_{CITO})^2} \quad (Ec. A11)$$

$$\frac{d[CaEGTA]}{dt} = a([EGTA]_{TOT} - [CaEGTA])[Ca^{2+}]_{CITO} - b[CaEGTA] \quad (Ec. A12)$$

$$\frac{d[CaTrop]}{dt} = ka([Trop]_{TOT} - [CaTrop])[Ca^{2+}]_{CITO} - kb[CaTrop] \quad (Ec. A13)$$

$$\frac{d[CaParv]}{dt} = kc([Parv]_{TOT} - [CaParv] - [MgParv])[Ca^{2+}]_{CITO} - kcb[CaParv] \quad (Ec. A14)$$

$$\frac{d[MgParv]}{dt} = km([Parv]_{TOT} - [CaParv] - [MgParv])[Mg^{2+}]_{CITO} - kmb[MgParv] \quad (Ec. A15)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{CITO\ TOT}}{dt} = FL + Fuga - FB \quad (Ec. A16)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{CITO\ TOT}}{dt} = \frac{d[Ca^{2+}]_{CITO}}{dt} + \frac{d[CaInd]_{CITO}}{dt} + \frac{d[CaEGTA]}{dt} + \frac{d[CaParv]}{dt} + \frac{d[CaTrop]}{dt} \quad (Ec. A17)$$

$$\frac{d[CaInd]_{CITO}}{dt} = EInd_{CITO} \times \frac{d[Ca^{2+}]_{CITO}}{dt} \quad (Ec. A18)$$

$$d[Ca^{2+}]_{CITO} / dt = (d[Ca^{2+}]_{CITO\ TOT} / dt - d[CaEGTA] / dt - d[CaTrop] / dt - d[CaParv] / dt) / (1 + EInd_{CITO}) \quad (Ec. A19)$$

Las simulaciones se realizaron asumiendo un curso temporal de la permeabilidad del RS de cinética y amplitud con las propiedades estimadas experimentalmente, los flujos de Ca^{2+} y los cambios de concentración de las distintas especies se calcularon integrando las ecuaciones numéricamente por medio del método de Euler sin modificación, con un paso de integración de 2 μs .

Con este modelo se estudiaron dos problemas:

1) La señal esperada teóricamente si tenemos indicador simultáneamente en el mioplasma y el RS.

2) La corrección de la hipótesis de que la amplitud de la señal de Ca^{2+} en el RS se relaciona linealmente con la permeabilidad del RS si se parte de la misma $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de reposo.

