

Universidad de la República

Licenciatura en Biología Humana

“Estudio de los efectos del fosfato inorgánico sobre la liberación de Calcio en el músculo esquelético”

Tesis de Grado

Juan J. Ferreira Gregorio
ferreiragregorio@gmail.com

Tutor: Prof. Gustavo Brum

Tesis de Grado



Facultad de Medicina – UdelaR,
Departamento de Biofísica, Lab. Biofísica del Músculo.
Montevideo-Uruguay.

Año 2013



Bestiario (Hombre - Rana) - por - Francesco Sambo

Página en blanco

Agradecimientos

Agradecimientos... siempre me han parecido extensos e incluso los criticaba a menudo, pero ahora llego el momento de escribirlos y comprendo el porqué la excesiva extensión. En primer lugar me gustaría agradecerles a mis padres Gabriela Gregorio y Juan Ferreira quienes son sin duda el motor de todos mis logros. Son ellos quienes han estado de forma incondicional y siempre apoyando con todas sus fuerzas mis decisiones aunque muchas veces no comprendieran el porqué. Como se que ellos van a leer este trabajo.

-“Muchas gracias mamá y papá son maravillosos, todo esto es gracias a ustedes”.

En segundo lugar me gustaría darle un especial agradecimiento a mi jefe y tutor, el Profesor Gustavo Brum quien ha sido el culpable de mi creciente interés en las ciencias biológicas básicas, y quien me ha enseñado básicamente todo lo que se, tanto de técnicas de laboratorio como de acoplamiento excitación contracción, músculo, y electrofisiología en general. Es quien además me brinda trabajo y me ha permitido avanzar en el ámbito científico, además de que siempre ha intentado asegurarme un mejor pasar económico.

Un grupo humano que se merece especial agradecimiento es quienes llevan adelante la carrera de la Licenciatura en Biología Humana. Ellos han sido quienes respondieron con mucha paciencia a mis miles de preguntas y dudas. Y espero que continúen con su estupendo trabajo manteniendo la Licenciatura en Biología Humana dentro de las opciones universitarias.

Mis agradecimientos para el Prof. Gonzalo Pizarro quien ha colaborado con sus críticas y con ideas de excelente calidad para mi trabajo, así como con consejos en momentos justos para mi formación. Por último mis gratificaciones al Dr. Gonzalo Ferreira y a la Comisión sectorial de investigación científica (CSIC) por el financiamiento otorgado para llevar a cabo este trabajo.

-“Muchas Gracias a todos.....”

Índice

1.	Resumen	7
2.	Tabla de Abreviaturas.	8
3.	Introducción y Antecedentes.	9
4.	Objetivos.	
4.1.	Objetivo general.	7
4.2.	Hipótesis:	
4.2.1.	Hipótesis 1.	17
4.2.2.	Hipótesis 2.	17
4.2.3.	Hipótesis 3.	17
4.3.	Objetivos específicos:	
4.3.1.	Objetivo específico 1.	18
4.3.2.	Objetivo específico 2.	18
4.3.3.	Objetivo específico 3.	18
4.3.4.	Objetivo específico 4.	18
5.	Metodología.	
5.	Metodología General.	20
5.1.	Soluciones utilizadas.	21
5.2.	Adquisición y procesamiento de datos.	21
5.2.1.	Medida de los transitorios de calcio.	21
5.2.2.	Eventos elementales de liberación de calcio.	23
5.3.	Carga del RS con pigmentos fluorescentes.	25
6.	Resultados.	
6.1.	Efectos del Pi sobre el flujo de liberación.	26
6.2.	Efectos del Pi sobre pulsos de larga duración.	31
6.3.	Efectos del Pi sobre los eventos elementales (Chispas).	33
6.4.	El bloqueo de los canales de Cl⁻ del RS impide los efectos del Pi.	38

7.	Análisis y discusión de resultados.	
7.1.	Efectos del Pi sobre el flujo de liberación.	47
7.2.	Efectos del Pi sobre pulsos de larga duración.	50
7.3.	Efectos del Pi sobre los eventos elementales (Chispas).	53
7.4.	Efecto del bloqueo de los canales de cloro en la membrana del RS.	59
7.5.	Efecto buffer del Pi.	65
8.	Conclusiones	68
9.	Bibliografía	70
10.1.	Anexo 1	77
10.2.	Anexo 2	79
10.3.	Anexo 3	81
11.	Firmas de responsable y Tutor	83

Resumen

En el músculo esquelético (ME) la liberación de Ca^{2+} es un proceso esencial para la activación del aparato contráctil. El Ca^{2+} necesario en el ME se libera masivamente desde el retículo sarcoplasmático (RS) para luego ser rápidamente recaptado hacia él. La actividad muscular intensa, como la que ocurre durante la fatiga muscular, produce un rápido ciclado de las moléculas de miosina, lo que consume suficiente ATP como para que el fosfato inorgánico (Pi), uno de los productos de su degradación, se acumule a concentraciones milimolares a nivel citoplasmático. Este es un anión importante que actúa en varios procesos celulares, y que se piensa podría tener un efecto inhibitorio sobre la liberación de Ca^{2+} . El Pi como otros aniones inorgánicos precipita con el Ca^{2+} y al acumularse en el RS precipita formando fosfato de Ca. Este proceso podría disminuir la concentración de Ca^{2+} libre disponible para ser liberada desde el RS. Los objetivos de este trabajo fueron, caracterizar los efectos del Pi sobre la liberación de Ca^{2+} en fibras musculares de rana en condiciones de control de voltaje, evaluar la respuesta de los eventos elementales de liberación, examinando posibles efectos directos del Pi sobre el canal de liberación (Receptores de Rianodina; RyR). Verificamos que la vía de entrada del Pi hacia el interior del RS, sería a través de canales de cloro (BCL y SCL, Laver y col., 2001). Para esto utilizamos distintos bloqueantes de los canales de cloro.

1. Tabla de abreviaturas

- **9AC** = ácido 9 antraceno carboxílico (bloqueante de los canales de Cloro).
- **AEC** = Acoplamiento Excitación-contracción
- **ATP** = Adenosine triphosphate
- **ATPasa** = Clase de enzimas que catalizan la descomposición de ATP en ADP y un ion fosfato libre.
- **BCI** = Canales de Cloro de alta conductancia (siglas en Inglés)
- **BTS** = N-benzyl-p-toluenesulfonamida (inhibor de la miosina)
- **DHPR** = Dihydropyridine Receptor (receptor de Dihidropiridina), Sensor de voltaje y/o Canal de Ca^{2+} tipo L
- **DMSO** = Dimetil sulfóxido
- **DIDS** = ácido 4,4'-di-isotiociano-2,2'-disulfónico (bloqueante de los canales de Cloro).
- **EGTA** = ácido etilen glicol tetraacético (buffer de cationes, como el Ca^{2+} y Mg^{2+})
- **F0** = Fluorescencia basal
- **FDHM** = Duración a la mitad del máximo (parámetro utilizado para caracterizar las chispas)
- **FWHM** = Ancho a la mitad del máximo (parámetro utilizado para caracterizar las chispas)
- **Kd** = Constante de disociación
- **Kps** = producto de solubilidad o producto iónico de un compuesto iónico
- **LCIC** = Liberación de Calcio inducida por Calcio
- **ME** = Músculo esquelético
- **NFA** = ácido niflúmico (bloqueante de los canales de Cloro).
- **Pi** = Fosfato inorgánico
- **PTPm** = Poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial
- **RS** = Retículo sarcoplasmático
- **RyR** = Receptores de rianodina
- **SCI** = Canales de cloro de baja conductancia (siglas en Ingles)
- **SERCA** = Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} - ATPase.
- **SITS** = ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-2,2'-estilbene disulfónico (bloqueante de los canales de Cloro)
- **Ttp** = Tiempo al pico (parámetro utilizado para caracterizar las chispas)

2. *Introducción y Antecedentes.*

Este trabajo intenta aportar información para una mejor comprensión de algunos de los mecanismos involucrados en la fatiga muscular. Específicamente se busca comprender los efectos que el fosfato inorgánico (Pi) podría ejercer, tras su acumulación en el citoplasma como consecuencia de la hidrólisis de ATP y de la fosfocreatina, requerida durante la contracción muscular (Godt & Nosek, 1989). Como se analizará y confirmará más adelante con los experimentos, el Pi tiene efectos fundamentalmente sobre la liberación de Ca^{2+} , provocando una disminución en la magnitud de la fuerza que los músculos son capaces de realizar (Dutka y col. 2005). Aunque la fatiga muscular involucra diferentes procesos, nosotros estudiaremos exclusivamente aquellos que estén relacionados particularmente con la liberación de Ca^{2+} .

El músculo esquelético se contrae y relaja debido al aumento y disminución de la concentración de Ca^{2+} libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) citoplasmática. Estos aumentos se producen por la liberación masiva de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS). Esta liberación es desencadenada por un proceso denominado acoplamiento-excitación-contracción (AEC)^{*1}, en respuesta a la despolarización producida por potenciales de acción que se propagan sobre el sarcolema y membrana de túbulos transversos (Túbulos T)^{*2} (Costantin LL. 1975). En el AEC se requiere la transmisión de la señal hacia el RS, lo que ocurre por la interacción de moléculas presentes en la membrana de los túbulos T, denominadas sensores de voltaje (Receptores de Dihidropiridina, DHPR)^{*3} y los canales de liberación de Ca^{2+} localizados en el RS (Receptores de Rianodina, RyR)^{*4}. La estequiometría entre los DHPR y RyR es de 2:1, enfrentándose cuatro DHPR a un RyR de forma alternada (Fig.1, Franzini-Armstrong PNAS, 2002)

De los RyR, se conocen tres isoformas, dos de las cuales se expresan en el músculo esquelético. La isoforma 1 (RyR1) forma a nivel de la tríada estructuras conocidas como “pies” (Block et al 1988) e interactúan con los DHPR. La isoforma 3, se observa en el músculo de rana y aves (isoforma beta) en igual proporción que la

1- Acoplamiento-excitación-contracción (AEC ó ECC en ingles) son todos aquellos procesos involucrados desde la señal eléctrica producida por el potencial de acción en la membrana del túbulo T, hasta el paso final correspondiente a la producción de fuerza por parte de la fibra muscular o por el mismo músculo.

2- Los Túbulos Transversos o túbulos T son invaginaciones del sarcolema que recorren la fibra muscular transversalmente alcanzando el centro de estas.

3- Los sensores de voltaje (DHPR) son esencialmente canales de Ca^{2+} tipo L, que en el músculo esquelético están adaptados para responder a cambios en el potencial eléctrico de membrana. (Ríos y Brum, 1987)

4- Los canales de liberación de Ca^{2+} ubicados en la membrana del RS son grandes estructuras que protruyen la membrana de este organelo logrando quedar enfrentados a los DHPR en el túbulo T. Deben su nombre “receptores de Rianodina (RyR)” a que son bloqueados selectivamente por esta droga.

isoforma alfa (equivalente a los RyR1). Esta isoforma se encuentra en mamíferos en el músculo diafragma y sóleo de adulto, también se ve en etapas tempranas en el desarrollo, donde los túbulos T no se han desarrollado (Shirokova y col. 1999).

Característicamente el RyR3 no se relaciona con los DHPR (Fig.1), se localizan lateralmente a la triada y su activación es debida al mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (LCIC). La isoforma 2 se expresa en el músculo cardíaco y es activada fisiológicamente por Ca^{2+} .

Felder and Franzini-Armstrong PNAS 2002

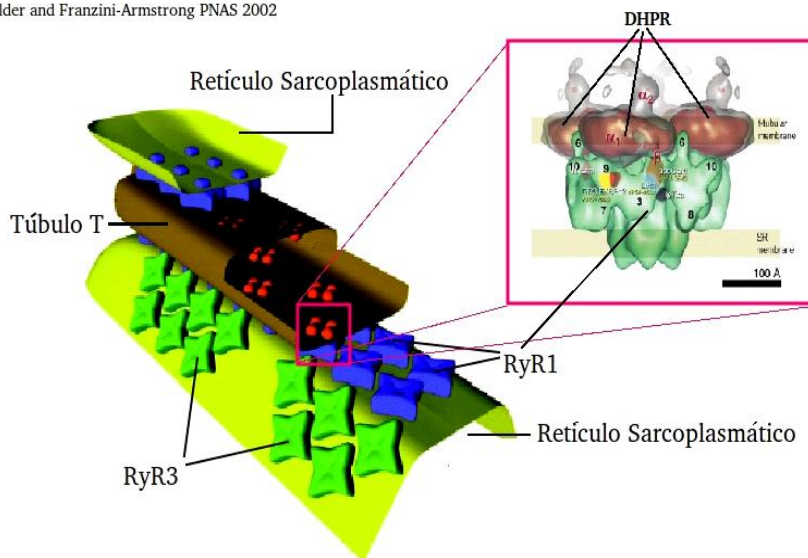


Figura 1. Estructura de la triada del músculo esquelético. Se puede observar la distribución espacial entre los receptores de Dihidropiridina (DHPR) y los receptores de Rianodina (RyR).

La imagen inferior izquierda fue obtenida de Felder & Franzini-Armstrong PNAS, 2002.

La imagen superior derecha es de Grigorieff y col. J of Membrane Biology, 2003.

Para la contracción, como mencionamos el músculo esquelético necesita de un aumento transitorio en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma. Este transitorio de Ca^{2+} resulta de un balance entre el flujo de liberación desde el RS hacia el citoplasma y de los flujos de remoción de Ca^{2+} hacia el RS. Aunque los transitorios son iniciados por cambios rápidos y propagados del potencial de membrana, las etapas siguientes involucran la difusión del Ca^{2+} desde su sitio de liberación inicial hasta las proteínas contráctiles. Este proceso de cinética más lenta, depende de las condiciones citoplasmáticas para la difusión del Ca^{2+} . Son factores importantes para la difusión, la geometría de la célula, la presencia de moléculas solubles y sitios con afinidad por el catión. Al ser este un proceso más lento que el eléctrico es uno de los mayores determinantes de la velocidad de contracción, por lo que una disminución en la concentración de calcio liberado disminuirá el gradiente para la difusión, de modo que cualquier factor que reduzca la magnitud del Ca^{2+} liberado reducirá también la magnitud de la contracción y aportará una reducción en la velocidad de contracción.

La disposición de los RyR1 descrita anteriormente permite una activación sincrónica de los mismos y la generación de importantes aumentos localizados de la concentración de Ca^{2+} . Este aumento activa los canales adyacentes por LCIC, lo que produce la apertura rápida de muchos canales. Es también el Ca^{2+} quien promueve el cierre de los propios RyR por un mecanismo de inactivación dependiente de Ca^{2+} (Murayama y Ogawa, 2004; Simon y col., 1991) lo cual resulta de importancia cuando se estudian los eventos elementales de liberación (“chispas”) como veremos y analizaremos.

Al estudiar las células en condiciones de control de voltaje y con pigmentos fluorescentes sensibles al Ca^{2+} en su citoplasma, podemos registrar los transitorios de Ca^{2+} generados en respuesta a pulsos de voltaje. De los registros obtenidos es posible calcular el flujo de liberación de Ca^{2+} (Moles/segundo), el cual en la rana presenta dos componentes característicos. Un “pico”, al cual lo sigue el segundo que es un componente estacionario o base (Melzer et al. 1984; Shirokova et al, 1996) (Fig. 2). En 1988, Ríos y Pizarro analizaron los componentes del flujo de liberación en rana y atribuyeron los dos componentes a dos fases diferentes. El componente estacionario (base) del flujo lo atribuyen en parte al producido por canales de liberación activados por voltaje (RyR1), lo cual involucra la activación de estos por interacción directa con los DHPR. El otro componente o pico corresponde también a la activación de los RyR y sería producido por la retroalimentación generada en el mecanismo de LCIC.

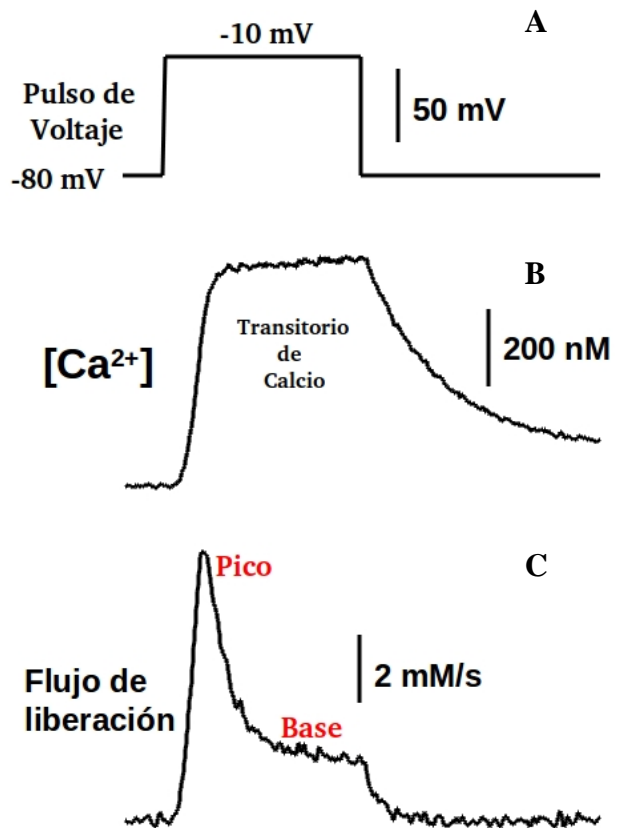


Figura 2. Registros en la doble trampa de vaselina. Registro de un transitorio de Ca^{2+} en rana (B), junto con el flujo de liberación correspondiente (C). En A mostramos el pulso de voltaje aplicado.

Con las técnicas de fluorescencia y la microscopía confocal se avanzó en la comprensión del mecanismo de liberación de Ca^{2+} en el músculo esquelético. La microscopía confocal permite detectar eventos elementales de liberación de Ca^{2+} denominados “chispas” (del inglés: sparks) (Tsugorka y col., 1995). Estas chispas se observan como aumentos localizados de la fluorescencia en las imágenes obtenidas con el microscopio confocal (Fig. 3).

Estos eventos son llamados “eventos elementales de liberación de Ca^{2+} ” en el anfibio, debido a que el transitorio global de Ca^{2+} está constituido por la superposición de eventos de esta naturaleza. El mecanismo de generación de estas chispas no es sencillo e involucra varios procesos. Estos los abordaremos en la discusión de los resultados. Las chispas en anfibio se producen espontáneamente, la señal se amplifica por LCIC y finalmente los RyRs se cierran por una inactivación dependiente de Ca^{2+} . Las chispas son el resultado de la apertura de unos 30 a 100 canales (clusters) (Kettlun et al, 2003, Ríos et al, 1999), pero de todas formas es frecuente observar eventos de larga duración y pequeña amplitud que se atribuyen a la apertura de un solo canal y que por su aspecto en los registros se compararon con una brasa en movimiento (En inglés: embers) (Shirokova y Ríos, 1997). En el mamífero fue más difícil demostrar la existencia de chispas similares a las encontradas en el músculo de rana (Zhou et al 2004, 2005; Kirsch y col. 2001; Weisleder y Ma, 2006), ya que estas no se producen espontáneamente, sin embargo se observan en células musculares en etapas tempranas del desarrollo (miotubos, in-vitro) debido a que estas últimas expresan RyR3 (Shirokova y col., 1999) y en condiciones especiales en el adulto.

A diferencia de la rana, en la rata adulta se observan fundamentalmente eventos elementales tipo “embers” (Csernoch et al, 2004; Baylor, 2005). Una condición que promueve la generación de chispas en los músculos de mamífero adulto se logra utilizando soluciones intracelulares con SO_4^{2-} como principal anión (Zhou et al 2004, 2005). El uso de estas soluciones intracelulares puso en evidencia una serie de fenómenos que involucran los mecanismos de control del canal de liberación de Ca^{2+} . En fibras de rana las chispas registradas en solución de glutamato muestran una morfología característica, siendo estas especialmente pequeñas y de gran amplitud (intensidad). Sin embargo en soluciones intracelulares con SO_4^{2-} , equivalentes a las usadas en las fibras de mamífero las chispas se tornan más anchas, de menor amplitud y

muchas veces se propagan, lo que indicaría un mayor tiempo de apertura y/o apertura de canales adyacentes por LCIC. Estas manifestaciones indican que el SO_4^{2-} afecta de alguna forma importante los mecanismos de control de los RyR lo que despertó el interés en estudiar el efecto de los aniones sobre el AEC y específicamente sobre los RyR.

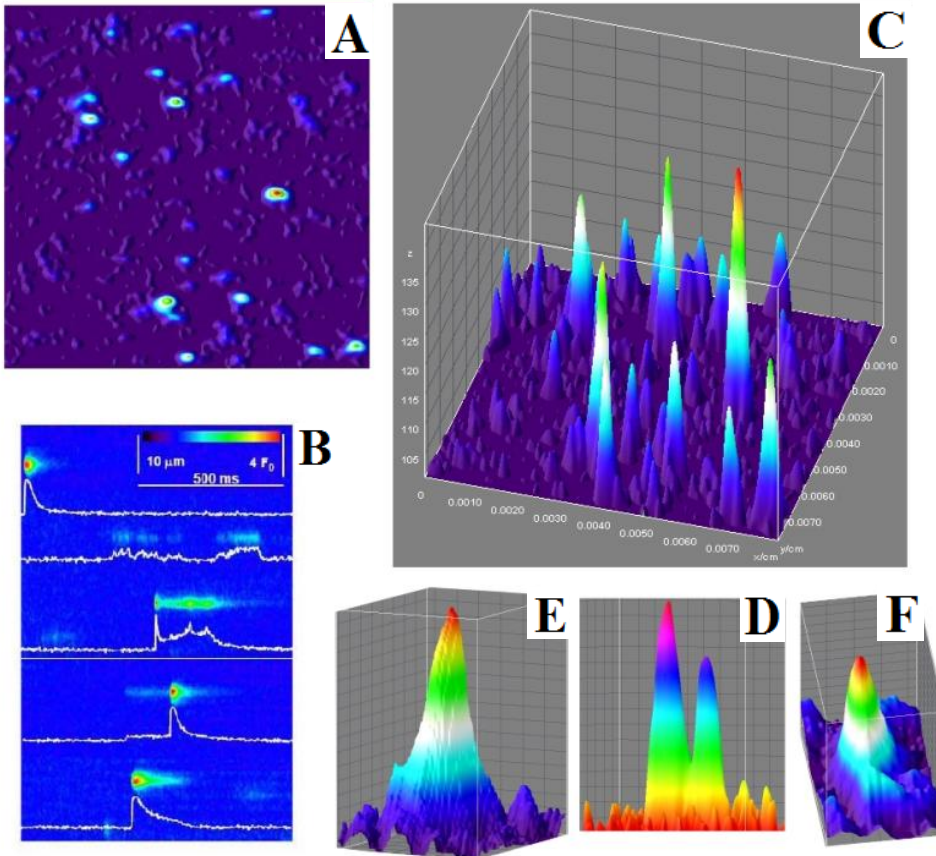


Figura 3. Imágenes ilustrativas de los eventos elementales de liberación de Ca^{2+} .

Las imágenes fueron obtenidas de músculo de rana mediante un microscopio confocal Leica Sp5 en modo “line scan”. Luego se le asigno diferentes escalas de colores según la intensidad de la luz emitida. En **A** se muestra una imagen “xt” de 512 líneas. En **B** se muestra el perfil de varias chispas y su curso temporal. **C** muestra una imagen estándar de 512 líneas con varias chispas de gran y pequeña amplitud. **D, E y F** Imagen 3D de diferentes chispas.

Al surgir el interés por la acción de los aniones, un anión de características similares al SO_4^{2-} y de gran relevancia biológica es el Pi. El Pi a nivel intramitocondrial cumple un importante rol como buffer, existiendo mecanismos específicamente diseñados para su transporte. Su acumulación en la mitocondria está vinculado con la apertura de poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), los cuales desempeñan un importante papel en la señalización en la apoptosis.

Nuestro interés principal en este anión radica como ya lo mencionamos, en que durante el ejercicio intenso, pero aún en condiciones fisiológicas este se acumula en el citoplasma como resultado de la hidrólisis de ATP logrando alcanzar concentraciones del orden de los 30 mM (Godt & Nosek, 1989). Tanto el Pi como el SO_4^{2-} difunden hacia el interior del RS logrando acumularse en este organelo. Esta acumulación,

produce la precipitación de las respectivas sales de SO_4^{2-} y Pi con el calcio libre dentro del RS, lo cual en caso del Pi podría contribuir a la reducción de la liberación de Ca^{2+} . En su conjunto estas observaciones plantean una serie de interrogantes sobre los mecanismos involucrados en el control de la liberación de Ca^{2+} . La elucidación de estas preguntas contribuirá a la comprensión de procesos fisiológicos tales como la fatiga muscular, pero también permitirá interpretar situaciones patológicas que tienen como base alteraciones de los canales de liberación de Ca^{2+} .

El efecto del Pi en el músculo ha sido observado por su acumulación dentro de las fibras musculares durante la fatiga. Se han planteado varios mecanismos por los cuales el Pi puede afectar la contracción. Se ha demostrado que el aumento de la concentración de Pi en el citoplasma disminuye la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} (Fryer y col., 1995, Godt & Nosek, 1989). También se han reportado cambios producidos por el Pi a nivel de la activación de la contracción, así mismo en preparaciones de bicapas lipídicas se observó que el Pi podría aumentar la probabilidad de apertura del canal de liberación de Ca^{2+} del RS (Fruen y col., 1994). Otra de las alternativas que ha sido considerada es que el Pi tenga un efecto inhibitorio sobre la recaptación del Ca^{2+} afectando la ATPasa del RS (SERCA) (Dawson y col. 1980). Esta inhibición determinaría un enlentecimiento de la relajación y como consecuencia debería aumentar la extrusión de Ca^{2+} hacia el exterior contrariamente a lo que se ha observado (Balnave & Allen, 1998). La inhibición farmacológica de la ATPasa del RS determina un aumento de la tensión basal durante el tétanos (ó contracción tetánica)^{*5}, en contraposición a lo observado durante la fatiga (Westerblad & Allen, 1994).

Desde el punto de vista de la acumulación de Pi, Fryer y col. en 1995, trabajaron con fibras peladas (skinned fibers) proponiendo que el principal efecto del Pi era debido a su acumulación en el RS. El Pi citoplasmático acumulado durante el ejercicio intenso podría difundir al interior del RS a través de los canales de cloro presentes en la membrana de este organelo. Esta hipótesis fue planteada por Laver y col., en 2001, quienes observaron que estos canales son permeables al Pi en preparados de bicapas.

5- La tetania es la capacidad de aumentar la fuerza de contracción mediante la estimulación repetida del músculo esquelético antes de que este tenga tiempo para relajarse (sumación temporal). Esto es posible gracias a la brevedad de los potenciales de acción. Produciéndose como resultado final de una estimulación repetida la liberación de más calcio desde el RS, provocando el consiguiente aumento de fuerza el cual será siempre mayor que el producido por una estimulación única debido al reclutamiento de mayor cantidad de miofilamentos.

