



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN DEL ESTADO REDOX  
SOBRE LA INHIBICIÓN POR MAGNESIO DE CANALES DE  
CALCIO MIOCÁRDICOS SENSIBLES A RYANODINA

**ALEJANDRO CHAMORRO BUSTAMANTE**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fisiología y  
Biofísica

**PROFESOR GUÍA: RICARDO BULL S.**

Financiamiento:

Proyecto FONDAP N° 15010006  
Proyecto FONDECYT N° 8980009

SANTIAGO, CHILE  
2004



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN DEL ESTADO REDOX SOBRE LA INHIBICIÓN POR MAGNESIO DE CANALES DE CALCIO MIOCÁRDICOS SENSIBLES A RYANODINA

### ALEJANDRO CHAMORRO BUSTAMANTE

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fisiología y  
Biofísica

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: RICARDO BULL S.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: RAMÓN MARTINEZ P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: EDUARDO KESSI C.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2004

## RESUMEN

Los iones calcio, como segundos mensajeros, son de importancia central en la regulación de variados procesos celulares. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  son generadas por ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular y/o por liberación de éste desde los reservorios intracelulares. Dos diferentes vías permiten la liberación de calcio desde el retículo sarco/endoplasmático: los canales con receptor para 1,4,5-inositol trifosfato y los canales liberadores de calcio sensibles a ryanodina.

Las distintas categorías taxonómicas de animales, expresan diversas isoformas de receptores de ryanodina (RyR) en las diferentes células excitables. En los mamíferos, RyR-1 es la principal isoforma encontrada en las células musculares esqueléticas, mientras que RyR-2 es la principal isoforma de las células del músculo cardíaco.

Los canales liberadores de calcio sensibles a ryanodina están regulados por la unión de varios iones y moléculas ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , ATP, y ADP-ribosa cíclica), por la interacción con otras proteínas (receptores de dihidropiridinas, calmodulina, FKBP12, triadina, juntina, y calsecuestrina), y por reacciones metabólicas que producen modificaciones covalentes de la proteína-canal (fosforilación y oxidación).

Estudios previos indican que los canales RyR presentan distintas respuestas a la concentración citoplasmática de calcio, activándose a concentraciones de calcio del orden  $\mu\text{M}$ , e inhibiéndose a concentraciones de calcio mM. Además, el  $\text{Mg}^{2+}$  es un potente inhibidor de la liberación de calcio, a las concentraciones encontradas en el músculo esquelético. Este efecto inhibitorio es muy marcado sobre la isoforma RyR-1, mientras que la inhibición sobre la isoforma RyR-2 es menos pronunciada.

Se ha demostrado que la modificación redox de los residuos SH del canal RyR altera su respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Mg}^{2+}$ . La oxidación aumenta la afinidad aparente para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  y disminuye la afinidad para la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$ . Inversamente, la reducción de los residuos SH disminuye la afinidad para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  y aumenta la afinidad para la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$ .

El propósito de esta memoria de título es estudiar, a nivel de canal único, la modificación de la inhibición por magnesio mediada por oxidación y/o reducción de residuos SH de canales RyR de músculo cardíaco, además de caracterizar el mecanismo por medio del cual la oxidación disminuye la inhibición por magnesio.

Nuestros resultados mostraron que los canales con respuesta de tipo MS, correspondientes a canales más reducidos, presentan una  $K_i$  para el  $Mg^{2+}$  menor que los canales con respuesta de tipo C, los cuales están más oxidados (Marengo et al., 1998). Además, encontramos que un canal con una conducta espontánea de tipo MS puede disminuir su sensibilidad a la inhibición por  $Mg^{2+}$  por oxidación de sus residuos SH, al transformarse en un canal de tipo C. Estos efectos fueron reversibles por reducción de residuos SH.

Utilizando el modelo publicado previamente por Laver et al. (1997) para explicar la inhibición por  $Mg^{2+}$  de los canales RyR, se encontró que a bajas concentraciones de calcio ( $6 \mu M$ ), los canales con respuesta de tipo MS fueron inhibidos por  $Mg^{2+}$  principalmente por competencia de éste con el  $Ca^{2+}$  por el sitio activador para  $Ca^{2+}$  (inhibición Tipo I). Los canales de tipo C fueron inhibidos principalmente por la unión del  $Mg^{2+}$  a los sitios inhibidores de baja afinidad, los cuales no discriminan entre  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (inhibición Tipo II). A concentraciones de  $Ca^{2+}$  más altas ( $13 \mu M$ ), tanto la unión al sitio activador para  $Ca^{2+}$  como a los sitios inhibidores para divalentes contribuyeron a la inhibición por  $Mg^{2+}$  de los canales de tipo MS.

## SUMMARY

Calcium ions, as second messengers, play a central role in the regulation of a variety of cellular processes.  $\text{Ca}^{2+}$  signals are generated by  $\text{Ca}^{2+}$  entry from the extracellular medium and/or by  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores. Two different pathways allow calcium release from the sarco/endoplasmic reticulum: inositol-1,4,5-trisphosphate receptor channels and ryanodine-sensitive calcium release channels.

Different taxonomic categories of animals differentially express ryanodine receptor (RyR) isoforms in different excitable cells. In mammals, RyR-1 is the main isoform found in skeletal muscle cells, whereas RyR-2 is the main isoform of heart muscle cells.

Ryanodine sensitive calcium release channels are regulated by binding of several ions and molecules ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , ATP, and cyclic ADP-ribose), by interaction with other proteins (dihydropyridine receptors, calmodulin, FKBP12, triadin, junctin, and calsequestrin), and by metabolic reactions that produce covalent modifications of the channel protein (such as phosphorylation and oxidation).

Previous studies indicate that RyR channels display different responses to the cytoplasmic calcium concentration, being activated by calcium in the  $\mu\text{M}$  range, and inhibited by mM concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ . Furthermore,  $\text{Mg}^{2+}$  is a powerful inhibitor of calcium release, at the concentrations found in skeletal muscle. This inhibitory effect is very marked on RyR-1, whereas inhibition of RyR-2 is less pronounced.

It has been demonstrated that redox modification of SH residues from the RyR channel protein modifies the channel response to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . Oxidation increases the apparent affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  activation and reduces the affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition. Conversely, SH reduction decreases the affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  activation and increases the affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition.

The aim of this professional degree memory is to study, at the single-channel level, the modification of magnesium inhibition mediated by oxidation

and/or reduction of SH residues from RyR channels from heart muscle and to characterize the mechanism by which oxidation reduces the magnesium inhibition.

Our results show that channels with MS response, that correspond to the more reduced channels, display a smaller  $K_i$  value for  $Mg^{2+}$  than channels with C response, which are more oxidized (Marengo et al., 1998). Furthermore, we show that a channel with spontaneous MS behavior can to reduce its sensitivity to  $Mg^{2+}$  inhibition by SH oxidation after becoming a C type channel. This effect was reversible upon SH reduction.

Using the model previously published by Laver et al. (1997) to explain  $Mg^{2+}$  inhibition of RyR channels, it was found that at low calcium concentrations (6  $\mu M$ ), channels with MS behavior were inhibited by  $Mg^{2+}$ , mainly by competition with  $Ca^{2+}$  at the  $Ca^{2+}$  activation site (Type I inhibition). Channels with C behavior were mainly inhibited by binding of  $Mg^{2+}$  to the low affinity inhibition sites, which do not discriminate between  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  (Type II inhibition). At higher  $[Ca^{2+}]$  (13  $\mu M$ ), binding to both Ca activation and divalent inhibitory sites contributed to  $Mg^{2+}$  inhibition of MS channels.

# INDICE

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	- 1 -
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	- 3 -
<b>Mecanismos de Señalización por Ca<sup>2+</sup></b> .....	- 3 -
- <i>Mecanismos que aumentan la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></i> .....	- 4 -
- <i>Mecanismos que remueven el Ca<sup>2+</sup> desde el citoplasma</i> .....	- 5 -
- <i>Generación de señales que movilizan Ca<sup>2+</sup></i> .....	- 7 -
- <i>Procesos sensibles al Ca<sup>2+</sup></i> .....	- 8 -
<b>Aspectos Espacio Temporales de la Señalización por Ca<sup>2+</sup></b> .....	- 8 -
- <i>Eventos elementales</i> .....	- 8 -
- <i>Ondas de Ca<sup>2+</sup></i> .....	- 10 -
<b>Señalización por Ca<sup>2+</sup> en el cardiomiocito</b> .....	- 10 -
<b>Canales Receptores de Ryanodina (RyR)</b> .....	- 12 -
<b>Moduladores de Canales RyR</b> .....	- 15 -
- <i>Modulación de Canales RyR por Calcio Citoplasmático</i> .....	- 15 -
- <i>Modulación de Canales RyR por Modificación de su Estado Redox</i> .....	- 17 -
<b>Patologías Relacionadas al RyR</b> .....	- 19 -
<b>OBJETIVOS</b> .....	- 22 -
- <i>Objetivo General</i> .....	- 22 -
- <i>Objetivos Específicos</i> .....	- 22 -
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	- 23 -
- <i>Aislamiento de vesículas de retículo sarcoplasmático de miocardio de conejo</i> .....	- 23 -
- <i>Experimentos en bicapas planas de lípidos</i> .....	- 26 -
- <i>Obtención y Análisis de Datos</i> .....	- 31 -

# INDICE

	Pág.
<b>RESULTADOS</b> .....	- 32 -
<b>Respuesta a la concentración citoplasmática de <math>Ca^{2+}</math> de canales nativos provenientes de miocardio de conejo</b> .....	- 32 -
<b>Inhibición por <math>Mg^{2+}</math> de canales nativos con diferente respuesta al <math>Ca^{2+}</math></b>	- 33 -
- <i>Inhibición de un canal nativo único con respuesta al calcio de tipo MS...</i>	- 33 -
- <i>Inhibición de un canal nativo único con respuesta al calcio de tipo C.....</i>	- 34 -
<b>La oxidación de los canales RyR modifica el efecto inhibitorio del <math>Mg^{2+}</math> sobre su actividad</b> .....	- 37 -
<b>Mecanismos de inhibición por magnesio</b> .....	- 40 -
<b>Mecanismo de inhibición por <math>Mg^{2+}</math> de canales de tipo MS a diferente concentración citoplasmática de calcio</b> .....	- 45 -
<b>DISCUSIÓN</b> .....	- 47 -
<b>Los canales RyR cardíacos estudiados exhibieron dos tipos de respuesta al calcio citoplasmático, y diferente sensibilidad a la inhibición por <math>Mg^{2+}</math></b> .....	- 47 -
<b>La oxidación de los residuos SH modifica la respuesta a la concentración citoplasmática de <math>Ca^{2+}</math> y a la inhibición por <math>Mg^{2+}</math></b> .....	- 48 -
<b>Los canales RyR cardíacos poseen distintos mecanismos de inhibición por <math>Mg^{2+}</math></b> .....	- 50 -
<b>CONCLUSIONES</b> .....	- 56 -
<b>ANEXO</b> .....	- 57 -
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	- 58 -



## INTRODUCCIÓN

El calcio liberado de los reservorios intracelulares contribuye al aumento transitorio de la concentración de calcio libre citoplasmático ( $[Ca^{2+}]_i$ ), que es la base de muchas de las respuestas de las células excitables, como la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores, la proliferación y la muerte celulares (Berridge, 1997), y la contracción en el músculo cardíaco y en el esquelético (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997). El calcio es liberado de estos reservorios a través de dos vías distintas, los canales-receptores para 1,4,5-inositol trifosfato ( $InsP_3R$ ) y los canales sensibles a ryanodina (RyR) (Berridge, 1997).

En las células excitables, el aumento de calcio citoplasmático provocado por el ingreso de calcio desde el medio extracelular a través de canales de calcio dependientes del potencial eléctrico -receptor de dihidropiridina (DHPR)- puede ser amplificado mediante el mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio (LCIC) en el que participan los canales-receptores de ryanodina (RyR).

La actividad del canal de calcio sensible a ryanodina es regulada por múltiples agonistas y moduladores. Entre ellos, el calcio activa el canal a concentraciones citoplasmáticas del orden  $\mu M$  y lo inhibe a concentraciones mM. El ATP activa los canales mientras que el magnesio los inhibe (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

Se ha demostrado recientemente que la oxidación de residuos SH modifican la dependencia al  $Ca^{2+}$  de los canales RyR de diferentes tejidos excitables incorporados en bicapas lipídicas planas, aumentando la afinidad aparente para la activación y disminuyendo la afinidad para la inhibición por calcio (Marengo et al., 1998). En experimentos de liberación rápida de calcio desde vesículas purificadas de retículo sarcoplasmático (RS) de músculo esquelético, se ha demostrado que la oxidación suprime el efecto inhibitorio del  $Mg^{2+}$  sobre la LCIC (Donoso et al., 2000).

En el año 1997, Laver et al. propusieron un modelo para explicar la inhibición por  $Mg^{2+}$  de los canales RyR. En este modelo la apertura del RyR está

controlada por dos sitios de unión para iones divalentes,  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$ . Uno de ellos es responsable de la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ , y el otro es responsable de la inhibición por divalentes.

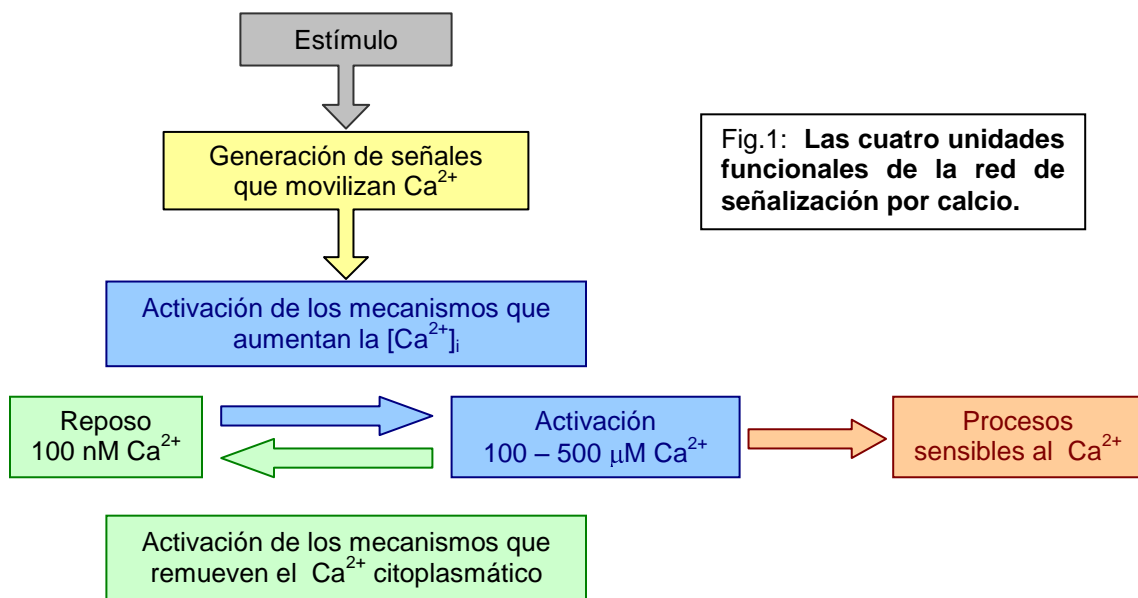
En esta tesis nos proponemos demostrar, al nivel de canal único, la modificación de la inhibición por magnesio mediada por oxido-reducción de residuos SH en canales RyR de músculo cardíaco, además de caracterizar el mecanismo por medio del cual la oxidación disminuye la inhibición por magnesio.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Mecanismos de señalización por $\text{Ca}^{2+}$

Los iones calcio, como segundos mensajeros, son de importancia central en la regulación de muchos y muy variados procesos celulares. Su mecanismo de acción parece ser simple: las células en reposo tienen, en general, una concentración citoplasmática de calcio libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de 100 nM pero durante la actividad ésta alcanza localmente valores cercanos a 100 - 500  $\mu\text{M}$ . La pregunta inmediata es ¿cómo puede esta elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  regular tantos procesos? Ello es posible gracias a la enorme versatilidad de los mecanismos de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ . Las células cuentan con múltiples vías para generar la señal de calcio, y cada tipo celular expresa un conjunto particular de elementos de los muchos componentes de este sistema señalizador, los cuales pueden ser compartidos o no para crear un amplio rango de señales espaciales y temporales (Berridge et al., 2003).

Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde reservorios intracelulares y/o por ingreso de éste desde el medio extracelular. Estas señales son transducidas por diferentes efectores que generan distintas respuestas. La red de señalización por calcio puede ser dividida en cuatro unidades funcionales (Fig. 1):



- **Mecanismos que aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$ :** Dependen de canales de  $Ca^{2+}$  que permiten el ingreso del  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular, o la liberación del  $Ca^{2+}$  desde los reservorios intracelulares.

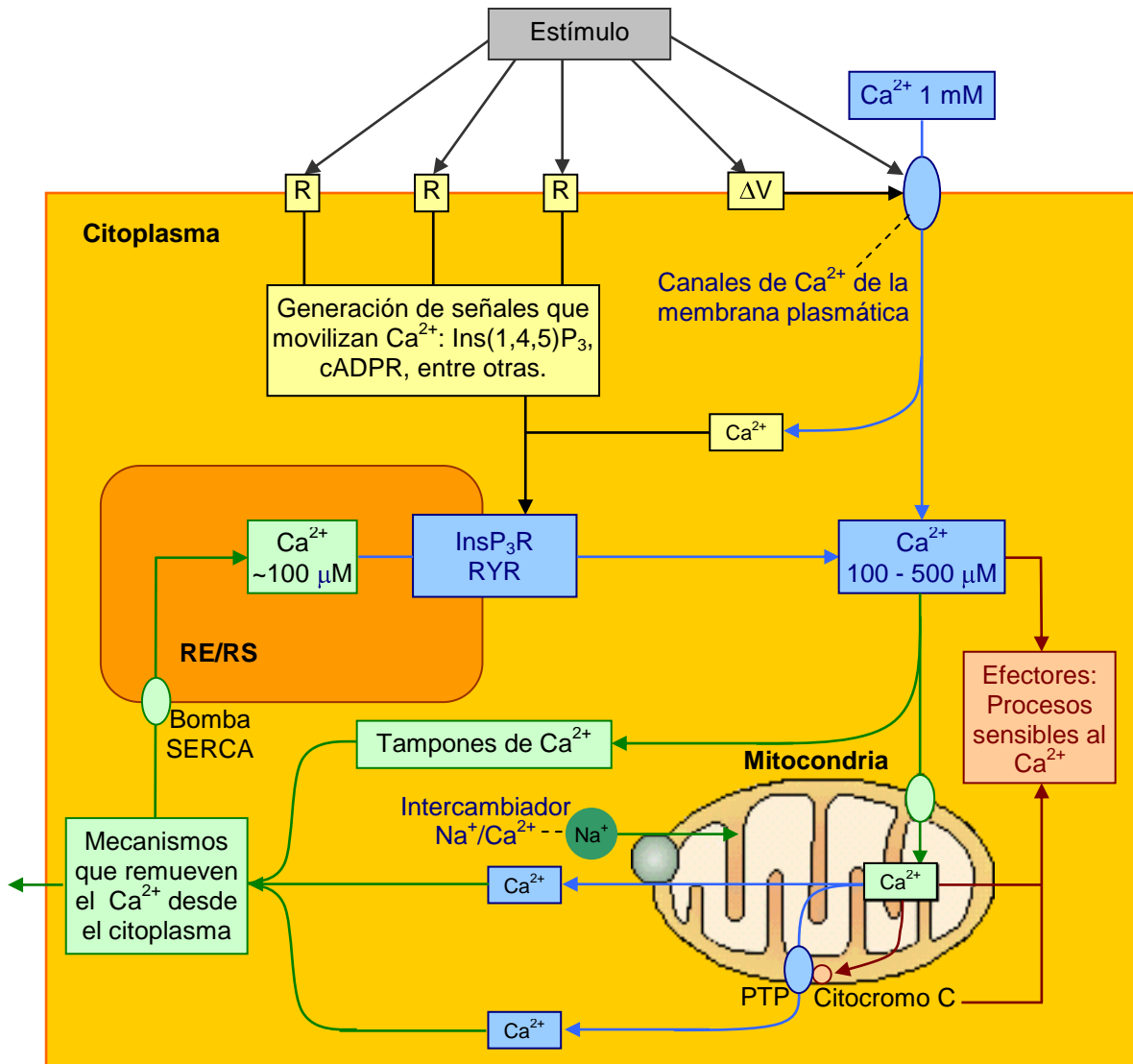


Fig.2: **Mecanismos que aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$**  (azul claro) dependen de canales de  $Ca^{2+}$  que controlan la entrada del  $Ca^{2+}$  extracelular, o la liberación del  $Ca^{2+}$  desde los reservorios intracelulares.

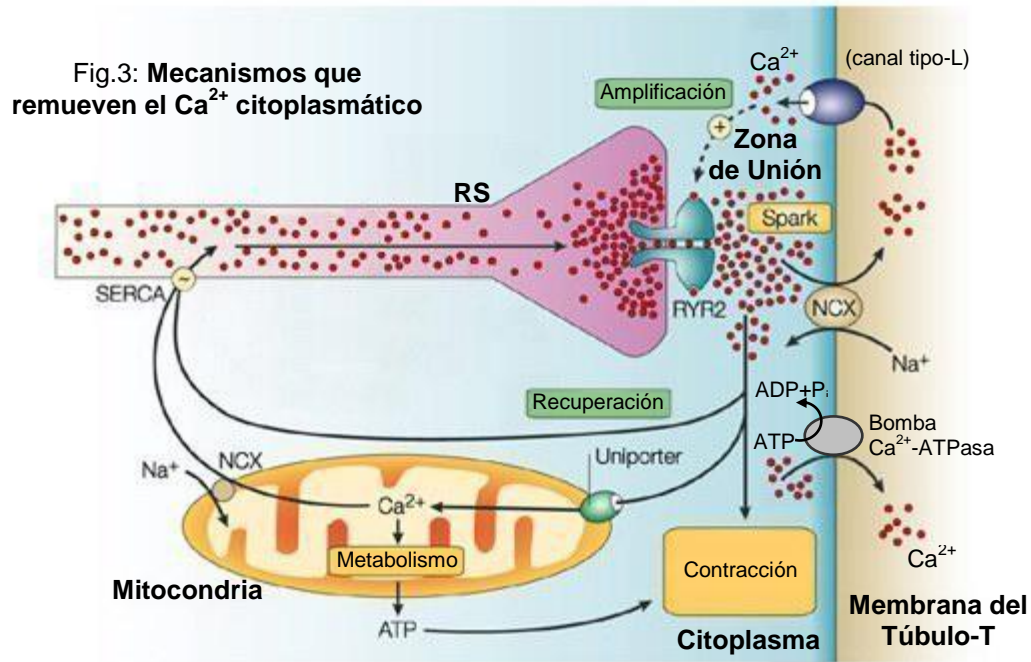
En el caso del  $Ca^{2+}$  extracelular, la entrada de éste es favorecida por el gran gradiente electroquímico para el  $Ca^{2+}$  existente entre los compartimientos separados por la membrana plasmática. Diversos canales de la membrana plasmática (los cuales poseen propiedades ampliamente diferentes) controlan la entrada de  $Ca^{2+}$ , directa o indirectamente desde el medio extracelular, en

respuesta a diferentes estímulos (Berridge et al., 2003). Así es como hay canales que son **activados por el potencial eléctrico**, como el DHPR, que responden a la depolarización de la membrana plasmática, y que se encuentran en las células excitables. Otros canales iónicos, como los canales **activados por receptor**, se abren en respuesta a la unión de un ligando extracelular, usualmente neurotransmisores tales como el glutamato o la acetilcolina. También existen los canales **activados por segundo mensajero** que son canales iónicos de la membrana plasmática que se abren en respuesta a segundos mensajeros intracelulares, tales como el diacilglicerol, los nucleótidos cíclicos y el ácido araquidónico (Mignen y Shuttleworth, 2000). En adición a estos mecanismos de apertura más claramente definidos hay muchos otros tipos de canales iónicos de la membrana plasmática que son sensibles a estímulos de diverso orden, tales como los **canales activados por vaciamiento de reservorios internos de  $\text{Ca}^{2+}$** , los canales termosensibles y los canales activados por estiramiento de la membrana (Berridge et al., 2003).