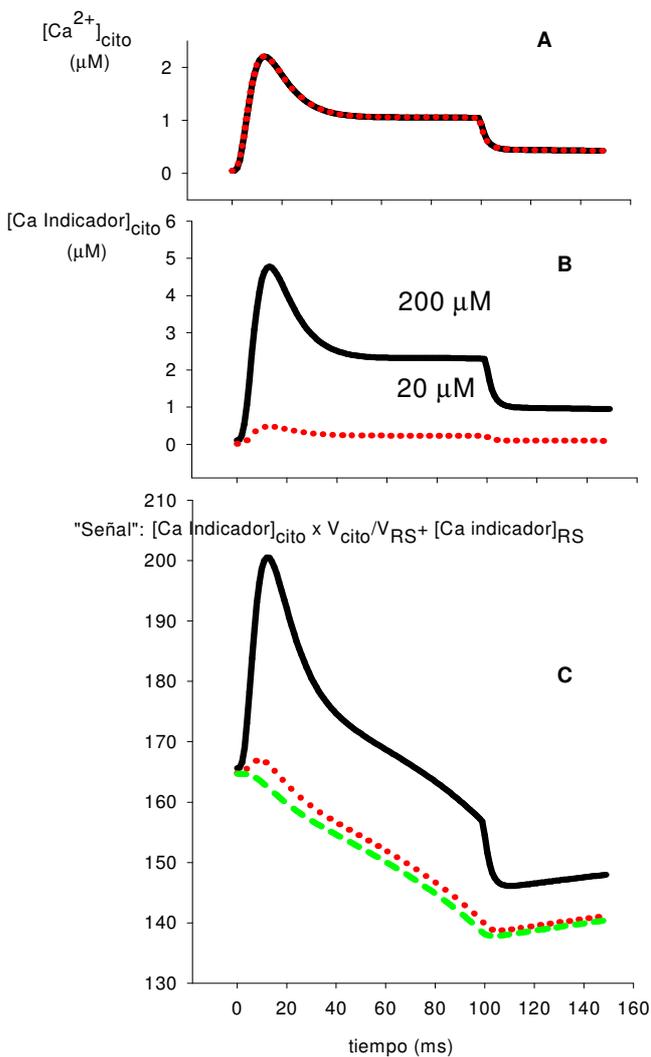


Figura A2. Propiedades de las señales de RS y citoplasma mezcladas.

1) Propiedades de las señales mezcladas.

Si el indicador de Ca^{2+} de baja afinidad está presente en el RS y en mioplasma simultáneamente la señal de fluorescencia tiene un componente citoplasmático superpuesto al de RS. Se exploró en el modelo la forma de las señales fluorescentes asumiendo varias concentraciones citoplasmáticas del indicador. En la figura A2 se muestra dos casos cuando la concentraciones citoplasmática y dentro del RS son iguales, 200 µM, y cuando en el citoplasma es 10 veces menor, 20 µM. A ambas concentraciones la simulación muestra que el

transitorio de Ca^{2+} libre mioplasmático es básicamente el mismo (Panel A), dado que el

indicador es un ligando menor comparado con parvalbúmina y sobre todo con el EGTA que en esta simulación se asumió a 5 mM. Las señales dentro del RS, tanto de Ca^{2+}

libre (que no se muestra) como del Ca^{2+} unido al indicador también son iguales. Lo que varía trivialmente es la amplitud de la señal citoplasmática (el complejo Ca-indicador), la que es 10 veces menor en el 2º caso (Panel B). La señal compuesta va a ser la suma ponderada de las dos señales. El peso relativo dependerá del volumen de cada compartimiento. Asumiendo el volumen del RS como 1, el de citoplasma se toma como 8, basado en estudios morfométricos. Este puede ser algo mayor o menor (de 11 a 5) pero en esencia no cambia las conclusiones. La “señal” cuando las concentraciones son iguales tiene un fuerte componente citoplasmático, es mayoritariamente una deflexión positiva que solo se hace negativa llegando al final del pulso (Trazo negro panel C). Es muy similar por ejemplo a las señales del recuadro superior de la fig. 12. En las condiciones de registro en esa figura el EGTA es de 50 mM, y en la simulación 5 mM, lo que sugiere que la concentración citoplasmática en el registro experimental fuese mayor. En ese sentido cabe comentar que basado en los experimentos de blanqueo en las células en las que no se aplicó el protocolo para vaciar el citoplasma el RS contribuye más o menos la mitad de la fluorescencia de reposo. Haciendo un cálculo aproximado, si en reposo el pigmento en el RS estuviese saturado y el pigmento en el citoplasma libre de Ca^{2+} , dado que la razón de fluorescencia es 14 y como el tamaño del citoplasma es 8 veces mayor que el RS, si las concentraciones fuesen iguales la fluorescencia proveniente del RS debería ser $14/8 = 1.75$ veces mayor, si son iguales entonces la concentración citoplasmática es 1.75 veces mayor, lo que explicaría que en mayor concentración de EGTA la señal compuesta es más o menos similar a la calculada. Esto es un tema secundario, el principal punto que nosotros queremos hacer a partir de estas simulaciones es que razonablemente en nuestras células a las que se aplicó el protocolo de vaciamiento la concentración citoplasmática del indicador sea el 10 % de la del RS o menor.