Consideremos entonces que el Pi ingresa al RS, y que una de las posibles vías de ingreso son los canales de cloro. El producto de solubilidad (Kps) de la sal CaHPO₄ es aproximadamente de unos 6 mM², por lo tanto asumiendo una concentración de 30 mM de Pi y un equilibrio con el citoplasma, la concentración de Ca²⁺ libre en el interior del RS no podría superar los 0.2 mM. Según datos bibliográficos el Ca²⁺ normal dentro del RS se encuentra entre valores de 0.3 y 0.8 mM de esta forma la precipitación del Ca²⁺ y el Pi en CaHPO₄ es una consecuencia inevitable. Una baja [Ca²⁺]_{SR} libre explicaría la disminución de la contractilidad debido a una reducción en el flujo de liberación de Ca²⁺. Dutka y col. (2005) estudiaron este mecanismo cuidadosamente en fibras peladas de músculo de rata. Este estudio mostró que mediante la exposición del citoplasma a una solución que contenía cafeína y una baja [Mg²⁺] libre, combinación que es un fuerte estimulante para la liberación de Ca²⁺, se produciría la depleción del Ca²⁺ dentro del RS por una liberación masiva. En estos experimentos observaron que en presencia de 30 mM de Pi el Ca²⁺ disponible para ser liberado disminuyó, y así también lo hizo la velocidad inicial de contracción. Esto ocurre sin que el contenido total de Ca²⁺ en el RS disminuya, lo que refuerza la hipótesis de que el Ca²⁺ precipita como CaHPO₄ dentro del RS. Duke y Steele (2001) mostraron también en fibras peladas que el oxalato tiene un efecto similar al Pi. Estos autores, de la comparación de los efectos de ambos agentes, concluyeron que el Pi debe tener adicionalmente un efecto inhibitorio directo sobre el canal de liberación en contraposición con lo observado por Fruen y col., en 1994, sobre canales incorporados en bicapas como se describió anteriormente.

Launikonis y col., en 2005, midieron en fibras permeabilizadas de rana la [Ca²⁺] libre dentro del RS mediante pigmentos ratiométricos. Reemplazaron el glutamato citoplasmático por una solución que contenía 50 mM de Pi, con la cual el [Ca²⁺] libre en el interior del RS disminuye y al ser restituida la solución original de glutamato, se produce un aumento de la [Ca²⁺] libre dentro del RS. Este aumento se debería a la resolubilización del Ca²⁺ por remoción del Pi.

De estos estudios se concluye que de los efectos descritos, la precipitación del Ca²⁺ libre provocada por el Pi dentro del RS sería uno de los efectos sobre el AEC de mayor relevancia para la contracción. Sin embargo, no se conoce con detalle cómo es que este anión afecta a los componentes del flujo de liberación de Ca²⁺ o como son afectados los canales de liberación cuando se encuentran naturalmente en la membrana

del RS, donde mantienen las interacciones con otras proteínas como son la calsecuestrina, la triadina y juntina, las cuales son de suma importancia para la homeostasis del Ca^{2+} .

De los RyR que no están asociados a DHPRs, su mecanismo de activación no estaría del todo esclarecido. Se cree que existiría una activación “concertada” (Marks y col, 1998) promovida por la FKBP. El RyR presenta sitios de activación e inactivación por Ca^{2+} (Meissner, 1994), el aumento del Ca^{2+} local por encima de cierto valor crítico constituye un mecanismo de activación para estos canales, pero a su vez un aumento mayor determina su inactivación. Además de esta regulación, recientemente se ha planteado la hipótesis de que el Ca^{2+} en el interior del RS podría modular luminalmente la liberación de Ca^{2+} en forma similar a como lo hace en el músculo cardíaco (Ríos y Györke, 2009). Esta modulación del canal de liberación podría ser a través de la ocupación de un sitio de unión intrarreticular del canal o a través del Ca^{2+} que sale por el propio canal y se liga a los sitios citoplasmáticos (Laver y col., 2004). También se maneja la hipótesis alternativa de que el canal puede ser modulado por la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS a través de proteínas asociadas como calsecuestrina interactuando con la triadina (Kobayashi y col, 2000). Sin embargo un trabajo reciente en el cual se estudió la frecuencia y parámetros de chispas en función de la concentración de Ca^{2+} en el RS mostró que el efecto era muy moderado (Launikonis y col., 2006) arrojando dudas sobre este mecanismo de control.

Con el objetivo de avanzar en la comprensión de los mecanismos de control sobre los canales de liberación (RyR) nos planteamos estudiar el flujo de liberación en condiciones de control de voltaje en fibras musculares expuestas a concentraciones elevadas de Pi intracelular. Estos experimentos no habían sido realizados y permitieron analizar el efecto de este anión (Pi) sobre los componentes cinéticos de la liberación activada por la despolarización de la membrana. El preparado que utilizamos presenta la ventaja de que la membrana celular se encuentra intacta, y a su vez nos permitió dializar el medio intracelular. Además de estos experimentos en fibras de membrana intacta, también realizaremos un estudio de los efectos de diferentes concentraciones de Pi sobre las chispas, y como estos efectos se afectan o no ante la presencia de bloqueantes de los canales de Cloro.

3. Objetivos:

4.1. Objetivo General:

El objetivo general que seguimos con este trabajo es contribuir al conocimiento y a la comprensión de los mecanismos que subyacen en la fatiga muscular, específicamente los que controlan la liberación de Ca^{2+} en el músculo esquelético. Nos centraremos en esclarecer el papel que el Pi puede tener sobre la modulación de la liberación de Ca^{2+} y sobre el RyR.

4.2. Hipótesis

4.2.1. Hipótesis-1:

La precipitación del Ca^{2+} como sal de fosfato en el interior del RS disminuye la liberación de Ca^{2+} desde este organelo. En esta hipótesis se considera que el Pi entra al retículo sarcoplasmático, lo que disminuiría el Ca^{2+} disponible para ser liberado, con la consecuente disminución en la magnitud del transitorio de Ca^{2+} .

4.2.2. Hipótesis-2:

El Pi puede tener efectos directos sobre el canal de liberación tanto del lado “cis”, como sobre el “trans”. Efectos contradictorios fueron reportados por distintos autores en bicapas lipídicas, pero en las condiciones que fueron realizados dichos experimentos el canal de liberación se encuentra lejos de las condiciones fisiológicas. Por este motivo estudiamos los efectos del Pi sobre el canal en un preparado nativo, como las fibras permeabilizadas.

4.2.3. Hipótesis-3:

El Pi penetra al RS a través de canales de cloro. Se ha demostrado en bicapas que estos canales son permeables al Pi. Por lo que podría constituir una vía de entrada al retículo. Estos canales son de 2 tipos, uno de alta conductancia (BCI) y otro de baja conductancia (SCI). Para confirmar esta vía de entrada realizaremos experimentos con distintos bloqueantes del canal de cloro.

4.3. *Objetivos Específicos:*

4.3.1. *Objetivo específico 1:*

Explorar el efecto del Pi citoplasmático sobre los transitorios de Ca^{2+} y sobre el flujo de liberación de Ca^{2+} , utilizando la técnica de fibra cortada en una doble trampa de vaselina. Este preparado nos permitió evaluar efectos sobre la liberación y el flujo de Ca^{2+} , activado por pulsos de voltaje.

4.3.2. *Objetivo específico 2:*

Explorar efectos del Pi utilizando pulsos de voltaje de larga duración intentando reproducir en fibra única las condiciones observadas durante contracciones tetánicas.

4.3.3. *Objetivo específico 3:*

Describir los efectos de distintas concentraciones de Pi (ej.: 2, 5, 7,5, 10, 20, 30, 55 y 110 mM Pi) sobre los eventos elementales de liberación de Ca^{2+} (Chispas) en fibras permeabilizadas de rana, preparado en el cual estos se producen espontáneamente.

4.3.4. *Objetivo específico 4:*

Confirmar la vía de entrada del Pi al RS. Reducir la entrada de Pi al RS con bloqueantes de los canales de cloro y estudiar los efectos del Pi sobre los RyR en ausencia de efectos intrareticulares. Para ello utilizamos un derivado estilbénico (SITS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-2,2'-etilbene disulfónico) y el ácido 9-antraceno carboxílico (9 AC).

5. Metodología general

El preparado biológico es músculo de rana de la especie *Rana catesbeiana* (*Lithobates catesbeianus*). Estos sirven como modelo biológico para obtener una evaluación con las dos isoformas de RyR (RyR1 y RyR3) que se encuentran en la membrana del retículo sarcoplasmático en el músculo esquelético. Los animales se sacrificaron de acuerdo con un protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Los músculos se extrajeron por disección manual al igual que las fibras que luego se montaron en cámaras específicas según la técnica utilizada.

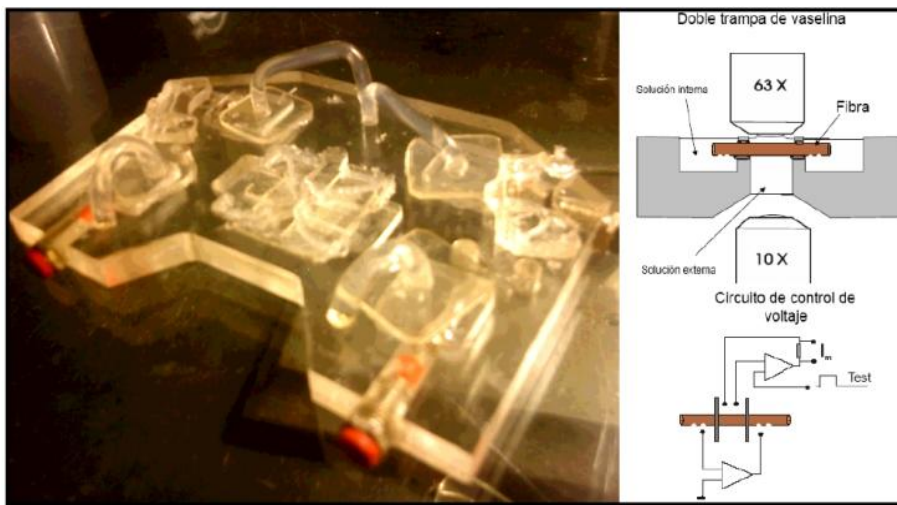


Figura 4,
Doble trampa de Vaselina.

A. Foto de una de las cámaras disponibles en el laboratorio, construida por nosotros.

B. Esquema del montaje de la fibra y del circuito para el control del voltaje.

Básicamente se utilizaron dos tipos de técnicas. La técnica de fibra cortada montada en doble trampa de vaselina en la cual las fibras son montadas según Kovacs, y col. 1983, y De Armas, y col. 1998. (Figura 4). Esta técnica nos permitió estudiar la liberación de Ca^{2+} en condiciones de control de voltaje. Las células mantienen la membrana intacta y la activación de la liberación se produce por la transmisión de la señal eléctrica por la interacción DHPR-RyR1 (fisiológica) ante cambios en el potencial de membrana producidos por pulsos de voltaje. Esta preparación además permite modificar el medio intracelular e introducir el anión (Pi) en estudio a la concentración deseada. La fibra se coloca a lo largo de 3 compartimentos sellados con vaselina. Los compartimentos laterales o externos se llenan con solución interna y la sección de fibra que permanece en este compartimento se corta o se permeabiliza para permitir el acceso al citoplasma. El compartimento medio se llena con solución externa, véase figura 4.

Para lograr un correcto control del voltaje de membrana se reducen las corrientes iónicas a través de la membrana, por sustitución de los iones permeantes en la solución externa, por iones o moléculas no permeables. Para registrar el Ca^{2+} utilizamos pigmentos fluorescentes del tipo Fluo-3.

La segunda técnica consiste en montar fibras musculares en una cámara con fondo de vidrio lo que permite su observación con un microscopio invertido. Las fibras se permeabilizaron por saponización lo cual permite acceder al medio intracelular. La saponización se estandarizó, bañando la membrana de las fibras con una solución al 0,02 % de saponina durante 1:30 minutos, y se agregó dextran al 4% en todas las soluciones internas. El pigmento fluorescente utilizado para el registro de los eventos elementales de liberación de Ca^{2+} es el Rhod-2.

5.1 Soluciones utilizadas.

Soluciones (mM)						
Solutos	Relajación	Internas para fibras permeabilizadas			Interna fibra cortada	Externa
		Referencia	Carga	110 mM Fosfato	Referencia	
K-Glut	120	110	110	-	110	-
KH_2PO_4	-	-	-	110	-	-
TEA-MS	-	-	-	-	-	110
Hepes	-	10	10	10	10	-
Tris Mal	5	-	-	-	-	5
MgCl_2	2	0.4	0.9	0.4	0.9	6
CaCl_2	-	1e-4	2e-4	1e-4	1e-4	2
3-4 DAP	-	-	-	-	-	1
9 AC	-	X ^{*1}	-	-	-	2
EGTA	0.1	1 (10) ^{*2}	1	1	10	-
ATPMg^{2+}	-	-	-	-	5	-
ATPNa_2^+	-	5	5	5	-	-
PCr	-	5	5	5	5	-

Tabla I. Soluciones. Se muestran las soluciones utilizadas durante el proyecto. La solución de relajación, la interna para fibras cortadas y la externa fueron utilizadas con la técnica de la doble trampa de vaselina. Mientras que las otras dos se utilizaron en las fibras permeabilizadas. *1- Las concentraciones de 9AC utilizadas se indican en el texto. *2- 10mM EGTA se utilizó solo en las soluciones que contenían 10 mM Cafeína. Las distintas concentraciones de Pi se lograron mezclando la solución de referencia y 110 mM Pi.

La solución externa para la doble trampa de vaselina se diseñó para reducir al mínimo las corrientes iónicas. El componente principal es metansulfonato de tetraetilamonio. Se usó 3-4 diaminopiridina para bloquear los canales de potasio. Para evitar el movimiento utilizamos BTS (N-benzyl-p- toluenesulfonamida) a 100 μ M. A las soluciones internas se les adicionó el pigmento fluorescente Fluo-3 o Rhod 2 entre 200-400 μ M y 50-100 μ M respectivamente.

Para obtener las diferentes concentraciones de Pi se realizaron mezclas en diferentes proporciones de las soluciones de referencia y 110 mM Pi, y luego se agregaba el CaCl₂ y MgCl₂ calculados. En los experimentos de doble trampa de vaselina utilizamos soluciones internas de Cs₃PO₄ y CsGlut en conjunto con las soluciones de KPO₄ y KGlut por ser el Cesio un bloqueante de las corrientes de potasio (K) y nos permite obtener mejores registros.^{*6} En los experimentos diseñados para registrar eventos elementales luego de permeabilizadas las fibras se incubaron en una solución denominada de “carga” donde el Ca²⁺ y el Mg²⁺ se mantienen elevados para recuperar el Ca²⁺ dentro del RS, luego de someter las fibras a la despolarización causada por la solución de relajación y por la permeabilización de la membrana.

La osmolaridad se promedió de mediadas del plasma de ranas, obteniendo valores de 200-240 mOsm/l, medida que se mantuvo de rutina al igual que el pH que se fijó en 7,00 +/- 0.05. Para calcular las concentraciones libres de cationes y otros iones en las soluciones se utilizó el programa Maxchelator (<http://maxchelator.stanford.edu>) el que nos permitió calcular el valor de Ca²⁺ libre entre 100-200 nM, teniendo entre 1 y 10 mM de EGTA.^{*7}

5.2. Adquisición y procesamiento de datos

Para la obtención de datos en los experimentos con la doble trampa de vaselina se utilizó una computadora equipada con una tarjeta conversora (Analog Devices HSDAS, 100kHz). Esta tarjeta adquiere las variables experimentales (corriente, voltaje, intensidad de luz) permitiéndonos además generar los protocolos de pulsos, y fijar el potencial de mantenimiento.

6 - No se utilizaron soluciones internas completamente compuestas de Cs, debido a la precipitación que el Cs realiza con el Pi en solución. Las concentraciones de Cs que utilizamos variaron entre 10 y 30 mM. Aunque mayormente se utilizaron soluciones con sales de K⁺.

7- El EGTA es un quelante con cinética lenta $k_{on}=3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off}=0.5 \text{ s}^{-1}$, que a concentraciones entre 0.1 y 10 mM no interfiere mayormente con la liberación de Ca²⁺ (Naraghi and Neher 1997).

5.2.1. Medida de los transitorios de calcio.

El registro de los transitorios en la doble trampa de vaselina se realizó por métodos fluoroscópicos convencionales. Los transitorios de Ca^{2+} se registran con el pigmento fluo-3 (Invitrogen). Antes de comenzar el experimento se esperó aprox. 30-45 min lo que permitió alcanzar en el interior celular una concentración suficiente de Fluo-3 (50 – 100 μM).

La concentración de pigmento se determinó mediante medidas de la absorbancia de la fibra a 490 nm (Harkins et al., 1993). La monitorización de la concentración del pigmento durante el experimento nos permitió evaluar el grado de recambio de la solución interna.

Se calibró el dispositivo experimental con concentraciones conocidas de Ca^{2+} y pigmento en capilares de vidrio de 160 μm de diámetro, obteniendo los parámetros necesarios para el procesamiento. Estos parámetros se obtienen de la ecuación (Shirokova et al. 1996):

$$F_{min} = F_b + 0,75 \cdot K_{min} \left(1 - e^{-\ln 10 [(\epsilon_1(\lambda) + \epsilon_2(\lambda)) D_T P]} \right) D \quad (1)$$

F_b : Fluorescencia de fondo (Background).

$\epsilon_1(\lambda)$: Coeficiente de extinción del pigmento a la luz de excitación .

$\epsilon_2(\lambda)$: Coeficiente de extinción del pigmento a la luz de emisión.

0,75: corresponde al porcentaje de volumen donde se estima que el pigmento está diluyéndose, una corrección realizada desde una fibra prismática a una cilíndrica.

D_T : concentración total de pigmento dentro de la célula.

P : Paso óptico de la luz a través de la fibra.

D : Diámetro de la fibra.

F_{min} : valor de fluorescencia mínimo para esa concentración de pigmento.

Cuando se realizó la calibración del dispositivo con el capilar de vidrio, en base a la medida de la fluorescencia en presencia y ausencia de Ca^{2+} se obtuvo el valor de K_{min} para el dispositivo y la razón de la fluorescencia máxima y la mínima.

$$Razón = \frac{F_{max}}{F_{min}}$$

Con esta determinación se calcularon F_{min} y F_{max} a lo largo del experimento en base a las medidas de concentración del pigmento realizadas a intervalos regulares. Para el cálculo de la concentración de Ca se utilizó la ecuación (2).

$$[Ca^{2+}] = Kd \frac{(F-Fmin)}{(Fmax-F)} \quad (2)$$

(De Armas y col. 1998; Brum y col., 2003 y Shirokova y col. 1996)

Esta ecuación requiere conocer la constante de disociación del pigmento para el Ca^{2+} . El Kd para el Ca^{2+} del Fluo 3 es de 325 nM en cubetas, mientras que los valores de esta constante dentro de la célula se reportaron mayores a los descritos por el fabricante, siendo aproximadamente 1.1 μ M (Shirokova y col. 1996).

Los transitorios de Ca^{2+} representan el aumento del Ca^{2+} libre que el pigmento reporta en el citoplasma. La unión del Ca^{2+} al pigmento no es instantánea por lo que hay que tener en cuenta la cinética de esta reacción. Los valores de Koff y Kon para el fluo 3 son, 90 s^{-1} y 80 $s^{-1}\mu M^{-1}$ respectivamente (Shirokova y col. 1996). De esta forma utilizando la formula 3 obtenemos el curso temporal de la concentración de Ca^{2+} .

$$[Ca^{2+}](t) = \frac{[kon^{-1} * \frac{dF}{dt} + Kd * (F - Fmin)]}{(Fmax - F)} \quad (3) \text{ (Shirokova y col. 1996)}$$

El flujo de liberación se estimó del transitorio de Ca^{2+} , realizando ajustes con un modelo de remoción (Melzer y col., 1987, Brum y col. 1988). Conociendo los parámetros de remoción es posible a partir de la derivada primera del curso temporal de la concentración de Ca^{2+} calcular el flujo de liberación.

$$\frac{dCa^{2+}}{dt} = (FL - FR) \quad FL = \frac{dCa^{2+}}{dt} + FR \quad (4)$$

FL: Flujo de Liberación

FR: Flujo de Remoción

Se ajustó el modelo de remoción a la caída del transitorio de Ca^{2+} luego de finalizado el pulso de voltaje (asumiendo que la liberación culminó). De este ajuste se estimaron los parámetros del modelo y se calculó en base a los mismos el flujo de remoción durante el pulso. Una vez conocida la remoción se aplicó la ecuación 4 para calcular el flujo de liberación.

5.2.2. Eventos elementales de liberación de calcio.

Las chispas se registraron en imágenes generalmente de 512 x 512 píxeles, obtenidas en modo “line-scan” con el microscopio confocal. (Figura 5). De esta forma se obtiene el registro de una sola línea y se la repite 512 veces en el tiempo (2.5 ms por línea a 400Hz). Colocando una línea por debajo de la anterior se obtiene la imagen en 2 dimensiones, con distancias en el eje x y tiempo en el eje y (Figura 5, A).

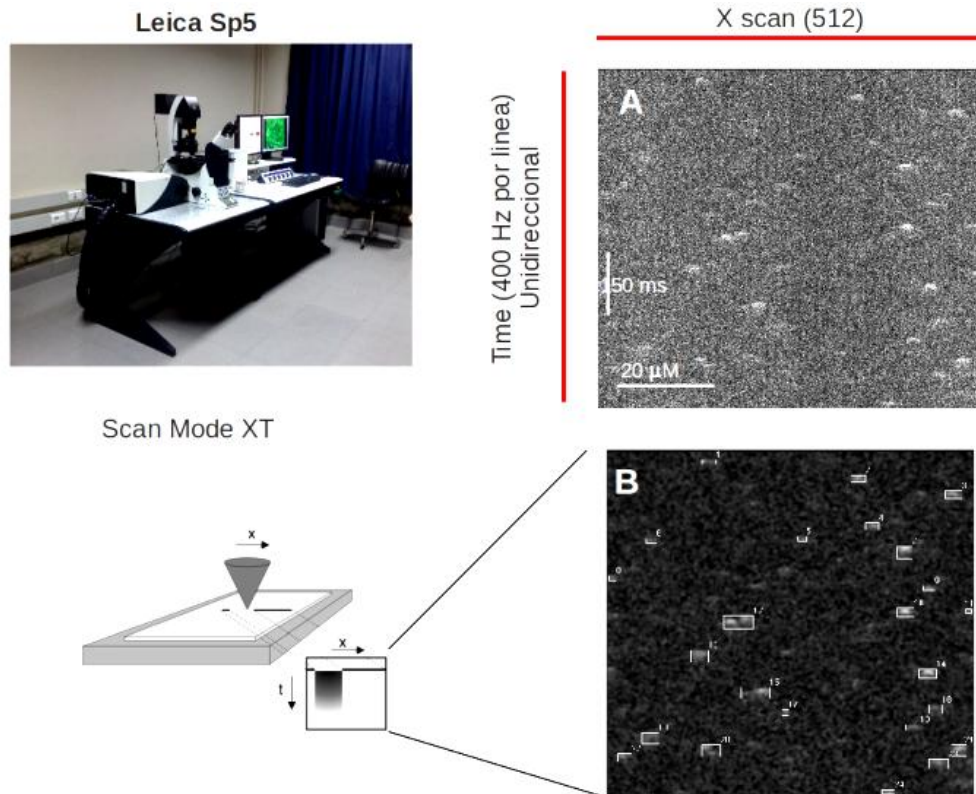


Figura 5. Microscopio Confocal. La foto corresponde al microscopio Leica SP5, de la Unidad de Microscopía Confocal de la Facultad de Medicina, UdelaR. (Uruguay-Montevideo).

En A observamos la imagen obtenida de la superposición de las 512 líneas registradas en el mismo sitio. En B, se ve la misma imagen que en A pero ahora procesada con la rutina SparkMaster donde se detectan y recuadran las chispas.

Para procesar las imágenes “xt” utilizamos la rutina desarrollada por Eckard Picht y col. en 2006, llamada SparkMaster, que corre en el programa Image-j. SparkMaster nos permite ajustar parámetros para el procesamiento, dentro de los cuales se incluye un criterio de selección según la amplitud de la chispa con respecto al ruido. Los parámetros obtenidos son tanto generales de la imagen como particulares de las chispas, también calcula la frecuencia de chispas con unidades eventos/100μm/segundo.

Los parámetros individuales de las chispas determinados fueron la amplitud, el ancho a la mitad de la amplitud total (FWHM por sus siglas en ingles: full width at half-maximum amplitude), duración a la mitad de la amplitud máxima (FDHM), ancho total, duración total, tiempo al pico, pendiente máxima de la subida, constante de tiempo de la caída de la fluorescencia (τ). Son estos parámetros los que comparamos individualmente en las distintas condiciones estudiadas.

5.3. Carga del RS con pigmentos fluorescentes.

Para experimentos donde nos interesaba medir los cambios de Ca^{2+} en el RS, utilizamos pigmentos que atraviesan la membrana, y dentro de la célula se le hidroliza el ester AM por esterasas inespecíficas obteniendo de esta forma el fluoróforo dentro de la célula (cell-permeant acetoxymethyl esters; AM). Para este trabajo utilizamos 2 pigmentos del tipo AM, el Fluo 5N y el Mag-Fluo 4. Siendo ambos pigmentos sensibles a Ca^{2+} , ambos se excitan a 490 nm y emiten con un pico entre 515 a 517 nm. El Mag-Fluo 4 tiene afinidad por el Mg^{2+} ($K_d=4,7$ mM) pero también une Ca^{2+} con menor afinidad que el Fluo-3 o 4 lo que resulta adecuado para medir Ca^{2+} cuando su concentración es alta. Las K_d para estos pigmentos con el Ca^{2+} son, 90 μM para el Fluo 5N y 22 μM para el Mag-Fluo 4. Sin embargo según Dmytro Kornyeyev y col., 2010, el K_d del Mag-Fluo 4 para el Ca^{2+} asciende a casi 1 mM (940 μM aproximadamente) de esta forma el fluo 5N seguramente in vivo posea un K_d de mayor valor que el descrito por el fabricante. Estas constantes elevadas son importantes para registrar el Ca^{2+} libre en el RS que se estima se encuentra entre 0.3 y 0.8 mM, de otra forma los pigmentos se encontrarían saturados y no podríamos observar cambios en el Ca^{2+} del RS.

Para cargar las células con Mag-fluo-4 AM se disolvió el pigmento en DMSO con 1% de plurónico y luego en 2 ml de solución Ringer o Relajación llevando la concentración final a 10 μM , luego incubamos las fibras durante unos 30 minutos a temperatura ambiente (20°C aprox.). Para extraer el pigmento que se encuentra en el citosol, saponizamos las fibras dejando aquel pigmento que se encuentra en el RS casi exclusivamente. Para cargar el Fluo 5N el procedimientos es básicamente el mismo llevando el pigmento a la misma concentración con la única diferencia, aunque no menor, de que el tiempo de carga fue de 2:30 horas también a temperatura ambiente.

6. Resultados

6.1. Efectos del Pi sobre el flujo de liberación.

Se realizaron experimentos para estudiar los efectos del Pi sobre la liberación global de Ca^{2+} en fibras cortadas.