La otra fuente principal para la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  son los reservorios intracelulares que están localizados principalmente en el retículo endoplasmático/sarcoplasmático (RE/RS), en el cual el **receptor de inositol-1,4,5-trifosfato** ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) y el **receptor de ryanodina** (RyR) controlan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- **Mecanismos que remueven el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma:** Después que el calcio ha aumentado localmente y las células han modificado su actividad, el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido rápidamente y, en forma casi simultánea, desde el citoplasma por varias bombas e intercambiadores. Los mecanismos de bombeo tienen importantes funciones homeostáticas manteniendo el nivel de reposo del  $\text{Ca}^{2+}$  en aproximadamente 100 nM y asegurando que los reservorios internos se mantengan bien provistos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuatro diferentes mecanismos de bombeo son responsables de remover el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma (Fig. 3): la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) de la membrana plasmática, la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco-endoplasmático

(SERCA) y el uniporter mitocondrial, ubicado en la membrana mitocondrial interna y que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia el interior de la matriz mitocondrial (Berridge et al., 2003).



La bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática sacan  $\text{Ca}^{2+}$  fuera de la célula, mientras que la SERCA devuelve el  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RE/RS (Fig. 3) (Berridge et al., 2000).

La mitocondria es importante ya que tiene una enorme capacidad para acumular  $\text{Ca}^{2+}$ , secuestrándolo rápidamente desde el citoplasma durante el desarrollo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . La matriz mitocondrial contiene tampones que previenen el rápido aumento de la concentración dentro de ésta, y una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ha vuelto a su nivel de reposo, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial regresa lentamente esa gran carga de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma durante la fase de recuperación (Fig. 3), desde donde éste es devuelto al RE/RS o removido desde la célula (Berridge et al., 2000; Duchon, 1999). De esta forma la mitocondria es importante tanto en la determinación de la amplitud como de los patrones espacio-temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Duchon, 1999).

• **Generación de señales que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$ :** Las señales movilizadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 4) son generadas por estímulos que actúan sobre una variedad de receptores de la membrana plasmática, tales como los receptores ligados a la proteína G y los receptores con actividad tirosina quinasa, entre otros. Estos estímulos inducen tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, como la formación de segundos mensajeros que liberan el  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares. Las señales generadas incluyen: el inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) y la ADP-ribosa cíclica (cADPR), entre otros (Berridge et al., 2000, 2003). Estos diferentes mensajeros movilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden coexistir en las células, donde actúan sobre las distintas vías que aumentan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Berridge et al., 2000, 2003).

El  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado dentro del RE/RS es liberado a través de varios canales, de los cuales las familias de  $\text{InsP}_3\text{R}$  y de  $\text{RyR}$  han sido estudiadas más extensivamente. Además del  $\text{Ca}^{2+}$  mismo, el cual actúa sobre estas dos familias de canales, son muchos y diferentes factores los que regulan a estos receptores, ya sea en la superficie citoplasmática y/o luminal de la proteína-canal (Berridge et al., 2000, 2003).

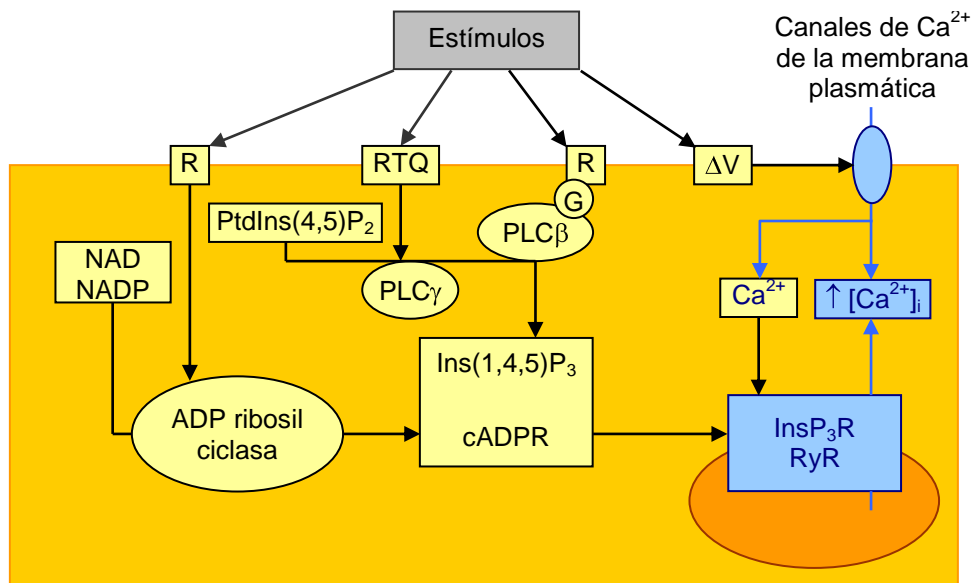


Fig.4: **Las señales movilizadoras de  $\text{Ca}^{2+}$**  (amarillo) son generadas por estímulos que actúan sobre una variedad de receptores de la membrana plasmática (R), tales como los receptores ligados a la proteína G y los receptores de tirosina quinasa (RTQ) entre otros. Las señales generadas incluyen: al inositol-1,4,5-trifosfato ( **$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$** ) y al ADP-ribosa cíclica (**cADPR**), entre otros.

- **Procesos sensibles al  $Ca^{2+}$ :** Una vez que ha aumentado la  $[Ca^{2+}]_i$ , este interactúa con diferentes proteínas que unen  $Ca^{2+}$ , que funcionan como efectores y/o como tampones de  $Ca^{2+}$  (Carafoli et al., 2001).

Los tampones pueden alterar tanto la amplitud como el tiempo de recuperación de los aumentos transitorios individuales de  $Ca^{2+}$ . Del  $Ca^{2+}$  que entra al citoplasma, sólo una muy pequeña proporción queda libre, porque la mayor parte de éste es rápidamente unido a los tampones, y una fracción menor, a los efectores (Berridge et al., 2003).

Los distintos efectores son los responsables de la activación de diferentes procesos celulares calcio-sensibles (Berridge et al., 2003). Efectores clásicos son la troponina C (TnC), cuya función es controlar la interacción de la actina y la miosina durante el ciclo de contracción del músculo cardíaco y esquelético, y la calmodulina (CAM), que regula muchos procesos tales como la contracción del músculo liso, la comunicación entre vías de señalización, la transcripción génica, la modulación de canales iónicos y el metabolismo. En adición a las proteínas ya mencionadas, hay numerosas proteínas que unen  $Ca^{2+}$  que tienen funciones más específicas, generando diversos tipos de respuesta celular (proliferación celular, fertilización, aprendizaje y memoria, secreción, síntesis de ATP y de esteroides, apoptosis, etc.) frente al mismo estímulo (Berridge et al., 2000).

### **Aspectos espacio temporales de la señalización por $Ca^{2+}$**

- *Eventos elementales.*

Los diferentes tipos de señales de  $Ca^{2+}$  mostrados en la figura 5 provienen de  $InsP_3Rs$  y/o  $RyRs$  que tienen diferentes grados de actividad dependiendo del nivel del agonista correspondiente. A bajos niveles de agonista, el grado de actividad es tal que  $RyRs$  o  $InsP_3Rs$  individuales se abren, produciendo eventos de canal-único que han sido llamados *quarks* (Lipp y Nigli, 1998) o *blips* (Bootman et al., 1997), respectivamente (Fig. 5b). Estos pueden ser considerados como los eventos fundamentales, a partir de los que serán construidas señales más complejas. Estos eventos de canal-único son muy infrecuentes, registrándose



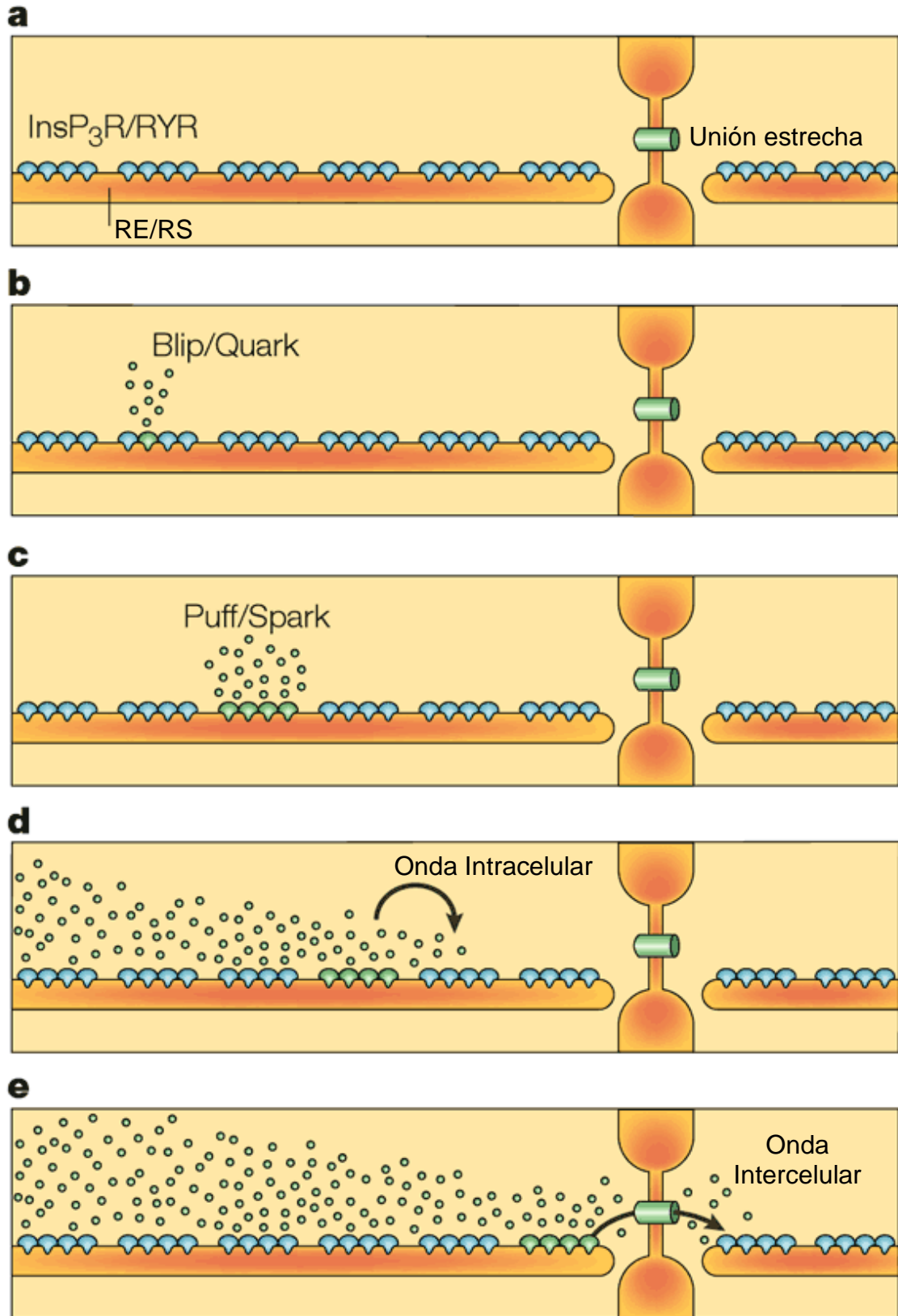


Fig.5: La organización espacial de la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los reservorios internos

habitualmente eventos de mayor amplitud, resultantes de la apertura coordinada de grupos de  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  o  $\text{RyRs}$ , los que son conocidos como *puffs* o *sparks*, respectivamente (Fig. 5c). Los sparks fueron descritos por primera vez en células cardíacas (Cheng et al., 1993) y representan señales de  $\text{Ca}^{2+}$  provenientes de un grupo de canales  $\text{RyR-2}$  que se abren sincronizadamente.

- *Ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ .*

Estos eventos elementales (*puffs* y *sparks*) pueden propagarse dando origen a señales globales de  $\text{Ca}^{2+}$  (*ondas de  $\text{Ca}^{2+}$* ) que viajan recorriendo las células (Fig. 5d). Para que las ondas se generen, la mayoría de los  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  y los  $\text{RyRs}$  deben ser suficientemente sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ , para responder a través del proceso de LCIC, en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  difunde a los receptores vecinos para producir otras liberaciones, generándose por tanto un proceso regenerativo. Cuando las *uniones estrechas (gap junctions)* conectan a las células, estas ondas intracelulares pueden difundir a células vecinas, creando ondas intercelulares (Fig. 5e) capaces de coordinar la actividad de muchas células (Lansley y Sanderson, 1999).

En adición a la creación de respuestas globales, estos eventos elementales tienen funciones señalizadoras dentro de dominios celulares altamente localizados. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, la mitocondria localizada cerca de los sitios donde se desarrollan eventos elementales acumula rápidamente el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que estimula el metabolismo mitocondrial y aumenta la formación de ATP (Fig. 6).

### **Señalización por $\text{Ca}^{2+}$ en el cardiomiocito**

Las células excitables emplean mecanismos rápidos de sincronización en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así es como, para activar la contracción, las células del músculo cardíaco desarrollan señales globales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el orden de los milisegundos. En este caso, la depolarización eléctrica o potencial de acción, que se propaga por la membrana superficial de la célula y por los túbulos transversales

(túbulos-T) hacia el interior de la célula, activa canales del sistema sarcotubular sensibles al potencial eléctrico (DHPR's). La apertura de estos canales permite el influjo de pequeñas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, las cuales son cuantitativamente insuficientes para generar la contracción. Sin embargo, esto permite la activación de un grupo de RyR's cardíacos (RyR-2) en el RS, cuya apertura libera cantidades mucho mayores de  $\text{Ca}^{2+}$ , en lo que constituye una amplificación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (LCIC<sup>1</sup>). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por este grupo de RyR's del RS, puede activar por LCIC otros RyR's más lejanos, generándose un proceso donde la señal combinada del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado aumenta globalmente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, el cual difunde hacia los miofilamentos para activar la contracción.

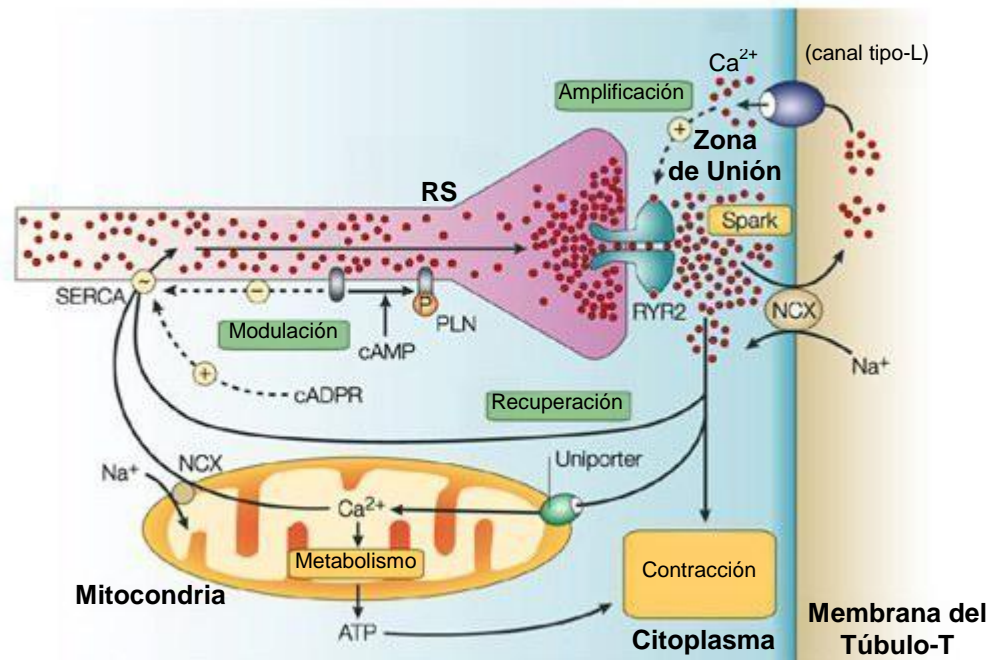


Fig.6: **Señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en el cardiomiocito** (Berridge et al., 2003). Esta circulación de  $\text{Ca}^{2+}$  es modulada por segundos mensajeros: el AMP cíclico (cAMP), el cual remueve la acción inhibitoria del fosfolamban (PLN), y/o el ADP-ribosa cíclica (cADPR) que activa la SERCA para aumentar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulable en el RS.

El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activa las SERCA's y los NCX de la membrana sarcotubular (Fig. 6), que comienzan tanto la reacumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior del RS, como el bombeo del  $\text{Ca}^{2+}$  fuera de la célula, respectivamente. Sin

<sup>1</sup> De igual forma, este proceso puede también ocurrir en células no excitables liberándose el  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios internos a través del  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Berridge et al., 2003).

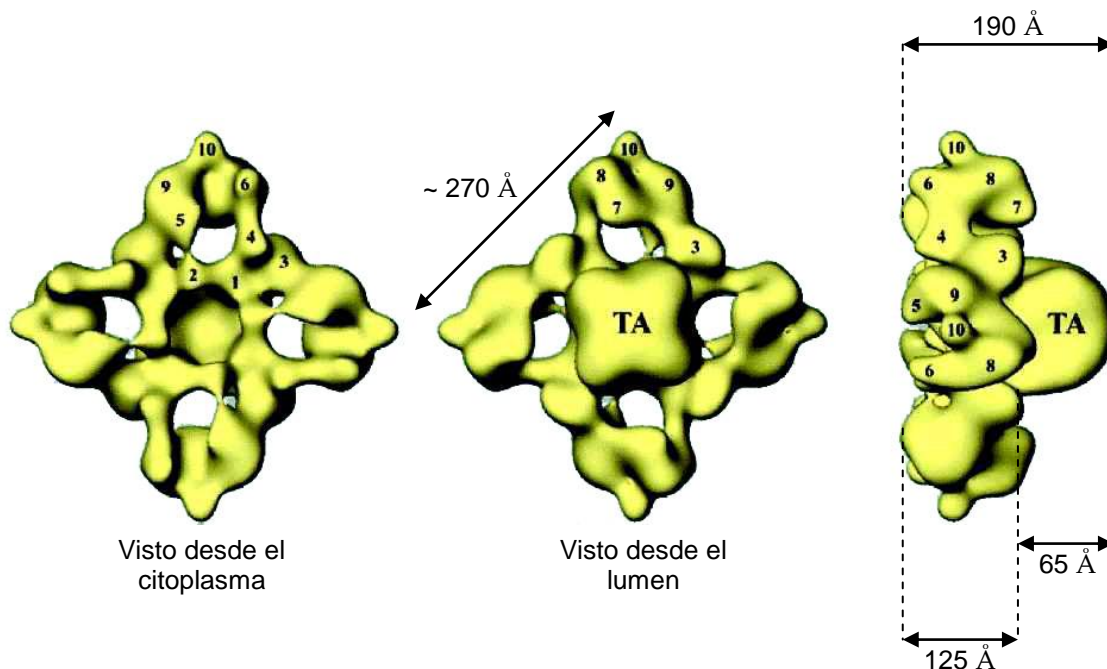
embargo, la recuperación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  sólo ocurre cuando los RyR's se cierran y quedan funcionando únicamente los mecanismos que remueven el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Este cierre de los RyR's ocurre, por una parte, por adaptación de los receptores y, además, por inhibición de los RyR's debido al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a concentraciones de orden mM. Por otra parte es crucial la ulterior disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  local cercano a los RyR's. Esta se debe inicialmente a la inactivación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  de los DHPR's y, finalmente, al cese del potencial de acción, con lo que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de los DHPR's cesa definitivamente.

El  $\text{Ca}^{2+}$  devuelto al lumen del RS, regresa a la cisterna terminal del RS (zona de unión) donde será usado para generar una nueva liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  para el siguiente latido cardíaco. Una pequeña proporción del  $\text{Ca}^{2+}$  viaja a través de la mitocondria, tiempo durante el cual estimula el metabolismo, generando el ATP necesario para mantener la contracción (Fig. 6).

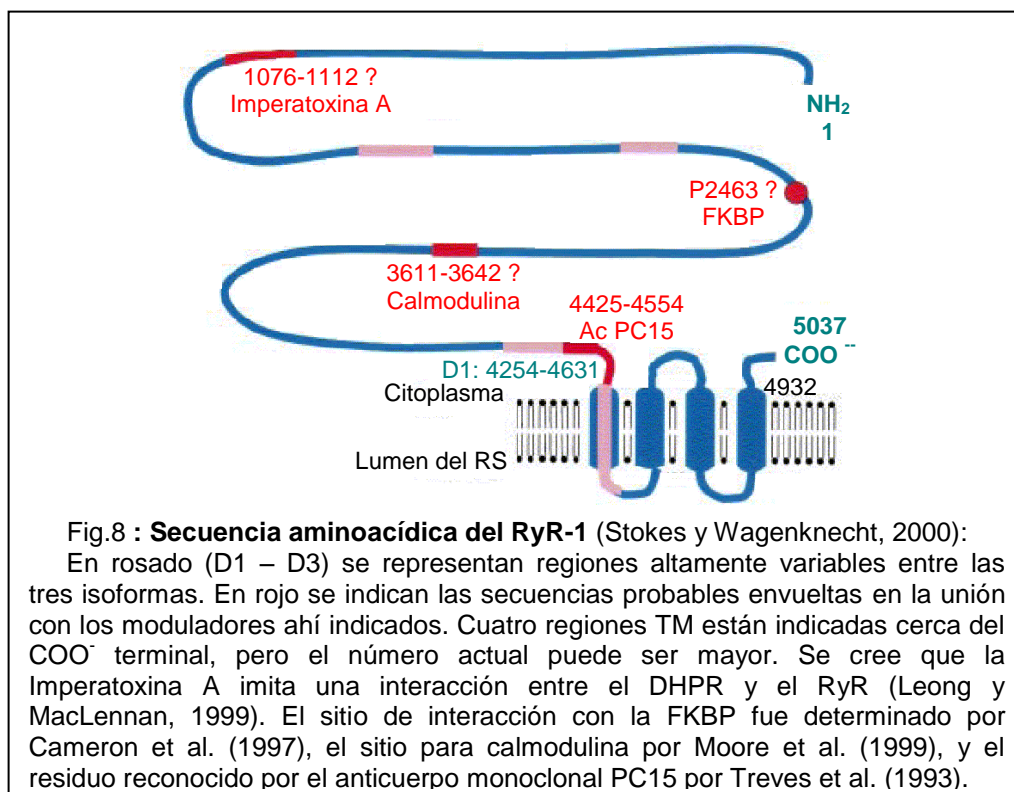
### Canales receptores de ryanodina (RyR)

Los canales receptores de ryanodina (RyR), los cuales reciben su nombre porque unen con alta afinidad al alcaloide vegetal ryanodina, están localizados en la cisterna terminal del RS, disponiéndose como un homotetrámero compuesto de 4 subunidades idénticas (Fig. 7). Además, las diferentes células excitables, y éstas en distintas categorías taxonómicas de animales, expresan diversas isoformas de este canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En mamíferos, la isoforma **RyR-1** es la principal encontrada en las células de *músculo esquelético*. Ésta posee un gran segmento citoplasmático cuyas medidas son  $\sim 270 \times 270 \times 125 \text{ \AA}$ , y un segmento de transmembrana más pequeño que protruye  $65 \text{ \AA}$  desde la superficie del homotetrámero (Fig. 7). Cada monómero de RyR-1 tiene una masa molecular de 565 kDa y está constituido por 5037 aminoácidos (Takeshima et al., 1989) (Fig. 8). Los dominios de transmembrana (TM), y la secuencia de aminoácidos que tapizan el poro, están localizados en el carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) terminal de la molécula. El número de dominios TM es aún incierto,



**Fig.7: Representación esquemática de la estructura tridimensional de un RyR.** Los números indican distintas estructuras globulares que corresponden a dominios estructurales que cambian su disposición relativa según el estado abierto o cerrado del canal (Stokes y Wagenknecht, 2000).