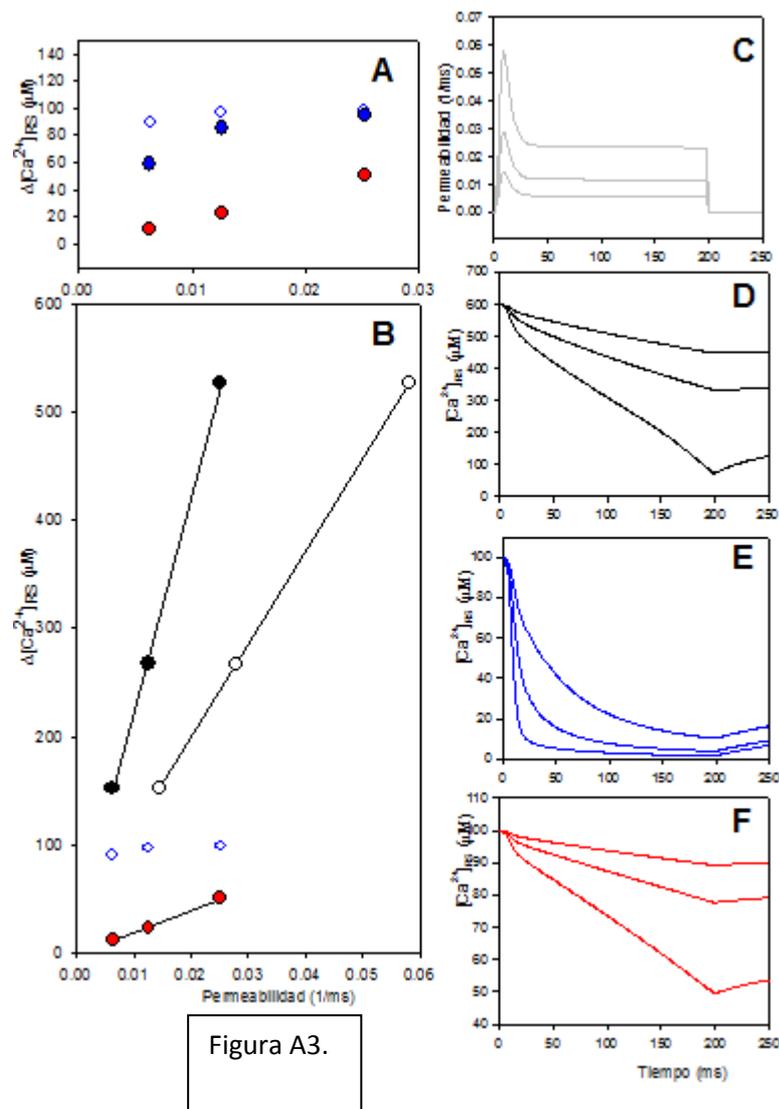
Otro aspecto relevante que surge de estas simulaciones es que la superposición de un pequeño componente citoplasmático podría ser una explicación para el retardo frecuentemente observado entre la señal citoplasmática y la del RS. En la figura A2C el trazo rojo, la señal compuesta con 10 % de concentración citoplasmática del indicador, está levemente desplazada hacia la derecha respecto a la señal pura del RS (en verde). Dado el ruido del registro, la pequeña deflexión positiva puede no ser detectada. La señal medida, que preserva lo fundamental de la señal verdadera del RS, aparece como levemente retrasada. No es la única explicación para el retardo, sería razonable pensar que el indicador este relativamente excluido de la región desde donde el Ca^{2+} es liberado, ocupada por el gel de CSQ. De ser así el retardo se originaría por la difusión de Ca^{2+} desde donde está el indicador al sitio de liberación.

2) Relación entre la amplitud de la señal de Ca^{2+} en el RS con la permeabilidad.