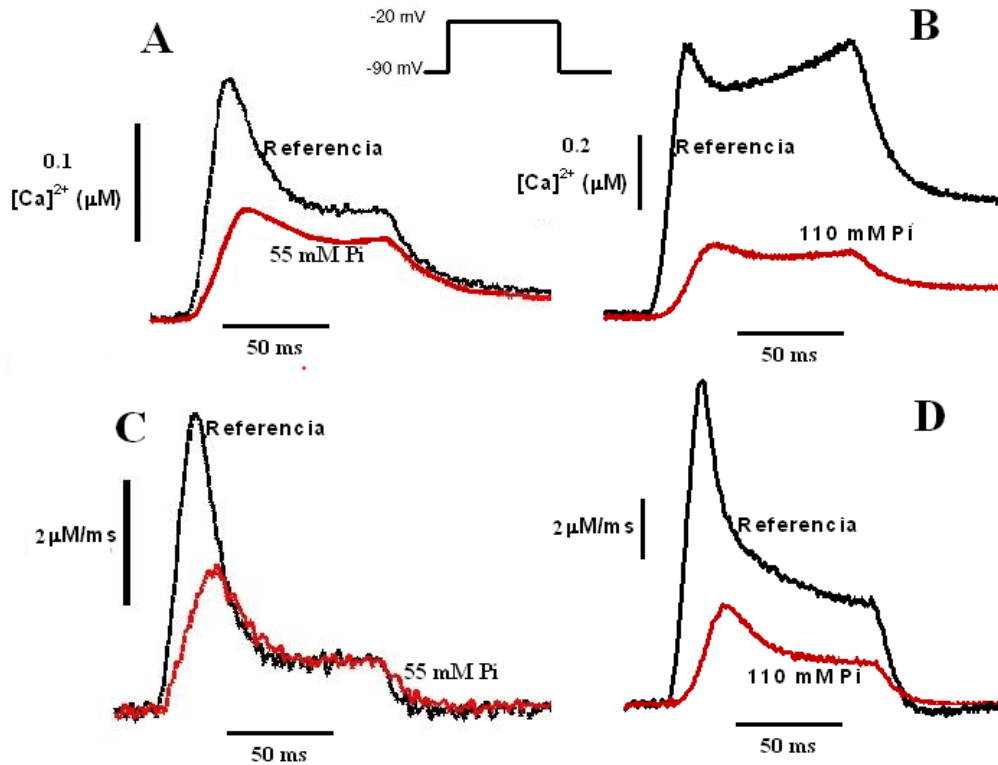


Figura 6. Efecto de reemplazar la solución interna por una solución que contiene 50 y 110 mM Pi, registros A, C y B, D respectivamente. En negro se muestran los registros obtenidos en solución de glutamato y en rojo los obtenidos en Pi luego de. Luego de transcurridos 22 y 52 minutos del cambio de solución. Los registros inferiores corresponden al flujo de liberación calculado a partir de los transitorios de Ca^{2+} . C corresponde con A y D con B. En la parte superior se esquematiza el pulso de voltaje aplicado.

En la figura 6 mostramos transitorios de Ca^{2+} (A y B) y los flujo de liberación de Ca^{2+} respectivos (C y D), obtenidos de dos experimentos que se comenzaron en solución interna de referencia (Kglut = registros negros) produciendo luego el cambio de esta a 55 y 110 mM Pi (fibra A y B respectivamente). Los registros se obtuvieron en respuesta a pulsos despolarizantes de 60 mV cuando el potencial de mantenimiento era igual a -80 mV. El cambio de solución a una conteniendo Pi se realizó cuando el pigmento alcanzó una concentración de entre 50–100 μM , suficiente para realizar los registros. Transcurrido este tiempo se realizó el cambio a Pi, luego de transcurridos 52 y 22 minutos (A y B respectivamente) se obtuvieron los registros en rojo. Se realizaron 16

experimentos cambiando la concentración de Pi de los cuales se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la figura 6. Estos resultados pueden ser interpretados en base a que la precipitación del Ca^{2+} como sal de Pi reduce la concentración de Ca^{2+} libre dentro del RS, provocando un menor flujo de liberación de Ca^{2+} .

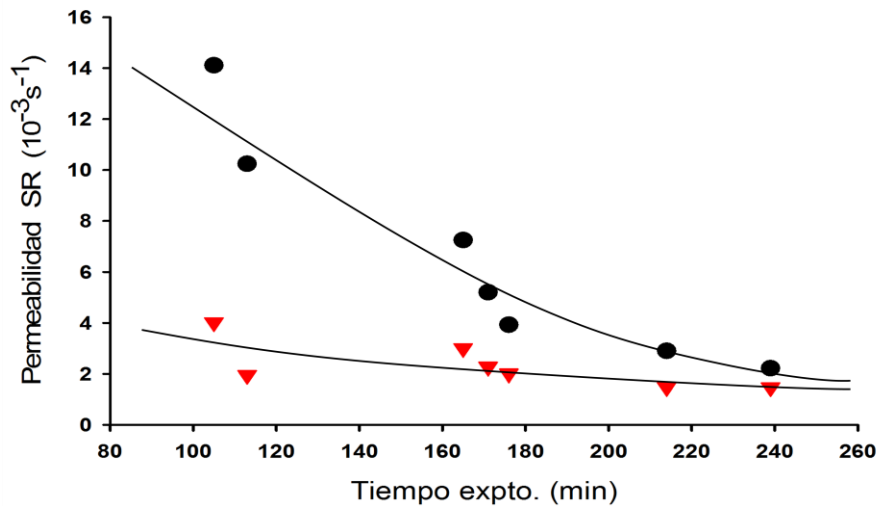


Figura 7. Efecto temporal del Pi. En la figura se muestra la variación en la amplitud del pico (círculos negros) y del componente estacionario (triángulos rojos) del flujo de liberación en pulsos a 0 mV de 100 ms de duración, luego de cambiar a una solución interna que contenía Pi. El pigmento fue cargado en solución de glutamato (referencia). Una vez alcanzada una concentración de pigmento de 50 μM se realizó el cambio a una solución conteniendo 50mM de Pi. Para el cálculo de la permeabilidad el contenido de Ca^{2+} del RS se varió de 500 a 300 μM (Schneider y col., 1987). Fibra 7529e.

De los flujos de liberación calculados podemos obtener una estimación de la permeabilidad del retículo sarcoplasmático al Ca^{2+} , para esto utilizamos el método descrito por Schneider y col., en 1987. En la figura 7, se muestra el efecto sobre el pico del flujo de liberación y sobre el componente estacionario de la permeabilidad del RS, para pulsos a 0 mV de 100 ms de duración.

Con el objetivo de evaluar posibles efectos del Pi sobre el sensor de voltaje se estudió la dependencia de la liberación de Ca^{2+} con el voltaje ya que debido a la composición de las soluciones utilizadas no es posible realizar medidas de las corrientes de carga (ver discusión). En la figura 8, representamos la magnitud del componente estacionario y del pico de los registros de flujo de liberación en función del voltaje en una fibra en condiciones de control de voltaje. En la parte A se observa la dependencia de la magnitud del pico con el voltaje de membrana durante los pulsos aplicados, así

como también la dependencia de la fase estacionaria. El Pi reduce la magnitud de ambos componentes, siendo la reducción del pico mayor que la producida sobre el componente estacionario. El efecto sobre el pico del flujo liberación alcanza una reducción promedio del 70%, siendo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Las diferencias en la fase estacionaria no son estadísticamente significativas. Los valores de los parámetros como amplitud del pico, pendiente y voltaje medio de la distribución se encuentran en la tabla I.

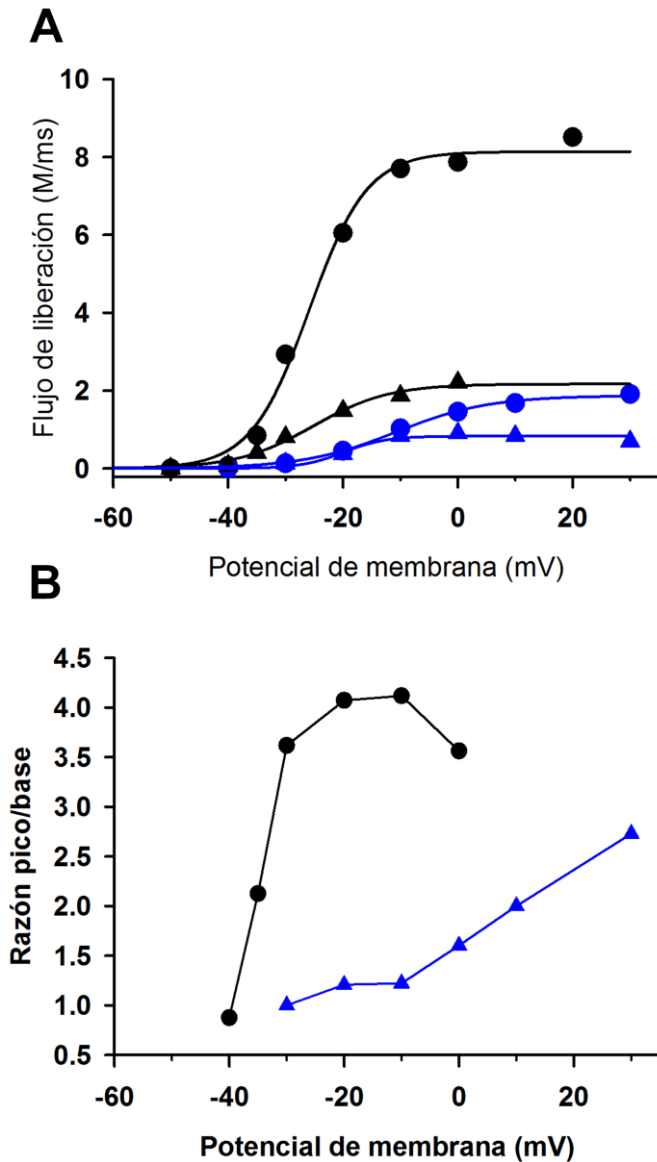


Figura 8. Efecto del Pi sobre los componentes del flujo de liberación. En A se muestra la dependencia de la amplitud del pico y del componente estacionario con el potencial de membrana. Los círculos corresponden a los picos y triángulos a la amplitud del componente estacionario (Negro = glutamato y azul = Pi) medida al final del pulso. Los parámetros del ajuste para los componentes de estado estacionario (parte A, triángulos) son, en glutamato: Amplitud= 0.25, $V_{medio} = -25.37\text{mV}$, $k(\text{pendiente}) = 6.98\text{mV}$; en solución de Pi: Amplitud= 0.058, $V_{medio} = -25.40$, $k(\text{pendiente})=5.10$. En B se encuentra la relación pico/base. Fibra 7541e. Los registros corresponden al cambio de solución interna de referencia (Kglut) a una solución que contenía 50 mM de Pi.

En la figura 8 parte B se graficó la dependencia de la relación pico/base con el voltaje en las dos condiciones. En presencia de Pi la relación pico/base se hace monótona creciente.

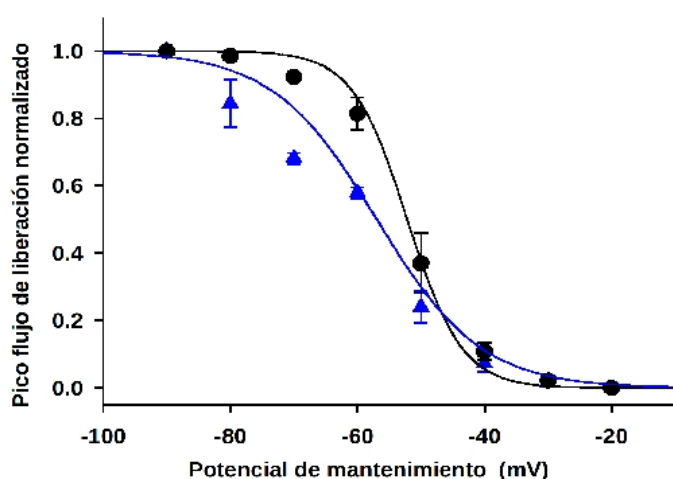


Figura 9. Curvas de inactivación del Flujo. Las curvas corresponden a la dependencia que tiene la inactivación del flujo de liberación con el voltaje de membrana. Los parámetros obtenidos del ajuste se encuentran en las tablas II y III. No existiría diferencia significativa entre los parámetros de las fibras en glutamato y Pi (al menos para este “n”). Excepto para la pendiente de la curva que muestra ser menor en presencia de 50 mM Pi.

En la figura 9, se muestran curvas de inactivación del flujo de liberación. Los parámetros de los ajustes se presentan en la tabla I y II. Para este conjunto de fibras se ve una invariabilidad en el voltaje de media distribución para la curva sigmoidea ajustada, sin embargo se verificó una disminución en la pendiente de la curva en presencia de Pi.

A modo de breve resumen podemos deducir que concentraciones de 50 mM o mayores a nivel citoplasmático, logran ingresar al retículo sarcoplasmático, produciendo la precipitación del Ca^{2+} libre en su respectiva sal (CaHPO_4).

Fibra	Glutamato			Fosfato			Efecto sobre pico
	Pico (mM/s)	V medio (mV)	Pendiente (mV)	Pico (mM/s)	V medio (mV)	Pendiente (mV)	
7541	8.13	-25.9	5.04	1.87	-10.8	8.16	-77%
7543/44	23.84	-22.7	2.94	8.87	-28.22	8.9	-63%
7545	5.61	-26.92	6.53	1.67	-30.3	4.27	-70%
Media	12.53	-25.14	4.84	4.14	-23.11	7.11	-70%
Error estandar	5.7	1.25	1.04	2.37	6.18	1.44	4%

(*) $P = <0.001$

TABLA I. Se muestran los parámetros obtenidos del ajuste de una función de Boltzmann a la dependencia de la activación del flujo de liberación de calcio con el voltaje. Las fibras promediadas se obtuvieron como se muestran en la figura 8, A. Se midió la amplitud del pico del flujo de liberación en función del potencial del pulso test. Siendo la de la amplitud en el pico del flujo el único valor que varío significativamente. La amplitud del componente estacionario no presento grandes variaciones (no se muestra). Valores obtenidos a 50 mM Pi.

Fibra	Glutamato		Fosfato	
	V medio (mV)	Pendiente	V medio (mV)	Pendiente
7541	-54.85	4.72	-53.06	8.45
7543/44	-54.18	4.59	-62.7	8.24
7545	-47.5	4.59	-55.15	7.87
Media	-52.15	4.63	-56.97	8.18 (*)
Error estándar	1.66	0.04	2.07	0.12

(*) $P = <0.001$

TABLA II. Parámetros de las funciones de Boltzmann ajustadas a las curvas de inactivación estacionaria para el flujo de liberación, correspondientes a lo mostrado anteriormente en la figura 9. La única diferencia significativa entre los parámetros de los ajustes de Referencia y 50 mM Pi, es la pendiente, la cual es de menor amplitud en Pi.

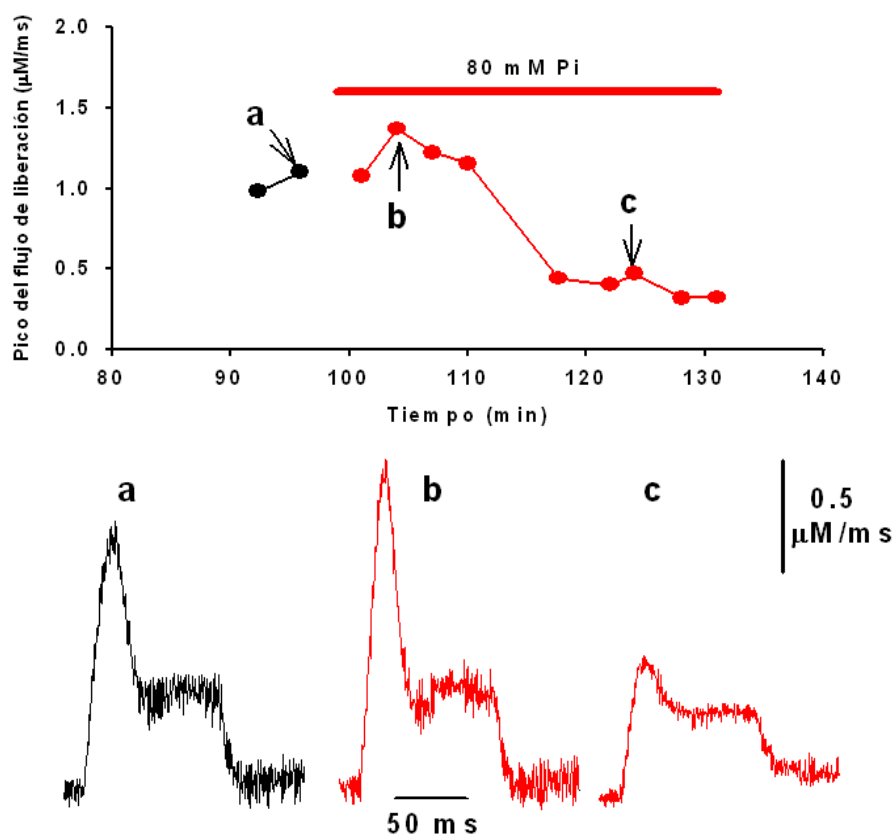


Figura 10. Curso temporal de la instalación del efecto del Pi. Se grafica la amplitud del pico del flujo de liberación en función del tiempo del experimento. Se observa una potenciación luego del cambio de la solución interna de glutamato a una conteniendo 80 mM Pi. B) Flujos de liberación correspondientes a diferentes tiempos a distintos tiempos. Las letras indican los puntos correspondientes en A.

En la figura 10, se muestra el curso temporal de los cambios en los flujos de liberación en un experimento en el cual se aplicó una solución conteniendo 80 mM Pi. Se aplicaron en forma regular pulsos de igual amplitud luego de sustituir la solución interna. Se observa una potenciación inicial del pico para luego reducirse progresivamente. Este resultado sugiere un efecto potenciador de bajas concentraciones del Pi (ver más adelante).

6.2. Efectos del Pi sobre pulsos de larga duración.

Exploramos el efecto del Pi citoplasmático sobre los transitorios de Ca^{2+} y sobre el flujo de liberación de Ca^{2+} , en respuesta a pulsos de voltaje de larga duración con la intención de reproducir en fibra única condiciones similares a las que se observan durante contracciones tetánicas producidas en protocolos de fatiga.

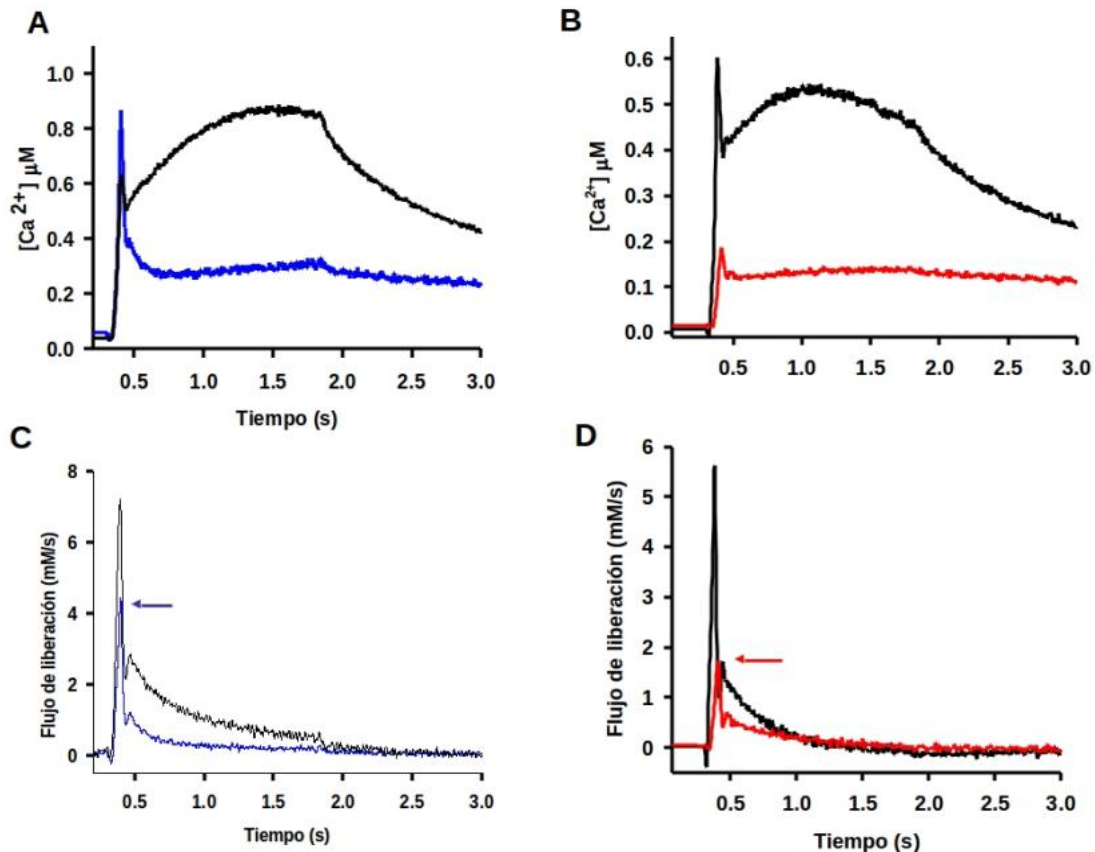


Figura 11. Transitorios de Ca^{2+} y flujos de liberación para pulsos de 1.5 s de duración. A y C corresponden a la misma fibra (7540e) y B y D a otra fibra (7543e). En color se identifican los registros en soluciones con Pi. En ambas fibras el Pi reduce el pico del flujo de liberación (flechas). Se observa que la segunda fase es también de menor amplitud.

En la figura 11, observamos transitorios de Ca^{2+} y los flujos de liberación calculados cuando aplicamos pulsos despolarizantes de larga duración (1,5 seg). Se muestran 2 fibras diferentes A y B y sus transitorios de Ca^{2+} , en C y D los flujos de liberación respectivos. La fibra A de la figura se comenzó en solución de referencia, una vez alcanzada una concentración de pigmento suficiente, la solución interna se sustituyó por solución interna de KH_2PO_4 con las mismas concentraciones iónicas y de pigmento, correspondiendo los primeros registros a solución de referencia y los demás a concentraciones Pi. La parte B muestra un experimento similar en otra fibra.

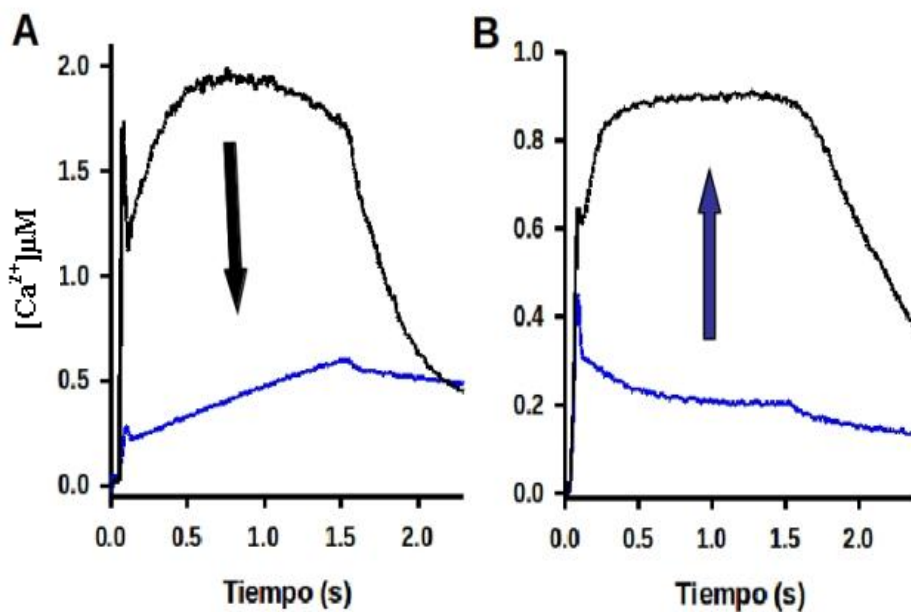


Figura 12, Reversibilidad del efecto del Pi. A y B son al igual que como se mostro en la figura 11 2 fibras que se realizaron con protocolos experimentales opuestos para observar la reversibilidad del efecto de Pi. La fibra A se comenzó en Kglut y luego se paso a Pi y la fibra B se comenzó en Pi y luego se cambio a Kglut. $[\text{Pi}] = 50 \text{ mM}$. Las flechas indican el efecto del cambio de solución. El registro en solución de referencia de la fibra B, posee una meseta que probablemente corresponda a la saturación del pigmento. .

En la figura 12, se aprecian 2 fibras sometidas a pulso despolarizantes de larga duración, donde queda en manifiesto que el efecto producido por el Pi es reversible. En la fibra A se comienza el experimento en solución de referencia y luego se cambia a una solución con 50 mM Pi y en la fibra B se realiza la operación contraria, comenzándose en solución interna con 50 mM Pi y luego cambiándose a solución de referencia.

6.3. Efectos del Pi sobre los eventos elementales (Chispas).

Con el objetivo de obtener información sobre los efectos del Pi sobre los canales de liberación en forma más directa estudiamos el efecto del Pi sobre los eventos elementales de liberación (Chispas). La preparación de fibra permeabilizada permite controlar la concentración de Pi citoplasmática. En la figura 13, se muestra como la frecuencia de aparición de eventos cambia en función de las concentraciones de Pi. Se realizaron series de 10 imágenes cada una en modo “xt”. Las barras corresponden a la cuantificación de la frecuencia promedio en cada serie. En esta figura también mostramos el protocolo normal utilizado para la evaluación de los efectos del Pi, donde siempre se intenta volver a solución de referencia para poder observar el estado de la célula antes y luego de la aplicación.

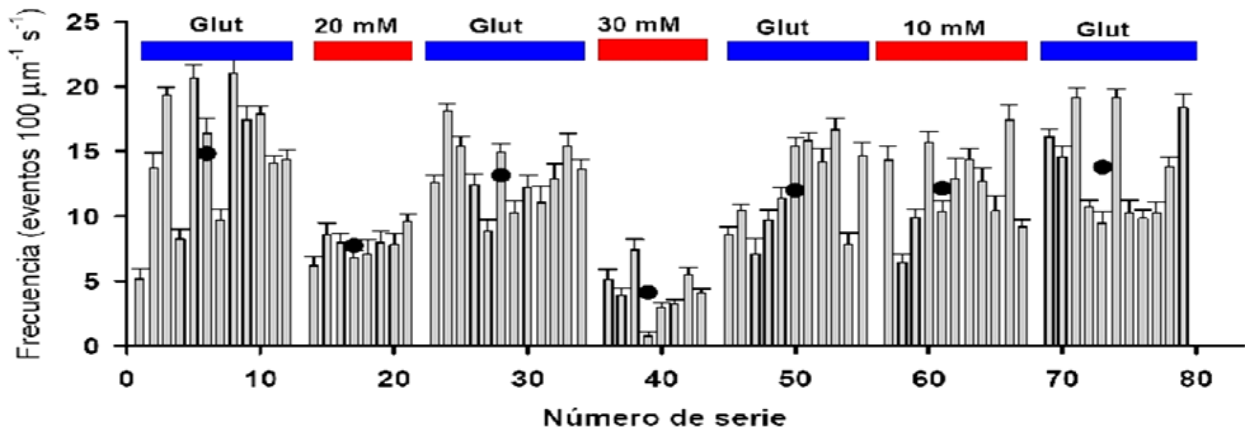


Figura 13. Transcurso de un experimento normal. Efecto de Pi sobre la frecuencia de aparición de chispas. Medida de la frecuencia de eventos en una fibra expuesta a 3 concentraciones de Pi (barras rojas) en forma alternada. Entre concentraciones sucesivas se lavó el Pi pasando solución de referencia (barras azules). Los círculos indican el promedio de la frecuencia a esa concentración. Los errores de las barras corresponden a los errores estándar en cada medida.