**Fig.8 : Secuencia aminoacídica del RyR-1** (Stokes y Wagenknecht, 2000):

En rosado (D1 – D3) se representan regiones altamente variables entre las tres isoformas. En rojo se indican las secuencias probables envueltas en la unión con los moduladores ahí indicados. Cuatro regiones TM están indicadas cerca del COO<sup>-</sup> terminal, pero el número actual puede ser mayor. Se cree que la Imperatoxina A imita una interacción entre el DHPR y el RyR (Leong y MacLennan, 1999). El sitio de interacción con la FKBP fue determinado por Cameron et al. (1997), el sitio para calmodulina por Moore et al. (1999), y el residuo reconocido por el anticuerpo monoclonal PC15 por Treves et al. (1993).

pero se sabe que existen a lo menos 4 de éstos (Takeshima et al., 1989) (Fig. 8). En humanos es codificado por el gen *ryr-1*, dentro del cromosoma 19 (Coronado et al., 1994; Rubtsov y Batrukova, 1997; Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999; Ashcroft, 2000).

La isoforma **RyR-2** es la principal isoforma de las células del *músculo cardíaco* de mamífero. Cada subunidad tiene 4968 residuos aminoacídicos y muestra un 66% de identidad con la secuencia de RyR-1 (Ashcroft, 2000). En humanos es codificado por el gen *ryr-2*, dentro del cromosoma 1 (Coronado et al., 1994; Rubtsov y Batrukova, 1997; Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999; Otsu et al., 1990).

La isoforma **RyR-3** se encuentra en los epitelios, en *neuronas*<sup>2</sup> y, en una proporción menor, en el músculo esquelético adulto. Cada subunidad tiene 4872 aminoácidos y muestra un 67% de identidad con RyR-1 (Ashcroft, 2000). En humanos es codificado por el gen *ryr-3*, dentro del cromosoma 15 (Coronado et al., 1994; Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999; Ashcroft, 2000).

A pesar de la alta identidad entre las tres isoformas de RyR, hay regiones con marcada divergencia. Existen tres regiones divergentes (Sorrentino y Volpe, 1993), D<sub>1</sub> comprende los residuos aminoacídicos 4254 al 4631 en el RyR-1 (Fig. 8), 4210 al 4562 en el RyR-2 y 4100 al 4400 en el RyR-3. D<sub>2</sub> está entre los residuos 1342 y 1403 en el RyR-1 (Fig. 8) y entre los residuos 1353 y 1397 en el RyR-2, mientras que, en el RyR-3, D<sub>2</sub> está ausente. D<sub>3</sub> está entre los residuos 1872 y 1903 en el RyR-1 (Fig. 8) y entre los residuos 1852 y 1890 en el RyR-2 (Stokes y Wagenknecht, 2000; Williams et al., 2001).

Las fibras musculares esqueléticas de *anfibios*, de *aves*, y de *peces* expresan dos diferentes isoformas de RyR, la  $\alpha$  y la  $\beta$  (Sutko y Airey, 1996; Franzini-Armstrong y Protasi, 1997; Ogawa et al., 1999). Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de anfibios y aves tienen una alta homología con RyR-1 y RyR-3 de mamíferos, respectivamente (Ogawa, 1994; Oyamada et al., 1994; Ottini et al., 1996).

---

<sup>2</sup> Las *neuronas* de los mamíferos expresan la isoforma RyR-3 además de las isoformas RyR-1 y RyR-2.

## Moduladores de canales RyR

Los mecanismos fisiológicos de activación e inhibición de estos diversos canales RyR están siendo hoy estudiados intensamente. Los canales RyR están regulados por múltiples compuestos celulares. Estos comprenden algunos iones y moléculas, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , ATP, y ADP-ribosa cíclica. En la regulación de los canales RyR también participan reacciones metabólicas incluyendo la fosforilación y la oxidación, e interacciones con otras proteínas, entre ellas los receptores de dihidropiridinas (DHPR), calmodulina, FKBP12, triadina, juntina, y calsecuestrina (Fig. 9 y 10) (Zhang et al., 1997). Estudios in vitro indican que el  $\text{Mg}^{2+}$  es un potente inhibidor de la LCIC a las concentraciones encontradas en el músculo esquelético (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

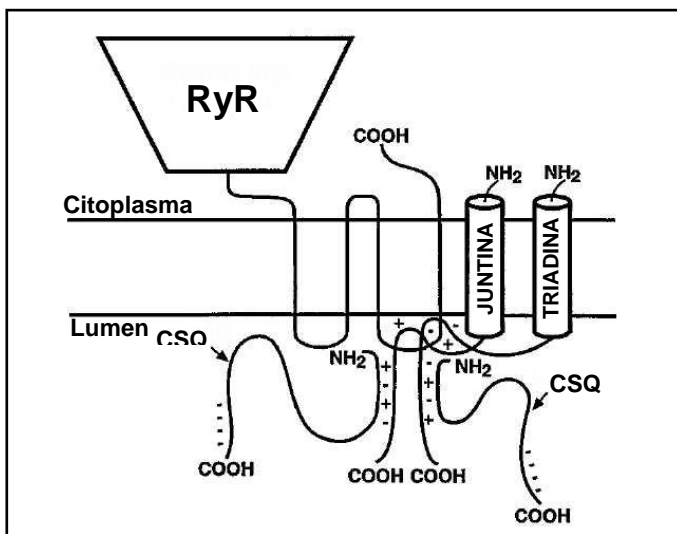


Fig.9: Modelo caricaturizado de las interacciones proteicas del RyR con la juntina, triadina y calsecuestrina (CSQ) en el RS del corazón. Las interacciones de las regiones COO' terminal de la triadina y la juntina con el loop intralumenal 2 del RyR son hipotéticas (Zhang et al., 1997).

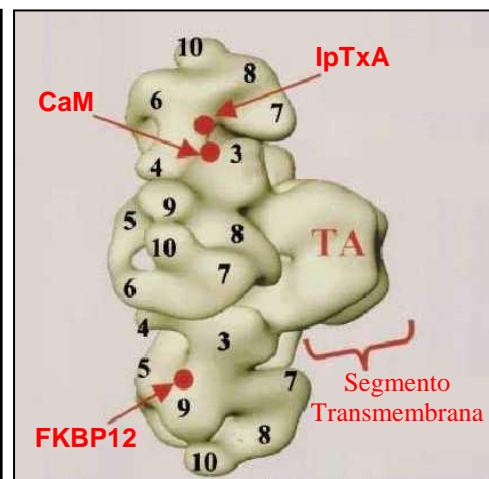
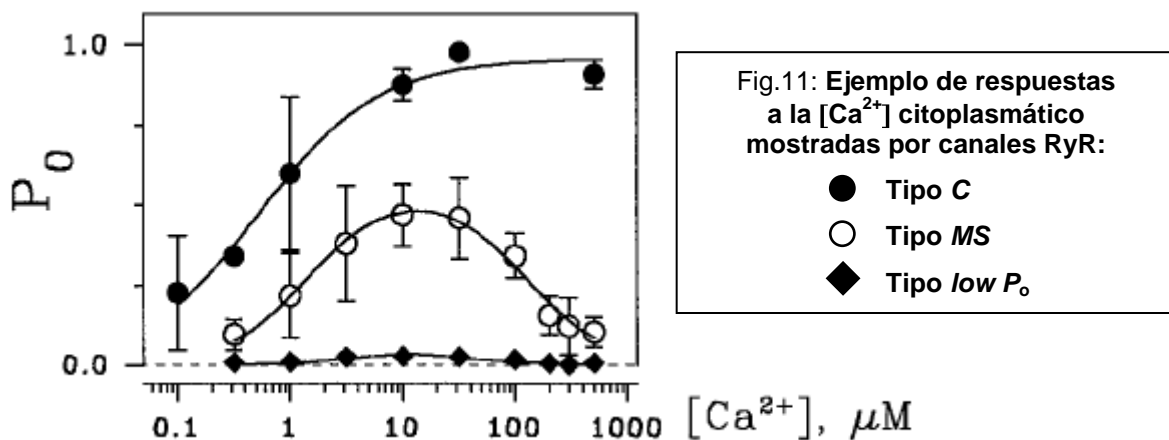


Fig.10: Sitios de interacción de la calmodulina (CaM), FKBP12 y la Imperatoxina A (IpTxA) en la estructura tridimensional del RyR. Se cree que la IpTxA imita una interacción del RyR con el DHPR (Stokes y Wagenknecht, 2000).

- **Modulación de canales RyR por calcio citoplasmático.**

Dentro de la variedad de compuestos celulares moduladores del RyR, el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático es el más importante. La actividad del canal, medida como la fracción de tiempo durante el cual el canal está abierto conduciendo iones ( $P_o$ ), se modifica en función de la concentración citoplasmática de calcio.

La actividad de un canal RyR único es generalmente una función con forma de campana de la concentración citoplasmática de calcio (Fill y Copello, 2002). Sin embargo, utilizando canales RyR únicos incorporados en bicapas lipídicas planas, se han descrito tres tipos diferentes de respuesta al calcio: las tipo *low P<sub>o</sub>*, *tipo MS* y *tipo C* (Marengo et al., 1996, 1998). Los canales con respuesta *tipo low P<sub>o</sub>* son pobremente activados por calcio, alcanzando un tiempo fraccional abierto ( $P_o$ ) menor que 0,1, en el rango de  $[Ca^{2+}]$  desde 0,1  $\mu$ M a 0,5 mM (Copello et al., 1997; Marengo et al., 1996). Los canales con respuesta *tipo MS* muestran una marcada activación para una  $[Ca^{2+}]$   $\mu$ M e inhibición para  $[Ca^{2+}] \geq 0,1$  mM (Bull y Marengo, 1993; Marengo et al., 1996, 1998). Los canales con respuesta *tipo C* tienen una activación sigmoïdal con falta de inhibición para aumentos en la  $[Ca^{2+}]$  citoplasmático hasta niveles de 1-2 mM (Bull y Marengo, 1993; Marengo et al., 1996, 1998) (Fig. 11).



Los canales presentes en las vesículas del RS aisladas desde *músculo cardíaco* de mamífero (RyR-2) muestran, en la mayoría de los trabajos reportados, una respuesta de *tipo C*. Sin embargo en algunos trabajos se ha reportado que los canales RyR cardíacos presentan además la respuesta de *tipo MS* (Marengo et al., 1998; Schiefer et al., 1995).

Los canales RyR del RS aislado desde *músculo esquelético* de mamífero (RyR-1) muestran con mayor frecuencia una respuesta de *tipo MS*. Sin embargo estos canales también tienen más de un tipo de respuesta al calcio (Copello et al., 1997; Marengo et al., 1998). Canales RyR únicos obtenidos de músculo



esquelético de anfibios, aves, y peces manifiestan al menos dos tipos de dependencia, C y MS (Bull y Marengo, 1993; Percival et al., 1994; O'Brien et al., 1995).

Los canales RyR aislados desde *neuronas* de la corteza cerebral de rata exhibieron los tres tipos de respuesta a la  $[Ca^{2+}]$  citoplasmático, siendo la más frecuente la respuesta de *tipo low  $P_o$* , seguida por la de *tipo MS*. La respuesta observada con menor frecuencia en canales RyR aislados desde vesículas provenientes del RE del cerebro de rata es la de *tipo C* (Marengo et al., 1996).

- **Modulación de canales RyR por modificación de su estado redox.**

Los agentes que oxidan los residuos sulfhidrilos (SH), como los radicales libres, y el peróxido de hidrógeno, activan los canales RyR incorporados a bicapas lipídicas planas (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). Los canales RyR cuentan con un gran número de cisteínas (Cys) en su secuencia aminoacídica (Tabla 1), las cuales son responsables de la formación de enlaces disulfuros (S-S), que unen covalentemente diferentes partes de su cadena polipeptídica, estabilizando así su estructura terciaria plegada, o que conectan dos monómeros separados (Randall et al., 2002).

Tabla 1: Cantidad de cisteínas en diferentes isoformas de RyR.

Isoformas	Cisteínas Totales	Referencias
<b>RyR-1</b> (músculo esquelético de conejo)	<b>100</b>	Takehima et al. (1989), Marks et al. (1989), Zorzato et al. (1990).
<b>RyR-2</b> (músculo cardíaco de conejo)	<b>89</b>	Otsu et al. (1990), Witcher et al. (1991).
<b>RyR-3</b> (cerebro humano)	<b>109</b>	Nakashima et al. (1997), Leeb y Brenig (1998).
<b>RyR- <math>\alpha</math></b> <b>RyR- <math>\beta</math></b> (músculo esquelético de rana)	<b>94</b> <b>97</b>	Oyamada et al. (1994). Oyamada et al. (1994).

La oxidación de residuos sulfhidrilos (SH) induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde las vesículas del RS, activa canales RyR's incorporados en bicapas lipídicas planas (Abramson et al., 1995; Favero et al., 1995; Marengo et al., 1998), y modifica la unión de ryanodina a las membranas del RS (Abramson et al., 1995; Favero et al., 1995). Residuos SH altamente reactivos de la proteína-canal participan en interacciones entre las subunidades del homotetrámero, en la formación de complejos de alto peso molecular con la triadina, y en la unión a la calmodulina. Todas las interacciones proteína-proteína que comprenden o son mediadas por residuos SH pueden ser parte del mecanismo de apertura normal del canal RyR (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997).

El estado redox de los residuos SH altamente reactivos presentes en el dominio citoplasmático de los canales RyR tiene un marcado efecto sobre la actividad de éstos, controlando sus respuestas a los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplasmático. La oxidación de los residuos SH modifica la dependencia de calcio de los canales RyR, sin importar su origen, produciendo un aumento en la actividad de estos. La reducción de los canales (nativos u oxidados) causa una disminución en la actividad del canal. De esta forma se ha propuesto que el estado de oxidación de la proteína-canal es un factor decisivo en la dependencia al calcio exhibida por las diferentes isoformas de RyR (Marengo et al., 1998).

La oxidación de residuos SH de canales RyR disminuye la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  del eflujo de calcio desde vesículas aisladas del RS. La oxidación parcial con timerosal de vesículas provenientes de músculo esquelético aumenta la rapidez de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , a diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$ . La oxidación total con timerosal de estas vesículas suprime completamente el efecto inhibitorio del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la LCIC, a una  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre de 1 mM. Los efectos de la oxidación sobre la LCIC pueden revertirse mediante el uso de agentes reductores de residuos SH. De esta forma, se ha propuesto que la oxidación de canales RyR disminuye la afinidad para el  $\text{Mg}^{2+}$  en el sitio inhibitorio del canal, lo que hace posible la LCIC en el músculo esquelético (Donoso et al., 2000).

## Patologías relacionadas al RyR

El aumento en la  $[Ca^{2+}]$  intracelular es un evento señalizador crucial en muchos tipos celulares. La isoforma cardíaca del receptor de ryanodina (RyR-2) es un componente importante de las vías de señalización en una amplia variedad de células excitables (neuronas, músculo liso, y corazón) y no excitables (parótida, páncreas, y médula adrenal), y es un componente crítico del acoplamiento excitación-contracción en el corazón. A diferencia del músculo esquelético, donde el acoplamiento excitación-contracción es mediado a través del acoplamiento mecánico entre RyR-1 y el DHPR, en el músculo cardíaco la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RS, a través del RyR-2, es inducida (mediante LCIC) por un influjo de  $Ca^{2+}$  a través del DHPR (Allen, 2002).

Se han reportado más de 30 mutaciones en el gen *ryr-1* que confieren la susceptibilidad de sufrir crisis de *Hipertermia Maligna* (HM), y provocan la *Enfermedad de los Cuerpos Centrales* (ECC) (Allen, 2002; Hübner y Jentsch, 2002). La **HM** no es enfermedad en el estricto sentido de la palabra, sino una predisposición genética (desorden neuromuscular autosómico dominante) en individuos clínicamente normales que responden anormalmente cuando son expuestos a anestésicos volátiles (como el halotano, isoflurano, enflurano), o a relajantes musculares despolarizantes (como la succinilcolina) (Fatkin y Graham, 2002; Roberts et al., 2001; Ashcroft, 2000). La crisis de HM es un evento inducido por fármacos, que se caracteriza por un metabolismo muscular esquelético acelerado y producción aumentada de calor, resultando en síntomas de rigidez y contracturas musculares, acidosis respiratoria y metabólica, hiperkalemia, arritmias, hipoxia e hipertermia, pudiendo, esta última, llegar a ser fatal de no ser tratada a tiempo. Si es reconocida tempranamente, la HM puede ser revertida mediante la administración de dantroleno, un relajante muscular que bloquea la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RS (Kozack y MacIntyre, 2001; Ashcroft, 2000).

En el caso de animales susceptibles, las crisis de HM pueden ser inducidas no solamente por fármacos, sino también por estrés físico y mental como el producido durante el transporte (Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999). En cerdos, la HM es un desorden autosómico recesivo que puede provocar la muerte y/o el

*síndrome de carnes pálidas, blandas y exudativas* (PSE). La HM provoca pérdidas económicas importantes en la producción de cerdos, debidas a la muerte súbita de los animales (*síndrome de estrés porcino* o PSS) y/o al decomiso de carnes de mala calidad de los animales enfermos o portadores (PSE) (Bonelli y Schifferli, 2001).

La **ECC** es una miopatía rara, que se hereda a través de un gen autosómico dominante. Se presenta en la infancia y se caracteriza por debilidad muscular e hipotonía al nacimiento (síndrome del infante blando). El diagnóstico se hace mediante biopsia muscular, la cual revela, en regiones conocidas como “cuerpos centrales” de las fibras musculares esqueléticas de tipo-1, una carencia de mitocondrias y enzimas oxidativas. Al correr del tiempo, la fuerza muscular usualmente mejora excepto por casos raros que muestran debilidad muscular progresiva (Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999; Aschcroft, 2000).

Hasta la fecha, se han reportado 21 mutaciones puntuales en el gen **ryr-2** (George et al., 2003) de individuos afectados por un grupo de cardiomiopatías estrechamente relacionadas que se caracterizan por muerte súbita temprana: la *cardiomiopatía arritmogénica ventricular derecha* (CAVD) (Tiso et al., 2001), la *taquicardia ventricular polimórfica familiar* (TVPF) (Laitinen et al., 2001), y la *taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica* (TVPC) (Priori et al., 2001). La **CAVD**, también llamada displasia arritmogénica ventricular derecha, es una enfermedad del músculo cardíaco que se caracteriza por una pérdida de miocitos debido a necrosis y/o apoptosis, con reemplazo por infiltración grasa y fibrosis del miocardio, resultando en inestabilidad eléctrica y riesgo de arritmias ventriculares fatales (Fatkin y Graham, 2002; Laitinen et al., 2001). La **TVPF** es un síndrome heredable autosómico dominante, caracterizado por la ocurrencia de episodios de taquicardia ventricular bidireccional y polimórfica, relacionadas a la estimulación adrenérgica o al ejercicio físico, en ausencia de cualquier evidencia de enfermedad estructural miocárdica (Laitinen et al., 2001). La **TVPC**, es un desorden arritmogénico genético inducido por estrés, que se caracteriza por generar una taquicardia ventricular bidireccional que puede degenerar en paro cardíaco, causando muerte súbita (Priori et al., 2001).

Cabe notar que estas mutaciones en el gen *ryr-2* están agrupadas en regiones altamente conservadas correspondientes con los dominios mutados del RyR-1 asociados con la HM y la ECC (Allen, 2002; George et al., 2003).

## OBJETIVOS

### Objetivo General

1. Estudiar el efecto de la modificación del estado redox sobre la inhibición por  $Mg^{2+}$  de canales únicos liberadores de calcio sensibles a ryanodina provenientes de músculo cardíaco.

### Objetivos Específicos

1. Confirmar que los canales RyR cardíacos (RyR-2) tienen dos respuestas a la concentración citoplasmática de calcio.

2. Estudiar la inhibición por  $Mg^{2+}$  de canales RyR-2 que presentan diferentes respuestas frente a la concentración citoplasmática de calcio.

3. Estudiar, a nivel de canal único, si la oxidación y/o la reducción modifican la inhibición por  $Mg^{2+}$  de canales RyR-2 que presentan diferentes respuestas a la concentración citoplasmática de calcio.

4. Comparar, utilizando un modelo de inhibición por  $Mg^{2+}$ , el ó los mecanismos de inhibición de canales con distinta respuesta a la concentración citoplasmática de calcio.