Se estudió como dependía en el modelo la amplitud de la señal de Ca^{2+} en el RS ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) con la permeabilidad usada en la simulación. El panel C de la figura A3 muestra simulaciones para tres permeabilidades con el mismo curso temporal y amplitudes de 100%, 50 % y 33% de 0.06 1/ms. Los transitorios de Ca^{2+} dentro del RS, calculados con un kd para CSQ de 600 μM , muestran que escalan en la misma proporción, como se muestra en el panel D cuando se parte con una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de 600 μM , y lo mismo se observa a valores menores hasta 200 μM . Ahora bien, partiendo de una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de 100 μM la depleción para 100 y 50 % de la permeabilidad es completa por lo que la relación deja de ser lineal como se muestra en E. La linealidad se recupera si para las mismas permeabilidades asumidas si se aumenta el poder amortiguador para Ca^{2+} dentro del RS. Las simulaciones en F se obtuvieron reduciendo el Kd de CSQ a 200 μM . El aumento de poder amortiguador dentro del RS al bajar el Ca^{2+} en el RS está

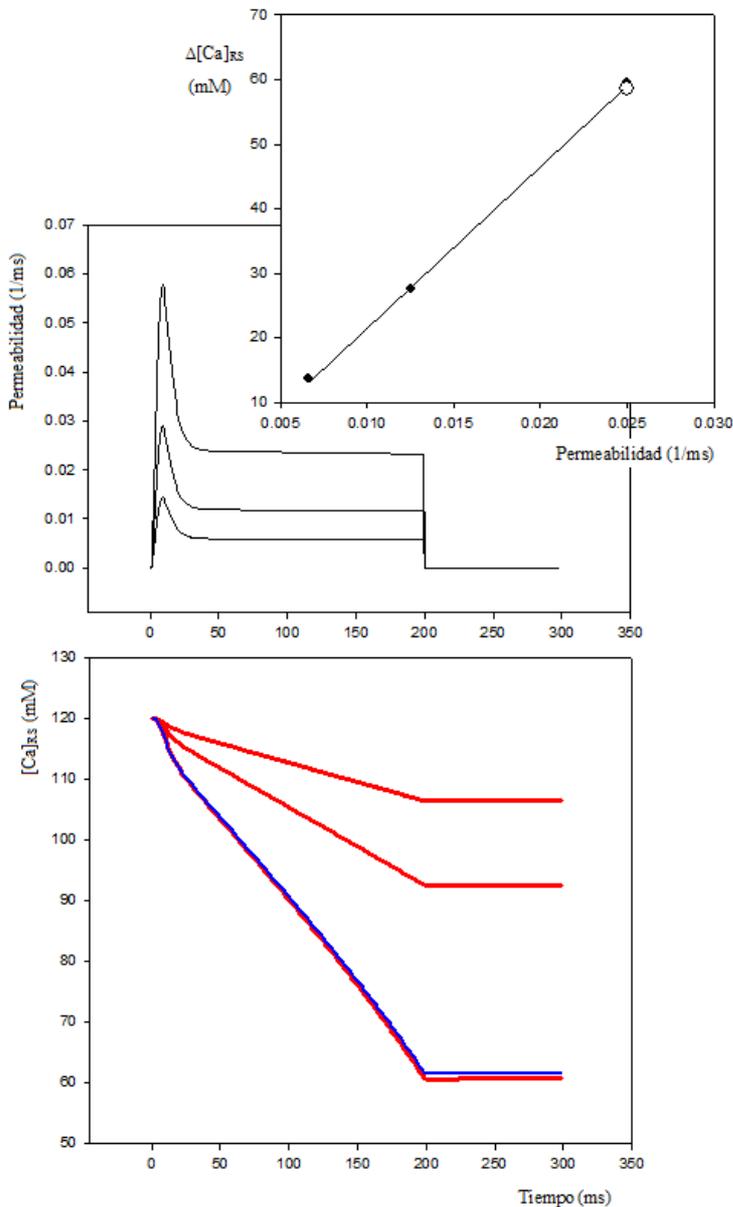
justificado experimentalmente. En las células de la tabla 1 el cociente $\Delta Ca_{Total}/\Delta Ca_{RS}$ pasa de 3 a 4 al pasar de 400 a 100 μM .