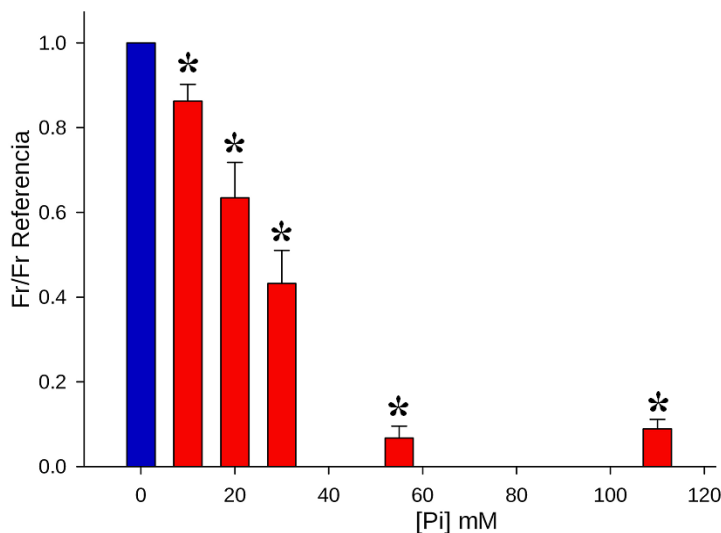


Figura 14. Efecto de Pi sobre la frecuencia de eventos. Se normalizó la frecuencia a su valor en referencia de glutamato (barra azul). Otros parámetros de los eventos se muestran en la Tabla III.

(*) Resultados estadísticamente significativos

En la figura 14, se muestra como la concentración de Pi afecta la frecuencia de aparición de chispas. Estos resultados se obtuvieron de varios experimentos donde se usaron alternativamente concentraciones de 10, 20, 30, 55 y 110 mM Pi a nivel citoplasmático. Como se aprecia existe una clara dependencia de la frecuencia de chispas con la concentración de Pi citoplasmático.

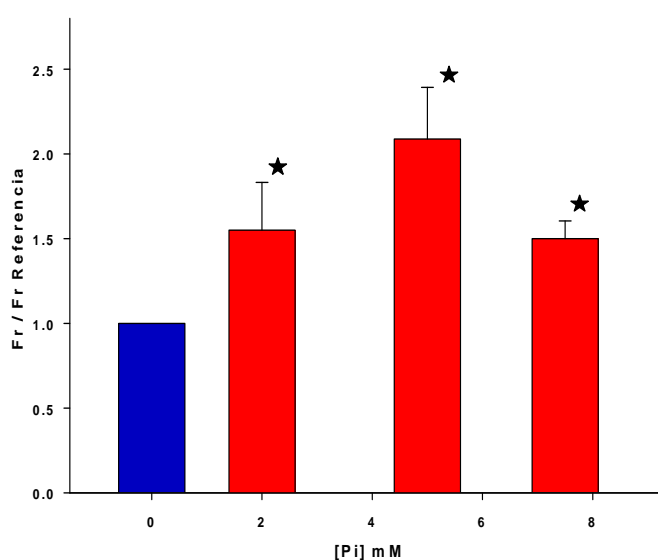


Figura 15. Efecto de bajas [Pi] sobre la frecuencia de eventos. Efecto del Pi sobre la frecuencia de aparición de eventos, los cuales fueron normalizados a la frecuencia en referencia de glutamato (barra azul). Otros parámetros en Tabla III. (★) Resultados estadísticamente significativos

Considerando estos resultados, el efecto del Pi citoplasmático en concentraciones de 10 mM a 110 mM produce una disminución de la frecuencia de aparición de las chispas.

El aumento de la probabilidad de apertura de canales individuales ante concentraciones bajas de Pi fue descrita previamente en preparados de bicapas lipídicas por Fruen y col., en 1994. En la figura 15 se mostramos como las concentraciones de 2, 5 y 7,5 mM Pi aumentan la frecuencia de aparición de chispas en preparados nativos.

Otros parámetros para estas chispas, se muestran en la tabla III. Los valores promedios para la chispa en referencia son: Frecuencia 13.4 eventos/100 μ m.s +/- 2.07; Amplitud 0.800 F/F0 +/- 0.113; FWHM 2.250 μ m +/- 0.111; FDHM 19.6 ms +/- 1.01; Ttp 10.81 ms +/- 0.464; $\Delta(F/F_0)/s$ 10.815 FI.U/s +/- 0.464; Tau 19.735 ms +/- 1.00. Estos valores fueron obtenidos del promedio de más de 25000 chispas.

[Pi] mM	Frecuencia (valor P)	Amplitud (valor P)	FWHM (valor P)	FDHM (valor P)	Ttp (valor P)	$\Delta(F/F_0)/s$ (valor P)	Tau (valor P)	(n)
0.0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	45
2.0	1.594 (0.031)*	1.032 (0.767)	1.066 (0.226)	1.045 (0.263)	1.036 (0.478)	1.006 (0.946)	1.012 (0.688)	6
5.0	2.0873 (0.003)*	0.943(0.311)	1.096 (0.722)	0.953 (0.477)	0.936 (0.412)	0.934 (0.301)	1.778 (0.422)	8
7.5	1.450 (0.041)*	1.200 (0.537)	0.972 (0.406)	1.018 (0.676)	1.005 (0.874)	1.215 (0.528)	0.896 (0.292)	3
10.0	0.863 (0.039)*	1.016 (0.783)	0.958 (0.192)	0.939 (0.044)*	0.972 (0.118)	1.001 (0.989)	0.926 (0.096)	4
20.0	0.634 (0.048)*	0.969 (0.203)	0.953 (0.205)	1.002 (0.825)	1.012 (0.063)**	0.958 (0.043)*	0.9807 (0.618)	3
30.0	0.4326 (<0.001)*	1.028 (0.678)	0.842 (<0.001)*	0.864 (0.002)*	0.924 (0.075)**	1.051 (0.522)	0.820 (0.004)*	13
55.0	0.067 (<0.001)*	0.845 (0.402)	0.7115 (0.035)*	0.774 (0.034)*	0.828 (0.065)**	0.853 (0.358)	0.643 (0.018)*	4
110.0	0.089 (<0.001)*	0.329 (0.031)*	0.715 (0.041)*	1.700 (0.048)*	2.089 (0.027)*	0.303 (0.030)*	1.987 (0.020)*	3

Tabla III. Parámetros para las chispas en diferentes concentraciones de Pi. Los experimentos fueron realizados como se mostro anteriormente en la figura 13, intentando realizar lavados luego de cada aplicación de Pi. Los parámetros se normalizaron al valor de referencia. La significación estadística fue realizada con Test de T pareados para cada concentración de Pi empleada. * indica los valores que arrojaron valores de P estadísticamente significativos. ** Indica aquellos que estuvieron cerca de ser significativos. Valor de P para significación estadística < 0.050. (n) Corresponde al número de fibras estudiadas.

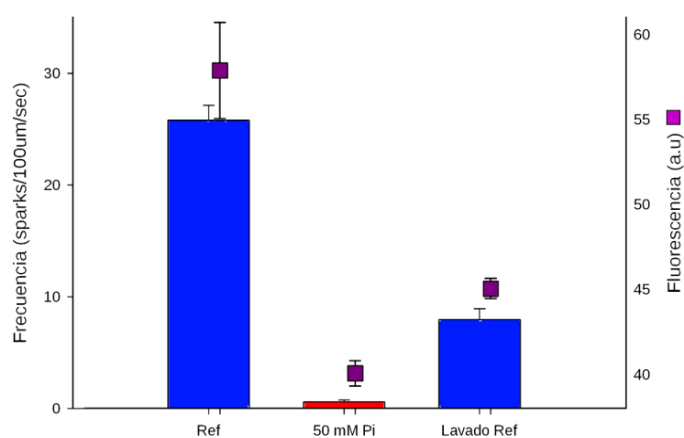


Figura 16. Frecuencia de chispas y Ca^{2+} en el RS. Representamos uno de los experimentos donde se registraron paralelamente Ca^{2+} dentro del RS como chispas a nivel citoplasmático. Las chispas disminuyen conforme disminuye el Ca^{2+} en el RS. n=4 (fibras)

Este efecto sobre la frecuencia podría deberse a la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el RS. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis realizamos experimentos con el pigmento fluorescente Fluo 5-N AM. Luego de cargar la fibra con el pigmento se permeabilizó la membrana celular, de forma que el pigmento que se encontraba en el citoplasma fuera en su mayor parte removido por los cambios de solución. Los cambios que observen serán exclusivamente provenientes de la fluorescencia emitida dentro del RS detectando el Ca^{2+} libre dentro de este organelo. En

la figura 16 mostramos un experimento donde se registraron simultáneamente la fluorescencia dentro del RS con Fluo 5-N y chispas con Rhod 2 en el citosol. En esta figura podemos observar como el Pi baja la fluorescencia en el RS y a su vez también descendiendo la frecuencia de chispas y como ambos se recuperan al lavar el Pi.

En la Figura 17 se observa el curso temporal de uno de los experimentos donde se aplicó una concentración de 50 mM de Pi en una fibra cargada con Fluo-5N. Para estos experimentos donde no conocemos la concentración de pigmento dentro del RS, se midió la fluorescencia luego de aplicar 10 mM cafeína en presencia de 10 mM EGTA para estimar la fluorescencia mínima (RS deplecionado). (La combinación de altas concentraciones citoplasmáticas de un amortiguador del Ca^{2+} y un estimulante de los RyR como la cafeína determina el vaciamiento completo del RS). Este procedimiento se realizó en todos los experimentos de este tipo y los cambios fueron normalizados como porcentaje de la variación máxima producida en cafeína. Los valores de fluorescencia para la normalización con la aplicación de cafeína no variaron significativamente en unidades arbitrarias entre varias fibras y el valor es 27.04 con un error estándar de 2.25 (n=19).

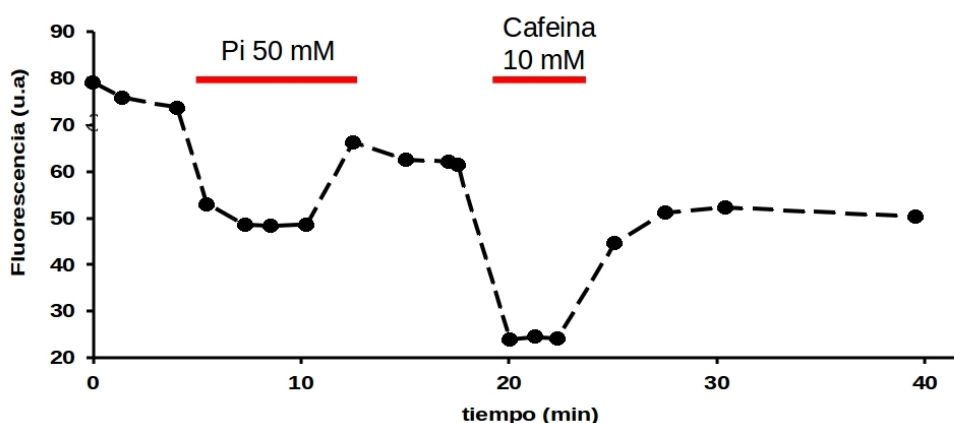


Figura 17. El Pi reduce la fluorescencia del RS. Se muestra un experimento en una fibra donde se registró la fluorescencia emitida por el Fluo 5N que se encuentra libre dentro del RS. La concentración utilizada de Pi fue de 50 mM. Como se carece de calibración para estos experimentos se realiza el vaciado del RS con 10 mM Cafeína para obtener los valores de fluorescencia basal.

El Pi reduce la $[Ca^{2+}]$ en el RS

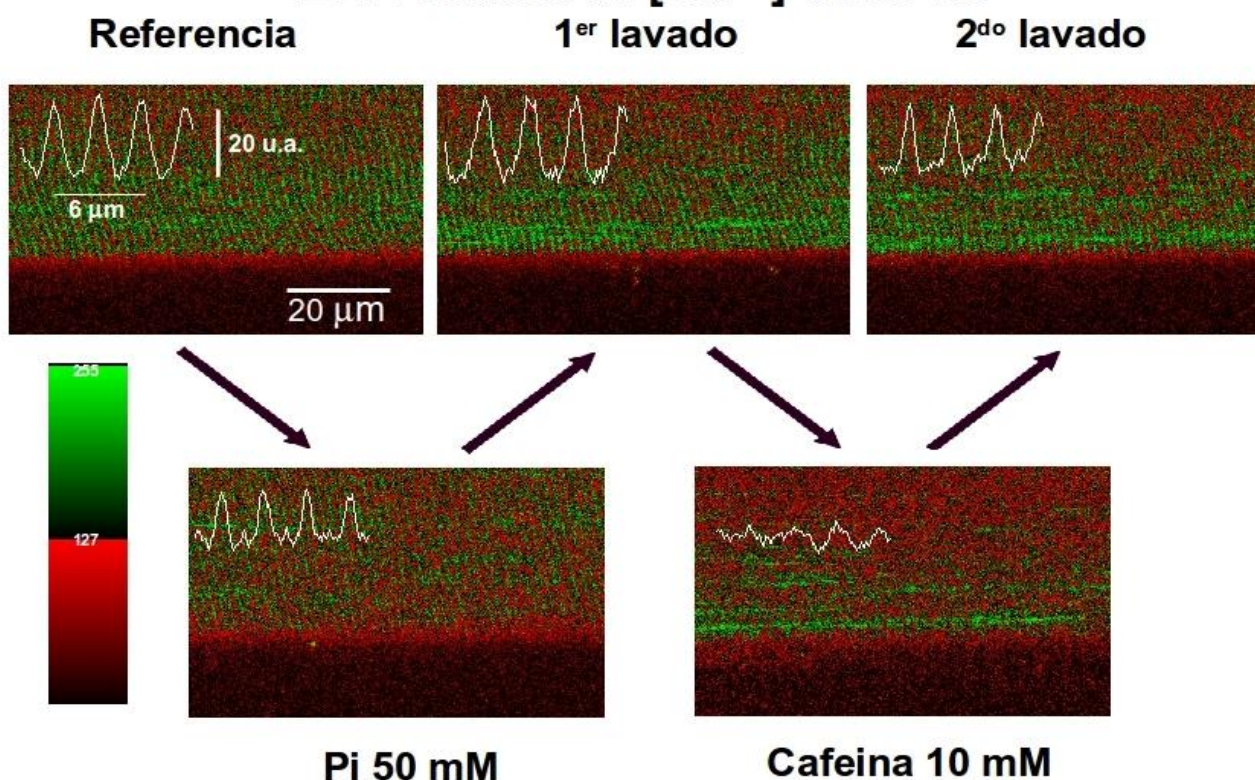


Figura 18. Registros de fluorescencia en el RS. Las imágenes muestran los perfiles medidos en una fibra cargada con Fluo 5N AM a la cual se le aplico una concentración citoplasmática de 50 mM de Pi y luego Cafeína 10 mM con los respectivos lavados. La morfología del perfil de fluorescencia muestra el característico bandeado que se correlaciona con la distribución de las cisternas terminales del musculo esquelético. Se adjunta la misma imagen de mayor tamaño en el Anexo 1.

En la figura 18 mostramos el perfil de distribución de la fluorescencia que se corresponde con el de las cisternas terminales de la fibra muscular. Se observa la disminución de la fluorescencia en ellas al aplicar 50 mM Pi o 10 mM cafeína. Esta imagen confirma la localización del pigmento dentro del RS ya que durante la aplicación de cafeína este bandeado desaparece.

En la figura 19 representamos los cambios en la fluorescencia producida probablemente por precipitación del Ca^{2+} en el RS en presencia de diferentes concentraciones de Pi. Para estos experimentos se realizaron cambios de soluciones aplicándose diferentes [Pi] citoplasmáticas con lavados entre ellas con solución de referencia. Como mencionamos anteriormente en todos los casos se aplicó cafeína 10 mM al final para determinar la fluorescencia remanente. Los valores de la figura también se incluyen en la tabla IV. Obsérvese como la fluorescencia disminuye conforme el Pi citoplasmático aumenta.

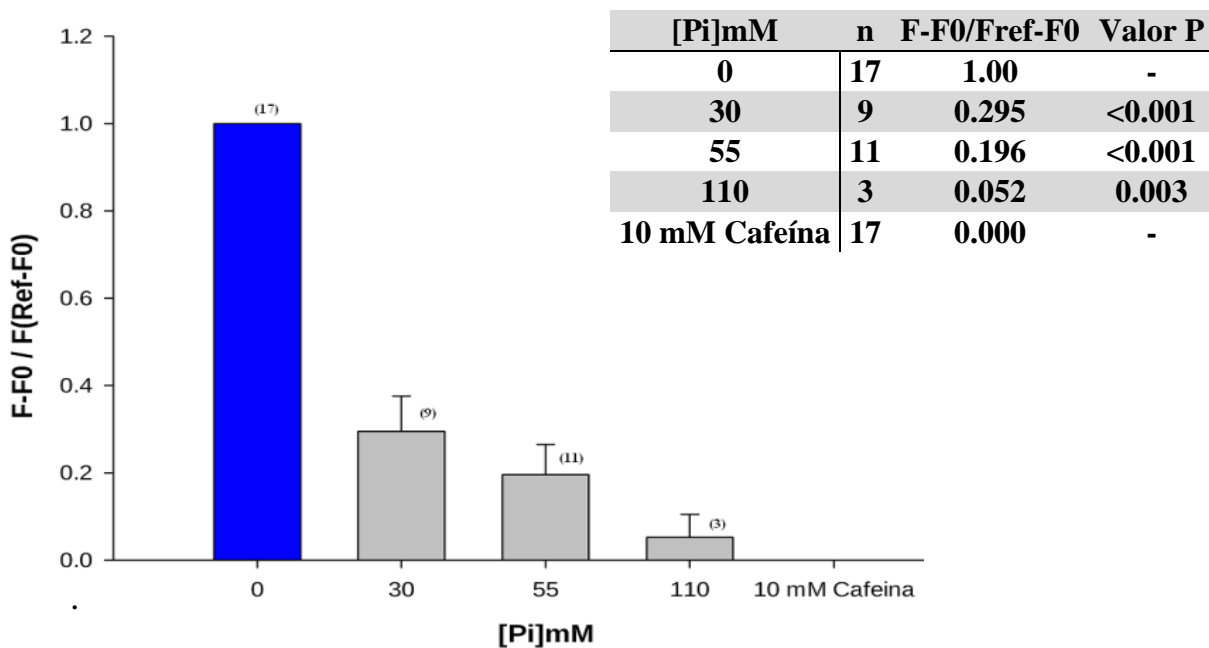


Figura 19 y Tabla IV. Fluorescencia del RS en función de la concentración de Pi citoplasmática. En la figura se grafica los valores de fluorescencia emitida por el fluoroforo Fluo 5N y sus errores estándar normalizados por la fluorescencia tras la aplicación de cafeína. En la tabla se muestran los valores de la grafica con el valor P. Para la significación estadística, se realizaron Test de T pareados. Las 3 concentraciones de Pi tienen efectos estadísticamente significativos.

6.4. *El bloqueo de los canales de Cl del RS impide los efectos del Pi.*

Con el objetivo de confirmar la hipótesis de que el Pi penetra al RS a través de canales de cloro realizamos experimentos con bloqueantes de estos canales como el ácido 9 antracencarboxílico (9AC) y ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-2,2'-estilbene disulfónico (SITS). Además de estos 2 bloqueantes realizamos pruebas con otros 2 bloqueantes de los canales de cloro, el ácido 4,4'-di-isotiociano-2,2'-disulfónico (DIDS) y el ácido Niflúmico (NFA). Tanto el DIDS como el NFA no son adecuados para su utilización en experimentos donde el objetivo es observar efectos y/o eventos en los cuales se involucra a los RyR, ya que ambos presentaron una estimulación importante e irreversible de estos canales. Por este motivo debemos en primera instancia evaluar los bloqueantes que utilizaremos y la concentración que debemos aplicar. Las figuras 20 y 21 muestran los efectos de distintas concentraciones de SITS y 9AC (respectivamente) sobre la frecuencia de chispas.

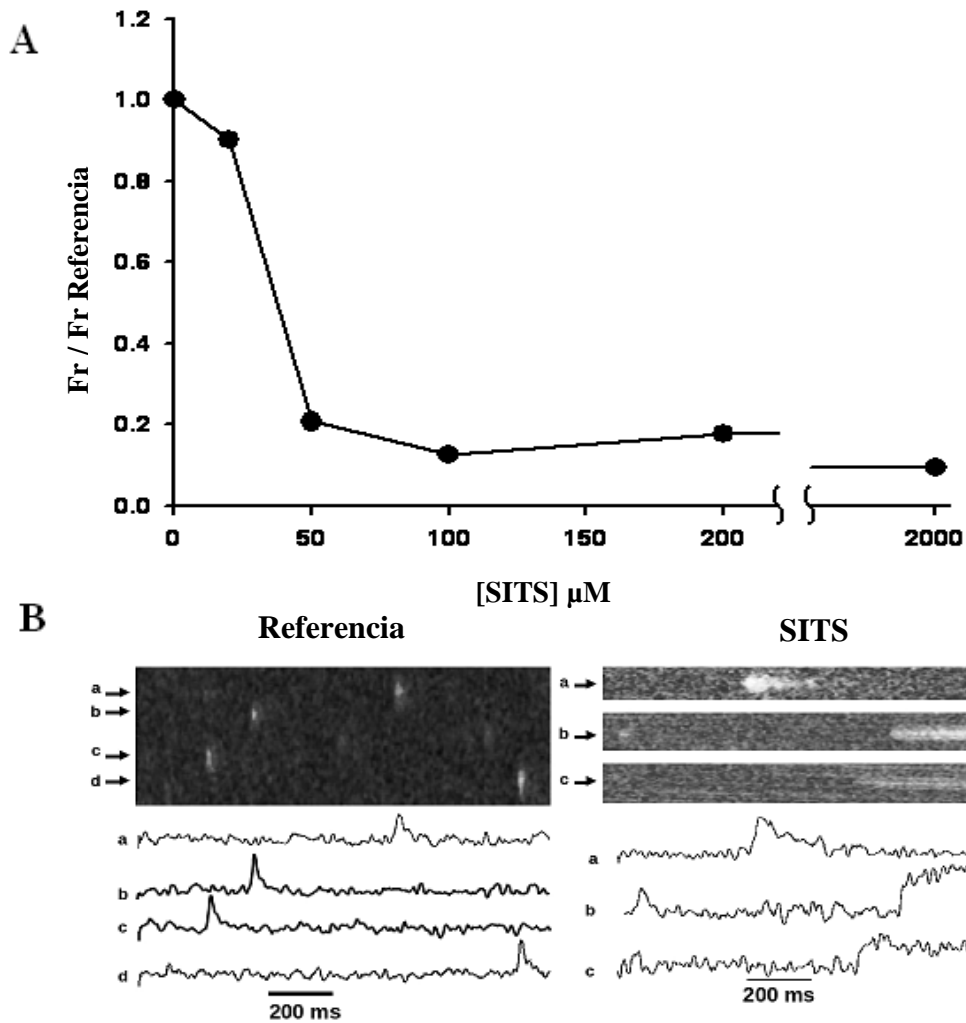


Figura 20. Efecto del SITS sobre la frecuencia de chispas. A. Curva de frecuencia de eventos en función de la concentración de SITS obtenida de 3 fibras. **B.** A altas concentraciones se observan eventos de larga duración al permanecer los canales de liberación abiertos por la estimulación del bloqueante.

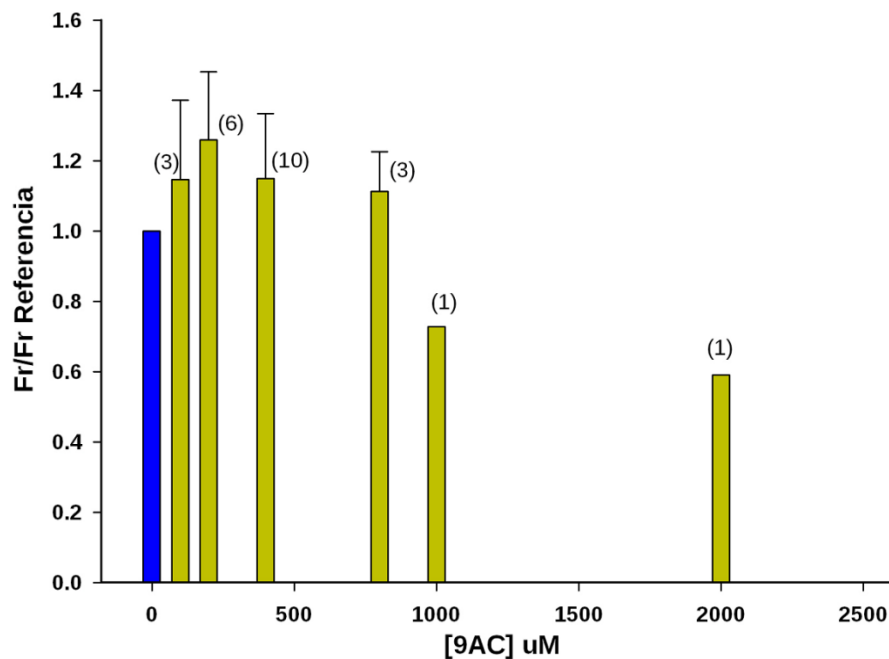


Figura 21. Efecto del 9AC sobre la frecuencia de aparición de chispas. Curva en función de la concentración de 9AC. El número encima de la barra indica el número de fibras de los cuales fueron promediados los valores.

Utilizamos el 9 AC a 400 μM , ya que esta concentración no produce una estimulación importante sobre las chispas. El leve aumento que produce 400 μM sobre la frecuencia de chispas fue normalizado sobre la respectiva frecuencia en 400 μM 9AC para poder comparar los efectos del Pi, entre estas fibras y las que no poseen 9AC.

[9 AC] μM	Fr/Fr Referencia	Valor P	n
100	1.1465	0.582	3
200	1.2597	0.238	6
400	1.1489	0.221	8
800	1.1135	0.494	2
1000	0.729	--	1
2000	0.5909	--	1

Tabla V. Efecto del 9AC sobre la frecuencia de aparición de chispas. El aumento de la frecuencia no es significativo. Esto puede deberse a la gran variabilidad observada en estos experimentos. (n) indica el número de fibras.

En la figura 22 se muestra como varia la frecuencia de chispas según las distintas concentraciones de Pi en el citoplasma en presencia de 400 μM 9AC.