5. Explicar, utilizando un modelo de inhibición por  $Mg^{2+}$ , los cambios que la modificación del estado redox produce en la inhibición por  $Mg^{2+}$  de canales RyR-2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

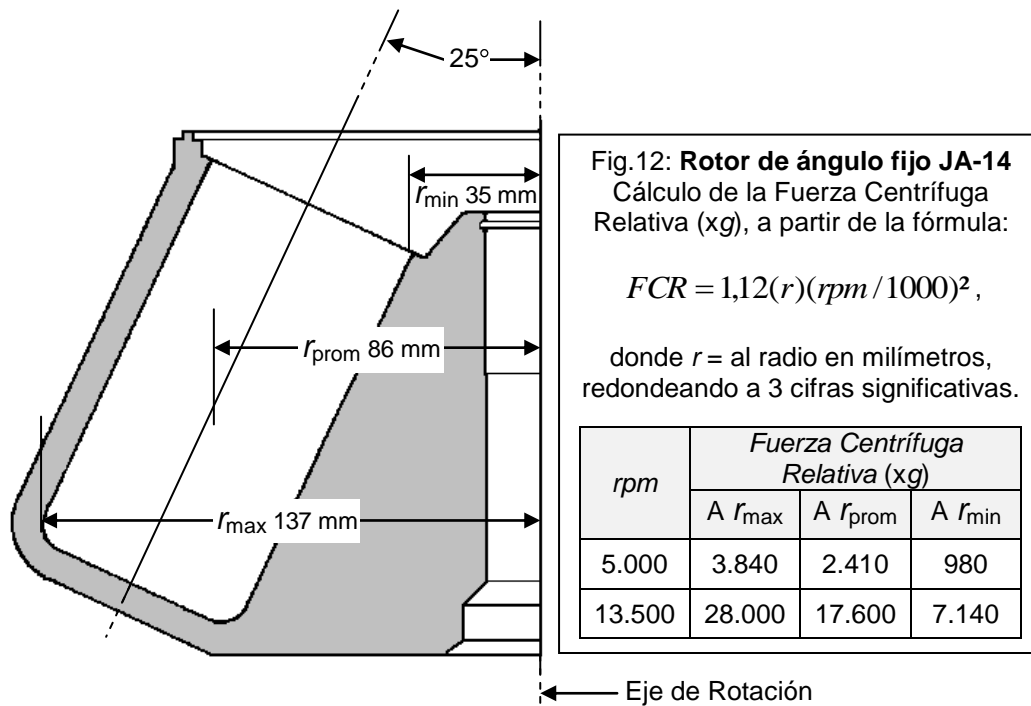
### Aislamiento de vesículas de RS de miocardio de conejo

La preparación de RS de músculo cardíaco de conejo se obtuvo por modificación de métodos previos (Inui et al., 1988), y consistió brevemente en lo siguiente:

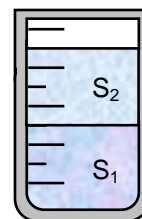
1. Los conejos (*New Zealand*) fueron anestesiados con pentobarbital sódico (dosis de 30 mg/kg) a través de la vena marginal de la oreja, después de lo cual se abrió el tórax y se disecó el corazón (aún en actividad) y la arteria aorta anterior.
2. A través de esta última se perfundió el corazón con una solución cardiopléjica fría (NaCl 102 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 16 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 2 mM) hasta que no se observaron vestigios de sangre.
3. Se extrajo el corazón, y se eliminaron las aurículas y el tejido conectivo, procurando dejar sólo el tejido muscular ventricular, el cual se pesó (peso húmedo).
4. Luego se colocó el tejido en una solución de homogeneización fría (MOPS/Tris 20 mM pH 6,8, sacarosa 0,3 M) a la que recién se le ha agregado inhibidores de proteasas y ditiotretol (leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM y DTT 3 mM), en una relación de 4 ml/g.t.h.<sup>3</sup>.
5. El tejido se cortó en trozos pequeños y fue homogeneizado 3 veces (manteniendo en hielo durante todo el procedimiento), durante 10 segundos cada vez, en un politrón Heidolph DiAx 600 a 20.500 rpm..

---

<sup>3</sup> Gramos de tejido húmedo.

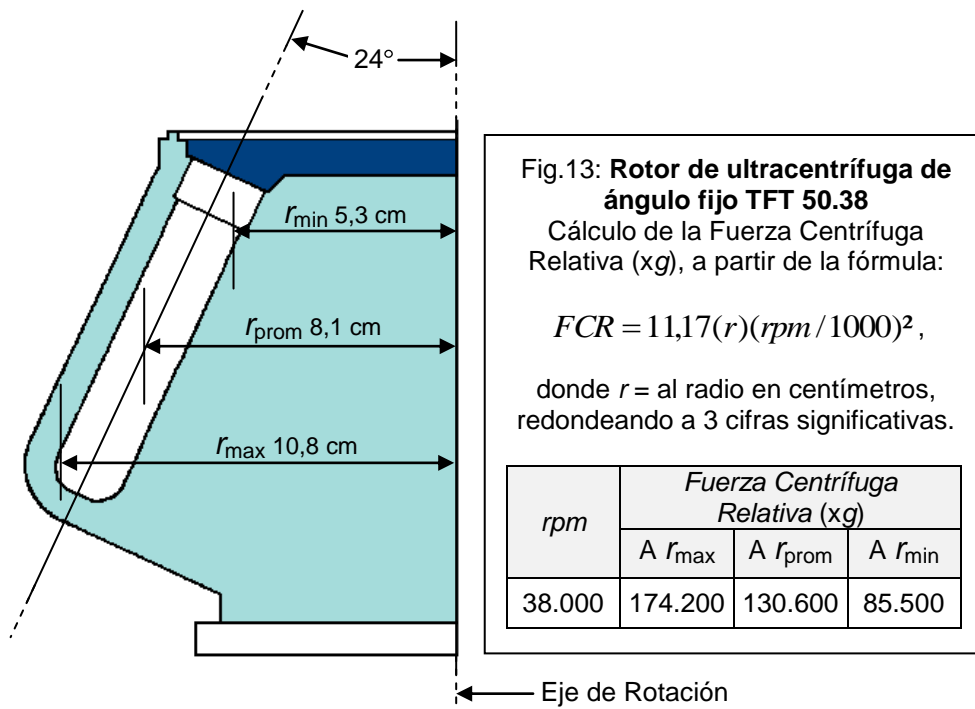


6. Se centrifugó a 5.000 rpm (3.840 x g) por 15 min. a 4°C, en un rotor de ángulo fijo JA-14 (Fig. 12).
7. Este primer sobrenadante ( $S_1$ ) se filtró a través de 4 capas de gasa, sobre un vaso de precipitado mantenido en hielo, y se almacenó.
8. El sedimento ( $P_1$ ) se resuspendió en 2-3 volúmenes (2-3 veces el peso en gramos del tejido original, en ml) de solución de homogeneización fría con inhibidores de proteasas, y se centrifugó nuevamente a 5.000 rpm (3.840 x g) por 15 min. a 4°C, en un rotor de ángulo fijo JA-14.
9. El sedimento ( $P_2$ ) se eliminó, y el sobrenadante ( $S_2$ ) se filtró a través de 4 capas de gasa, sobre un vaso de precipitado mantenido en hielo, y se juntó con el  $S_1$ .
10. Juntos ( $S_1 + S_2$ ) se centrifugaron a 13.500 rpm (28.000 x g) por 15 min. en un rotor de ángulo fijo JA-14 a 4°C (Fig. 12).





11. El nuevo sobrenadante ( $S_3$ ) se filtró a través de 4 capas de gasa sobre un vaso de precipitado mantenido en hielo. Se midió el volumen resultante y se añadió KCl en cantidad suficiente para que alcanzase una concentración final de 0,65 M KCl, con el objeto de remover las proteínas contráctiles.
12. Se homogeneizó y distribuyó la solución en tubos para ultracentrífuga.
13. Se centrifugó a 38.000 rpm ( $\sim 174.200 \times g$ ) por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ , en un rotor de ultracentrífuga de ángulo fijo TFT 50.38 (Fig. 13).



14. El sobrenadante ( $S_4$ ) se eliminó, y el sedimento ( $P_4$ ) se resuspendió en 1-2 ml de solución de homogeneización fría con inhibidores de proteasas y se homogeneizó 20 veces en un homogeneizador vidrio-vidrio mantenido en hielo.
15. Finalmente se fraccionó la resuspensión en alícuotas de  $100 \mu\text{L}$ , en tubos Eppendorf bien rotulados, y se congeló en nitrógeno líquido, almacenándose luego a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

## Experimentos en bicapas planas de lípidos

Membranas lipídicas artificiales bimoleculares (bicapas) planas fueron usadas originalmente como modelo para estudios de la estructura de la membrana celular (Laver, 2001). Su gran área (pueden ser producidas con diámetros dentro del rango de 1  $\mu\text{m}$  hasta 1 cm) y geometría plana las hace modelos de membrana particularmente convenientes para la realización de mediciones eléctricas y mecánicas.

El sistema donde se forman las bicapas (setup) consiste de un contenedor (bloque) y de una cubeta (copa), la que posee un orificio con un diámetro de 250  $\mu\text{m}$  (Fig. 14). Se agregaron 3 ml de una solución de Hepes/Tris 25 mM pH 7,0 en cada compartimento (tanto al interior de la copa como del bloque). Una mezcla de lípidos en una proporción dada (POPE : PS : PC<sup>4</sup> = 5:3:2), disuelta a una concentración final de 37,5 mg/ml en *n*-decano, fue colocada en el orificio de la copa plástica, produciéndose una película densa de lípidos que separa dos soluciones (Fig. 15).

Fig.14 Vista lateral de un setup

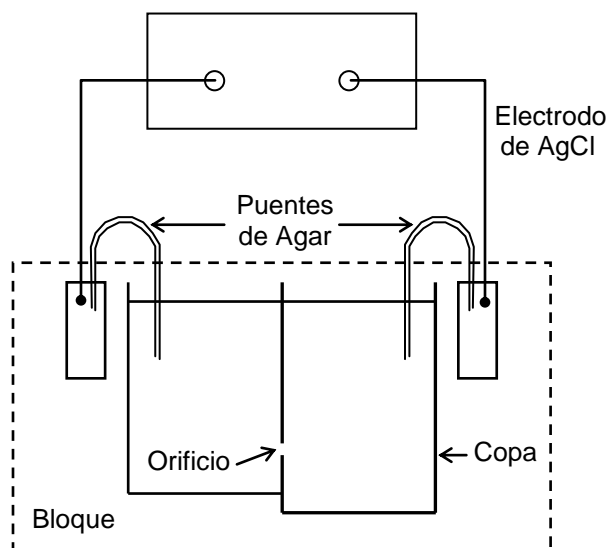


Fig. 15 Fotografía de una bicapa lipídica (mitad inferior de la apertura) durante su formación a partir de una película lipídica densa (mitad superior) (Laver, 2001).

La bicapa se forma espontáneamente a partir de esta película lipídica densa. Durante la formación de la bicapa, los lípidos forman monocapas con las interfases aceite-agua sobre cada lado de la película densa. El solvente escurre

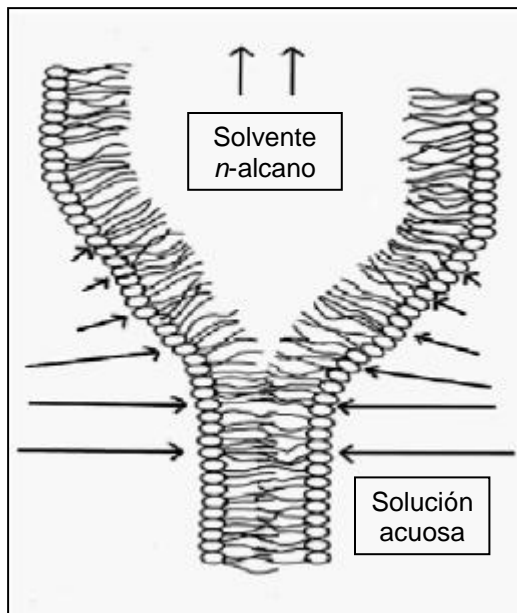
<sup>4</sup> Palmitoileoil fosfatidiletanolamina: fosfatidilserina: fosfatidilcolina, respectivamente.

de entre las dos monocapas, permitiendo así su aposición y la formación de la estructura de bicapa (Fig. 16) (Laver, 2001).

La formación de la bicapa es revelada por un aumento de la capacidad eléctrica ( $C$ ), la que varía en relación a las dimensiones de la membrana:

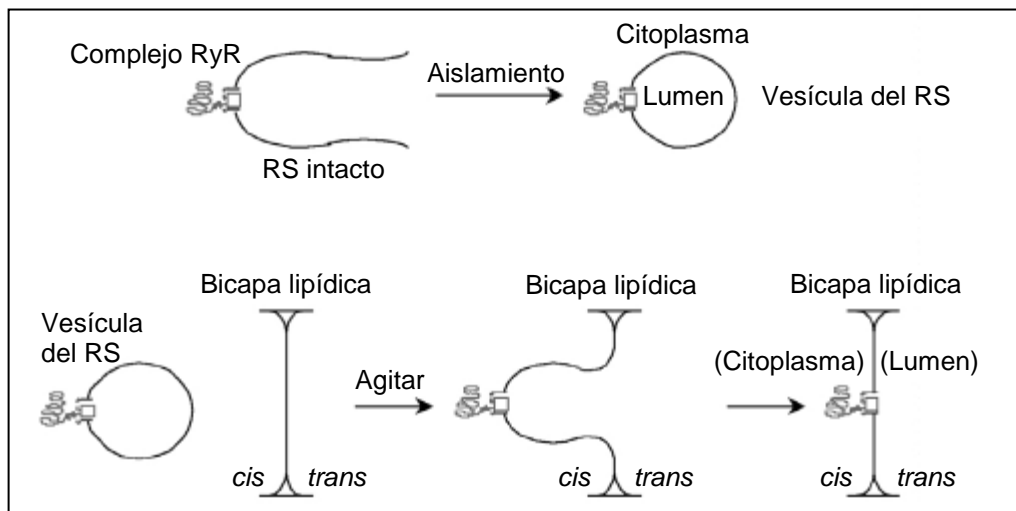
$$C = \varepsilon A / d, \text{ donde}$$

$A$  es el área de la bicapa,  $d$  es la distancia de separación entre las monocapas, y  $\varepsilon$  la constante dieléctrica del medio aislante entre ellas.



⇐ Fig. 16: **Diagrama esquemático del proceso de formación de la bicapa** mostrando las monocapas lipídicas con las dos interfaces aceite-agua. Los largos de las flechas, que se muestran en cada fase acuosa, indican las fuerzas relativas de Van der Waals entre las dos fases acuosas adyacentes. Esta fuerza compresiva hace escurrir el aceite (un *n*-alcano en este caso) fuera de entre las monocapas (Laver, 2001).

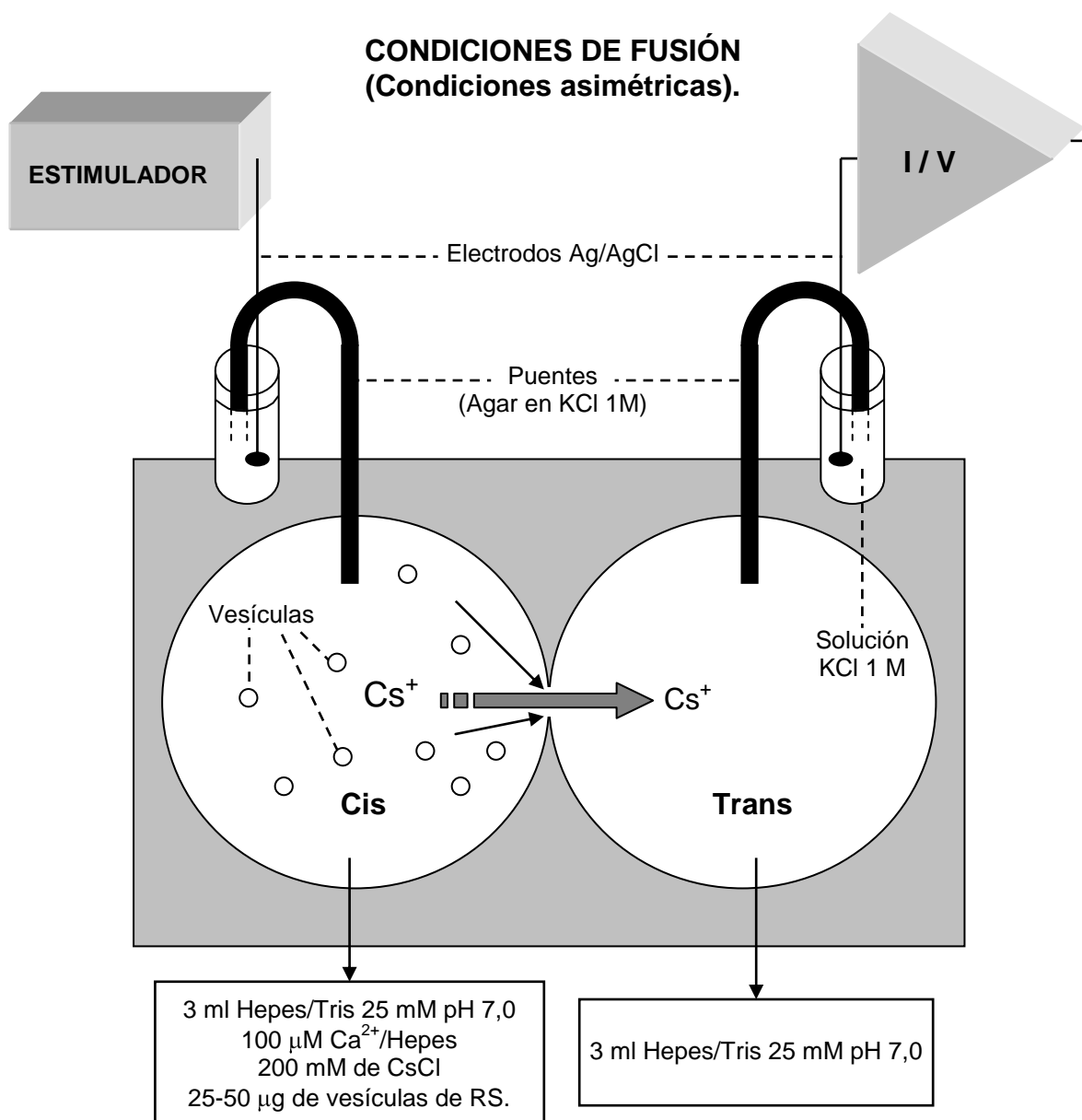
⇓ Fig. 17: **Orientación post-fusión del canal RyR.** Cuando la membrana del RS se fusiona con la bicapa, el lado citoplasmático de ésta se orienta en dirección a la solución *cis* y el lado luminal hacia la solución *trans* (Laver, 2001).



Una vez que se formó la bicapa, se añadió la preparación de vesículas de membrana de RS en la solución contenida por el bloque (compartimento *cis*). Las

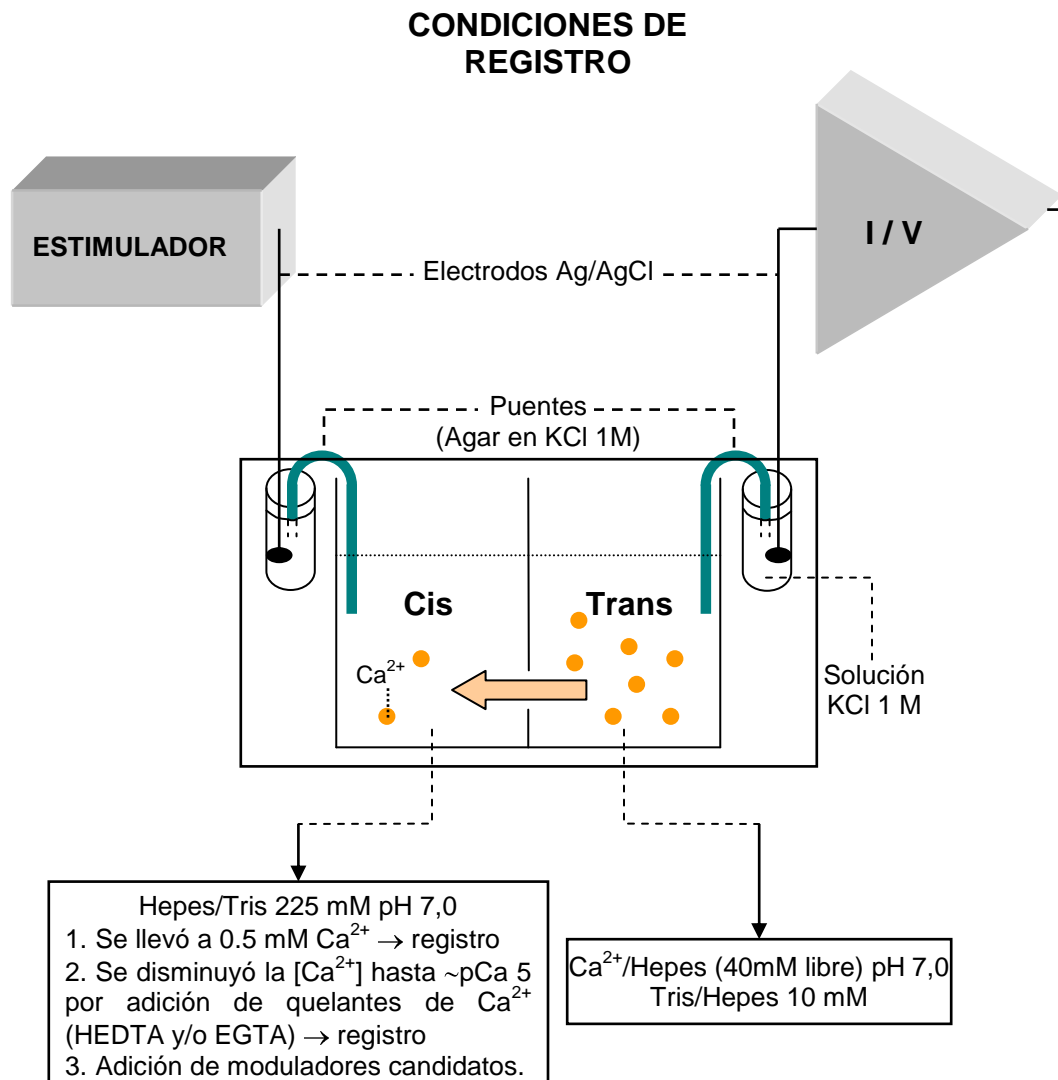
vesículas se incorporan a la bicapa, quedando la cara citoplasmática del canal orientada hacia el compartimento *cis*, y su cara luminal hacia el compartimento *trans* (solución contenida por la copa) (Fig. 17).

Para promover la fusión de las vesículas a la membrana, se adicionó cloruro de cesio (CsCl) al compartimento *cis*, para así crear un gradiente osmótico en la  $[Cs^+]$  a través de la bicapa (200 mM *cis* y 0 mM *trans* de  $Cs^+$ ). Además se adicionó  $Ca^{2+}$  (como Calcio/Hepes) al compartimento *cis*, como se muestra en el esquema siguiente:



Manteniendo la membrana a 0 mV, la fusión de un canal único se evidenció, en la pantalla del computador, como la aparición de una corriente catiónica con una conductancia de  $\sim 500$  pS para el  $\text{Cs}^+$  en estas condiciones. Después de la fusión, se perfundi6 el compartimento *cis* con 5 volúmenes de una solución Hepes/Tris 225 mM, pH 7,0, para evitar la fusión de otras vesículas a la bicapa. El compartimento *trans* se perfundi6 con una solución Calcio/Hepes 100 mM, pH 7,0, hasta alcanzar una concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  de 40 mM. En estas condiciones la presencia de un canal único en la bicapa se evidenció como una corriente catiónica llevada por  $\text{Ca}^{2+}$  con una conductancia de  $\sim 100$  pS.

Las condiciones de registro de los experimentos se muestran en el siguiente esquema:



En estas condiciones es posible monitorear la actividad de un canal único, y registrar cuando se abre (*estado abierto*) y se cierra (*estado cerrado*, estado conformacional no conductor donde no hay flujo de iones) el canal, mediante la medición de la corriente eléctrica que fluye a través de la membrana en respuesta a la aplicación de una gradiente electroquímica.

Esta alternancia entre dos niveles de conducción, corresponde a cambios conformacionales de la proteína donde el “poro” conductor se abre con una *amplitud* (conductancia<sup>5</sup>) y *frecuencia* que le será característica (cinética).