En los paneles A y B de la figura A3 se muestra la relación entre la señal de Ca^{2+} del RS y la permeabilidad. En el panel A se muestra la señal de $[Ca^{2+}]_{RS}$ en función de la permeabilidad promedio, calculada como la integral de la permeabilidad transitoria durante el pulso dividida por la duración del pulso. En la misma se puede ver como cuando se parte de una concentración de 100 μM (círculos vacíos azules), o de 50 μM (círculos llenos azules) se pierde la linealidad entre la señal de calcio y la



permeabilidad.

En rojo, partiendo de una concentración de 100 μM se recupera la linealidad al modificar el k_d de CSQ. En el panel B podemos ver la relación lineal entre la señal de



calcio y las permeabilidades pico partiendo de una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de 600 μM (círculos negros vacíos). La linealidad se mantiene partiendo de la misma concentración cuando se grafica la amplitud en función de la permeabilidad promedio (círculos negros lleno). También se observa la pérdida de la linealidad partiendo de una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de 100 μM (círculos vacíos azules) y cuando esta se recupera al disminuir el k_d a 200 μM .

En la figura A4 este punto se

Figura A4.

explora en más detalle incluyendo en las simulaciones las diferencias en las propiedades del sistema de amortiguación de Ca^{2+} en el

citoplasma utilizadas experimentalmente. El panel superior muestra las permeabilidades usadas en la simulación, las mismas que se utilizaron en la figura anterior. En el panel inferior se grafican los transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ calculados con el modelo. En azul se grafica el cálculo con 40 mM EGTA en el citoplasma para el caso de la máxima

permeabilidad, y en rojo las simulaciones en presencia de 20 mM BAPTA para las tres permeabilidades utilizadas. El resultado es independiente de estas, consistente con que el poder buffer de equilibrio de ambas soluciones (40 mM EGTA y 20 mM BAPTA) es el mismo. En el recuadro arriba y a la derecha del panel superior se muestra la correlación entre la permeabilidad promedio en abscisas y el $\Delta[\text{Ca}]_{\text{RS}}$ en ordenadas. Los puntos en negro corresponden a los transitorios calculados asumiendo BAPTA en el citoplasma, el círculo abierto es correspondiente a EGTA. De estas simulaciones se concluye que es legítimo utilizar el $\Delta[\text{Ca}]_{\text{RS}}$ como un indicador del efecto de los amortiguadores extrínsecos sobre la permeabilidad de Ca^{2+} de la membrana del RS.

Bibliografía

Bannister RA, Beam KG. (2013). Cav1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca²⁺ channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1828:1587–1597.

Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* 85(1):33-69.

Blinks JR, Rüdell R, Taylor SR. (1978). Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin. *J Physiol.* 277:291–323.

Block BA, Franzini-Armstrong C. (1988). The structure of the membrane systems in a novel muscle cell modified for heat production. *J Cell Biol.* 107(3):1099-112.

Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 107(6):2587-600.

Brum, G, Fitts, R, Pizarro, G, Ríos, E. (1988b). Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* 398: 475-505.

Calderón, J.C., Bolaños, P. & Caputo, C. (2014). The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys Rev* 6: 133.

Caputo C, Giménez M D. (1967). Effects of external Ca²⁺ deprivation on single muscle fibres. *J Gen Physiol* 50:2177–2195

Cheng, H., W.J. Lederer, and M.B. Cannell. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 262:740–745.

Csernoch L, Jacquemond V, Schneider MF. (1993). Microinjection of Strong Calcium Buffers Suppresses the Peak of Calcium Released during Depolarization in Frog Skeletal Muscle Fibers *J Gen Physiol.* 101(2):297-333

Csernoch L, Zhou J, Stern MD, Brum G, Ríos E. (2004) The elementary events of Ca²⁺ release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle *J Physiol* 557(1): 43-58.

De Armas R, González S, Brum G, Pizarro G. (1998). Effects of 2,3-butanedione monoxime on excitation-contraction coupling in frog twitch fibers. *J Mus Res Cell Motil* 19:961–977.