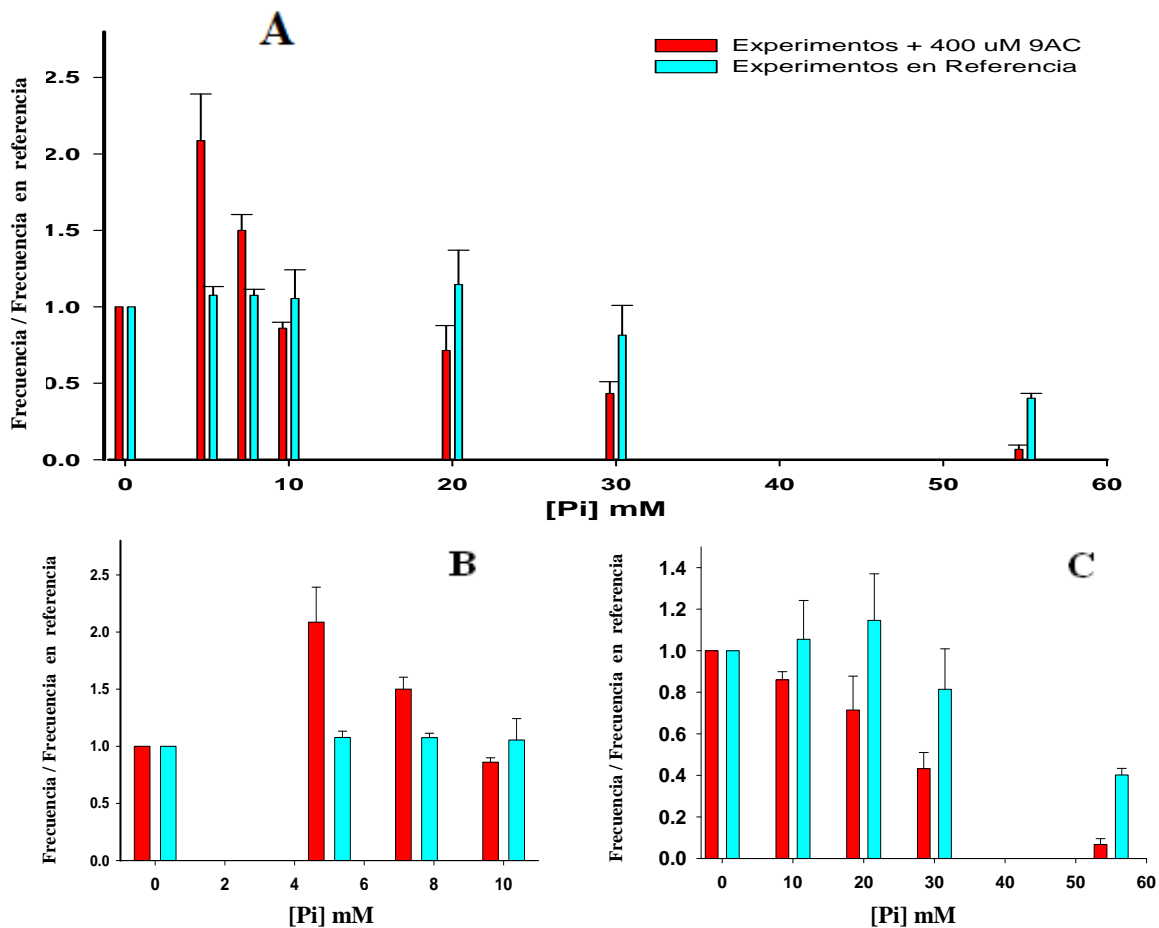


Figura 22. Frecuencia de chispas en soluciones con 400 μM 9AC. A mostramos todas las concentraciones incluso aquellas que no disminuyen la frecuencia de chispas como 5 y 7,5 mM Pi. B. Se muestra como el 9AC interfiere con la estimulación que el Pi produce sobre el RyR. C. Concentraciones en las que el Pi reduce la frecuencia de chispas. Obsérvese que el 9AC retarda la entrada de Pi al RS, produciendo un desplazamiento de la curva hacia la derecha.

En la Tabla VI se presentan los parámetros de las chispas registradas a diferentes concentraciones de Pi cuando se ha incorporado 400 μ M 9AC para bloquear los canales de cloro. Y en la tabla VII se compara la frecuencia de chispas en ausencia y presencia de 400 μ M 9AC. Se realizaron Test de T, para muestras independientes, siendo significativas las diferencias.

[Pi] mM	Frecuencia (Valor P)	Amplitud (Valor P)	FWHM (Valor P)	FDHM (Valor P)	TtP (Valor P)	$\Delta(F/F_0)/s$ (Valor P)	Tau (Valor P)	n
5	1.076 (0.246)	1.020 (0.701)	0.991 (0.469)	1.007 (0.100)	1.005 (0.754)	1.020 (0.740)	0.988 (0.748)	5
7.5	1.075 (0.129)	0.994 (0.879)	0.981 (0.032)*	0.986 (0.038)*	0.973 (0.012)*	0.999 (0.990)	0.951 (0.167)	5
10	1.055 (0.797)	0.891 (0.298)	0.956 (0.336)	0.966 (0.509)	0.970 (0.482)	0.887 (0.202)	0.920 (0.026)*	3
20	1.146 (0.549)	0.836 (0.033)*	0.931 (0.214)	0.919 (0.139)	0.933 (0.087)	0.846 (0.011)*	0.885 (0.073)	5
30	0.814 (0.411)	0.908 (0.409)	0.870 (0.104)	0.823 (0.040)*	0.903 (0.074)	0.964 (0.737)	0.779 (0.009)*	4
55	0.402 (0.481)	0.949 (0.341)	0.881 (0.342)	0.845 (0.274)	0.934 (0.249)	0.979 (0.859)	0.743 (0.041)*	2

Tabla VI. Parámetros de las chispas a distintas concentraciones de Pi cuando el RS se encuentra bañado con una solución de 400 μ M 9AC. Mostramos todas las concentraciones incluso aquellas que anterior mente no presentaban disminución de la frecuencia de chispas como 5 y 7,5 mM Pi. Estas concentraciones bajas de Pi no producen estimulación en presencia de 9AC como si lo producían sin el bloqueante. Se observa un bloqueo parcial de los canales de cloro del RS, suficiente mente eficiente como para desplazar la respuesta de la frecuencia de chispas al Pi hacia valores bastantes mayores. (n) indica el número de fibras.

[Pi] mM	Fibras sin 9 AC			Fibras + 400 μ M 9AC			Valor P
	Frecuencia	Std error	n	Frecuencia	Std error	n	
0.0	1.000	0.000	45	1.000	0.000	24	-
5.0	2.540	0.526	9	1.076	0.056	5	0.026*
7.5	1.450	0.104	3	1.075	0.039	5	0.003*
10.0	0.863	0.039	4	1.055	0.187	3	0.293
20.0	0.634	0.083	3	1.146	0.224	5	0.143
30.0	0.433	0.078	13	0.814	0.195	4	0.045*
55.0	0.067	0.028	4	0.402	0.031	2	0.002*

Tabla VII. Efecto protector del 9AC sobre los efectos del Pi. En la tabla además de las frecuencias de aparición de chispas para distintas concentraciones de Pi en ausencia y en presencia de 400 μ M 9AC. Se realizo pruebas estadísticas con un test de T para muestras independientes y estos arrojaron los valores para el parámetro de valor P que se muestran a la derecha. Los valores de P, para la diferencias entre para el tratamiento con 9 AC es significativo para los valores de 5, 7.5, 30 y 55 mM Pi. (n) indica el número de fibras.

Como mencionamos anteriormente la concentración de 9AC de 400 μM es suficiente para producir un bloqueo total de los canales de cloro. Sin embargo este bloqueo se produce sobre el lado intrarreticular del canal, por lo que con 400 μM 9AC en el citosol probablemente no se alcancen concentraciones suficientes para bloquear completamente el canal en el interior del RS. Los resultados obtenidos con 400 μM 9AC, muestran que a altas concentraciones de Pi la frecuencia de chispas disminuye, aunque menos que en referencia. Sin embargo para asegurar un bloqueo completo de los canales de cloro, con el objetivo de impedir completamente o en mayor medida la entrada de Pi al RS, debemos incrementar la concentración de 9AC dentro del RS. Para ello se cargó el RS con concentraciones elevadas de 9AC ($\approx 2 \text{ mM}$) durante 20-30 minutos. Luego de incubadas las células con estas altas concentraciones de 9AC realizamos el experimento con una concentración estándar de 400 μM como referencia, esto evita la depleción del 9AC del RS por debajo de estos valores.

Para poder realizar la incubación debimos suprimir la estimulación que realiza el bloqueante sobre los RyR. El inhibidor más común de los RyR es el Mg^{2+} por lo cual este es nuestra primera opción (Lacampagne et al, 1998).

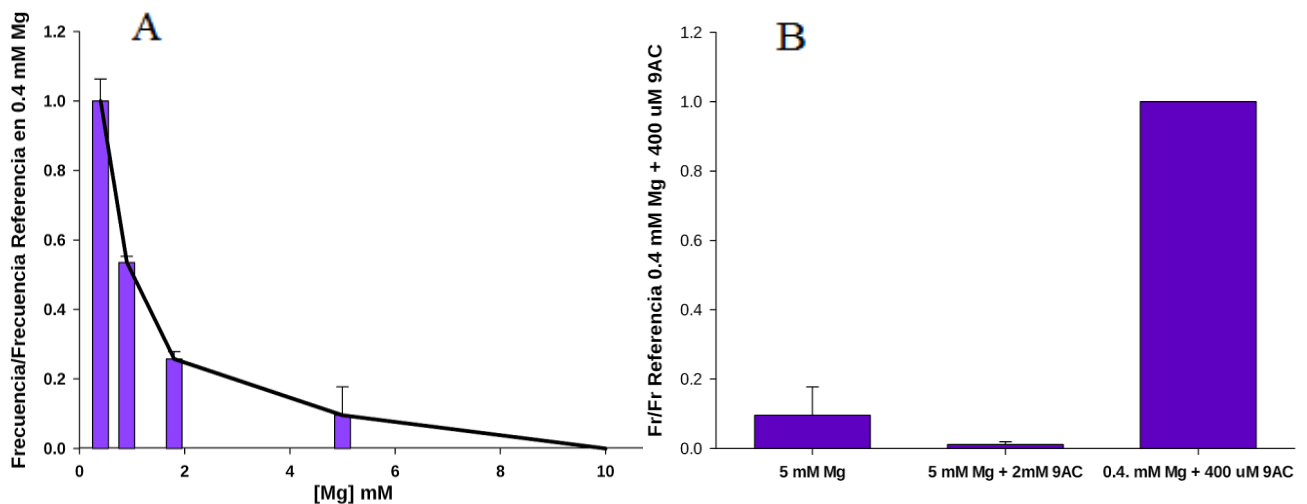


Figura 23. Inhibición de la frecuencia de chispas por Mg^{2+} . **A.** Concentraciones crecientes de Mg^{2+} inhiben las chispas, obteniendo una inhibición completa a 10 mM. Para esta figura la frecuencia de chispas fue normalizada a la solución de referencia la cual posee 400 μM 9AC. **B.** Luego de incubar las células durante 20-30 min con 5 mM Mg y 2 mM 9AC y el posterior lavado con 0,4 mM Mg y 400 μM 9AC volvemos a registrar una frecuencia normal de chispas.

En la figura 23 A, se muestra como concentraciones crecientes de Mg^{2+} reducen la frecuencia de chispas. Las chispas se ven completamente inhibidas a una concentración de 10 mM Mg^{2+} . La frecuencia de chispas promedio en condiciones control es de 19,21 eventos/100 μ m.s +/- 0.63, mientras que la frecuencia promedio en 5 mM Mg^{2+} es de 0,40 eventos/100 μ m.s +/- 0,0827. Luego de estandarizados los efectos del Mg^{2+} sobre nuestros preparados observamos los resultados que se obtienen al utilizar el Mg^{2+} para contrarrestar los efectos del 9AC.

En la figura 23 B, observamos como el Mg^{2+} logra suprimir la estimulación producida por el 9AC sobre los RyR, cuando incubamos las células con 2 mM 9AC y 5 mM Mg^{2+} . Luego de incubar la célula para aumentar la concentración de 9AC dentro del RS, y lavar con solución de referencia (0,4 mM Mg y 400 μ M 9AC) se observa (Figura 23 B) la recuperación de la frecuencia de chispas, a partir de la cual luego aplicamos altas concentraciones de Pi.

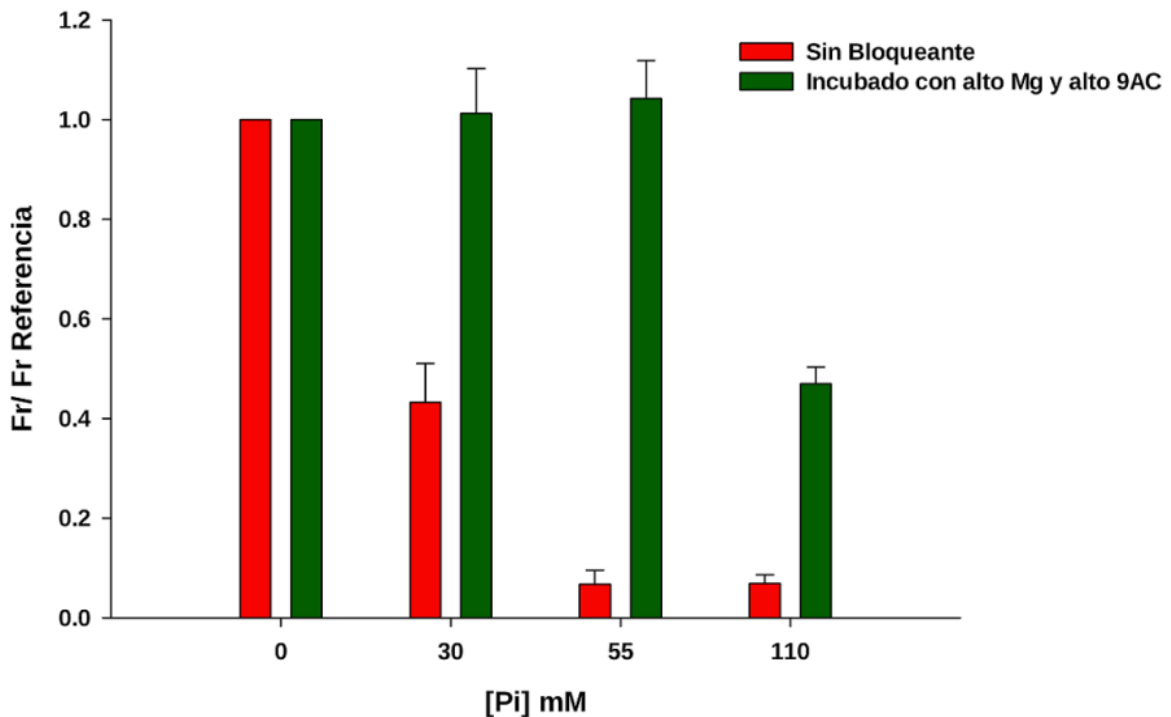


Figura 24. Variación de la frecuencia, efecto de altas concentraciones de Pi en presencia y ausencia del bloqueante de los canales de cloro. Se incubaron las fibras por 20 – 30 minutos con altas concentraciones de 9AC y Mg^{2+} . Con este tratamiento observamos que la frecuencia se mantiene estable hasta en concentraciones de 55 mM Pi inclusive. Aunque disminuye a valores mayores como 110 mM Pi.

En la figura 24 podemos ver el efecto producido por 30, 55 y 110 mM Pi sobre la frecuencia de chispas, en ausencia de 9AC (rojo) y en presencia de este tras el tratamiento de incubación durante 20-30 minutos en 5 mM Mg²⁺ (verdes).

Con las altas concentraciones de bloqueante y el alto Mg²⁺ se observa un menor efecto del Pi sobre la frecuencia de eventos. La frecuencia se mantiene constante hasta concentraciones de 55 mM. Este resultado podría estar indicando que el 9AC logró bloquear los canales de Cl⁻ evitando la entrada del Pi al RS. Esto es lo que se observa en la figura 24 (Barras verdes). Los valores para los parámetros de las chispas cuando son incubadas con 9AC se muestran en la tabla VIII.

[Pi] mM	Frecuencia (Valor P)	Amplitud (Valor P)	FWHM (Valor P)	FDHM (Valor P)	Duración (Valor P)	Ancho (Valor P)	Ttp (Valor P)	$\Delta(F/F_0)/s$ (Valor P)	Tau (Valor P)	n
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	8
30	1.013 (0.897)	1.077 (0.535)	0.890 (0.517)	0.8125 (0.578)	0.889 (0.784)	0.8657 (0.317)	0.813 (0.140)	1.110 (0.483)	0.752 (0.056)	3
55	1.043 (0.630)	1.448 (0.250)	1.011 (0.802)	0.890 (0.218)	1.049 (0.380)	0.936 (0.151)	0.905 (0.418)	1.488 (0.111)	0.675 (0.046)*	3
110	0.4703 (0.039)*	1.916 (0.235)	1.153 (0.212)	0.9123 (0.351)	1.311 (0.179)	1.156 (0.402)	1.510 (0.105)	0.842 (0.146)	1.450 (0.011)*	2

Tabla VIII. Parámetros de los eventos cuando las fibras son incubadas con alto 9AC y alto Mg²⁺. Los parámetros fueron normalizados a las condiciones en referencias. Los valores para la significación estadística se obtuvieron al realizar test de T para resultados pareados. La significación estadística es considerada cuando los valores de P menores a 0.050. (*) Muestra los resultados que son estadísticamente significativos. (n) indica el número de fibras.

Para confirmar que el Ca²⁺ no disminuye dentro del RS cuando logramos un bloqueo completo de los canales de cloro, se realizaron experimentos con Fluo-5N similares a los mostrados en la figura 19, pero siguiendo el mismo procedimiento recién descrito de incubación de la fibra con alto 9AC y Mg²⁺, tal cual se hizo en relación a la figura 24.

Obsérvese en la figura 25 que el bloqueo impide el descenso de la fluorescencia que reporta la concentración de Ca²⁺ libre dentro del RS. En presencia de 55 mM Pi el descenso de la fluorescencia es no significativo en comparación con los resultados obtenidos en las condiciones previamente mostradas (figura 19).

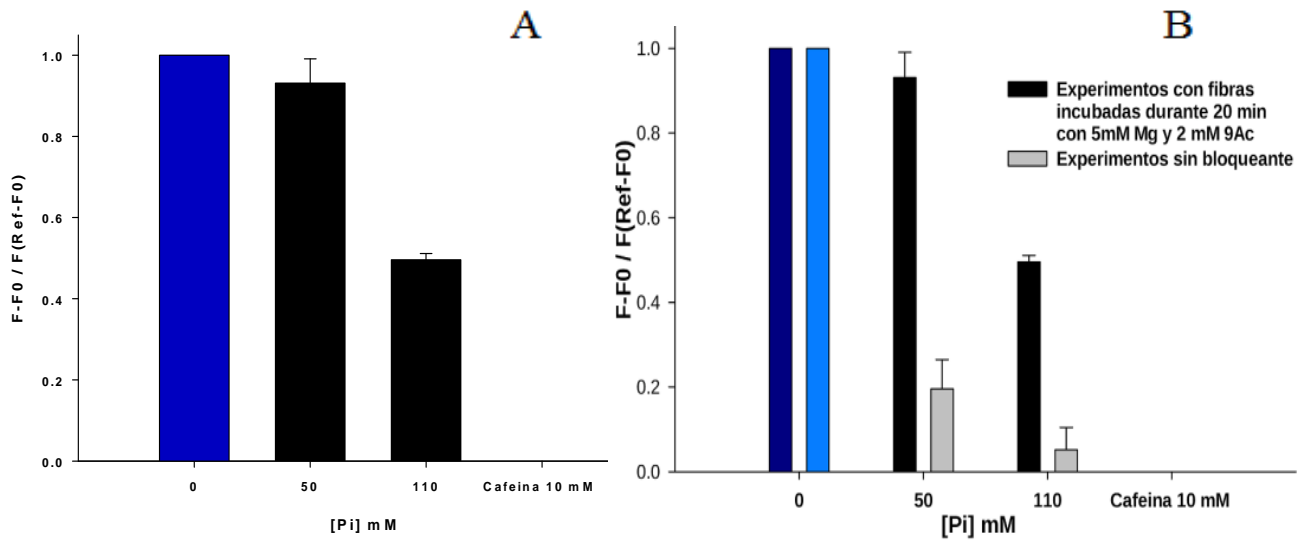


Figura 25. Fluorescencia de Fluo 5N dentro del RS. Estos registros fueron realizados con Fluo 5N, y se observa como varía la fluorescencia emitida dentro del RS en presencia de altas concentraciones de Pi. **A**, muestra el efecto cuando tenemos bloqueado el canal con 9 AC. En **B** se compara la fluorescencia en presencia y en ausencia del tratamiento con alto 9AC.

En la tabla IX mostramos los valores correspondientes a la gráfica de la figura 25 con los datos estadísticos. Si observamos los valores para 55 y 110 mM Pi vemos que existe una diferencia significativa entre fibras que poseen el canal de cloro bloqueado y las que no

[Pi] mM	Fibras sin 9 AC			Fibras incubadas con 9AC			Valor P
	F-F0/F(Ref-F0)	Std error	n	F-F0/F(Ref-F0)	Std error	n	
55	0.196	0.069	3	0.932	0.06	9	<0.001
110	0.052	0.053	2	0.496	0.015	11	<0.001

Tabla IX. Efecto protector de los bloqueantes de cloro sobre la fluorescencia del fluo 5N dentro del RS. Los parámetros corresponden a la figura 25 B, donde podemos observar la eficiencia del 9AC incubado a altas concentraciones para lograr un mayor bloqueo del canal de cloro y de esta forma presumiblemente evitar la entrada de Pi al RS. Los valores corresponden a intensidad de luz emitida por fluo 5N dentro del RS, normalizados por los valores de intensidad obtenidos tras la aplicación de 10 mM cafeína. El tratamiento mostró resultados significativos para ambas concentraciones de Pi. (n) indica el número de fibras.

.Realizamos experimentos en condiciones de control de voltaje bloqueando los canales de cloro. En estos se observó una potenciación de la liberación con la incorporación de altas concentraciones de Pi. Los resultados de uno de estos experimentos se muestran en la figura 26 donde se muestran los flujos de liberación y el efecto sobre la relación pico/base de 110 mM Pi.

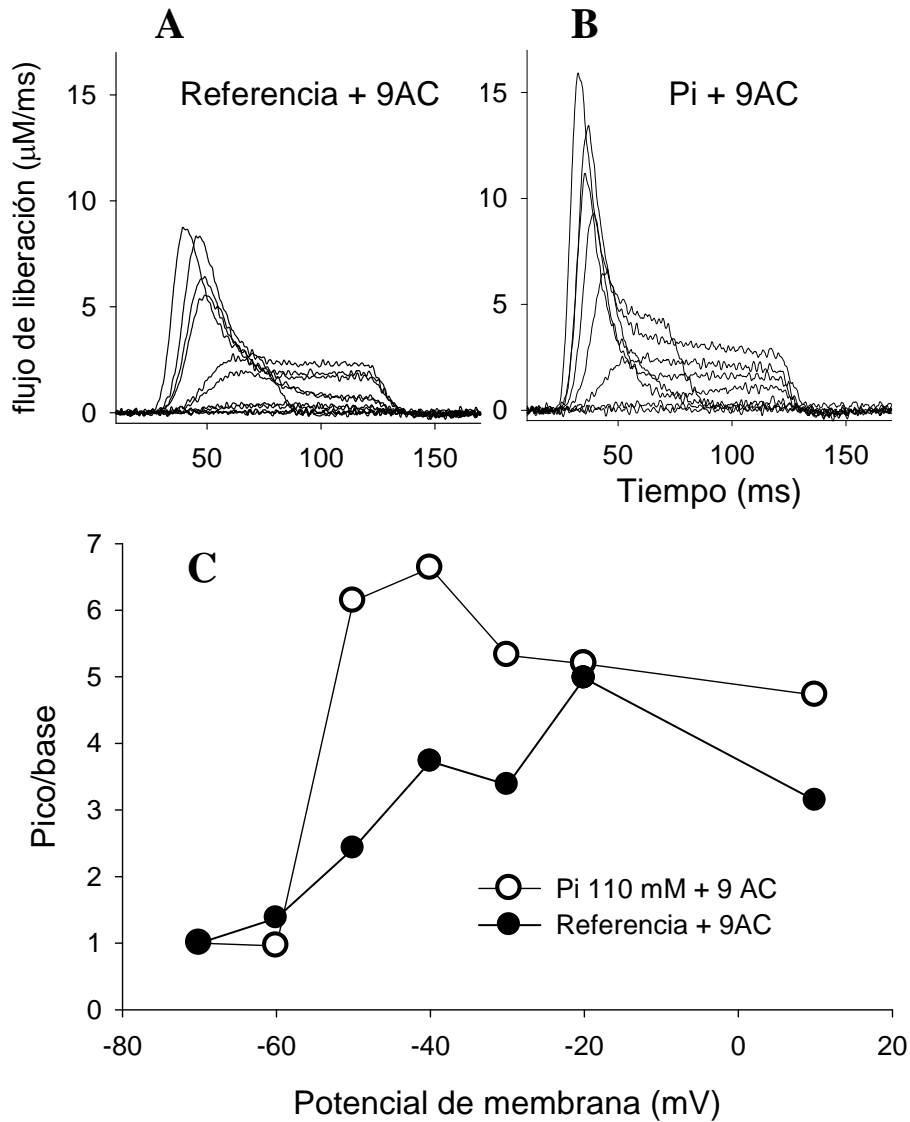


Figura 26. Bloqueo de los canales de Cloro en presencia de alto Pi en fibras montadas en una doble trampa de vaselina. La figura A muestra los flujos de liberación de Ca^{2+} obtenidos como respuesta a pulsos de diferentes voltajes, estos fueron obtenidos en presencia de 9AC. En la parte B observamos el efecto de incorporar 110 mM Pi a la solución interna. La potenciación desapareció luego de 180 minutos en solución de Pi. En C se exhibe las relaciones pico base de los flujos de liberación a diferentes voltajes en ambas condiciones. En esta fibra se puede observar una clara potenciación producida por la incorporación de 110 mM Pi al citosol de la célula. Fibra 7279e

7. *Análisis y discusión de resultados*

En el presente trabajo se estudió el efecto de altas concentraciones citoplásmicas de Pi sobre la liberación de Ca^{2+} del músculo esquelético. De importancia debido a la acumulación de Pi durante la actividad muscular intensa que produce fatiga. La disminución de fuerzas que se observa en esta condición se atribuye fundamentalmente a este proceso (Fryer y col, 1995). Los resultados obtenidos muestran que el Pi disminuye la liberación de Ca^{2+} debido a su acumulación en el RS. En este trabajo mostramos que este proceso puede ser revertido por el bloqueo selectivo de los canales de Cl^- que se encuentran en el RS, confirmando a estos canales como la principal vía de entrada para el Pi. Adicionalmente mostramos que este anión tiene un efecto potenciador sobre el canal de liberación de Ca^{2+} efecto que ha sido sugerido por Fruen y col (1994). Se discutirán los resultados de los experimentos realizados en relación a los objetivos planteados.

7.1. *Efectos del Pi sobre el flujo de liberación.*

La aplicación intracelular de Pi en altas concentraciones determinó una disminución del transitorio de Ca^{2+} y consecuentemente del flujo de liberación (Figuras 6, 7 y 8). Nuestra hipótesis supone que el Pi ingresa al RS, produciendo allí la precipitación del Ca^{2+} , lo que reduce la cantidad de catión disponible para ser liberado durante la contracción, como lo propusieron Fryer y col. en 1995. Como pudimos observar los flujos de liberación son menores en presencia de Pi (Fig. 6C y 6D y Fig. 8A), siendo el efecto a nivel del pico más marcado.