Los experimentos electrofisiológicos fueron realizados en la estación de trabajo descrita en el Anexo.

El compartimento *trans*, conectado a un conversor corriente-voltaje, corresponde a tierra virtual. La señal de corriente se filtró a 5 kHz con un filtro activo de paso bajo y se grabó con un sistema PCM (Pulse Code Modulation) en una grabadora de cintas de video, para su análisis posterior. Los registros se efectuaron a temperatura ambiente (22-24<sup>0</sup> C), luego de agitar en forma continua durante 30 – 60 segundos después de cada adición de agonista, modulador o bloqueador (todos se agregaron en el compartimento *cis*). La oxidación de los canales se indujo por adición de timerosal como agente oxidante directo. La reducción de los canales se indujo por adición de GSH (glutation reducido) como agente reductor directo. Para registrar el efecto inhibitorio del Mg<sup>2+</sup> se adicionaron alícuotas de MgSO<sub>4</sub> 0,5 M al lado *cis*. Los niveles de Mg<sup>2+</sup> libre (entre un rango de 8,5 μM hasta ~3 mM de Mg<sup>2+</sup>) se fijaron por el uso de HEDTA<sup>6</sup> y EGTA<sup>7</sup> como quelantes de Mg<sup>2+</sup>.

---

<sup>5</sup>  $g = i / V$  (a partir de la ley de Ohm), donde  $g$  representa la *conductancia* (Siemens, S),  $i$  representa la *corriente eléctrica* (Amperes, A), y  $V$  la *diferencia de potencial eléctrico* (Volt, V).

<sup>6</sup> Ácido N-(2-Hidroxi)etilen-diaminotriacético.

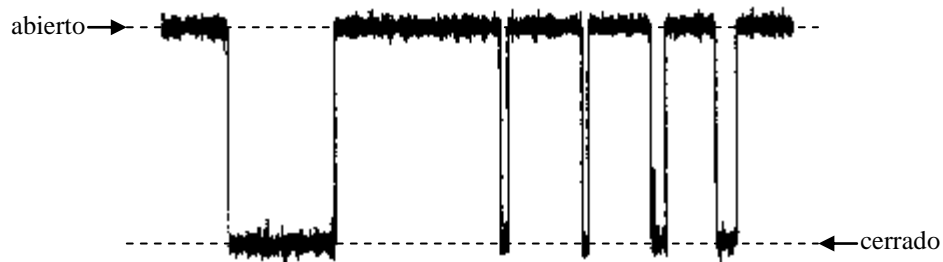
<sup>7</sup> Ácido etilen glicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético.

### Obtención y análisis de datos

Las señales análogas fueron filtradas a 400 Hz usando un filtro de paso bajo de ocho polos tipo Bessel (902 LPF, Frequency Devices Inc., Haverhill, MA, USA) y se digitalizaron a 2 kHz con un conversor análogo digital de 12 bits (interfase Labmaster DMA, Scientific solutions, Inc., Solon, OH, USA) comandado por un microcomputador Pentium 166 MHz, usando el programa de adquisición de datos AXOTAPE (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA). Las señales digitalizadas fueron analizadas con el conjunto de programas pClamp (Axon Instrument, Inc., Foster City, CA, USA), mediante el cual se realizó el cálculo del tiempo fraccional abierto ( $P_o$ ), con la utilización de registros de al menos 120 segundos de duración.

El cálculo del tiempo fraccional abierto ( $P_o$ ) fue realizado según la siguiente expresión:

$$P_o = \text{Tiempo en estado abierto} / \text{tiempo total de registro}$$



Las distribuciones de la duración de los tiempos abiertos y cerrados, considerando entre 500 – 30.000 eventos, fueron ajustadas con la suma de 3 o 4 funciones exponenciales usando el método de la máxima verosimilitud, por medio del programa pClamp (Axon Instrument, Inc., Foster City, CA, USA). Los eventos menores de 0,8 ms fueron excluidos del análisis.

## RESULTADOS

### Respuesta a la concentración citoplasmática de $\text{Ca}^{2+}$ de canales nativos provenientes de miocardio de conejo.

Los canales RyR nativos derivados del RS de miocardio de conejo presentaron, similarmente a lo publicado previamente (Marengo et al., 1998), dos tipos de dependencia frente a la concentración citoplasmática de calcio: MS y C. En la figura 18 se muestran registros representativos (10 segundos de duración) de la respuesta a la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  de canales RyR únicos, que presentaron espontáneamente dichas respuestas al calcio. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el compartimiento *cis* varió en el rango de 0,1 – 500  $\mu\text{M}$ .

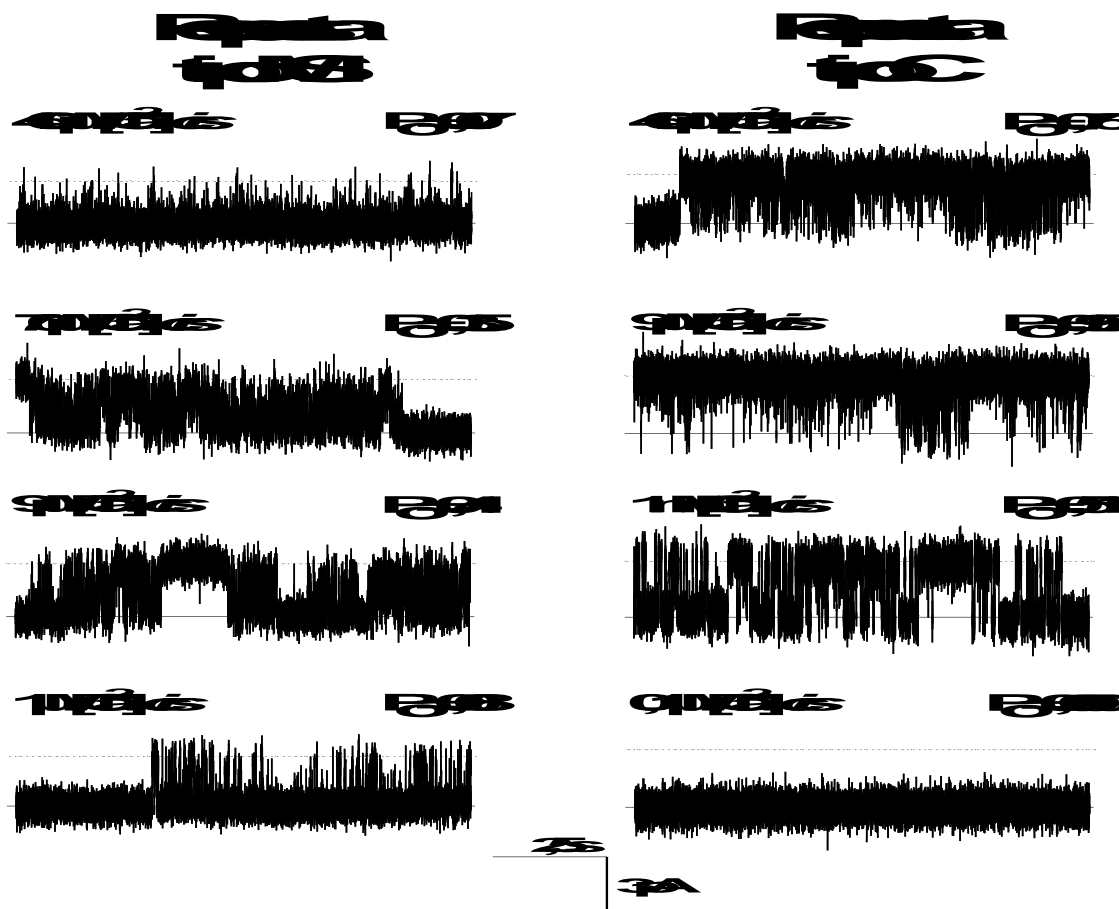


Fig. 18: Respuestas al calcio de canales RyR nativos únicos de miocardio de conejo. El compartimiento *cis* contenía una solución 225 mM Hepes/Tris, pH 7,0. El compartimiento *trans* contenía una solución 40 mM Calcio/Hepes, 10 mM Tris/Hepes, pH 7,0. El potencial de membrana fue fijado en 0 mV. Los valores del  $P_o$  fueron calculados a partir de registros de al menos 120 segundos de duración. La línea continua (inferior) corresponde al nivel cerrado del canal, y la línea punteada (superior) al nivel abierto.



El canal con respuesta de tipo MS presentó una dependencia con forma de campana (Marengo et al., 1998). Para una concentración de  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , presentó una actividad baja ( $P_o = 0,08$ ), la cual aumentó ( $P_o = 0,41$ ) a  $9 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , alcanzando un máximo ( $P_o = 0,54$ ) a una concentración de  $22 \mu\text{M Ca}^{2+}$  (no mostrado). A concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores se produjo una disminución en su actividad ( $P_o = 0,35$  a  $70 \mu\text{M}$ ), mostrando una marcada inhibición ( $P_o = 0,07$ ) a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $460 \mu\text{M}$ .

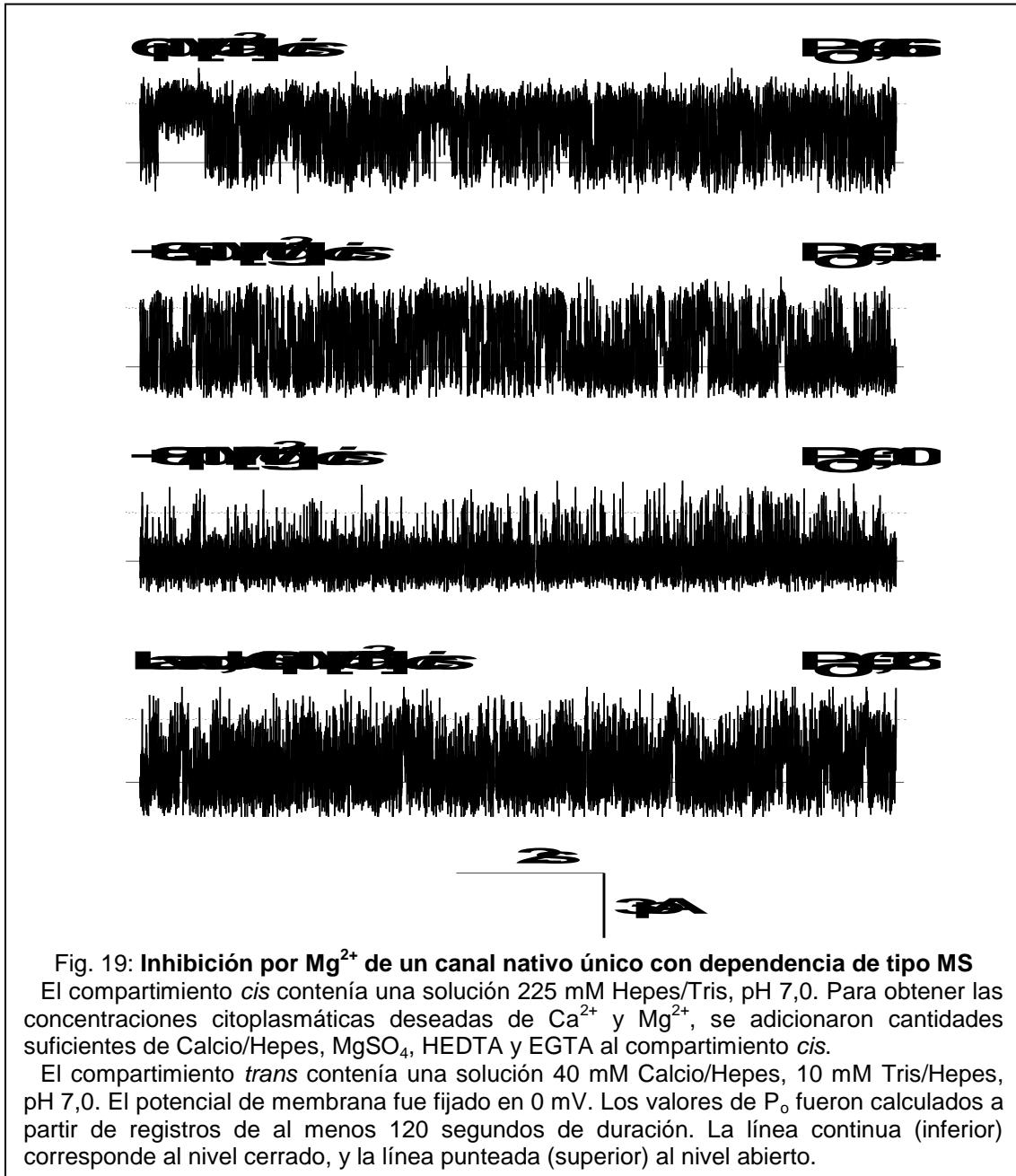
El canal con respuesta de tipo C presentó una activación sigmoideal (Marengo et al., 1998) con escasa inhibición ( $P_o = 0,76$ ) a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático ( $460 \mu\text{M}$ ). A bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático ( $0,1 \mu\text{M}$ ) su  $P_o$  fue cercano a cero ( $P_o = 0,006$ ). Sin embargo, a diferencia del canal con respuesta de tipo MS, presentó actividad intermedia ( $P_o = 0,51$ ) a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $1 \mu\text{M}$ , la cual aumentó alcanzando un máximo de activación ( $P_o = 0,95$ ) a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $9 \mu\text{M}$ .

### **Inhibición por $\text{Mg}^{2+}$ de canales nativos con diferente respuesta al $\text{Ca}^{2+}$ .**

En este trabajo se estudió la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  de canales RyR nativos derivados del RS de miocardio de conejo, que presentaron diferente respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada en el compartimiento *cis* fue de  $6 - 13 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , ya que a ésta los canales alcanzaron habitualmente su actividad máxima.

#### **• Inhibición de un canal nativo único con respuesta al calcio de tipo MS.**

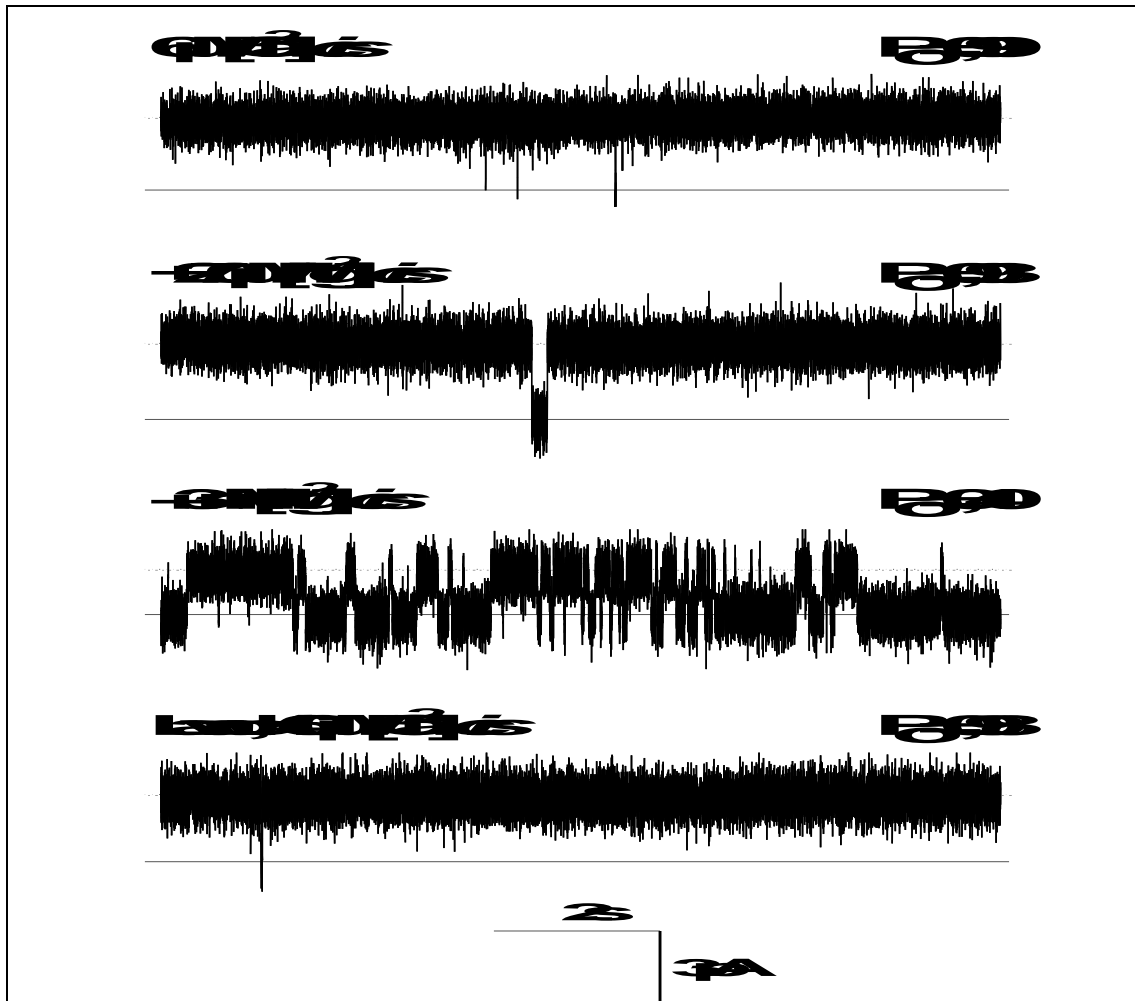
En la figura 19 se muestra el efecto de la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  de un canal RyR único que presentó espontáneamente una respuesta a calcio de tipo MS ( $P_o = 0,66$  a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*). A medida que se aumentó la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  en el compartimiento *cis*, el canal se inhibió gradualmente: su  $P_o$  disminuyó desde  $0,66$  a  $0,34$  con  $8,5 \mu\text{M Mg}^{2+}$  *cis*, y a  $0,10$  con  $87 \mu\text{M Mg}^{2+}$  *cis* (Fig. 19, primeros tres trazados superiores). Este efecto fue reversible. Luego de reemplazar la solución del compartimiento *cis* con una solución  $225 \text{ mM Hepes/Tris}$ , pH  $7,0$  (lavado), el canal volvió a presentar una respuesta al calcio de tipo MS, evidenciada por la inhibición de su actividad ( $P_o = 0,26$ ) a  $460 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis* (Fig. 19, trazado inferior).



- **Inhibición de un canal nativo único con respuesta al calcio de tipo C.**

En la figura 20 se muestra el efecto de la inhibición por  $Mg^{2+}$  de un canal RyR único que presentó espontáneamente una respuesta al calcio de tipo C ( $P_o = 0,99$  a  $6 \mu M Ca^{2+}$  *cis*). A medida que se aumentó la concentración de  $Mg^{2+}$  en el compartimiento *cis*, el canal disminuyó gradualmente su  $P_o$ , siendo mucho menos sensible al efecto inhibitorio del  $Mg^{2+}$  que el canal con dependencia de tipo MS. Su  $P_o$  disminuyó desde 0,99 hasta apenas 0,93 para  $270 \mu M Mg^{2+}$  *cis*, y sólo se

produjo una inhibición parcial del canal ( $P_o = 0,40$ ) para 3 mM  $Mg^{2+}$  *cis*, la máxima concentración de  $Mg^{2+}$  utilizada (Fig. 20, primeros tres trazados superiores). También se pudo, en este caso, revertir la inhibición mediante el lavado del compartimiento *cis*, con la solución mencionada anteriormente: el canal volvió a presentar una respuesta al calcio de tipo C, lo que se evidencia por la falta de inhibición ( $P_o = 0,98$ ) a 460  $\mu M$   $Ca^{2+}$  *cis* (Fig. 20, trazado inferior).

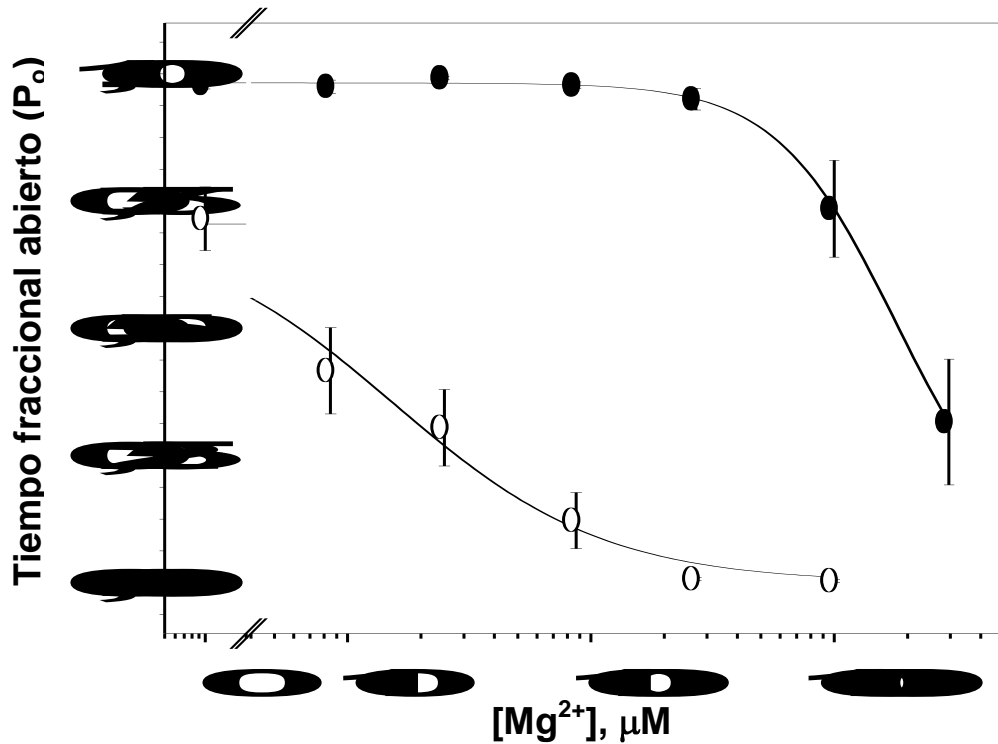


**Fig. 20: Inhibición por  $Mg^{2+}$  de un canal nativo único con dependencia de tipo C**

Para obtener las concentraciones citoplasmáticas deseadas de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , se adicionaron cantidades suficientes de Calcio/Hepes,  $MgSO_4$ , HEDTA y EGTA al compartimiento *cis*. Los compartimientos *cis* y *trans* contenían las mismas soluciones mencionadas en la figura 19.

El potencial de membrana fue fijado en 0 mV. Los valores de  $P_o$  fueron calculados utilizando registros de al menos 120 segundos de duración. La línea continua (inferior) corresponde al nivel cerrado, y la línea punteada (superior) al nivel abierto.

En la figura 21 se muestran los cambios en el tiempo fraccional abierto de la población de canales de tipo **MS** (círculos vacíos) y **C** (círculos llenos) en función de la concentración citoplasmática de  $Mg^{2+}$  libre. Los datos fueron obtenidos a una  $[Ca^{2+}]_{cis}$  fija de  $6 \mu M$ .