Endo M. (2009). Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 98:1153-1176.

Endo M, Iino M. (1980). Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR functions by saponin treatment. *J Mus Res Cell Motil* 1(1):89-100.

Freise D, Held B, Wissenbach U, Pfeifer A, Trost C, Himmerkus N, Schweig U, Freichel M, Biel M, Hofmann F, Hoth M, Flockerzi V. (2000). Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca^{2+} currents and alters channel inactivation properties. *J. Biol. Chem.* 275 14476–14481.

Felder E, Franzini-Armstrong C. (2002). Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(3):1695-700.

Felder E, Protasi F, Hirsch R, Franzini-Armstrong C, Allen PD. (2002). Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys. J.* 82, 3144–3149.

Fénelon K, Lamboley CR, Carrier N, Pape PC. (2012). Calcium buffering properties of sarcoplasmic reticulum and calcium-induced Ca^{2+} release during the quasi-steady level of release in twitch fibers from frog skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 140(4):403-19.

Fill M, Copello J. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82:893-922.

Franzini-Armstrong, C. (1970). Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* 47, 488–498.

Gandhi CS, Isacoff EY. (2002). Molecular models of voltage sensing. *J Gen Physiol.* 120:455–63.

Harrison SM, Bers DM. (1989). Correction of proton and Ca^{2+} association constants of EGTA for temperature and ionic strength. *Am J Physiol.* 256:C1250–1256.

Hernández-Ochoa EO, Pratt SJP, Lovering RM and Schneider MF. (2016). Critical Role of Intracellular RyR1 Calcium Release Channels in Skeletal Muscle Function and Disease. *Front. Physiol.* 6:420. doi: 10.3389/fphys.2015.00420.

Hille B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001.

Hollingworth S, Gee KR, Baylor SM. (2009). Low-affinity Ca^{2+} indicators compared in measurements of skeletal muscle Ca^{2+} transients. *Biophys J.* 97(7):1864-72.

- Ikemoto N, Bhatnagar GM, Nagy B, Gergely J. (1972). Interaction of divalent cations with the 55,000-dalton protein component of the sarcoplasmic reticulum. Studies of fluorescence and circular dichroism. *J. Biol. Chem.* 247,7835–7837.
- Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Campbell KP. (1987). Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J. Biol. Chem.* 262,16636–16643.
- Jong DS, Pape PC, Chandler WK, Baylor SM. (1993). Reduction of calcium inactivation of sarcoplasmic reticulum calcium release by fura-2 in voltage-clamped cut twitch fibers from frog muscle. *J Gen Physiol.* 102(2):333-70.
- Kabbara AA, Allen DG. (2001). The use of the indicator fluo-5N to measure sarcoplasmic reticulum calcium in single muscle fibres of the cane toad. *J. Physiol.* 534:87–97.
- Kahn A, Sandow A D. (1950). The potentiation of muscular contraction by the nitrate-ion. *Science* 112:647–649
- Klein MG, Cheng H, Santana LF, Jiang YH, Lederer WJ, Schneider MF. (1996). Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379(6564):455-8.
- Kovacs L, Ríos E, Schneider MF. (1983). Measurement and modification of free calcium transients in frog skeletal muscle fibres by a metallochromic indicator dye. *J Physiol* 343:161-196
- Kashiyama T, Murayama T, Suzuki E, Allen PD, Ogawa Y. (2010). Frog alpha- and beta-ryanodine receptors provide distinct intracellular Ca^{2+} signals in a myogenic cell line. *PLoS ONE* 5(7): e11526. doi:10.1371
- Melzer W, Ríos E, Schneider MF. (1984). Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophys J* 45: 637 – 641.
- Murayama T, Kurebayashi N. (2011). Two ryanodine receptor isoforms in nonmammalian vertebrate skeletal muscle: possible roles in excitation-contraction coupling and other processes. *Rev. Progress in Biophysics and Molecular Biology* 105 134-144.
- Nakai J, Tanabe T, Konno T, Adams B, Beam KG (1998). Localization in the II–III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation–contraction coupling. *J. Biol. Chem.* 273 24983–24986.
- Neher E. (1986). “Concentration profiles of intracellular Ca^{2+} in the presence of diffusible chelator”. *Exp Brain Res*, 14, pp. 80-96.