El pico se produce por una activación retroalimentada por LCIC, y la meseta es atribuida a un flujo de menor magnitud pero constante que pasa a través de los RyR1 y que se mantiene durante todo el pulso (Pizarro y Ríos, 1988), los RyR3 también contribuyen durante la fase estacionaria. De modo general la relación pico/base permite cuantificar la contribución relativa de la LCIC, una relación alta indica que la cantidad de RyR3 que se abrieron por LCIC por cada RyR1 que se abrió por voltaje es mayor. En el rango de voltajes intermedios la razón es máxima lo que determina que la proporción de canales activados por la LCIC es mayor, aunque la razón disminuye a voltajes altos. El alto Pi afecta ambas fases del flujo de liberación y pero como se ve en la figura 8

produce una disminución en la razón pico/base, por lo que el Pi está afectando a la LCIC en mayor medida que a la liberación mantenida por el voltaje. Los datos obtenidos del efecto del Pi sobre el pico del flujo liberación muestran que este alcanza una reducción promedio del 70%, siendo la misma estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Por el otro lado la fase estacionaria en algunas fibras se mantuvo pero en otras disminuyó, motivo por el cual, el promedio de las diferencias no fue estadísticamente significativo. Los valores de los parámetros se encuentran en la tabla I.

El efecto sobre la relación pico/base se correlaciona directamente con el aumento de la concentración de Pi citoplásmica. Como se muestra en la figura 7 y 10, donde representamos el establecimiento del efecto sobre el pico del flujo de liberación y sobre el componente estacionario de la permeabilidad del RS. A medida que transcurre el tiempo luego del cambio de solución vemos como la amplitud del pico se reduce progresivamente con el aumento de la concentración de Pi en la zona de registro, este aumento se produce de forma gradual con la difusión del Pi desde los compartimentos laterales de la cámara hacia la zona central donde se encuentra la sección de fibra sobre la que se realizan los registros. Sin embargo la cuantificación de cuanto Pi ingresa a la célula es muy difícil de determinar por lo que nuestra mejor estimación es la que realizamos en base a las constantes de difusión para el pigmento y para el Pi, siendo estas de $3.33 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y $0.20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, para el Pi y el pigmento (unido o no a Ca^{2+}) respectivamente (Yoshizaki y col. 1972). Estos datos nos indican que la difusión del pigmento debería ser más lenta que la del Pi. La concentración de pigmento es medida durante todo el experimento por lo que es posible estimar cuando el Pi alcanza una concentración cercana a la de los compartimentos laterales en la zona de registro. En la figura 10, observamos el curso temporal del flujo de liberación en un experimento donde se realizó el cambio a una solución con 80 mM Pi. La diferencia de este experimento con los realizados de rutina es la adquisición temprana de pulsos a intervalos regulares luego de realizado el cambio a solución de Pi. Es interesante destacar la potenciación del transitorio de Ca^{2+} que se observa inicialmente en el rango donde las concentraciones de Pi son aun bajas. En su conjunto estos experimentos confirman que el Pi reduce la liberación de Ca^{2+} al alcanzar altas concentraciones y sugiere un efecto potenciador a bajas concentraciones.

El ingreso de Pi al RS, disminuye el gradiente de Ca^{2+} entre el RS y citosol provocando un menor flujo de liberación y por lo tanto un transitorio de menor amplitud. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros investigadores en fibras peladas donde se ven disminuciones en la magnitud de la fuerza producida (Fryer y col., 1995).

Alternativamente al efecto sobre el Ca^{2+} en el RS también se puede plantear la existencia de un efecto amortiguador sobre el Ca^{2+} llevado a cabo por el Pi en el lado citoplasmático. Sin embargo como analizaremos más adelante, hemos demostrado que este efecto no produciría una reducción sobre los parámetros como las observadas en presencia de alto Pi. Por lo tanto descartamos en primera instancia el posible efecto amortiguador del Pi a nivel citoplasmático como el determinante principal del efecto sobre el transitorio.

Otra alternativa posible para explicar nuestras observaciones es que el Pi produzca una inhibición sobre el RyR, tanto sobre el lado citoplasmático (lado “cis”) como sobre la porción luminal del canal (lado “trans”). Con respecto a la inhibición sobre el lado cis, como veremos más adelante y como lo describió Fruen y col., en 1994, en experimentos en canales incorporados en bicapas lipídicas, puede ser descartada porque se ha observado que el Pi posee un efecto estimulante sobre el RyR. Fruen y col., describieron este efecto como un posible efecto potenciador de la actividad muscular, ya que las concentraciones de Pi fisiológicas se encuentran estimulando los RyR. Nuestro planteo concuerda con el Fruen y col., pero también proponemos que la acumulación citoplasmática de Pi durante la actividad intensa podría actuar como un inhibidor de actividad muscular, lo que produciría la disminución en la acumulación de Pi, evitando daño celular y permitiendo la recuperación del ATP utilizado. No hemos podido descartar la posible inhibición de los RyR por el Pi sobre el lado trans.

Si bien es poco probable que el Pi afecte el sensor de voltaje se realizaron algunos experimentos para descartar posibles efectos a este nivel. Lo ideal hubiera sido medir corrientes de carga, sin embargo para ello es necesario utilizar soluciones intracelulares que contengan Cs, para producir un mayor bloqueo de los canales de K^+ . Sin embargo este catión precipita a bajas concentraciones en presencia de Pi por lo que las soluciones debieron realizarse en base a glutamato de K^+ . En sustitución se estudió la dependencia del voltaje de la activación del flujo de liberación y de su inactivación

(Figuras 8 y 9). Los parámetros de los ajustes se observan en la tabla I y II. Se observa una invariabilidad en el voltaje de media distribución y de la pendiente para las curvas sigmoideas ajustadas para la activación en referencia y en presencia de Pi indicando que la dependencia del voltaje no se afecta. Sin embargo se observó una disminución en la pendiente de las curvas de inactivación en presencia de Pi. Aunque el punto de inflexión se mantiene básicamente al mismo voltaje este resultado indica que el Pi de alguna manera promueve la inactivación de la liberación. Este efecto se podría explicar también en base a la disminución de la liberación por los mecanismos discutidos anteriormente.

Solo hemos observado las consecuencias sobre la liberación de Ca^{2+} debidas a concentraciones entre 50 y 110 mM de Pi. Aunque se realizaron experimentos con concentraciones menores de Pi (ej: 10, 20 y 30 mM), los resultados son muy variables debido seguramente al ingreso gradual que el Pi posee hacia la zona de registro, provocando disminuciones, aumentos o ninguno de los dos sobre la liberación de Ca^{2+} aunque siempre se produce una reducción en la liberación cuando se aumenta la duración de los experimentos, estos resultados no pueden ser interpretados como efectos del Pi por la vida útil de las preparaciones.

7.2. Efectos del Pi sobre pulsos de larga duración.

Con el objetivo de poner en evidencia la capacidad del RS para mantener la liberación de Ca^{2+} en presencia de altas [Pi] se realizaron experimentos con pulsos de larga duración (1.5 s). En la figura 11, mostramos registros de los transitorios de Ca^{2+} y el cálculo del flujo de liberación correspondiente. Se evidencia una disminución del pico de liberación al igual que como ya fue discutido. En estos experimentos el Pi produce una mayor reducción sobre la magnitud del componente estacionario del flujo de liberación que la observada con pulsos cortos. Estos resultados se pueden interpretar en base a la disminución en la concentración del Ca^{2+} libre dentro del RS, y fueron reafirmados con la realización de simulaciones de la liberación de Ca^{2+} (Ver más adelante). Experimentos similares a los anteriores se utilizaron para confirmar la reversibilidad del efecto del Pi. En la figura 12, se aprecian 2 fibras (A y B) sometidas a pulsos despolarizantes de larga duración donde se demuestra que el efecto del Pi es reversible. La fibra A se comenzó en solución de referencia y luego se cambio a una

solución con 50 mM Pi y mientras que en la fibra B se realizó el protocolo contrario. El lavado del Pi intracelular mediante la dialización del medio interno es muy difícil en mayor medida por las limitantes temporales de los experimentos y solo en unos pocos se pudo llevar a cabo exitosamente. En las fibras permeabilizadas la reversibilidad del efecto se pudo demostrar más fácilmente (Ver más adelante). Para confirmar la interpretación de lo observado con pulsos prolongados, utilizamos un modelo matemático propuesto por Stern y col. (1997). Con este modelo realizamos simulaciones de los transitorios de Ca^{2+} y de los flujos de liberación introduciendo los parámetros correspondientes a las condiciones a las cuales se sometieron a las fibras. Se simularon pulsos de corta o media duración (200 ms) y de larga duración (1 seg.) con diferentes concentraciones de Ca^{2+} en el RS (Ver parámetros en Anexo 2).

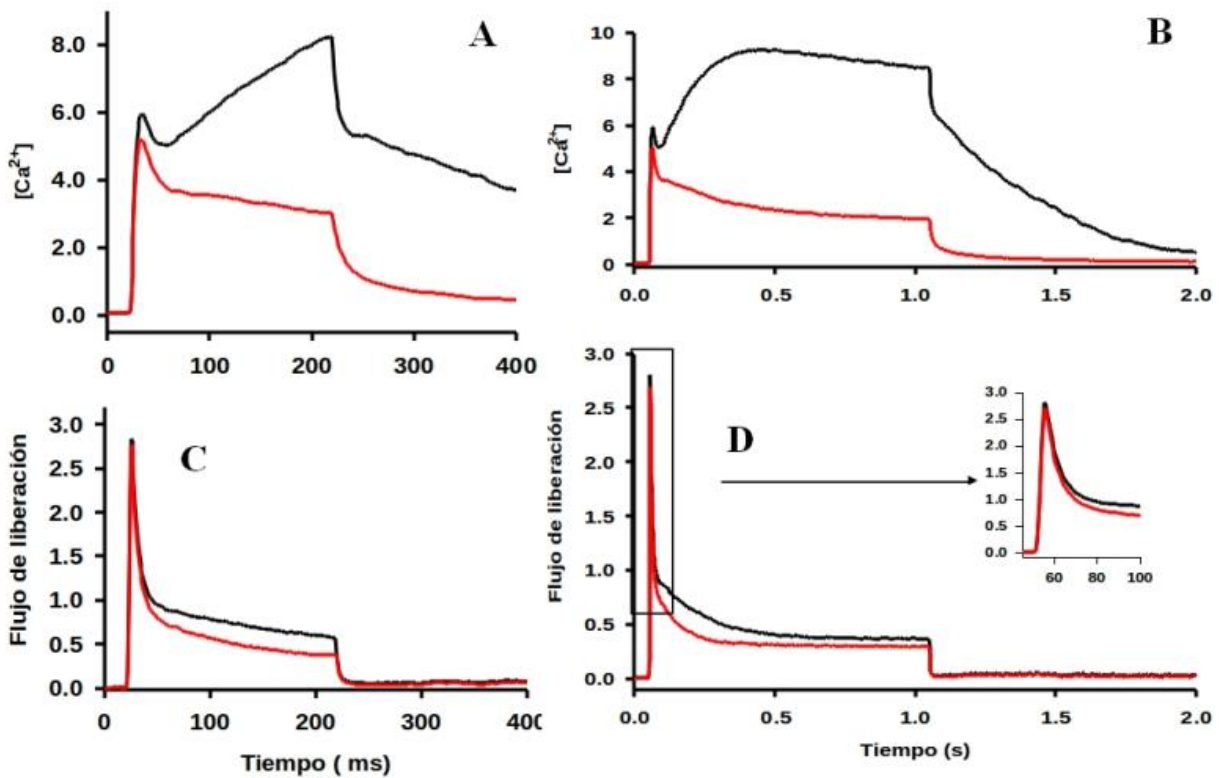


Figura 27. Simulaciones de los efectos de Pi sobre los transitorios. Utilizando el modelo de Stern y col. (1997) para el couplón se simulamos transitorios de Ca^{2+} de aspecto similar a los obtenidos experimentalmente para pulsos de 200 ms y 1.5 s a 0 mV. Se grafican los transitorios en los paneles superiores y en los paneles inferiores los flujos correspondientes. Los trazados negros corresponden a un contenido de Ca^{2+} del RS de 4 mM, los rojos de 2 mM.

Los resultados obtenidos de las simulaciones en la figura 27 son muy similares a los obtenidos experimentalmente (Figuras 11 y 12). Los transitorios de Ca^{2+} muestran una caída más prominente cuando se reduce el contenido de Ca^{2+} del RS de 4 a 2 mM. Aunque en las simulaciones no se observa una disminución del pico del flujo tan marcada como la que se observa en los experimentos. Atribuimos esta a que el modelo no considera la existencia de receptores RyR3 en las zonas periféricas a la tríada como realmente existen (Felder, E., y Franzini-Armstrong, C., 2002). A pesar de esto las simulaciones reproducen adecuadamente los resultados experimentales apoyando la hipótesis de que el principal efecto del Pi es una reducción del Ca^{2+} libre dentro del RS. Si bien las concentraciones de Ca^{2+} en el RS son un poco elevadas comparadas a las descritas en la bibliografía (Launikonis y col., en 2005) fue necesario utilizar estos valores para reproducir en las simulaciones, los transitorios de Ca^{2+} mostrados en las figuras 11 y 12.

Los resultados son suficientes como para concluir a modo general que altas concentraciones citoplasmáticas de Pi reducen los transitorios de Ca^{2+} en el músculo esquelético. Este efecto es producido por la disminución de la magnitud del flujo de liberación, el cual depende de la cantidad de Ca^{2+} dentro del RS. En los pulsos de larga duración ambos componentes del flujo de liberación presentan una reducción. De esta forma podemos estimar que existirá una reducción en la fuerza realizada por un músculo durante una contracción tetánica cuando las concentraciones de Pi a nivel citoplasmático son elevadas. Este mecanismo para explicar la reducción de la fuerza ha sido reportado por varios autores en varios tipos de fibras y con diferentes técnicas (Millar y Homsher, 1990; Debold y col., 2006; Westerblad y Allen, 1996; Jones y col., 2009).

Resumiendo entonces estos experimentos describen cómo el Pi afecta los flujos de Ca^{2+} desde el RS. Además de los resultados mostrados, los experimentos con la doble trampa de vaselina permitieron corroborar que el Pi no afecta significativamente la dependencia de los sensores de voltaje (DHPR), por lo que los efectos del Pi sobre la contracción muscular son casi exclusivamente debidos a sus efectos sobre el manejo del Ca^{2+} .

7.3. *Efectos del Pi sobre los eventos elementales (Chispas).*

Como se indicó anteriormente estos experimentos con la membrana celular permeabilizada, complementan a los mostrados anteriormente ya que permiten controlar exactamente la concentración de iones en el citoplasma, conociendo entonces la concentración de Pi, Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc., a la que la membrana del RS se encuentra expuesta sobre el lado “cis” (citoplasmático). Los transitorios de Ca^{2+} mostrados anteriormente se producen por la superposición de cientos de eventos elementales de liberación inducidos en los casos anteriores por pulsos de voltaje despolarizantes. Por esto el análisis de los eventos individuales se vuelve de igual importancia y nos ofrece información sobre las propiedades de los canales de liberación (RyR). Se estudió el efecto que tiene el Pi sobre las chispas en un amplio rango de concentraciones (2 a 110 mM).

En las figura 13, 14 y 15 se muestra como la frecuencia de aparición de eventos cambia con los cambios en las soluciones de las concentraciones de Pi y que estos efectos son totalmente reversibles. La frecuencia disminuye para concentraciones de Pi superiores a 10 mM, existiendo una clara dependencia de la frecuencia de chispas con la concentración de Pi citoplasmático. La frecuencia disminuye hasta un valor cercano al 7 % de su valor en referencia en presencia de 55 y 110 mM Pi, mientras que en 30 mM Pi la frecuencia alcanza el 45% aproximadamente. Estos datos son los que se presentaron en la Tabla III, junto con los demás parámetros que describen a las chispas.

Para concentraciones menores de 10 mM se observa una potenciación de la ocurrencia espontánea de chispas. Debemos tener en cuenta que los mecanismos por los que se generan las chispas son complejos e incluso discutidos. Nosotros consideramos un mecanismo que involucra varias etapas y distintos tipos de regulación. En primera instancia existe una apertura espontanea de los canales de liberación (RyR), es durante estas aperturas que ellos permiten la salida de Ca^{2+} hacia el citosol desde el RS. Dependiendo si el Ca^{2+} liberado alcanza para que en la proximidad de los RyR adyacentes (microambiente citoplasmático) se obtenga una concentración (“umbral”) que promocióne la apertura retroalimentada por LCIC, en este caso se disparara una chispa. De esta forma una chispa es la apertura retroalimentada de 30 a 100 canales de liberación. Aunque también se podría llegar a considerar la existencia de un sitio de Ca^{2+} de los RyR a nivel luminal que promueva la apertura de estos, y facilite la

producción de una chispa, estos sitios solo están descritos para músculo cardíaco no aún para músculo esquelético. (Laver y Honen, 2008).

Siguiendo la misma línea de razonamiento con la misma hipótesis, el Pi una vez dentro del RS produce la precipitación del Ca^{2+} libre, reduciendo de esta forma la magnitud del gradiente que existe entre el interior del RS y el citoplasma. Al reducir el Ca^{2+} disponible para ser liberado será menor la cantidad de Ca^{2+} que logre atravesar los RyR durante las aperturas espontáneas esto disminuye la probabilidad de producir la apertura de RyR adyacentes por LCIC y por lo tanto se reduce de esta forma la ocurrencia de chispas.

Sin embargo para concentraciones de Pi menores a 10 mM como mencionamos, se observó un efecto potenciador que concuerda con un efecto por estimulación directa del Pi sobre los RyR en el lado citoplasmático. El aumento de la probabilidad de apertura de canales individuales a concentraciones bajas de Pi fue descrita previamente en preparados de bicapas lipídicas por Fruen y col. en 1994. En la figura 15 se mostró como concentraciones de 2, 5 y 7,5 mM Pi aumentan la frecuencia de aparición de chispas. La frecuencia aumenta hasta llegar a un máximo a concentraciones de 5mM de Pi, pero a concentraciones mayores disminuye. Si el Pi ingresa al RS y se equilibra con el Pi del citoplasma, la interpretación racional de porque la frecuencia comienza a disminuir en 7,5 mM Pi si seguimos esta línea de pensamiento es que, se alcanza el producto de solubilidad (Kps) para la sal formada por el Ca^{2+} y el Pi (CaHPO_4) (6 mM^2) y asumiendo una concentración de Ca^{2+} libre en el interior del RS de aproximadamente 0.8 mM, concentraciones de Pi mayores de 5 mM estarían determinando la precipitación de Ca^{2+} dentro del RS. Este efecto comienza a contraponerse con el efecto estimulante del Pi a bajas concentraciones. Esto sería lo que se observa a 7.5 mM Pi donde la estimulación decae con respecto a la de 5 mM Pi, y continua decayendo a medida que utilizamos mayores concentraciones de Pi.

Para poder analizar las chispas consideremos que estas se generan desde una fuente puntual de liberación de Ca^{2+} desde donde aumenta la concentración de Ca^{2+} y difunde luego en 3 dimensiones, de forma que se podría representar como una esfera que aumenta en diámetro e intensidad desde la fuente puntual de liberación. Si registramos esta esfera en modo “xt” con el microscopio se lograrían extraer una serie de parámetros, algunos de los cuales mostramos en la figura 28, y son estos los que nos

permiten describir y comparar aspectos particulares de las chispas en diferentes condiciones. La cuantificación de estos parámetros se muestra en la tabla III para diferentes concentraciones de P_i .

En la figura 28, esquematizamos el registro de fluorescencia de una chispa en modo “xt” donde se indica: la Amplitud (F/F_0); el Ancho total a la mitad del máximo (FWHM, por siglas en Inglés); la Duración Total a la Mitad del Máximo (FDHM, siglas en Inglés); el Tiempo al pico (T_{tp} , tiempo necesario para alcanzar el valor máximo); $\Delta(F/F_0)/s$ (Pendiente de la fase inicial medida entre el 10 y el 90 % de F/F_0 ; “Velocidad de ascenso”); y Tau (constante temporal la caída Ca^{2+} liberado).

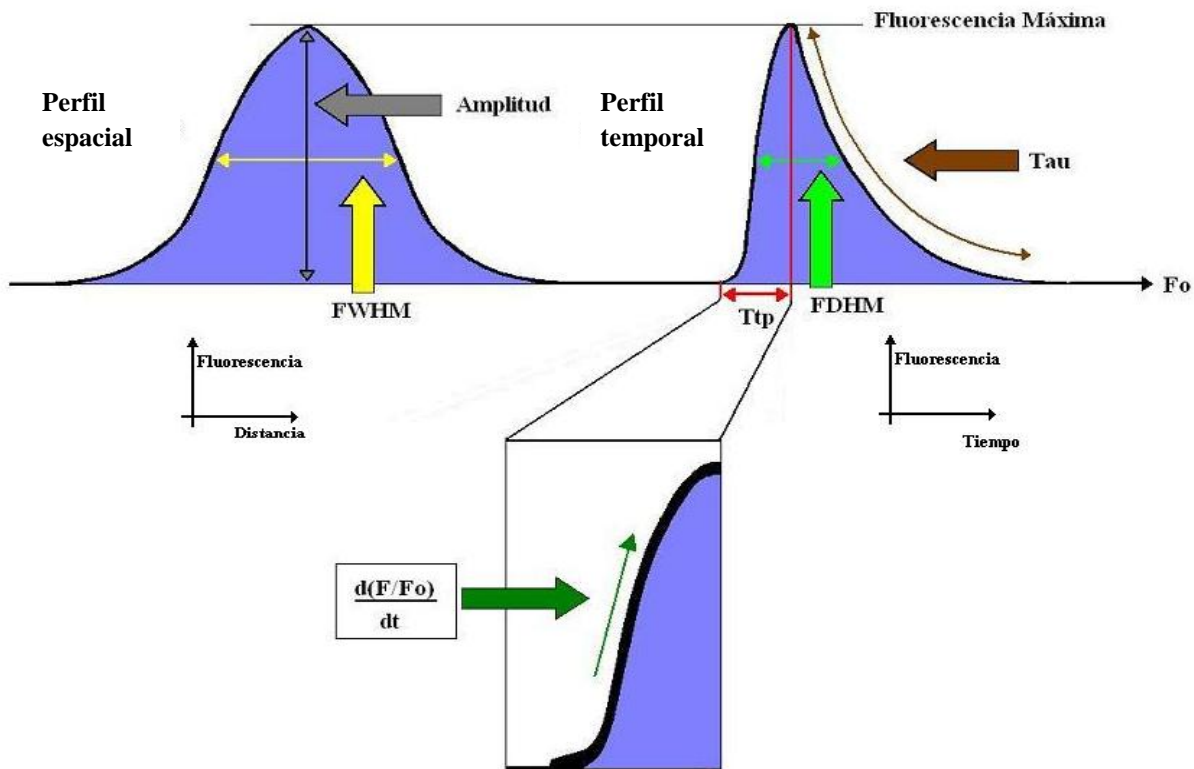


Figura 28. Representación de los parámetros de las chispas a evaluar. Se muestra una representación en función del tiempo y en función de la distancia de una chispa registrada en modo “xt” con un microscopio confocal.

Con respecto a los parámetros de las chispas, la liberación retroalimentada producida por la apertura de varios canales, es el proceso que determina el tiempo al pico (T_{tp}) y la $\Delta(F/F_0)/s$ (Figura 28). La amplitud de la chispa, se encuentra determinada por la duración de la apertura de los canales. Estos se cierran por inactivación dependiente de Ca^{2+} (Ríos y col., 2008). Este es porque como

mencionamos el receptor de rianodina además de ser activado por Ca^{2+} es inactivado por este catión cuando se encuentra a concentraciones elevadas sobre la cara citoplasmática del RyR. Sabemos que una concentración de 800 nM de Ca^{2+} citoplasmático inhibe gran parte de las chispas que se producen (Zhou y col., 2004).

La figura 29, tomada del artículo " *Ca^{2+} release flux underlying Ca^{2+} transients and Ca^{2+} sparks in skeletal muscle*" publicado por Ríos y Brum en 2002, donde vemos la concentración de Ca^{2+} en una chispa estimulada por voltaje (pulso a -50 mV) en el músculo esquelético de rana. Notar que el Kd para la inhibición se encuentra sobrepasado en el microambiente de la chispa ("fuente"), por esto se produce el cierre repentino de los RyR dando final a la chispa. La imagen de la figura es un promedio que realizaron los autores de 67 chispas alineadas por su punto de mayor fluorescencia.

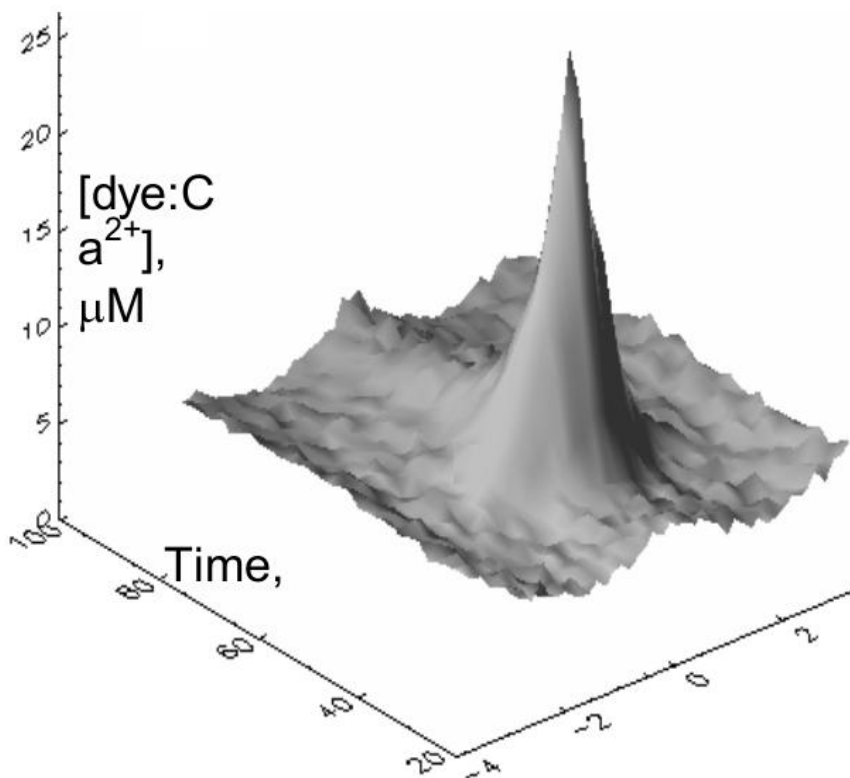


Figura 29, Medida del Ca^{2+} liberado en un chispa. En esta imagen se muestra la distribución local de la concentración de Ca^{2+} unido al pigmento, las cual se obtuvo de la fluorescencia promedio de 67 chispas obtenidas por pulsos despolarizantes a -50 mV en fibras musculares de rana. Las chispas fueron seleccionadas según su Ttp para poder alinearse en su punto de máxima amplitud para luego promediarse. Imagen tomada de " *Ca^{2+} release flux underlying Ca^{2+} transients and Ca^{2+} sparks in skeletal muscle*" publicado por Ríos y Brum en 2002

Dentro de los parámetros, tanto el FWHM, como el FDHM se seleccionan en representación del ancho y de la duración de la chispa, por ser medidas con mayor fiabilidad en comparación con el ancho total y la duración total, debido a como el programa spark master determina estos últimos valores. Con respecto a Tau, esta constante temporal nos indica el curso temporal en el cual el Ca^{2+} disminuye luego del final de la fase de ascenso de la chispa. Depende de los factores que estén involucrados en la remoción del Ca^{2+} , siendo la remoción la suma de las contribuciones de cada buffer tanto los incorporados como el EGTA y el pigmento como los celulares por ejemplo la parvalbúmina, el ATP, sitios de las troponinas, así como también la contribución de la bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA).