**Fig 21: Inhibición por  $Mg^{2+}$  de canales de tipo C y MS.**

Los círculos representan los valores promedio de  $P_o$  obtenidos para la población de canales de tipo **MS** (círculos vacíos: 11 experimentos de canal único) y **C** (círculos llenos: 18 experimentos de canal único). Las líneas sólidas representan los mejores ajustes no-lineales de los datos a una ecuación de Hill (Ec. 1). Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Los datos de los canales de tipo MS y C fueron ajustados a la siguiente ecuación de Hill (Ec. 1):

$$\text{Ec. (1)} \quad P_o = \frac{P_{oini} * K_i^n}{K_i^n + [Mg^{2+}]^n},$$

donde  $P_{oini}$  corresponde al valor de  $P_o$  en ausencia de  $Mg^{2+}$ ,  $K_i$  es la concentración de magnesio a la cual se alcanza la mitad de la inhibición máxima del canal, y  $n$  es el coeficiente de Hill para la inhibición por magnesio.

Los parámetros obtenidos con las poblaciones de canales de tipo MS y C se muestran en la tabla siguiente:

<b>6 <math>\mu\text{M Ca}^{2+}</math> <i>cis</i></b>	<b><math>P_{oini}</math></b>	<b><math>n</math></b>	<b><math>K_i</math></b>
<b>Canales de tipo MS</b>	0,705 $\pm$ 0,031	0,91 $\pm$ 0,14	14,6 $\pm$ 2,8 $\mu\text{M}$
<b>Canales de tipo C</b>	0,983 $\pm$ 0,003	1,70 $\pm$ 0,04	1,90 $\pm$ 0,03 mM

Se observaron dos patrones de inhibición por magnesio. Uno para los canales de tipo MS, caracterizado por una alta afinidad aparente para la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que se evidencia por una  $K_i$  baja de  $\sim 15 \mu\text{M}$ , y un coeficiente de Hill cercano a 1, que sugiere falta de cooperatividad en la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$ . Los canales de tipo C mostraron otro patrón, caracterizado por una baja afinidad para la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$ , evidenciado por una  $K_i$  alta de  $\sim 2 \text{ mM}$  y un coeficiente de Hill de 1,7, lo que sugiere cooperatividad en la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$ .

### **La oxidación de los canales RyR modifica el efecto inhibitorio del $\text{Mg}^{2+}$ sobre su actividad.**

La presencia de diferentes respuestas a la concentración citoplasmática de calcio y de un patrón diferente de inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$ , en un tejido que expresa una sola isoforma (en este caso dos tipos de respuesta al calcio y al  $\text{Mg}^{2+}$  para la isoforma RyR-2) podría deberse a una modificación post-traducciona de los canales por procesos tales como la fosforilación y/o cambios en su estado redox.

En esta tesis investigamos la posible modificación del efecto inhibitorio del magnesio debido a cambios en el estado redox del canal. La figura 22 muestra un canal RyR único derivado del RS de miocardio de conejo que presentó espontáneamente una respuesta al calcio de tipo MS, evidenciada por un  $P_o$  bajo ( $P_o = 0,16$ ) a  $500 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis* y por una apreciable actividad ( $P_o = 0,75$ ) a una concentración de  $13 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis* (Fig. 22, primeras dos trazas superiores de la columna izquierda). La adición de  $\text{Mg}^{2+}$  en la cara citoplasmática del canal produjo una inhibición gradual de éste a medida que se aumentó la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ : su  $P_o$  disminuyó desde 0,75, en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , a 0,29 con  $0,28 \text{ mM Mg}^{2+}$  *cis*, y a un valor cercano a 0 con una concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  en el compartimiento *cis* de  $0,95 \text{ mM}$  (Fig. 22, trazas inferiores de la columna izquierda).

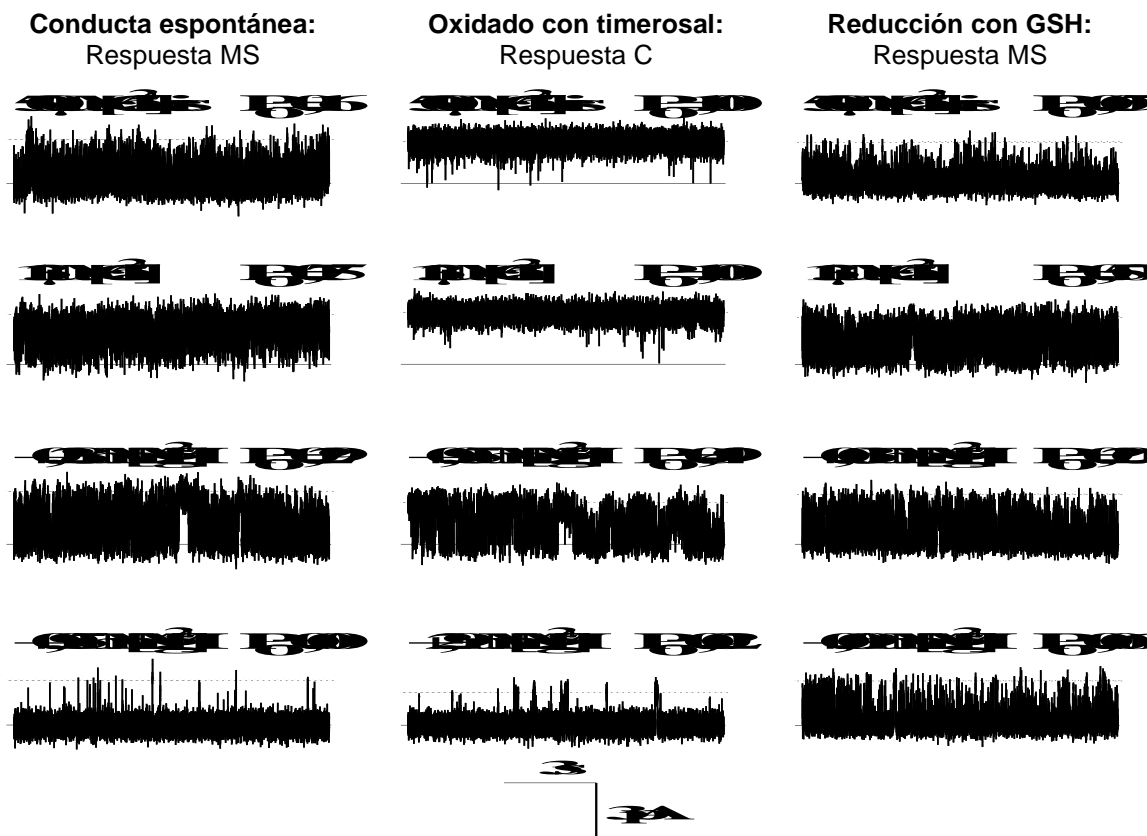
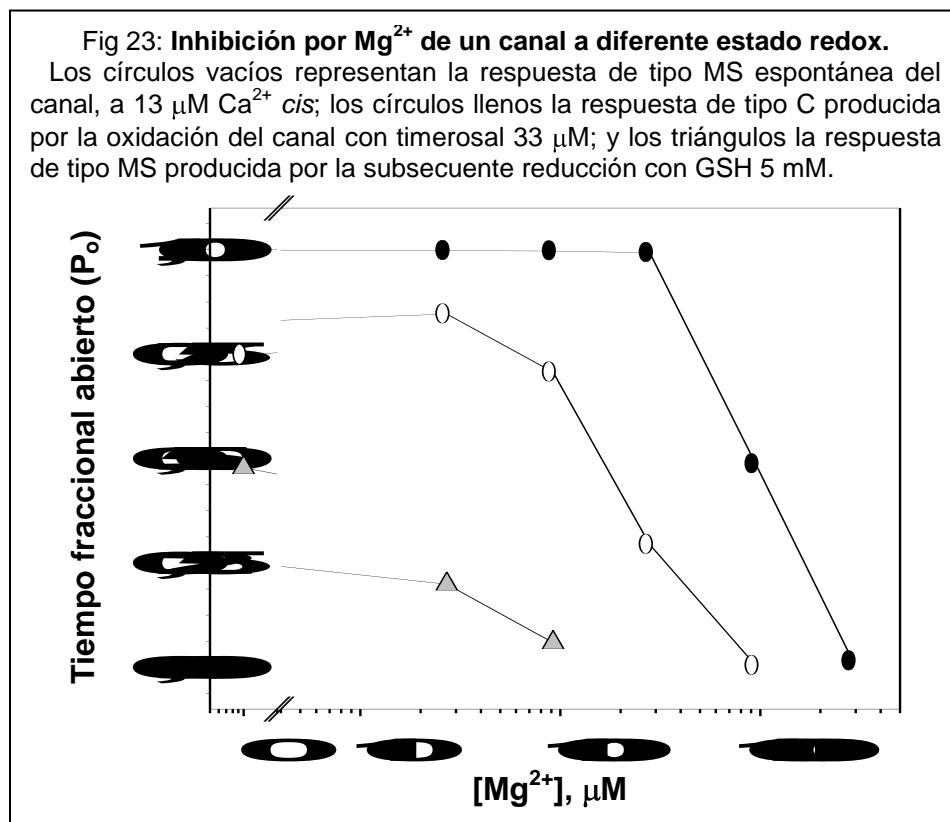


Fig. 22: **Modificación del efecto inhibitorio del  $Mg^{2+}$  sobre la actividad de un canal único, por oxido-reducción de residuos SH**

Con el objeto de modificar su respuesta al  $Ca^{2+}$  (y al  $Mg^{2+}$ ), el canal fue oxidado con timerosal  $33 \mu M$ , durante aproximadamente 5 segundos. Una vez producida la oxidación, evidenciada por un aumento en el  $P_o$ , se lavó el compartimiento *cis* para detener la reacción y evitar que su progreso condujese a la inactivación del canal (Abramson et al., 1995; Marengo et al., 1998). En estas condiciones, la respuesta al calcio de este mismo canal se transformó en una respuesta al calcio de tipo C, evidenciada por una falta de inhibición ( $P_o = 1,0$ ) a  $500 \mu M Ca^{2+}$  *cis* y porque esta actividad alta ( $P_o = 1,0$ ) se mantuvo a  $13 \mu M Ca^{2+}$  *cis* (Fig. 22, primeras dos trazas superiores de la columna central). La adición de  $Mg^{2+}$  en el compartimiento *cis* produjo una inhibición gradual del canal, a medida que se aumentó la concentración de  $Mg^{2+}$ . Sin embargo la  $[Mg^{2+}]$  requerida para la inhibición fue mayor. El  $P_o$  disminuyó desde 1,0, en ausencia de  $Mg^{2+}$ , a 0,49 con  $0,95 \text{ mM } Mg^{2+}$  *cis*, y a 0,02 con  $2,9 \text{ mM } Mg^{2+}$  *cis* (Fig. 22, trazas inferiores de la columna central).

En una tercera etapa, y con el objeto de revertir la modificación de la actividad del canal previamente inducida por la oxidación, los residuos SH del canal fueron reducidos mediante la incubación con GSH 5 mM, por aproximadamente 2 minutos. Una vez producida la reducción, evidenciada por una disminución en el  $P_o$ , se lavó el compartimiento *cis* para eliminar el GSH. En estas condiciones el canal expresó nuevamente una respuesta al calcio de tipo MS, evidenciada por la inhibición por  $Ca^{2+}$  del canal ( $P_o = 0,05$ ) a  $500 \mu M Ca^{2+}$  *cis* y por presentar una actividad intermedia ( $P_o = 0,50$ ) a una concentración de  $13 \mu M Ca^{2+}$  *cis* (Fig. 22, primeras dos trazas superiores de la columna derecha). La adición de  $Mg^{2+}$  produjo una inhibición gradual de éste a medida que se aumentó la concentración de  $Mg^{2+}$  en el compartimiento *cis*: su  $P_o$  disminuyó desde 0,50, en ausencia de  $Mg^{2+}$ , a 0,20 con  $0,03 mM Mg^{2+}$  *cis*, y a 0,06 con  $0,09 mM Mg^{2+}$  *cis* (Fig. 22, trazas inferiores de la columna derecha). En esta condición el canal se inhibió con concentraciones bajas de magnesio.

En la figura 23 se muestra la inhibición de este canal a todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$  probadas.



### Mecanismos de inhibición por magnesio

Con el propósito de estudiar el mecanismo a través del cual el  $Mg^{2+}$  inhibe a los canales RyR, analizamos el cambio en la duración y en el peso relativo, de los eventos abiertos y cerrados, de canales únicos con respuestas de tipo MS y C.

Las distribuciones de la duración de los eventos abiertos y cerrados de un canal único con respuesta de tipo MS, en ausencia de magnesio y a una concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$  de  $6 \mu M$ , fueron ajustadas por la suma de 4 funciones exponenciales (Fig. 24, parte superior). La adición de magnesio modificó principalmente la duración promedio de los eventos cerrados, aumentando más las constantes de tiempo de mayor duración y afectando poco la duración de los eventos abiertos (Fig. 24, parte inferior). Además hubo un marcado cambio en los pesos relativos tanto de los eventos abiertos como cerrados. Los eventos abiertos de duración intermedia se hicieron menos frecuentes y los eventos cerrados de larga duración aumentaron su peso relativo (Fig. 24).

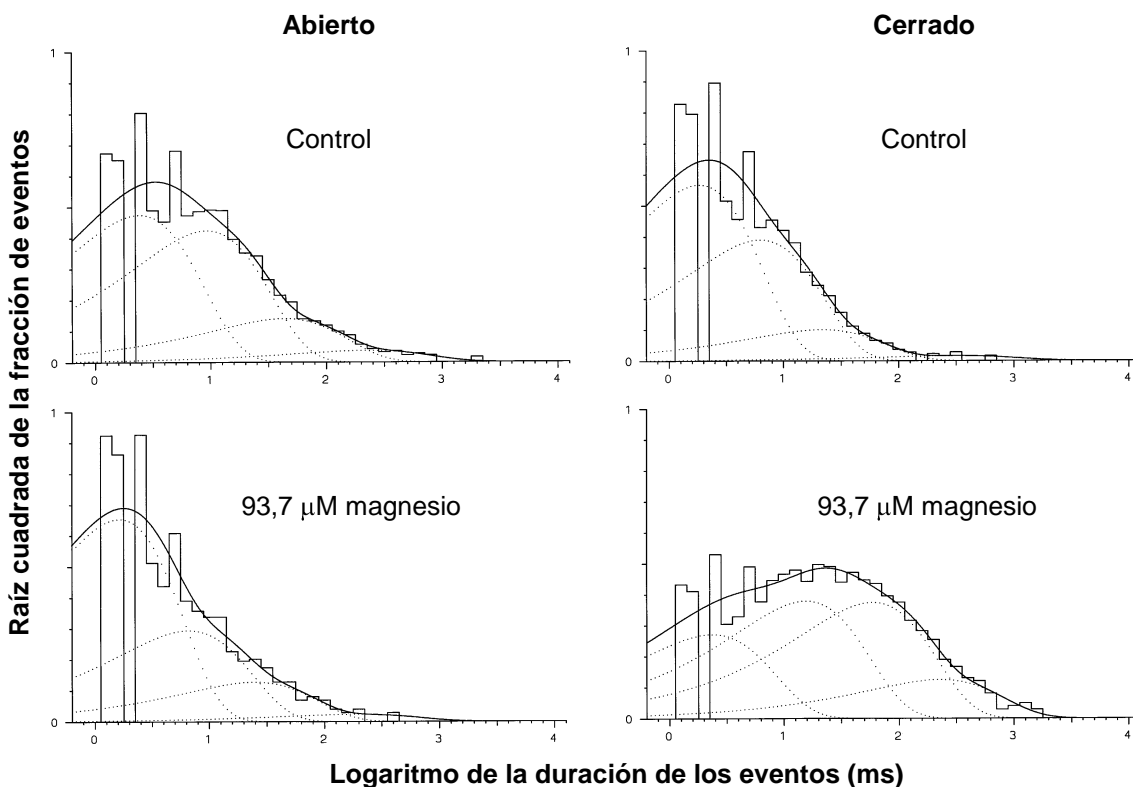


Fig. 24: Efecto del magnesio sobre la duración de los eventos abiertos y cerrados de un canal con respuesta de tipo MS. Los histogramas fueron construidos a partir de registros, de experimentos de canal único, de al menos 120 seg. de duración. Los datos fueron ajustados con 4 funciones exponenciales (líneas punteadas) usando el método de máxima verosimilitud. Las líneas continuas corresponden a la suma de las 4 funciones exponenciales.



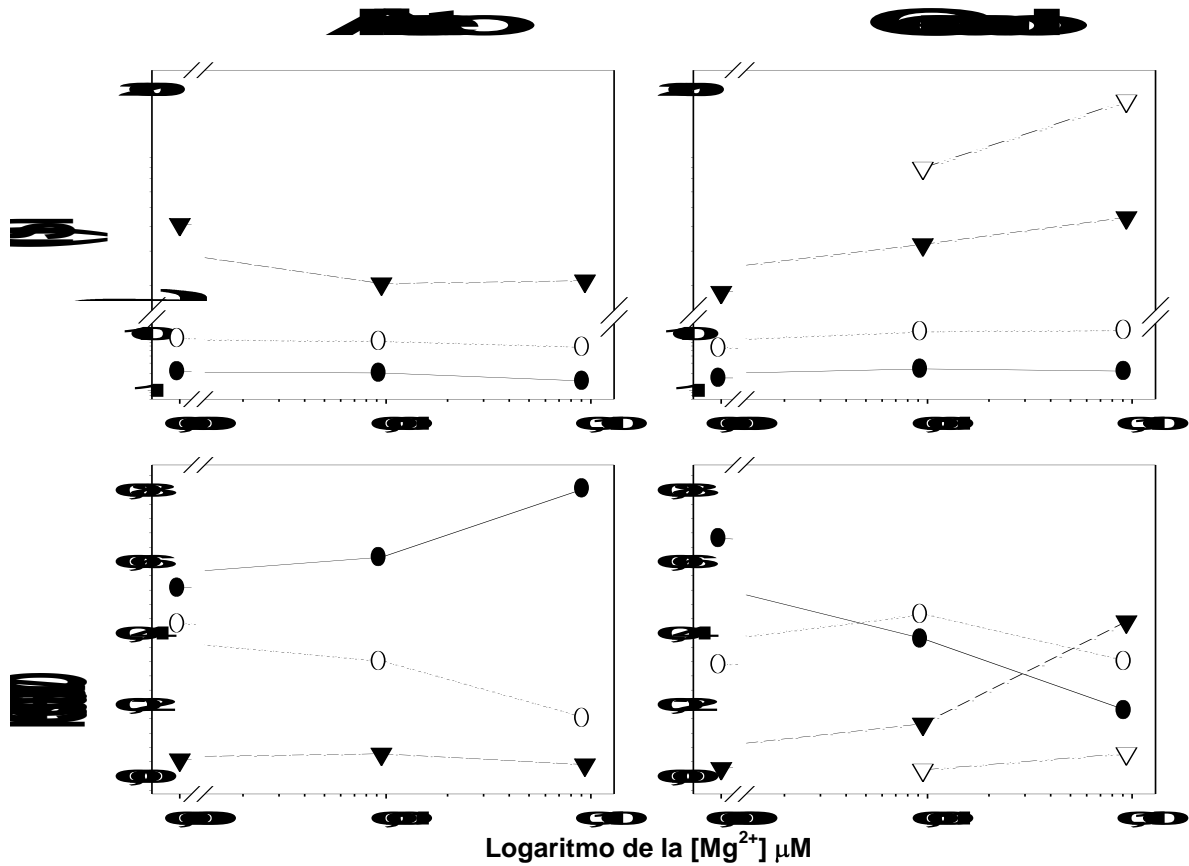


Fig. 25: Efecto del magnesio sobre las constantes de tiempo ( $\tau$ ) de los eventos abiertos y cerrados de un canal con respuesta de tipo MS. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a partir de registros de experimentos con canal único. *Superior*: valores de las constantes de tiempo; *Inferior*: sus pesos relativos. Los círculos representan las constantes de tiempo rápidas y los triángulos las lentas.

La figura 25 muestra los cambios cuantitativos inducidos por el magnesio sobre los valores de las constantes de tiempos abiertos y cerrados (Fig. 25, parte superior), y sobre sus pesos relativos (Fig. 25, parte inferior). Sólo se muestran las constantes de tiempo con un peso relativo  $>0,005$ . En ausencia de magnesio, los valores ajustados para las dos constantes de tiempo abierto rápidas (círculos) fueron 2,2 y 8,3 ms, y para la constante lenta (triángulos) fue de 41,1 ms. Después de la adición de 93,7  $\mu\text{M}$  magnesio los valores de las constantes de tiempo abierto rápidas no variaron en forma apreciable (1,5 y 5,8 ms respectivamente), pero la constante lenta disminuyó a 21,2 ms. En ausencia de magnesio, los valores de las dos constantes de tiempo cerrado rápidas fueron 1,6 y 5,6 ms, y el de la constante de tiempo cerrado lenta fue de 18,6 ms. Después de la adición de 93,7  $\mu\text{M}$  magnesio el valor de la constante de tiempo cerrado más rápida no varió

mayormente (de 1,6 a 2,2 ms), mientras que las otras constantes aumentaron: la constante rápida restante aumentó de 5,6 a 11,5 ms, y la constante lenta aumentó de 18,6 a 44,5 ms, apareciendo además una nueva constante de tiempo cerrado lenta que, a esta concentración de magnesio, alcanzó los 174,5 ms.

La adición de magnesio aumentó además el peso relativo de la constante de tiempo abierto de más corta duración (Fig. 25, círculos llenos, parte inferior izquierda), disminuyendo la importancia de la otra constante rápida (Fig. 25, círculos vacíos, parte inferior izquierda). La constante de tiempo abierto lenta (Fig. 25, triángulos llenos, parte inferior izquierda) no modificó mayormente su peso relativo ( $\sim 0,05$ ). En el caso de las constantes de tiempo cerrado, la adición de magnesio aumentó el peso relativo de las constantes lentas (Fig. 25, triángulos, parte inferior derecha), disminuyendo principalmente la importancia de la constante más rápida (Fig. 25, círculos llenos, parte inferior izquierda).