Obermair GJ, Kugler G, Baumgartner S, Tuluc P, Grabner M, Flucher BE. (2005). The Ca^{2+} channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit determines Ca^{2+} current kinetics in skeletal muscle but not targeting of $\alpha 1\text{S}$ or excitation-contraction coupling. *J. Biol. Chem.* 280:2229–2237.

Olivera JF, Pizarro G. (2010). A reappraisal of the Ca^{2+} dependence of fast inactivation of Ca^{2+} release in frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 31(2):81-92.

Olivera JF, Pizarro G (2016). Excitation contraction uncoupling by high intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in frog skeletal muscle: a voltage clamp study. *J Muscle Res Cell Motil.* 37(4-5):117-130.

Pape PC, Jong DS, Chandler WK. (1995). Calcium release and its voltage dependence in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *J. Gen. Physiol.* 106:259–336.

Park H, Park IY, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker AK, Kang C. (2004). Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J. Biol. Chem.* 279:18026–18033. doi: 10.1074/jbc.M311553200.

Perni S, Marsden KC, Escobar M, Hollingworth S, Baylor SM, Franzini-Armstrong C. (2015). Structural and functional properties of ryanodine receptor type 3 in zebrafish tail muscle. *J Gen Physiol.* 145(3):173-84.

Pizarro G, Ríos E. (2004). How source content determines intracellular Ca^{2+} release kinetics. Simultaneous measurement of $[\text{Ca}^{2+}]$ transients and $[\text{H}^+]$ displacement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 124:239–258.

Pouvreau S, Royer L, Yi J, Brum G, Meissner G, Ríos E, Zhou J. (2007). Ca^{2+} sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(12):5235-40.

Ríos E, Brum G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle *Nature* 325:717–720.

Ríos, E., and M.F. Schneider. (1981). Stoichiometry of the reactions of calcium with the metallochromic indicator dyes antipyrilazo III and arsenazo III. *Biophys. J.* 36:607–621.

Ríos E, Pizarro G. (1988). Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *NIPS* 3:223-227.

Rios E, Pizarro G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 71:849-908.

Sandow AD. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med* XXV:176–201.

Shirokova N, García J, Pizarro, Ríos E. (1996). Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol* 107:1-187

Shirokova N, García J, Ríos E. (1998). Local calcium release in mammalian muscle. *The Journal of Physiology*. 512:377–384.

Schneider MF, Simon BJ and Szucs G. (1987). Depletion of calcium from the sarcoplasmic reticulum during calcium release in frog skeletal muscle *J Physiol*. 392:167-92

Schredelseker J, Di Biase V, Obermaier GJ, Felder ET, Flucher BE, Franzini-Armstrong C, Grabner M. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:17219–17224.

Stern M, Pizarro G, Ríos E. (1997) Local control model of excitation contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 110:415-440.

Stern MD. (1992). Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 13:183–192

Sutko JL, Ito K, Kenyon JL. (1985). Ryanodine: a modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release in striated muscle. *Federation Proc* 44: 2984–2988.

Sun X.H., Protasi F., Takahashi M., Takeshima H., Ferguson D.G., Franzini-Armstrong C. (1995). The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 129(3):659–671.

Sztretye M, Yi J, Figueroa L, Zhou J, Royer L, Ríos E. (2011). D4cpv-calsequestrin: a sensitive ratiometric biosensor accurately targeted to the calcium store of skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 138(2):211-29.

Sztretye M, Yi J, Figueroa L, Zhou J, Royer L, Allen P, Brum G, Ríos E. (2011). Measurement of RyR permeability reveals a role of calsequestrin in termination of SR Ca^{2+} release in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 138(2):231-47.

Tsien RY. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19: 2396–2404.