Analizando los parámetros mostrados en la tabla III, el primer parámetro que vemos que se ve estadísticamente afectado por el Pi es la frecuencia de aparición de chispas ya mencionado anteriormente. A concentraciones bajas de Pi se produce una estimulación que alcanza su máximo en 5 mM Pi y a 7,5 se mantiene la estimulación pero con una amplitud menor a la alcanzada en 5 mM. A 10 mM Pi la frecuencia ya se encuentra por debajo de la de referencia y continua bajando hasta 55 y 110 mM Pi donde pareciera llegar a una meseta. Todos los cambios producidos por el Pi sobre la frecuencia de aparición de chispas resultaron ser estadísticamente significativos. Para el análisis estadístico se utilizaron Test de T para datos pareados, comparando las condiciones antes y después de la aplicación de Pi para todos los experimentos y en todas las concentraciones independientemente.

Con respecto a la amplitud observamos que no existen cambios sustancialmente significativos, excepto al alcanzar los 110 mM Pi en el citoplasma. En 110 mM Pi existe una gran reducción de la amplitud la cual puede ser explicada en base a una sumación de 2 componentes uno es la reducción del Ca^{2+} libre que sucede en el RS y el otro componente es el efecto buffer del Pi sobre el Ca^{2+} . Con 110 mM de Pi es esperable una leve reducción de los parámetros por este efecto (Ver más adelante). En base a nuestra hipótesis consideramos que el efecto sobre la amplitud a esta concentración de Pi es mayormente debido al efecto sobre la reducción del Ca^{2+} libre dentro del RS. Con respecto al FWHM, “ancho a la mitad del máximo” vemos como a una concentración de 5 mM de Pi se produce un leve aumento de este, lo que se encuentra asociado a la estimulación que produce el Pi a esa concentración. Luego a concentraciones de 30 mM

comienza a reducirse no alcanzando una reducción mayor que el 70% de los valores de referencia en 110 mM Pi.

La FDHM varía menos homogéneamente y posee reducciones significativas en 10, 30 y 55 mM Pi, pudiéndose atribuir estas 2 últimas a una reducción en la magnitud de Ca^{2+} liberado y a un aumento en los componentes de remoción de Ca^{2+} . Sin embargo a 110 mM Pi se produce un aumento en la duración de la chispa, concordantemente a lo que se esperaría si la magnitud del Ca^{2+} liberado es menor, pero contrario a lo que se vería ante un aumento en la concentración de buffers disponibles para la remoción del Ca^{2+} liberado. Si analizamos ambas partes, liberación y remoción, observamos que el aumento de la duración es causado en parte por un menor flujo de liberación de Ca^{2+} durante la apertura de los RyR, lo que produce el aumento significativo del Ttp (“Tiempo al pico”) y una reducción en la velocidad de ascenso de la concentración de Ca^{2+} (reducción de $\Delta(F/F_0)/s$). Este aumento lento de la concentración de Ca^{2+} produce un retardo en la inactivación de los RyR por la inactivación dependiente de Ca^{2+} lo que a su vez produce un aumento de la duración. Con respecto a Tau, al aumentar la magnitud de buffers para el Ca^{2+} , razonablemente se esperaría una reducción tal cual ocurre para 30 y 55 mM Pi. Sin embargo para 110 mM Pi Tau aumenta significativamente, esto nos llevo a reevaluar lo planteado por Dawson y col en 1980. Estos autores propusieron que el Pi podría producir una inhibición de la SERCA, aunque esta inhibición según lo que observamos se produciría a concentraciones de Pi mucho mayores a las que se pueden alcanzar durante la fatiga muscular (Fatiga \approx 30 mM Pi). Esta inhibición determinaría un enlentecimiento de la relajación en fibras musculares sometidas a protocolos de fatiga. (Los valores promedios de los parámetros de las chispa en referencia se mostraron en la página 34)

Los experimentos realizados con el pigmento fluorescente Fluo 5-N AM, en los cuales luego de cargado, se permeabilizó la membrana de las fibras para retirar el pigmento que se encontraba en el citoplasma permitieron la evaluación de los cambios del Ca^{2+} dentro del RS y correlacionarlos con el efecto del Pi sobre las chispas. Se utilizaron concentraciones de Pi superiores a 20 mM ya que por debajo de este valor la combinación entre el kd del pigmento por el Ca^{2+} y la concentración de Ca^{2+} dentro del RS no nos permitió registrar los cambios en las señales de fluorescencia. Se determinó la fluorescencia basal, del RS deplecionado de Ca^{2+} haciendo pulsos con cafeína y

utilizando altas concentraciones de buffers de Ca^{2+} (EGTA) en el citoplasma. En la figura 17 vimos el curso temporal de un experimento donde se perfundi6 Pi y este produce un descenso de la fluorescencia emitida. Aunque no realizamos la adecuada calibraci6n del pigmento para conocer la concentraci6n de Ca^{2+} , podemos afirmar que la disminuci6n de la fluorescencia corresponde a una disminuci6n del Ca^{2+} en el RS. En la figura 18 mostramos la localizaci6n del pigmento en la fibra muscular y un perfil que se corresponde con la distribuci6n de las cisternas terminales del RS. Este bandeo disminuye al aplicar 50 mM Pi y desaparece al aplicar 10 mM cafe6na. Para poder confirmar la asociaci6n entre la concentraci6n de Ca^{2+} dentro del RS y la frecuencia de chispas en la figura 16 mostramos un experimento donde se registr6 simult6neamente el Ca^{2+} dentro del RS con Fluo 5-N y chispas con Rhod-2 en el citosol. En esta figura podemos observar de modo general como el Pi baja la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS y a su vez tambi6n desciende la frecuencia de chispas.

En la figura 20 representamos la ca6da de la fluorescencia producida por el Ca^{2+} en el RS con diferentes concentraciones de Pi en varios experimentos, mostrando una clara correlaci6n entre la fluorescencia y la cantidad de Pi. Para estos experimentos en todos los casos se aplicaron pulsos de cafe6na 10 mM para la determinaci6n de la fluorescencia basal. Los valores de la figura tambi6n se aprecian en la tabla IV. Obs6rvase como la fluorescencia disminuye conforme el Pi citoplasm6tico aumenta. De esta forma estos experimentos nos permiten afirmar que el Pi citoplasm6tico produce una reducci6n en la concentraci6n de Ca^{2+} libre dentro del RS, as6 como tambi6n que el Pi citoplasm6tico ingresa al RS.

7.4. Efecto del bloqueo de los canales de cloro en la membrana del RS

Seg6n Laver y col. 2001 la v6a de entrada sugerida son los canales de cloro presentes en la membrana del RS. De los canales involucrados, est6n los denominados BCL y SCL (siglas en ingl6s) o canales de gran y peque6a conductancia respectivamente. El canal BCL (250 pS en 250/50 mM Cl⁻; cis/trans) no presenta reportes de estar regulado por ligandos a nivel a citoplasm6tico (Tanifuji et al. 1987; Kourie et al. 1996b). El canal de peque6a conductancia o SCL (75 pS in 250/50 mM Cl⁻) contrariamente se encuentra altamente regulado. Siendo inhibido por acidificaci6n citoplasm6tica (pH<7), nucle6tidos de adenosina (Ahern & Laver, 1998; Kourie, 1999) e inositol fosfato (Kourie et al. 1997), adem6s es dependiente del voltaje encontr6ndose

abierto a potenciales de membrana entre 0 y -80 mV (Kourie et al. 1996). También es activado e inhibido por oxidación y reducción respectivamente (Kourie, 1997) y activado por 1 μM de Ca^{2+} citoplasmático (Kourie et al., 1996a).

Estos canales de cloro en la membrana del RS del músculo esquelético se encuentran en mayor cantidad de la que se explica por las funciones establecidas, como por ejemplo la de transportadores de contra-iones durante la liberación de Ca^{2+} desde el RS, la cual siquiera han sido demostrada fehacientemente en el músculo esquelético (Coonan & Lamb, 1998). Pero su presencia, podría ser comprendida si estos permitieran el paso de forma fisiológica a otros importantes aniones distintos al Cl^- como por ejemplo al Pi. Laver y col., en 2001 confirmaron que los canales SCl y BCl son permeables a Pi y a otros aniones.

Hasta el momento solo hemos observado como el Pi afecta a las chispas y sus parámetros. Para confirmar la hipótesis 3 de que el Pi ingresa al RS por los canales de cloro realizamos experimentos bloqueando estos canales. Los canales SCL no son necesarios de bloquear, ya que estarían bloqueados por la concentración (5 mM) de ATP que utilizamos en las soluciones internas de referencia. Estos presentan un Kd para el Na_2ATP de 0.45 +/- 0.06 mM y 0.95 +/- 0.05 mM para el MgATP. (Ahern. y Laver. 1998). Con respecto al canal BCL, realizamos experimentos utilizando bloqueantes específicos para los canales de cloro como el ácido 9-anthraceno carboxílico (9AC) y el ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-2,2'-estilbene disulfónico (SITS). Además de estos dos bloqueantes se realizaron pruebas con otros dos: el ácido 4,4'-di-isotiociano-2,2'-disulfónico (DIDS) y el ácido Niflúmico (NFA). Siendo estos últimos 2 no adecuados para su utilización ya que ambos presentan una importante estimulación sobre los canales de liberación de Ca^{2+} , teniendo incluso un efecto irreversible.

Para decidir que bloqueante utilizar y la concentración a aplicar evaluamos los efectos tanto de SITS como de 9AC sobre las chispas. Para inhibir los canales de cloro en la membrana del músculo esquelético es necesaria una concentración de 9AC de entre 100-200 μM (Steinmeyer, K., y col., 1991) mientras que el SITS por sus similitudes químicas con el DIDS suponemos tendría un Kd de unos 20–60 μM (Laver y col., 2001). Para seleccionar la concentración más adecuada realizamos pruebas a diferentes concentraciones de cada uno observando el efecto sobre las chispas (sobre el canal RyR).

Como se mostró en la figura 20-A 50 μM SITS disminuye la frecuencia de chispas a un 20 %. Este efecto no implica necesariamente un bloqueo del canal, sino que este bloqueante aumenta el tiempo de apertura de los RyR (por estimulación) los cuales permanecen abiertos depleccionando el RS de Ca^{2+} e impidiendo la formación de nuevas chispas. Esta conclusión se base en la aparición de eventos de larga duración (figura 20, B) y aumento basal de la fluorescencia. Por este motivo el SITS resulta no ser el bloqueante adecuado para utilizar en esta situación, ya que no se podría superar concentraciones de 20 μM y por lo tanto sería imposible conseguir un bloqueo adecuado de los BCL. Efectos similares se obtuvieron con DIDS y el NFA, con o sin aparición de eventos prolongados.

El 9AC si bien produce una pequeña estimulación como se mostró en la figura 21 es nuestra mejor opción. La reducción que se produce a concentraciones mayores de 800 μM responde al mismo proceso que describimos para SITS, es decir los canales no están siendo inhibidos sino sobre estimulados promoviendo la apertura prolongada lo que reduce la ocurrencia de chispas.

Observando los datos de la figura 21, decidimos que la concentración adecuada de 9AC a utilizar es de 400 μM , ya que esta no produce una estimulación significativa sobre las chispas y se encuentra lo suficientemente por encima del K_d como para producir un adecuado bloqueo. El aumento de la frecuencia que produce 400 μM 9AC es leve y fue normalizado sobre la respectiva frecuencia en 400 μM 9AC para poder comparar los efectos de las distintas concentraciones de Pi, entre las células con 9 AC y las que no lo poseen.

Ahora entonces evaluamos los efectos del Pi sobre la frecuencia de aparición de chispas pero esta vez en presencia de 400 μM 9AC. En la figura 22 mostramos como varia este parámetro en función de la concentración de Pi. Como mencionamos y mostramos anteriormente las concentraciones bajas de Pi producen una estimulación sobre los canales RyR actuando seguramente sobre el sitio aniónico de estimulación. Cuando observamos el efecto de las concentraciones bajas de Pi en presencia de 400 μM 9AC vemos que el efecto potenciador que estas bajas concentraciones poseen se encuentra ausente en presencia de 9AC. Estos datos sugieren que el 9AC está compitiendo con el Pi y que se está uniendo con mayor afinidad al sitio aniónico en los RyR pero con eficiencia claramente menor para estimular el canal.

Obsérvese que para las concentraciones de 10 y 20 mM Pi una concentración de 400 μM 9AC citosólica contrarresta los efectos observados del Pi sobre la frecuencia de chispas, sin embargo el efecto en la reducción de la frecuencia de chispas se observa nuevamente a concentraciones mayores tales como 30 y 55 mM Pi. Aunque la magnitud de la reducción es menor a estas concentraciones de Pi cuando 400 μM 9 AC está presente. Esta observación nos sugiere un bloqueo incompleto de los canales de cloro en la membrana de RS entorpeciendo de esta forma el ingreso del Pi al RS y sus posteriores efectos sobre la precipitación del Ca^{2+} . La hipótesis de un bloqueo parcial se ve fundamentada en que el Pi sigue ejerciendo sus efectos pero con un corrimiento en la curva dosis respuesta hacia concentraciones mayores. (Corrimiento hacia la derecha, disminuye la sensibilidad).

En la Tabla VI observamos los parámetros más relevantes de las chispas registradas a diferentes concentraciones de Pi en presencia de 400 μM 9AC. Hasta 20 mM Pi no se observan diferencias significativas en la frecuencia de aparición de chispas, aunque para las concentraciones mayores (30 y 55 mM Pi) tampoco existen diferencias estadísticamente significativas, se observa una reducción mayor en el valor promedio de la frecuencia. Esperamos que para el caso de 55 mM la significación estadística se pueda obtener aumentando el número de experimentos. 400 μM 9AC contrarresta el efecto de 10 y 20 mM Pi ya que no produjeron diferencias importantes en las magnitud de los parámetros de las chispas, incluso aquellos que la estadísticamente es significativa los cambios son leves (ver tabla VI).

La concentración de 9AC de 400 μM suponemos que es suficiente para producir un bloqueo total de los canales de cloro, sin embargo este bloqueo sobre los BCL se produce del lado intrareticular del canal (Pusch y col., 2002), por lo que 400 μM 9AC en el citosol no asegura que se alcance concentraciones similares y suficientes dentro del RS. Esto se ve afirmado por la disminución en la frecuencia que se continúa observando al aplicar altas concentraciones de Pi. Por este motivo y para lograr un bloqueo completo de los canales realizamos experimentos donde el RS fue cargado con concentraciones altas de 9AC (≈ 2 mM) durante 20-30 minutos, esto aumenta la difusión del bloqueante hacia el RS aumentando la concentración de este en el lumen del RS. Luego de incubadas las células realizamos el experimento con una

concentración estándar de 400 μM como referencia, lo cual evita la depleción del 9AC dentro del RS por debajo de estos valores.

Para que estos experimentos fueran viables debimos suprimir la estimulación que realiza el bloqueante sobre los RyR a altas concentraciones. Para lo cual utilizamos Mg^{2+} a altas concentraciones. En la figura 23 A, mostramos como concentraciones crecientes de Mg^{2+} reducen la frecuencia de chispas, y en la figura 23, B mostramos la reversibilidad de las chispas luego de la incubación con alto 9AC y Mg^{2+} . Las chispas se encuentran completamente inhibidas a una concentración de 10 mM Mg^{2+} . La frecuencia de chispas promedio en condiciones control fue de 19,21 chispas/100 $\mu\text{m.s}$ +/- 0,63, mientras que la frecuencia promedio en 5 mM Mg^{2+} fue de 0,403 chispas/100 $\mu\text{m.s}$ +/- 0,083.

El efecto producido por 30, 55 y 110 mM Pi en ausencia de 9AC y en presencia de este tras el tratamiento de incubación durante 20-30 minutos se mostró en el grafico 24. Las altas concentraciones de bloqueante y el alto Mg^{2+} logran elevar la concentración de 9AC a un nivel intrareticular suficiente como para lograr un alto bloqueo de los canales de cloro e impedir la entrada del Pi hacia el RS. Si el Pi no ingresa al RS no podrá producir la disminución del Ca^{2+} libre y por lo tanto no reduciría la frecuencia de chispas. Esto es lo que se observa en la figura 24. Los valores para los parámetros de las chispas cuando son incubadas con 9AC se muestran en la tabla VIII. Para los valores de frecuencia con este tratamiento previo observamos que la frecuencia de chispas no disminuye significativamente incluso en 55 mM Pi. Mientras que para concentraciones mayores como 110 mM Pi, la frecuencia de chispas disminuye a valores cercanos al 50 %, muy por encima al 8 % que se alcanzaba en ausencia de 9AC. Esto nos indica que el bloqueo de los canales de cloro es mayor cuando incubamos las fibras con altas concentraciones de 9AC por un periodo de tiempo. No podemos asegurar que a concentraciones de 110 mM Pi el ingreso de este anión se produzca por vías alternativas cuando la concentración es tan elevada.

Analizamos los parámetros de las chispas de la tabla VIII con fibras cargadas durante 20-30 minutos con 9AC. Lo más notorio que observamos es que para 55 y 110 mM existe un aumento de la amplitud de las chispas. Un aumento que solo fue observado para concentraciones de 7,5 mM Pi en ausencia de 9AC pero de menor magnitud. Una posible interpretación de este resultado es que 55 y 110 mM Pi son

suficiente para remover el 9AC del sitio aniónico de los RyR, ya que como mencionamos estos resultados no se observaron con el Pi a bajas concentraciones en presencia de 9AC. Relacionado con este aumento de amplitud encontramos que el FWHM y el ancho total aumentan proporcionalmente. Sin embargo en 110 mM Pi la duración total y el FDHM no aumentan proporcionalmente, el aumento en la duración total responde al aumento en Tau más que al aumento en el FDHM. Este último no aumenta lo que nos indica que la base de la chispa se prolonga más en tiempo que la duración a la mitad de la chispa. Con respecto a Tau, para concentraciones de 30 y 55 mM Pi existe una reducción la cual puede estar relacionada con el efecto buffer del Pi sobre el Ca^{2+} liberado. Pero al igual a lo que sucede en ausencia de 9AC a concentraciones de 110 mM Pi la magnitud de Tau aumenta notablemente. Como lo mencionamos anteriormente esto se puede interpretar como un efecto del Pi interfiriendo con la actividad de la bomba SERCA lo que disminuye la recaptación del Ca^{2+} hacia el RS.

Del análisis anterior surge la interpretación de que el efecto del 9AC es debido a que impide la entrada del Pi al RS e inhibe la precipitación de Ca^{2+} manteniendo de esta forma la liberación. Para confirmar esta hipótesis se repitieron los experimentos en los cuales se cargó el RS con Fluo 5N en fibras (figura 19), pero ahora fueron incubadas con 2 mM de 9AC al igual que lo mencionamos en la sección anterior. El objetivo de esta serie de experimentos fue demostrar que la fluorescencia del RS en presencia de alto Pi no disminuye cuando se bloquean completamente los canales de cloro. En la figura 25, A se observa la fluorescencia en presencia de 50 y 110 mM de Pi. El bloqueo impide el descenso de la fluorescencia que reporta la concentración de Ca^{2+} libre dentro del RS. En presencia de 55mM Pi el descenso de la fluorescencia es mínimo en comparación con los resultados obtenidos en las condiciones de referencia (sin bloqueo) (figura 25, B). Por lo que podemos afirmar que el Pi pasa por el canal de cloro del RS y cuando bloqueamos estos el Pi no ingresa al RS no produciéndose de esta forma la disminución en la concentración de Ca^{2+} libre dentro del RS, que si se observa cuando el canal no es bloqueado.

En la tabla IX mostramos los valores de la gráfica de la figura 25 con los datos estadísticos de las diferencias, para los cuales utilizamos un test de t para muestras independientes. Destacamos la gran diferencia entre los valores de fluorescencia en

presencia de 55 y 110 mM Pi donde existe una diferencia significativa entre fibras que poseen el canal de cloro bloqueado y las que no.

7.5. Efecto buffer del Pi.

Unas de las interrogantes que se planteo en los análisis anteriores es en que medida altas concentraciones de Pi puedan ejercer efectos de tipo buffer sobre el Ca^{2+} citoplasmáticos y por lo tanto afectar de esta forma los parámetros de las chispas.

Este efecto podría reducir los parámetros de las chispas y podría ser interpretado equívocamente como resultado de la precipitación de Ca^{2+} dentro del RS. Por estos motivos es importante intentar cuantificar el efecto del Pi como buffer. Para realizar esto hemos analizado los parámetros de las chispas, especialmente las diferencias entre los obtenidos en experimentos realizados con la misma concentración de Pi en ausencia, 400 μ M e incubación con alto 9AC.

[9AC] μ M	55 mM Pi												n
	Amplitud	Std. error	FWHM	Std. error	FDHM	Std. error	Ttp	Std. error	Delta	Std. error	Tau	Std. error	
0.00	0.845	0.159	0.7115*	0.078	0.774*	0.010	0.828	0.061	0.853	0.135	0.643*	0.075	4
400	0.949	0.031	0.881	0.071	0.845	0.071	0.930	0.027	0.979	0.093	0.743*	0.0164	2
2 mM por 20 minutos	1.448	0.152	1.011	0.037	0.900	0.063	0.905	0.094	1.488	0.177	0.675	0.0727	3

Tabla X. Efecto buffer del Pi. Los parámetros corresponden a los obtenidos para las chispas en experimentos con distintas concentraciones de 9AC y con la metodología de carga del RS con 9AC. Observamos que los parámetros aumentan a medida que bloqueamos en mayor medida la entrada del Pi al RS. Indicándonos que el efecto buffer del Pi es moderadamente pequeño.

En la tabla X, vemos los parámetros estándares para el análisis de las chispas, donde todos fueron obtenidos en la misma concentración de Pi en el citoplasma, 55 mM Pi. Como podemos observar a medida que el bloqueo de los canales de cloro es mayor, y por lo tanto existe un mayor impedimento de la entrada de Pi al RS los parámetros de las chispas se acercan a los valores en referencia. En el caso de la amplitud observamos un gran aumento cuando las células son incubadas con alto 9AC por 20 minutos, como mencionamos anteriormente este aumento puede ser debido a la estimulación ejercida por el 9AC sobre los RyR que es removida por esta concentración de Pi, logrando este

ejercer su efecto estimulante sobre los RyR. Por lo tanto los datos mostrados en la tabla X sugieren que el efecto del Pi como amortiguador de Ca^{2+} es menor.

Para apoyar esta interpretación sobre el efecto buffer del Pi realizamos simulaciones de las chispas con una rutina escrita para correr en entorno Mac sigma. Esta rutina simula la difusión del Ca^{2+} en las 3 dimensiones desde una fuente puntual de liberación. Los efectos observados en las simulaciones corresponden sólo a los efectos citoplasmáticos, excluyendo los efectos que el Pi pudiera eventualmente tener dentro del RS. En este modelo se incluyen diferentes amortiguadores de Ca^{2+} , tales como los celulares (troponina, parvalbumina, ATP) y agregados como el EGTA, el pigmento y además el Pi. En el modelo hemos descrito este último anión con una constante de unión (kon) limitada por difusión y utilizamos los valores de las constantes de afinidad aparente tomadas del MaxChelator ($K_{dCa}=18.9 \text{ mM}$, $K_{dMg}=13.7\text{mM}$). Los parámetros utilizados para la realización de las simulaciones se observan en el Anexo 3, donde se detallan los valores de las constantes y concentraciones utilizadas.

En la figura 30, A podemos observar la diferencia en el perfil temporal de las chispas simuladas con 2 concentraciones diferentes de Pi. Hay que tener en cuenta que se asume que el único efecto del Pi simulado es aquel que este tenga como buffer a nivel citoplasmático ya que asume una fuente con geometría fija y no se modifican los gradientes.

Los resultados de las simulaciones se encuentran en concordancia con los presentados en la tabla X. Se verifica una reducción máxima del 20% en la amplitud para la concentración más alta simulada. El perfil espacial muestra también una pequeña modificación en el pico, pero prácticamente incambiado al 50% de la amplitud. Por lo tanto las simulaciones sugieren que el Pi tiene un efecto amortiguador leve sobre el Ca^{2+} citoplásmico por lo que es difícil que reduzca la difusión del Ca^{2+} como para inhibir la generación de la chispa y bajar la frecuencia de aparición de estas.

Es de gran interés el aumento en la amplitud de las chispas que se observa en altas concentraciones de Pi cuando la fibra fue incubada con alto 9AC. Y esto nos sugiere que el efecto estimulador del Pi predomina sobre el producido por el 9AC, por lo que podemos deducir que ambos actúan sobre el mismo sitio de estimulación sobre el RyR.

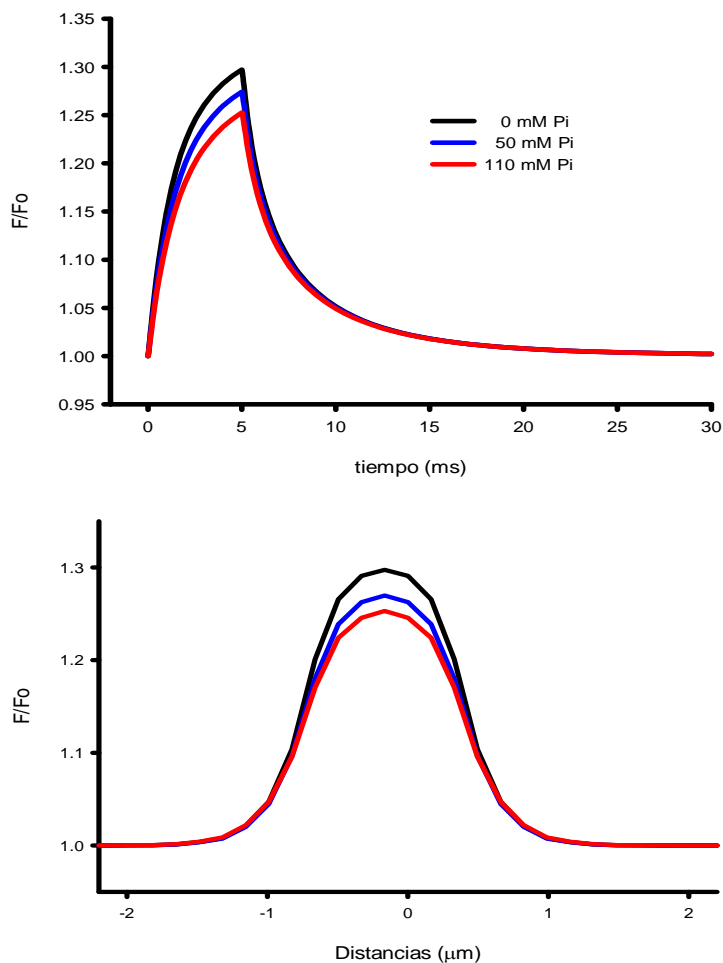


Figura 30. Simulación de eventos en presencia de Pi.

Las figuras muestran 3 chispas obtenidas de simulaciones realizadas con el agregado de Pi a 2 concentraciones 50 y 110 mM. En estas figuras muestra que el Pi a altas concentraciones tiene un efecto amortiguador menor sobre la morfología de los eventos.

En **A** se muestra el perfil temporal de la chispa registrada en modo “xt”.

En **B**, el perfil en la dimensión x.

Los trazos negros corresponden a 0mM Pi, los azules a 50 mM y los rojos a 110 mM.