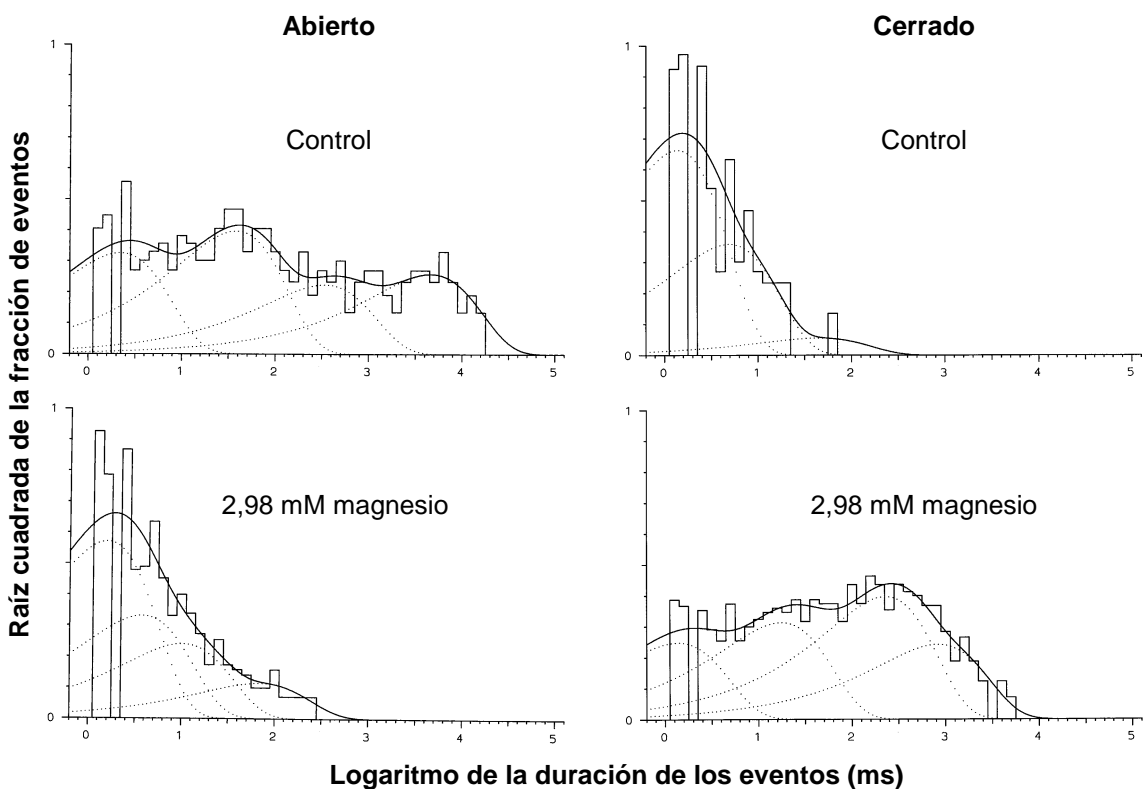


Fig. 26: Efecto del magnesio sobre la duración de los eventos abiertos y cerrados de un canal con respuesta de tipo C. Los histogramas fueron construidos a partir de registros de al menos 120 seg. de duración, de experimentos en canal único. Los datos fueron ajustados con 3 ó 4 funciones exponenciales (líneas punteadas) usando el método de máxima verosimilitud. Las líneas continuas corresponden a la suma de las funciones exponenciales.

Las distribuciones de la duración de los eventos abiertos y cerrados de un canal único con respuesta de tipo C, en ausencia de magnesio y a una concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $6 \mu\text{M}$ , fueron ajustadas por la suma de 3 ó 4 funciones exponenciales (Fig. 26, parte superior). La adición de magnesio no modificó mayormente la duración promedio de los eventos de más corta duración (abiertos y cerrados), disminuyendo en cambio los valores de la duración promedio de las otras constantes de tiempo abierto, y aumentando la duración promedio de las otras constantes de tiempo cerrado (Fig. 26, parte inferior). Además hubo un marcado cambio en los pesos relativos tanto de los eventos abiertos como cerrados. Los eventos abiertos de más corta duración se hicieron relativamente más frecuentes, y los de más larga duración disminuyeron su peso relativo. Por otro lado, los eventos cerrados de más corta duración disminuyeron su frecuencia relativa y los de larga duración la aumentaron (Fig. 26).

La figura 27 muestra el cambio cuantitativo inducido por el magnesio sobre los valores de las constantes de tiempos abiertos y cerrados (Fig. 27, parte superior), y sobre sus pesos relativos (Fig. 27, parte inferior). En cada caso se muestran las constantes de tiempo con un peso relativo  $>0,005$ . En ausencia de magnesio, los valores ajustados para las dos constantes de tiempo abierto rápidas fueron 2,0 y 33,7 ms (círculos llenos y vacíos, respectivamente), y para las constantes lentas fueron de 300,4 y 4076,3 ms (triángulos llenos y vacíos, respectivamente). Después de la adición de  $\sim 3$  mM magnesio, sólo el valor de la constante de tiempo abierto más rápida no varió mayormente (de 2,0 a 1,4 ms), disminuyendo el valor de todas las otras constantes: la constante rápida restante disminuyó a 3,4 ms y las constantes lentas disminuyeron a 9,0 y 60,7 ms respectivamente. En ausencia de magnesio, los valores para las dos constantes de tiempo cerrado rápidas fueron 1,2 y 4,4 ms (círculos llenos y vacíos, respectivamente). Después de la adición de  $\sim 3$  mM magnesio el valor de la constante de tiempo cerrado más rápida no varió (1,2 ms), mientras que la otra constante rápida aumentó desde 4,4 a 15,6 ms. Además aparecieron dos nuevas constantes de tiempo cerrado lentas que, a una concentración de magnesio de  $\sim 3$  mM, alcanzaron 203,1 y 737,2 ms (triángulos llenos y vacíos, respectivamente).

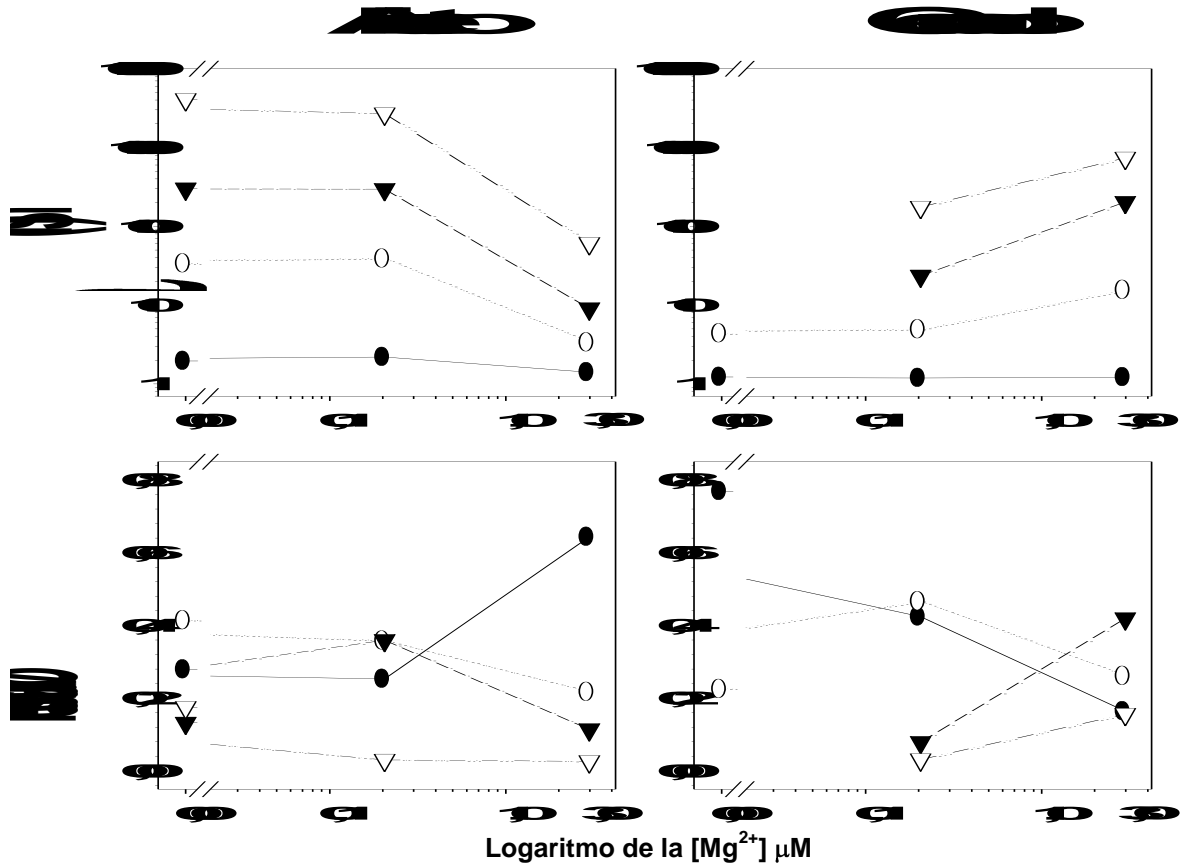


Fig. 27: Efecto del magnesio sobre las constantes de tiempo ( $\tau$ ) de los eventos abiertos y cerrados de un canal con respuesta de tipo C. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a partir de registros de experimentos con canal único. *Superior*: valores de las constantes de tiempo; *Inferior*: sus pesos relativos. Los círculos representan las constantes de tiempo rápidas y los triángulos las lentas.

La adición de magnesio disminuyó el peso relativo de la constante de tiempo cerrado de más corta duración (Fig. 27, círculos llenos, parte inferior derecha), mientras que el de la otra constante rápida (Fig. 27, círculos vacíos, parte inferior derecha) varió sin una tendencia definida. En el caso de las constantes de tiempo cerrado lentas (Fig. 27, triángulos, parte inferior derecha), la adición de magnesio aumentó el peso relativo de ambas constantes, y principalmente el peso relativo de la constante de tiempo cerrado menos lenta (Fig. 27, triángulos llenos, parte inferior derecha).

Los cambios inducidos en el  $P_0$  por el magnesio se explican, en el caso del canal con respuesta de tipo MS, principalmente por un aumento en la duración promedio de los eventos cerrados, especialmente de los de larga duración. En el caso del canal con respuesta de tipo C, los cambios inducidos por el  $Mg^{2+}$  se

explican por un cambio en la duración promedio tanto de los eventos abiertos como de los cerrados: la duración de los eventos abiertos disminuye y la de los cerrados aumenta. En ambos tipos de canales, los pesos relativos de las constantes de tiempos abiertos y cerrados, siguen tendencias similares entre ellas. En otras palabras, al aumentar la  $[Mg^{2+}]$  el canal se va abriendo gradualmente menos veces. Como habitualmente el canal RyR-2 se abre mediante la unión de calcio a un sitio activador de alta afinidad para este ion, esto se podría explicar por una competencia entre el  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  por el sitio activador. Si esto fuera cierto podríamos esperar que un aumento en la  $[Ca^{2+}]$  desplazara al magnesio aumentando el valor de la  $K_i$ , necesiéndose mayores concentraciones de  $Mg^{2+}$  para producir la inhibición del canal.

### Mecanismo de inhibición por $Mg^{2+}$ de canales de tipo MS a diferente concentración citoplasmática de calcio

En la figura 28 se muestran los cambios en el tiempo fraccional abierto de la población de canales de tipo MS en función de la concentración citoplasmática de  $Mg^{2+}$  libre, a distintas concentraciones citoplasmáticas de calcio. Los datos fueron obtenidos a 6  $\mu M$  (círculos) y a 13  $\mu M$  (triángulos)  $[Ca^{2+}]$  *cis*. Los parámetros obtenidos con estas poblaciones de canales, a distintas concentraciones citoplasmáticas de calcio se muestran en la siguiente tabla:

Canales de tipo MS	$P_{oini}$	$n$	$K_i$
A 6 $\mu M$ $Ca^{2+}$ <i>cis</i>	0,705 $\pm$ 0,031	0,91 $\pm$ 0,14	14,6 $\pm$ 2,8 $\mu M$
A 13 $\mu M$ $Ca^{2+}$ <i>cis</i>	0,926 $\pm$ 0,017	1,65 $\pm$ 0,14	91,6 $\pm$ 5,5 $\mu M$

Como se mencionó anteriormente y se observa en esta tabla, los canales de tipo MS 6  $\mu M$   $Ca^{2+}$  *cis*, se caracterizaron por una alta afinidad aparente para la inhibición por  $Mg^{2+}$ , evidenciado por una  $K_i$  baja de  $\sim 15$   $\mu M$ , y un coeficiente de Hill cercano a 1, que sugiere falta de cooperatividad en la inhibición por  $Mg^{2+}$ . Los canales de tipo MS a 13  $\mu M$   $Ca^{2+}$  *cis*, mostraron otro patrón, caracterizado por una menor afinidad para la inhibición por  $Mg^{2+}$ , evidenciado por una  $K_i$  mayor de  $\sim 100$   $\mu M$  y un coeficiente de Hill de 1,65, lo que sugiere cooperatividad en la inhibición por  $Mg^{2+}$ .

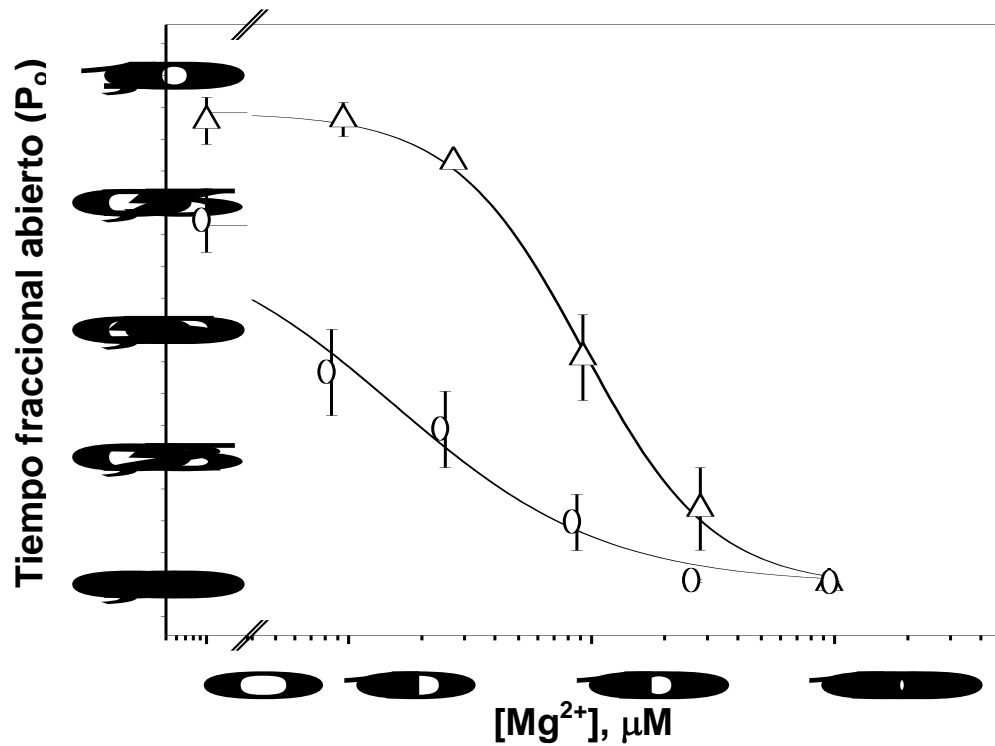


Fig 28: Inhibición por  $Mg^{2+}$  de canales de tipo MS a diferente concentración citoplasmática de calcio. Los círculos representan los valores promedio de  $P_o$  obtenidos para la población de canales de tipo MS a  $6 \mu M$  (círculos: 11 experimentos de canal único) y a  $13 \mu M$  (triángulos: 6 experimentos)  $[Ca^{2+}]_{cis}$ . Las líneas sólidas representan los mejores ajustes no-lineales de los datos a una ecuación de Hill (Ec. 1). Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

## DISCUSIÓN

### **Los canales RyR cardíacos estudiados exhibieron dos tipos de respuesta al calcio citoplasmático, y diferente sensibilidad a la inhibición por $Mg^{2+}$**

Los resultados presentados en este trabajo muestran que los canales RyR nativos únicos derivados del RS de miocardio de conejo responden a cambios en la  $[Ca^{2+}]_{cis}$ . Todos los canales RyR estudiados presentaron los mismos dos tipos de respuesta frente a la concentración citoplasmática de calcio, MS y C, que los publicados previamente por Marengo et al. (1998) para canales RyR cardíacos.

Los canales con distintas respuestas a la concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$ , también mostraron diferente sensibilidad a la inhibición por  $Mg^{2+}$ . Así, los canales de tipo MS exhibieron una  $K_i$  para el  $Mg^{2+}$  menor que los canales de tipo C. Cabe recordar que la  $K_i$  para el  $Ca^{2+}$  de canales de tipo MS es mucho menor que la  $K_i$  para el  $Ca^{2+}$  de canales de tipo C. Por ello, la inhibición por  $Mg^{2+}$  podría explicarse por la unión de éste al sitio inhibidor para divalentes del RyR. Esto es válido para canales que sólo se inhiben a concentraciones altas de  $Mg^{2+}$  (Laver et al., 1997).

Laver et al. (1997) encontraron una alta correlación ( $r = 0,95$ ) entre la sensibilidad a la inhibición por  $Ca^{2+}$  y a la inhibición por  $Mg^{2+}$ , en canales RyR únicos de tipo C, implicando que aquellos canales que son más sensibles a la inhibición por  $Ca^{2+}$ , son a su vez más sensibles a la inhibición por  $Mg^{2+}$ , y viceversa, lo que concuerda con nuestros resultados.

Dado que los canales aislados desde músculo cardíaco tienen esencialmente sólo una isoforma (RyR-2), y que exhibieron dos diferentes respuestas al calcio, es necesario invocar un mecanismo alternativo a la presencia de diferentes isoformas de RyR, para dar cuenta de las diferentes respuestas al calcio citoplasmático observadas en ellos.

Como por oxidación un canal con respuesta de tipo MS puede transformarse en un canal con respuesta de tipo C (Marengo et al., 1998), las diferentes respuestas frente a la concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  pueden deberse a cambios en el estado redox del canal.

**La oxidación de los residuos SH modifica la respuesta a la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$**

En un canal RyR cardíaco que espontáneamente presentó una respuesta al calcio de tipo MS, y que fue incubado con timerosal 33  $\mu\text{M}$  se modificó tanto la respuesta a la concentración citoplasmática de calcio como el efecto inhibitorio del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el canal. Esto se puede apreciar en los cambios del  $P_o$  sufridos por el canal antes y después de la oxidación de éste, a iguales concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  libres:

	500 $\mu\text{M}$ $\text{Ca}^{2+}$ <i>cis</i>	13 $\mu\text{M}$ $\text{Ca}^{2+}$ <i>cis</i>	0,95 mM $\text{Mg}^{2+}$ <i>cis</i>
Conducta espontánea (tipo MS)	0,16	0,75	0,00
Oxidado con timerosal (tipo C)	1,00	1,00	0,49

Luego de haber sido oxidado, el canal fue insensible al efecto inhibitorio de una alta concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  (500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  *cis*) y aumentó su actividad a 13  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  *cis*. Además, el efecto inhibitorio del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el canal fue menor.

Opuestamente, la incubación con GSH 5 mM de este canal previamente oxidado, modificó también su respuesta a la concentración citoplasmática de calcio así como el efecto inhibitorio del  $\text{Mg}^{2+}$ , revirtiendo el efecto producido por la oxidación. Esto se puede apreciar en los cambios del  $P_o$  sufridos por el canal a iguales concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  libres:

	500 $\mu\text{M}$ $\text{Ca}^{2+}$ <i>cis</i>	13 $\mu\text{M}$ $\text{Ca}^{2+}$ <i>cis</i>	0,09 mM $\text{Mg}^{2+}$ <i>cis</i>
Conducta espontánea (tipo MS)	0,16	0,75	0,71
Oxidado con timerosal (tipo C)	1,00	1,00	1,00
Reducido con GSH (tipo MS)	0,05	0,50	0,06

Luego de haber sido reducido, el canal fue más sensible al efecto inhibitorio de una alta concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  (500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  *cis*), y disminuyó su actividad a 13  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Además, el efecto inhibitorio del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el canal fue sensiblemente mayor, produciéndose la inhibición del canal a bajas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$ .



Los agentes oxidantes de residuos SH aumentan significativamente la actividad de los diferentes canales RyR nativos incorporados en bicapas lipídicas, como se evidenció por un aumento en el  $P_o$ , aumentando la afinidad para la activación por  $Ca^{2+}$  (Marengo et al., 1998) y disminuyendo la afinidad para la inhibición por  $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$  (Marengo et al., 1998; Donoso et al., 2000). Los agentes reductores de residuos SH disminuyen significativamente la actividad de los diferentes canales RyR, disminuyendo la afinidad para la activación por  $Ca^{2+}$  (Marengo et al., 1998) y aumentando la afinidad para la inhibición por  $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$  (Marengo et al., 1998; Donoso et al., 2000).

### Los canales RyR cardíacos poseen distintos mecanismos de inhibición por $Mg^{2+}$

Laver et al. propusieron, en el año 1997, un modelo para explicar la inhibición por  $Mg^{2+}$  de los canales RyR. En este modelo la apertura del RyR está controlada por dos sitios de unión para iones divalentes,  $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$  (Fig. 29). Uno de ellos es responsable de la activación por  $Ca^{2+}$ , y el otro es responsable de la inhibición por divalentes. Se asumió que estos sitios operaban independientemente y que el canal conducía iones solamente cuando las compuertas asociadas a estos sitios estaban abiertas. Evidencia sobre la apertura independiente de éstas había sido obtenida previamente por Laver y Curtis (1996).

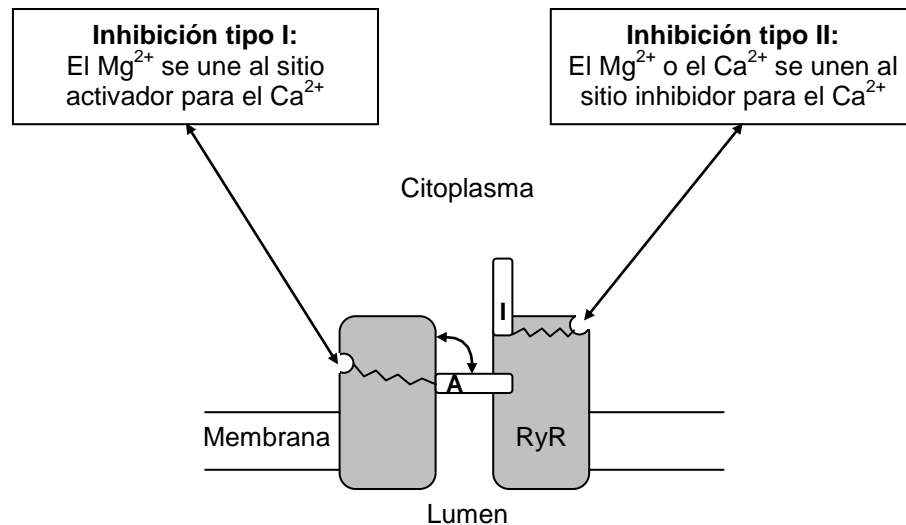


Fig. 29: Esquema de un canal RyR que ilustra los principales aspectos del modelo de inhibición por  $Mg^{2+}$ . Los sitios activador e inhibidor para al  $Ca^{2+}$  en el canal RyR están asociados a las compuertas A e I respectivamente. Se asumió que estos sitios operan independientemente y que ambas compuertas (asociadas a estos sitios) deben estar abiertas para que el canal conduzca iones.

– *Inhibición tipo I: Inhibición por  $Mg^{2+}$  por unión al sitio activador para el  $Ca^{2+}$ .* El  $Mg^{2+}$  previene la apertura del canal (reduciendo el  $P_o$ ) al competir con el  $Ca^{2+}$  por el sitio activador, de alta afinidad. La inhibición se debe a que, a diferencia de la unión del  $Ca^{2+}$  a este sitio, la unión del  $Mg^{2+}$  no abre la “compuerta A” del canal (Fig. 29).

– *Inhibición tipo II: Inhibición por  $Mg^{2+}$  por unión al sitio inhibidor para divalentes.* La unión del  $Mg^{2+}$  a más de uno, y probablemente dos sitios

inhibidores de baja afinidad ( $\sim$ mM), los cuales no discriminan entre el calcio y el magnesio, cierra la “compuerta I” del canal (Fig. 29).

Los distintos patrones de inhibición por  $Mg^{2+}$  obtenidos en este tesis con canales RyR únicos provenientes de miocardio de conejo, que presentaron los diferentes tipos de respuestas al calcio (MS y C), se pueden explicar por la existencia de los dos mecanismos de inhibición por magnesio ya mencionados (inhibición tipo I y II).