Parámetros en Anexo 3

Con estos resultados en mente se llevaron a cabo experimentos en fibra cortada con alto 9AC en el medio intracelular (fig.26). Los resultados muestran que en estas condiciones el flujo de liberación en presencia de Pi en la solución intracelular (110 mM en los extremos) no solo no se reduce como se mostró al principio, sino que se potencia. La relación pico-base también muestra un marcado aumento a voltajes intermedios. En su conjunto estos resultados muestran el efecto potenciador directo sobre el flujo de liberación que tiene el Pi actuando directamente sobre el canal de liberación del lado citoplasmático en fibras que conservan su membrana y el mecanismo de AEC intacto cuando se impide su ingreso al RS. Debemos recordar que la concentración de Pi en el centro de la fibra seguramente sea un poco menor que la concentración que colocamos en los compartimentos laterales, pero en esas condiciones en ausencia de 9AC siempre obtuvimos una marcada inhibición.

8. Conclusiones

1. En relación a los resultados obtenidos en la primera parte para los objetivos específicos 1 y 2, en ambos apartados hemos observado disminuciones en los transitorios de Ca^{2+} inducidos por pulsos de voltajes. Este constituye uno de los principales resultados de este trabajo: la demostración directa de que el Pi intracelular suprime el flujo de liberación de Ca^{2+} afectando principalmente el pico del mismo. Si bien también se observa un efecto sobre el componente estacionario, este es menor. Estos resultados se interpretaron como debidos a un efecto sobre el contenido de Ca^{2+} del RS y sobre la LCIC. Los experimentos con fibras permeabilizadas permitieron evaluar la producción de chispas. Describimos el efecto que el Pi presenta sobre estas, reduciendo la frecuencia básicamente al 7 % en altas concentraciones. La disminución de la frecuencia se correlacionó con la precipitación del Ca^{2+} libre dentro del RS, estos datos concuerdan con los descritos en fibras cortadas.
2. Un segundo resultado relevante de este trabajo es la confirmación mediante el uso de indicadores de Ca^{2+} dentro del RS de que el Pi ingresa al mismo. Estos estudios permitieron evidenciar la disminución del Ca^{2+} dentro de este organelo en presencia de Pi y correlacionar este efecto con la disminución de la producción de chispas.
3. La tercera conclusión importante de este estudio la constituye el hecho de que confirmamos que la principal vía de entrada para el Pi hacia el RS son los canales de cloro como lo habían propuesto Laver y col. en 2001, principalmente por el canal de alta conductancia (BCL) que se encuentra en la membrana del RS y que no es inhibido por ATP. No podemos descartar otras vías de entrada, pero si confirmamos que el ingreso por estos canales es la vía principal del anión hacia el RS, ya que utilizando bloqueantes para los canales de cloro logramos impedir el ingreso del Pi al RS.
4. El cuarto resultado importante es que con el preparado de fibras permeabilizadas hemos confirmado la existencia de un efecto potenciador del Pi sobre los canales de liberación actuando a nivel citoplasmático. A bajas concentraciones este anión puede jugar un rol importante potenciando la actividad muscular durante la actividad intensa. También evidenciamos, impidiendo la entrada de Pi al RS, el

efecto potenciador a concentraciones más altas, pero este en condiciones fisiológicas sería contrarrestado por la disminución del Ca^{2+} dentro del RS.

5. Un resultado adicional fue la demostración por primera vez de que el 9AC posee un efecto potenciador sobre los canales de liberación del musculo esquelético (RyR). Este efecto se manifiesta por un aumento de la frecuencia de los eventos elementales de liberación y por la aparición de eventos de larga duración que responden a aperturas prolongadas de uno o varios canales. También se confirmó que otros bloqueantes tienen importantes efectos potenciadores sobre los RyR.
6. En suma, los resultados de estos estudios contribuyen a la comprensión de los mecanismos involucrados en la fatiga muscular. Adicionalmente proporcionan información que permitirá abrir nuevas líneas de investigación en el tema.

7. *Bibliografía*

- Ahern GP, Laver DR. (1998) ATP inhibition and rectification of a Ca^{2+} -activated anion channel in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biophys J.*;74(5):2335-51.
- Allen DG. (2004) Skeletal muscle function: role of ionic changes in fatigue, damage and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: 485-493
- Allen DG, Lannergren J, Westerblad H (1995) Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol* 80:497-527
- Balnave CD, Allen DG. (1998) Evidence for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am J Physiol.* 274:C940-6
- Baylor SM. (2005) Calcium sparks in skeletal muscle fibers. *Cell Calcium.* 37(6):513-30
- Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P. & 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, 2587–2600.
- Brum G, Piriz N, DeArmas R, Ríos E, Stern M, Pizarro G. (2003). Differential effects of voltage dependent inactivation and local anesthetics on kinetic phases of Ca^{2+} release in frog skeletal muscle. *Biophys J.* Jul;85(1):245-54.
- Brum G, Ríos E, Stéfani E. (1988). Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 398:441-73.
- Costantin LL. (1975). Electrical properties of the transverse tubular system. *Fed Proc.*;34(5):1390-4.
- Coonan JR, Lamb GD (1998) Effect of chloride on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mechanically skinned skeletal muscle fibres. *Pflugers Arch.*;435(5):720-30.
- Csernoch L, Zhou JS, Stern MD, Brum G, Ríos E (2004) The elementary events of Ca^{2+} release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle. *J Physiol* 557:43–58
- Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. (1980) Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J Physiol.* 299:465-84.

- De Armas R, González S, Brum Gand Pizarro G. (1998) Effects of 2,3-butanedione monoxime on excitation-contraction coupling in frog twitch fibres *J Mus Res Cell Motil* 19: 961-977
- Debold EP, Romatowski J, Fitts RH. (2006) The depressive effect of Pi on the force-pCa relationship in skinned single muscle fibers is temperature dependent. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(4):C1041-50. Epub 2005 Nov 9.
- Duke AM and Steele DS (2001). Mechanisms of reduced SR Ca²⁺ release induced by inorganic phosphate in rat skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:418-429,
- Dutka TL, Cole L, Lamb GD (2005) Ca release in mammalian skeletal muscle reticulum reduces action potential-mediated Calcium phosphate precipitation in the sarcoplasmic Am J Physiol Cell Physiol 289:1502-1512
- Favero TG (1999) Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and muscle fatigue. *J Appl Physiol* 87(2): 471–483
- 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
- Figueroa L, Zhou J, Momotake A, Ellis-Davies G, Ríos E and Brum G. (2010) CICR and Ca-dependent inactivation, quantified through the sparks in single muscle cells. *Biophys.Soc.Meeting.San.Francisco.*
<http://www.biophysics.org/Default.aspx?alias=www.biophysics.org/2010meeting>
- Fruen BR, James S, Mickelson R, Shomer NH, Roghair TJ, Louis CF (1994) Regulation of the Sarcoplasmic Reticulum Ryanodine Receptor by Inorganic Phosphate. *Am Soc Biochem Mol Biol* 269: 192-196
- Fryer MW, Owen VJ, Lamb GD, Stephenson DG.(1995) Effects of creatine phosphate and P(i) on Ca²⁺ movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 482:123-40.
- Godt RE, Nosek TM.(1989) Changes of intracellular milieu with fatigue or hypoxia depress contraction of skinned rabbit skeletal and cardiac muscle.*J Physiol.* 412:155-80.
- González A, Kirsch WG, Shirokova N, Pizarro G, Brum G, Pessah IN, Stern MD, Cheng H, Ríos E. (2000) Involvement of multiple intracellular release channels in calcium sparks of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):4380-5

- Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM. (1993) Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys J.* ;65(2):865-81.
- Jones PP, Braun AP. (2009) Store operated Ca²⁺ entry (SOCE): from structure to function. *Channels (Austin).*;3(1):1-2. Epub 2009 Jan 23.
- Kettlun C, González A, Ríos E, Fill M. (2003) Unitary Ca²⁺ current through mammalian cardiac and amphibian skeletal muscle ryanodine receptor Channels under near-physiological ionic conditions. *J Gen Physiol.* 122(4):407-17
- Kirsch WG, Uttenweiler D, Fink RH.(2001) Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol.* 537:379-89
- Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR. (2000) Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* 275(23):17639-46.
- Kornyejev D, Reyes M, Escobar AL. (2010) Luminal Ca(2+) content regulates intracellular Ca(2+) release in subepicardial myocytes of intact beating mouse hearts: effect of exogenous buffers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* ;298(6):H2138-53.
- Kourie JI, (1997) A redox O₂ sensor modulates the SR Ca²⁺ countercurrent through voltage- and Ca(2+)-dependent Cl⁻ channels. *Am J Physiol.*;272(1 Pt 1):C324-32.
- Kourie JI, (1997) ATP-sensitive voltage- and calcium-dependent chloride channels in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *J Membr Biol.* 1;157(1):39-51.
- Kourie JI, (1997) Chloride channels in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* ;68(2-3):263-300.
- Kourie JI, (1999) pH-modulation of chloride channels from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J Membr Biol.* 1;167(1):73-83.
- Kourie JI, Laver DR, Ahern GP, Dulhunty AF. (1996) A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Am J Physiol.* 270(6 Pt 1):C1675-86
- Kovacs L, Rios E, Schneider MF (1983) Measurement and modification of free calcium transients in frog skeletal muscle fibres by a metallochromic indicator dye. *J Physiol* 343:161-96

- Lacampagne A, Klein MG, Schneider MF. (1998) Modulation of the frequency of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release events (Ca²⁺ sparks) by myoplasmic [Mg²⁺] in frog skeletal muscle. *J Gen Physiol.*;111(2):207-24.
- Launikonis BS, Zhou J, Royer L, Shannon TR, Brum G, Ríos E.(2005) Confocal imaging of [Ca²⁺] in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence. *J Physiol.* 567(Pt 2):523-43
- Launikonis BS, Zhou J, Santiago D, Brum G, Ríos E. (2006) The changes in Ca²⁺ sparks associated with measured modifications of intra-store Ca²⁺ concentration in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 128(1):45-54
- Laver DR, Honen BN.(2008) Luminal Mg²⁺, a key factor controlling RYR2-mediated Ca²⁺ release: cytoplasmic and luminal regulation modeled in a tetrameric channel. *J Gen Physiol.*;132(4):429-46.
- Laver DR, Lenz GK, Dulhunty AF (2001) Phosphate ion channels in sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Physiol* 535:715-28
- Laver DR, O'Neill ER, Lamb GD (2004) Luminal Ca²⁺-regulated Mg²⁺ inhibition of skeletal RyRs reconstituted as isolated channels or coupled clusters. *J Gen Physiol* 124(6):741-58
- Marx SO, Ondrias K, Marks AR. (1998) Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science* 281: 818–821
- Masaki T, Yoshizaki C. (1972) The onset of myofibrillar protein synthesis in chick embryo in vivo. *J Biochem.*;71(4):755-7.
- Meissner G (1994) Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56:485-508
- Melzer W, Ríos E, and Schneider MF (1984) Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophys.J.* 45:637--641.
- Melzer W, Ríos E, and Schneider MF (1987) A general procedure for determining the rate of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *Biophys J.*1(6):849-63.
- Millar NC, Homsher E. (1990) The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibers. A steady-state and transient kinetic study. *J Biol Chem.* ;265(33):20234-40.

- Murayama T, Ogawa Y.(2004) RyR1 exhibits lower gain of CICR activity than RyR3 in the SR: evidence for selective stabilization of RyR1 channel. *Am J Physiol Cell Physiol*; 287(1):C36-45.
- Naraghi M, Neher E. (1997) Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci*. 17:6961-73
- O'Neill ER, Sakowska MM, Laver DR. (2003) Regulation of the calcium release channel from skeletal muscle by suramin and the disulfonated stilbene derivatives DIDS, DBDS, and DNDS. *Biophys J*. 84(3):1674-89
- Pizarro G, Ríos E. (2004) How source content determines intracellular Ca²⁺ release kinetics. Simultaneous measurement of [Ca²⁺] transients and [H⁺] displacement in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 124:239-58
- Pusch M, Accardi A, Liantonio A, Guida P, Traverso S, Camerino DC, Conti F. (2002) Mechanisms of block of muscle type CLC chloride channels (Review). *Mol Membr Biol*. ;19(4):285-92.
- Rios, E. y Brum,G. (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325:717-720,
- Rios, E. y Brum,G. (2002). Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in skeletal muscle. *Front Biosci*. 2002 May 1;7:d1195-211.
- Ríos, E., Györke S. (2009) Calsequestrin, triadin and more: the molecules that modulate calcium release in cardiac and skeletal muscle. *J Physiol* 587(Pt 13):3069-70
- Ríos, E. & Pizarro, G. (1988) *News Physiol Sci* 3, 223–227
- Ríos, E., Stern MD. (1997) Calcium in close quarters: microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*.;26:47-82.
- Ríos E, Stern MD, González A, Pizarro G, Shirokova N. (1999) Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle. *J Gen Physiol*. 114(1):31-48
- Ríos E, Zhou J, Brum G, Launikonis BS, Stern MD. (2008) Calcium-dependent inactivation terminates calcium release in skeletal muscle of amphibians. *J Gen Physiol*.;131(4):335-48.
- Schneider, M.F, Simon BJ y Szucs. 1987 Depletion of calcium from the sarcoplasmic reticulum during calcium release in frog skeletal muscle. *J Physiol* 392: 167-192

- Shirokova N, Shirokov R, Rossi D, González A, Kirsch WG, Garcia J, Sorrentino V, Rios E (1999) Spatially segregated control of Ca²⁺ release in developing skeletal muscle of mice, *J. Physiol.* 521: 483-495
- Shirokova, N., García, J., Pizarro, G. & Ríos, E. (1996) Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *Journal of General Physiology* 107, 1-18.
- Shirokova N, Rios E. (1997) Small event Ca²⁺ release: a probable precursor of Ca²⁺ sparks in frog skeletal muscle, *J Physiol* 502 3–11
- Simon BJ, Klein MG, Schneider MF. J. (1991) Calcium dependence of inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol.* 1991 Mar;97(3):437-71
- Steinmeyer K, Klocke R, Ortlund C, Gronemeier M, Jockusch H, Gründer S, Jentsch TJ. (1991) Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature.* 28;354(6351):304-8.
- Steinmeyer K, Ortlund C, Jentsch TJ. (1991) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature.* 28;354(6351):301-4
- Tanifuji M, Sokabe M, Kasai M. (1987) An anion channel of sarcoplasmic reticulum incorporated into planar lipid bilayers: single-channel behavior and conductance properties. *J Membr Biol.* 1987;99(2):103-11.
- Tsugorka A, Ríos E, Blatter LA (1995) Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science.* 269(5231):1723-1726
- Weisleder N, Ma JJ. (2006) Ca²⁺ sparks as a plastic signal for skeletal muscle health, aging, and dystrophy. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Jul;27(7):791-8
- Westerblad H, Allen DG. (1994) Relaxation, [Ca²⁺]_i and [Mg²⁺]_i during prolonged tetanic stimulation of intact, single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol.* 480:31-43
- Westerblad H, Allen DG. (1996) Mechanisms underlying changes of tetanic [Ca²⁺]_i and force in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.*;156(3):407-16.
- Westerblad H, Allen DG. (1996) Slowing of relaxation and [Ca²⁺]_i during prolonged tetanic stimulation of single fibres from *Xenopus* skeletal muscle. *J Physiol.* 1;492 (Pt 3):723-36.

- Westerblad H, Allen DG. (1996) The effects of intracellular injections of phosphate on intracellular calcium and force in single fibres of mouse skeletal muscle. Pflugers Arch.;431(6):964-70.
- Wolf, M. Eberhart, A. Glossmann, H., Striessnig. J, Grigorieff, N. (2003) Visualization of the Domain Structure of an L-type Ca²⁺ Channel Using Electron Cryo-microscopy. J Mol Biol.; 332(1):171-82.
- Zhou J, Launikonis BS, Ríos E, Brum G. (2004) Regulation of Ca²⁺ sparks by Ca²⁺ and Mg²⁺ in mammalian and amphibian muscle. An RyR isoform-specific role in excitation-contraction coupling? J Gen Physiol. 124:409-28
- Zhou J, Brum G, Gonzalez A, Launikonis BS, Stern MD, Rios E. (2005) Concerted vs. sequential. Two activation patterns of vast arrays of intracellular Ca²⁺ channels in muscle. J Gen Physiol. 126(4):301-9.

10.1. ANEXO 1

Figura 18. Registros de fluorescencia en el RS.

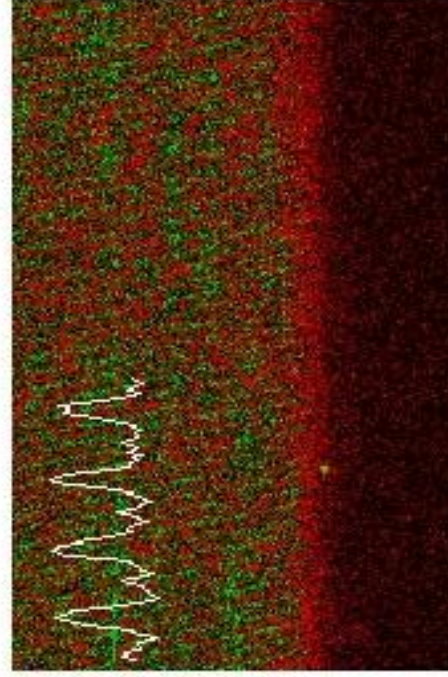
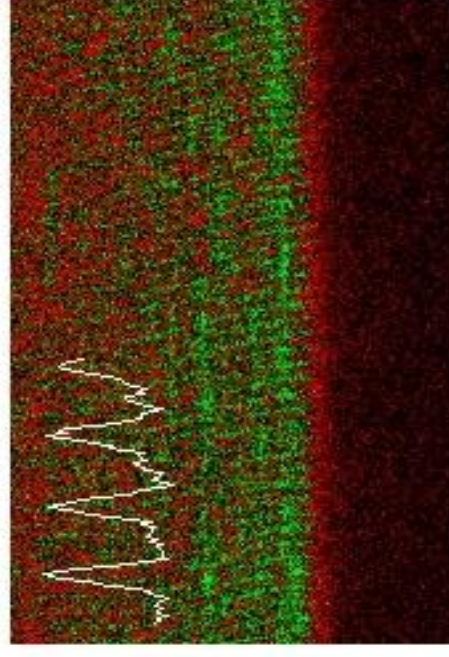
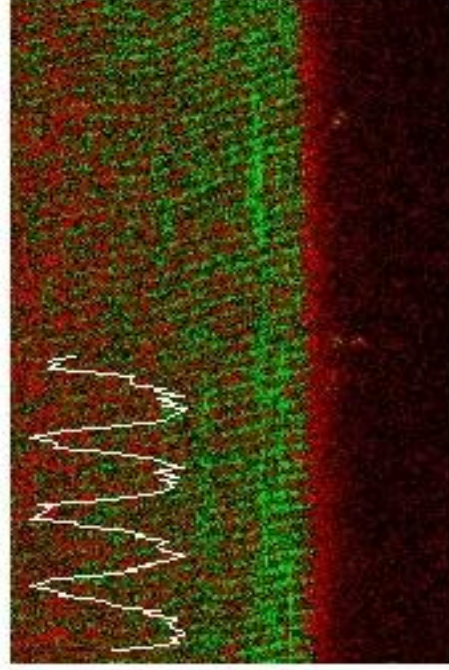
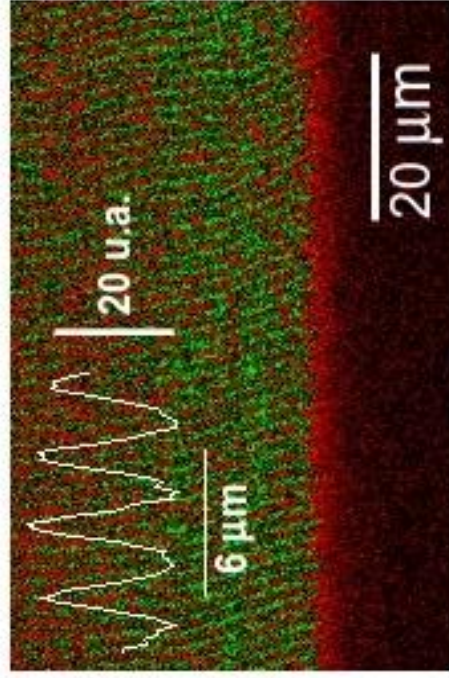
Las imágenes muestran los perfiles medidos en una fibra cargada con Fluo 5N AM a la cual se le aplicó una concentración citoplasmática de 50 mM de Pi y luego Cafeína 10 mM con los respectivos lavados. La morfología del perfil de fluorescencia muestra el característico bandeo que se correlaciona con la distribución de las cisternas terminales del músculo esquelético. Se adjunta la misma imagen de mayor tamaño en el anexo 1.

El Pi reduce la $[Ca^{2+}]$ en el RS

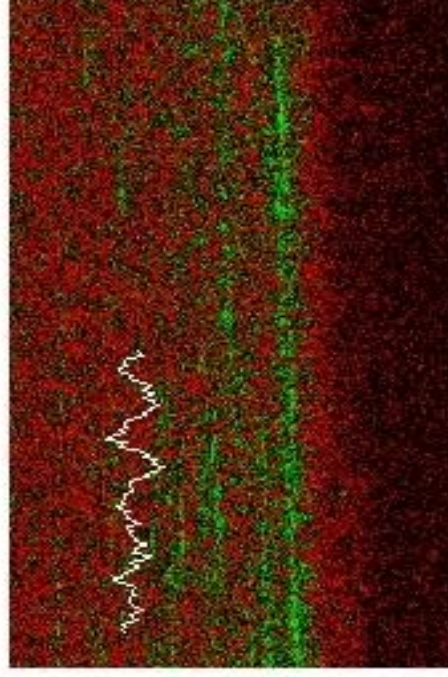
Referencia

1^{er} lavado

2^{do} lavado



Pi 50 mM



Cafeina 10 mM

10.2. ANEXO 2

Parámetros utilizados para la simulación de los transitorios y de los flujos de liberación de Ca^{2+} para pulsos de corta o media y larga duración. Figura 29.

Concentraciones en mM, corriente pA, tiempo ms, medidas en μm .

Las variaciones que se produjeron fueron como lo mencionamos en el texto de variar la concentración de Ca^{2+} dentro del RS de 4 a 2 mM.

-4 mM Ca^{2+} dentro del RS ~ fibra en condiciones de referencia.

-2 mM Ca^{2+} dentro del RS ~ fibra en presencia de Pi.

-Corriente por los canales de Ca^{2+} activados por $\text{Ca}^{2+} = 0.3 \text{ pA}$

-Corriente por los canales de Ca^{2+} activados por voltaje = 0.1 pA

Duración de la liberación entre 200 y 1000 ms,

$[\text{Ca}^{2+}]$ basal 100 nM

$[\text{Mg}^{2+}]$ libre 0.5 mM

[EGTA] 10 mM

Coefficiente de difusión:

dca = 0.5 { Coeficiente de difusión del calcio }

Concentraciones y constantes cinéticas:

EGT= 10 mM. {EGTA total}

KoffEG= $0.11 \times 10^{-1} \text{ ms}^{-1}$ {Ca:EGTA Constante de disociación }

KonEG= $0.77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$ {Ca:EGTA Constante de asociación }

SERCA [0.13] mM total

Max. Vel. De la bomba = $0.98 \times 10^{-2} \text{ mM} \cdot \text{ms}^{-1}$

KoffPP = 0.15 {Ca:bomba Constante de disociación }

KonPP = 500.0 {Ca:bomba Constante de asociación }

Parvalbumina.

PVT = 1.8 mM {Concentración total}

Con Ca²⁺

KoffPVCA = 0.29×10^{-2} {Ca:parvalbumina Constante de disociación}
KonPVCA = 100.0 {Ca:parvalbumina Constante de asociación }

Con Mg²⁺

KoffPVMG = 0.27×10^{-2} {Mg:parvalbumina Constante de disociación}
KonPVMG = 0.4×10^{-1} {Mg:parvalbumina Constante de asociación }

Troponina.

TRT = 0.24 {total troponina, troponina total}
KonTR=100 {Ca:troponina Constante de asociación }
KoffTR = 0.6 {Ca:troponin dissociation Constante de disociación }

10.3. ANEXO 3

Parámetros utilizados para la simulación de chispas. Figura 32 A y B

Concentraciones en mM, corriente pA, tiempo ms, medidas en μm .

Corrente de liberación = 22 pA

Duración de la liberación = 5 ms,

Tamaño fuente 0.5 μm

[Ca²⁺] basal 100 nM

[Mg²⁺] libre 0.3 mM

Coefficientes de difusión:

dca = 0.35 { Coeficiente de difusión del calcio }

db = 0.02 { Coeficiente de difusión del pigmento libre de Ca }

dbc = 0.02 { Ca:dye Coeficiente de difusión del pigmento unido a Ca }

degca = 0.036 { Coeficiente de difusión del EGTA con o sin ligando }

dpv = 0.016 { Coeficiente de difusión de la Parvalbumina }

datp = 0.14 { Coeficiente de difusión del ATP }

dpi = 0.33 { Coeficiente de difusión del Pi }

Concentraciones y constantes cinéticas:

bt = 0.20 { Concentración total de pigmento }

kon = 81 { Constante de asociación del Ca y el pigmento }

kd = 0.0011

koff = kd*kon { Ca:pigmento Constante de disociación }

EGTA=10 mM. { Total EGTA }

KoffEG= 0.0075 { Ca:EGTA Constante de disociación }

KONEG= 15 { Ca:EGTA Constante de asociación }

{kd= 0.0005 mM}

Fosfato inorganico

PIT = 0, 50, 110. { Pi total }

Con Ca²⁺

KoffPICA = 1400000 { Ca:Pi Constante de disociación }

KonPICA = 70000 { Ca:Pi Constante de asociación }

Con Mg²⁺

KoffPIMG = 980000 { Mg:Pi Constante de disociación }
KonPIMG = 1400000 { Mg:Pi Constante de asociación }

Bomba ATPasa SERCA del RS:

PPT = 0.24 { Sitios Totales de la bomba, mM }
PMAX = 0.0098 { Max SR constante de la bomba }
KoffPP = 0.5 { Ca: bomba, Constante de disociación }
KonPP = 500.0 { Ca: bomba Constante de asociación }

Parvalbumina.

PVT = 1.0 { total parvalbumina }

Con Ca²⁺

KoffPVCA=0.00125 { 0.0005 ,Ca:parvalbumina constante de disociación }
KonPVCA = 125.0 { Ca:parvalbumina Constante de asociación }
{ KdCa = 0.000010 mM }

Con Mg²⁺

KoffPVMG = 0.003 { Mg:parvalbumin constante de disociación }
KonPVMG = 0.03 { Mg:parvalbumin Constante de asociación }
{ KdMg = 0.1 mM }

ATPT = 5.0 mM { total ATP }

Con Ca²⁺

KoffATPCA = 30 { Ca:ATP constante de disociación }
KonATPCA = 150 { Ca:ATP Constante de asociación }
{ kd=0.2 mM }

Con Mg²⁺

KoffATPMG = 0.195 { Mg:ATP constante de disociación }
KonATPMG = 1.95 { Mg:ATP Constante de asociación }
{ kd= 0.1 mM }

Troponina

TRT = 0.24 mM { total troponin }
KonTR = 10.0 { Ca:troponin Constante de asociación }
KoffTR = 0.6 { Ca:troponin constante de disociación }
{ kd=0.06 mM }

Juan José Ferreira

(Responsable)

Gustavo Brum

(Tutor)