En la figura 30 se muestran todas las situaciones probables de unión, bajo las condiciones experimentales de esta tesis, de iones divalentes ( $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$ ) a los dos sitios de unión en el modelo propuesto por Laver et al. (1997).

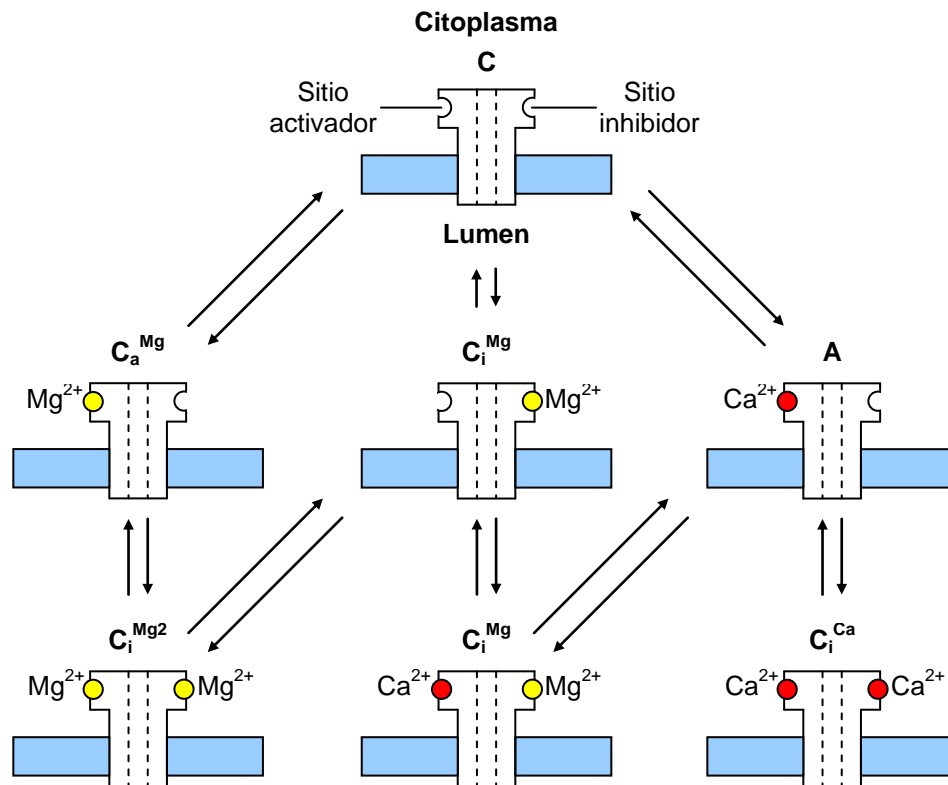
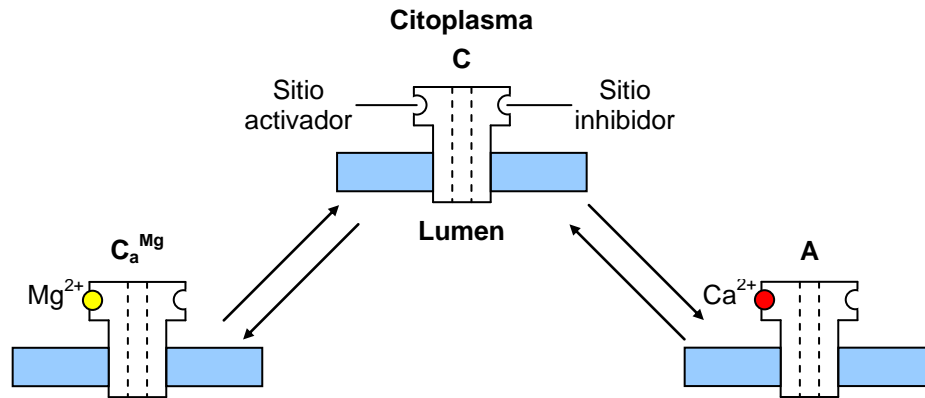


Fig. 30: **Modelo de la unión del  $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$  al RyR.**

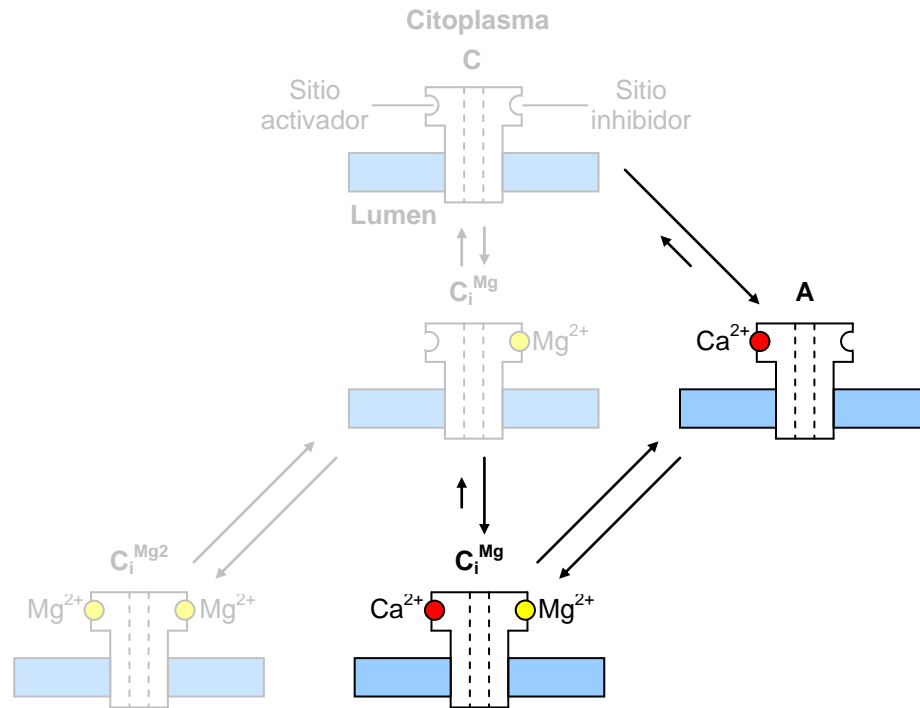
En este modelo, el RyR está representado por diferentes conformaciones.  $C_a^{Mg}$  corresponde al estado de inhibición por  $Mg^{2+}$  por unión de éste al sitio activador. **C** es un estado donde ningún sitio ha sido ocupado. **A** es el estado abierto del canal por unión de  $Ca^{2+}$  al sitio activador. Finalmente están las formas inactivadas del canal ( $C_i$ ) por unión de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  al sitio inhibidor.

Los cambios inducidos en el  $P_o$  por el magnesio se explican, en el caso de los canales con respuesta de tipo MS (a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*), por el siguiente esquema:



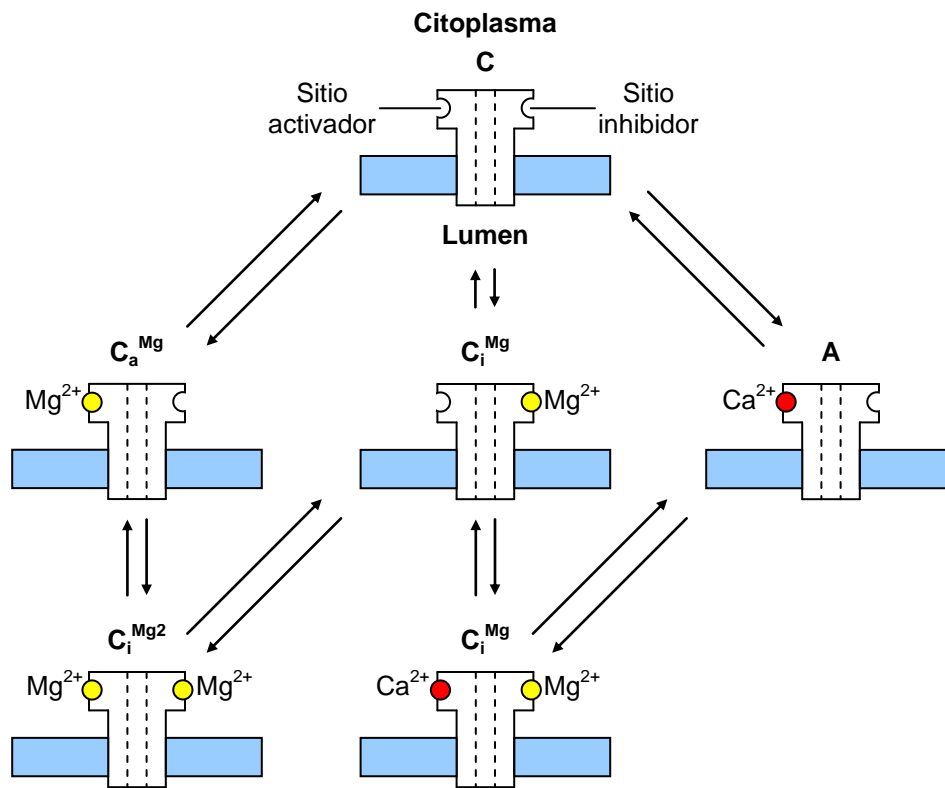
Cuando ninguno de los dos sitios ha sido ocupado, el canal se encuentra en un estado no conductor (**C**). Al unirse el  $\text{Ca}^{2+}$  al sitio activador del RyR, éste recibe la señal para abrirse y conducir iones (**A**). Al agregar  $\text{Mg}^{2+}$ , éste compite por el sitio activador llevando al canal a un estado no conductor, con  $\text{Mg}^{2+}$  unido a este sitio ( **$C_a^{\text{Mg}}$** ). Esto se traduce principalmente en un aumento en la duración promedio de los eventos cerrados, sin modificación en la duración de los eventos abiertos. La  $K_i$  para la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  encontrada a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis* ( $\sim 15 \mu\text{M}$ ), es muy baja en comparación con la afinidad aparente, descrita previamente por Laver et al. (1997), para la unión del  $\text{Mg}^{2+}$  al sitio activador (afinidad de  $\sim 1 \text{ mM}$ ). Como la inhibición se produce a concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , pensamos que es poco probable que exista unión de  $\text{Mg}^{2+}$  al sitio inhibidor para divalentes (inhibición de tipo II). Un coeficiente de Hill cercano a 1 observado para la población de canales con respuesta de tipo MS estudiados a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*, sugiere no cooperatividad en la unión del  $\text{Mg}^{2+}$  al sitio activador de alta afinidad para el  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, a esta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  de estos canales es principalmente de tipo I, no cooperativa.

En el caso de los canales con respuesta de tipo C (a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*), los cambios inducidos por el magnesio se explican por el siguiente esquema:



En ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y a esa concentración citoplasmática de calcio, el canal con respuesta tipo C permanece casi todo el tiempo abierto ( $P_o = 1,0$ ) conduciendo iones (A). Sin embargo, al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ , éste ocupa el sitio inhibidor llevando al canal a un estado no conductor ( $C_i^{\text{Mg}}$ ), por lo cual el canal se cierra. Al aumentar más aún la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ , éste puede también desplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  del sitio activador ( $C_i^{\text{Mg}2}$ ). Esto se traduce en una disminución en la duración promedio de los eventos abiertos, y en un aumento en la duración de los cerrados. Un coeficiente de Hill de  $\sim 2$  observado para la población de canales con respuesta de tipo C estudiados a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*, sugiere cooperatividad en la unión del  $\text{Mg}^{2+}$  a por lo menos 2 sitios de unión para divalentes (Laver et al., 1997). Así, a esta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  de estos canales es principalmente de tipo II, cooperativa.

Como se demostró en los resultados obtenidos, en canales con respuesta de tipo MS, un aumento en la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  (a  $13 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*), modificó el patrón de inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  para estos canales. En este caso, los cambios inducidos por el magnesio se explican por el esquema siguiente:



Básicamente, el canal con respuesta de tipo MS a  $13 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*, sigue un patrón de inhibición similar al mencionado anteriormente para el canal de tipo MS a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*. Sin embargo, el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  activa más al canal, por lo que la fracción de tiempo durante la cual el canal está abierto aumenta, y la fracción de tiempo durante la cual el canal está cerrado disminuye. Esto último más el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , hacen necesario una concentración mayor de  $\text{Mg}^{2+}$  para producir la inhibición del canal, lo que se evidencia por un aumento en la  $K_i$  para el  $\text{Mg}^{2+}$ , desde  $\sim 15 \mu\text{M}$  a  $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis* hasta  $\sim 100 \mu\text{M}$  para  $13 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*. Al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ , este ocupa además el sitio inhibidor llevando al canal a otro estado no conductor ( $C_i^{\text{Mg}}$ ). Por lo tanto, las contribuciones

relativas de los dos mecanismos inhibitorios al efecto total del magnesio dependen, en el canal con respuesta de tipo MS, de la concentración citoplasmática de calcio: a una baja concentración de calcio la inhibición por magnesio es principalmente de tipo I, y a una alta concentración de calcio entra en juego además la de tipo II. Un coeficiente de Hill de  $\sim 2$  observado para la población de canales con respuesta de tipo MS estudiados a  $13 \mu\text{M Ca}^{2+}$  *cis*, sugiere cooperatividad en la unión del  $\text{Mg}^{2+}$  a por lo menos 2 sitios de unión para divalentes (inhibición de tipo II), considerando los resultados previamente publicados por Laver et al. (1997) y los aquí obtenidos, que sugieren no cooperatividad para la inhibición de tipo I. Así, a esta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la inhibición de tipo II de estos canales es cooperativa.

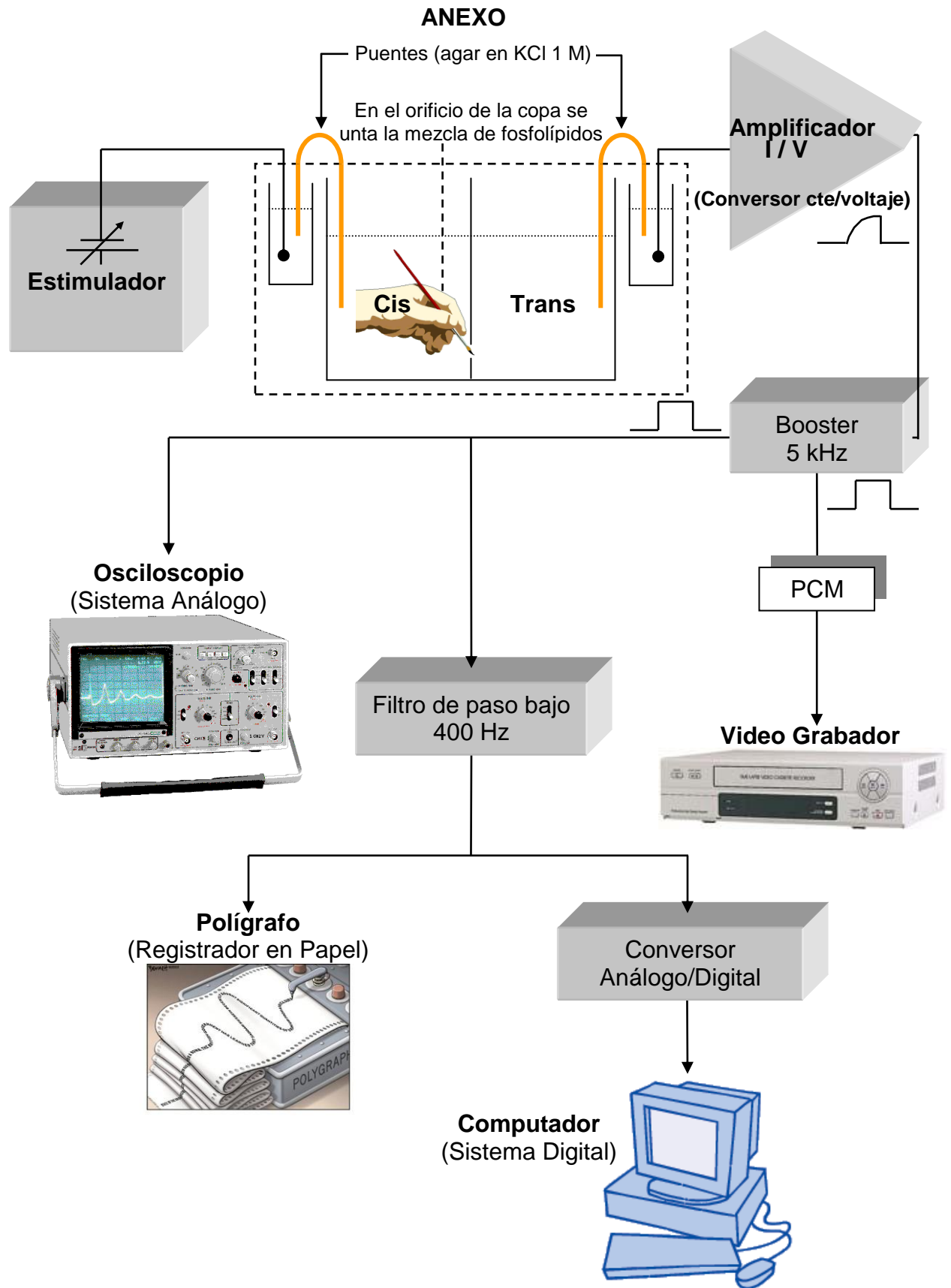
## CONCLUSIONES

Nuestros resultados mostraron que los canales RyR cardíacos estudiados exhibieron diferente sensibilidad a la inhibición por  $Mg^{2+}$ . Los canales con respuesta de tipo MS, correspondientes a canales más reducidos, presentan una  $K_i$  para el  $Mg^{2+}$  menor que los canales con respuesta de tipo C, los cuales están más oxidados.

Además, un canal con una conducta espontánea de tipo MS disminuyó su sensibilidad a la inhibición por  $Mg^{2+}$  por oxidación de sus residuos SH, transformándose en un canal de tipo C. Estos efectos fueron reversibles por reducción de residuos SH.

Los canales RyR cardíacos poseen distintos mecanismos de inhibición por  $Mg^{2+}$ : por competencia de éste con el  $Ca^{2+}$  por el sitio activador (inhibición tipo I) y por unión de  $Mg^{2+}$  a más de uno, y probablemente dos sitios inhibidores de baja afinidad para divalentes (inhibición tipo II). A una baja concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$  ( $6 \mu M$ ) los cambios inducidos por el  $Mg^{2+}$  se explican, en los canales con respuesta de tipo MS, por el mecanismo de inhibición tipo I, y en los canales con respuesta de tipo C, por el mecanismo tipo II. A concentraciones de  $Ca^{2+}$  más altas ( $13 \mu M$ ), tanto la unión al sitio activador para  $Ca^{2+}$  como a los sitios inhibidores para divalentes contribuyen a la inhibición por  $Mg^{2+}$  de los canales de tipo MS.





**BIBLIOGRAFÍA**

- Abramson, J. J.; Zable, A. C.; Favero, T. G.; Salama, G. (1995).** Thimerosal interacts with the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 29644 – 29647.
- Allen, P. D. (2002).** Leaky “feet” and sudden death. *Circ. Res.* 2002; 91: 181 – 182.
- Ashcroft, F. M. (2000).** “Ion Channels and Disease”. Capítulos 9 y 14. Academic Press©2000.
- Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Roderick H. (2003).** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 517 – 529.
- Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 11 – 21.
- Berridge, M. J. (1997).** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* 499: 291 – 306.
- Bonelli, A. M. y Schifferli, C. (2001).** Síndrome estrés porcino. *Arch. Med. Vet.* vol.33, no.2, p.125 – 135. ISSN 0301-732X.
- Bootman, M.; Niggli, E.; Berridge, M. J.; Lipp, P. (1997).** Imaging the hierarchical  $\text{Ca}^{2+}$  signalling system in Hela cells. *J. Physiol.* 499: 307 – 314.
- Bull, R.; Marengo, J. J. (1993).** Sarcoplasmic reticulum release channels from frog skeletal muscle display two types of calcium dependence. *FEBS Lett.* 331: 223 – 227.
- Cameron, A. M.; Nucifora, F. C.; Fung, E. T.; Livingston, D. J.; Aldape, R. A.; Ross, C. A.; Snyder, S. H. (1997).** FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J. Biol. Chem.* 272: 27582 – 27588.

- Carafoli, E.; Santella, L.; Brance, D.; Brisi, M. (2001).** Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36: 107 – 260.
- Cheng, H.; Lederer, W. J.; Cannell, M. B. (1993).** Calcium sparks – elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart-muscle. *Science* 262: 740 – 744.
- Copello, J.; Barg, S.; Fleischer, S. (1997).** Heterogeneity of  $\text{Ca}^{2+}$  gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys. J.* 73: 141 – 156.
- Coronado, R.; Morrissette, J.; Sukhareva, M.; Vaughan, D. M. (1994).** Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* 266: C1485 – C1504.
- Donoso, P.; Aracena, P.; Hidalgo, C. (2000).** Sulfhydryl oxidation overrides  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition of calcium-induced calcium release in skeletal muscle triads. *Biophys. J.* 79: 279 – 286.
- Duchen, M. R. (1999).** Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol.* 516: 1 – 17.
- Fatkin, D.; Graham, R. M. (2002).** Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* 82: 945 – 980.
- Favero, T. G.; Zable, A. C.; Abramson, J. J. (1995).** Hydrogen peroxide stimulates the  $\text{Ca}^{2+}$  release channels from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 2557 – 2563.
- Fill, M.; Copello, J. A. (2002).** Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82: 893 – 922.

- Franzini-Armstrong, C.; Protasi, F. (1997).** Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77: 699 – 729.
- George, C.; Higgs, G.; Lai, F. A. (2003).** Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ. Res.* 93: 531 – 540.
- Hübner, C. A.; Jentsch, T. J. (2002).** Ion channel diseases. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2435 – 2445.
- Inui, M.; Wang, S.; Saito, A.; Fleischer, S. (1988).** Characterization of junctional and longitudinal sarcoplasmic reticulum from heart muscle. *J. Biol. Chem.* 263: 10843 – 10850.
- Kozack, J. K.; MacIntyre, D. L. (2001).** Malignant hyperthermia. *Phys. Ther.* 81: 945 – 951.
- Laitinen, P. J.; Brown, K. M.; Piippo, K.; Swan, H.; Devaney, J. M.; Brahmbhatt, B.; Donarum, E. A.; Marino, M.; Tiso, N.; Viitasalo, M.; Toivonen, L.; Stephan, D. A.; Kontula, K. (2001).** Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 103: 485 – 490.
- Lansley, A. B.; Sanderson, M. J. (1999).** Regulation of airway ciliary activity by  $Ca^{2+}$ : simultaneous measurement of beat frequency and intracellular  $Ca^{2+}$ . *Biophys. J.* 77: 629 – 638.
- Laver, D. R. (2001).** The power of single channel recording and analysis: it's application to ryanodine receptors in lipid bilayers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28: 675 – 686.

- Laver, D. R.; Baynes, T. M.; Dulhunty, A. F. (1997).** Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms. *J. Memb. Biol.* 156: 213 – 229.
- Laver, D. R.; Curtis, B. A. (1996).** Response of ryanodine receptor channels to  $Ca^{2+}$  steps by rapid solution exchange. *Biophys. J.* 71: 732 – 741.
- Leeb, T.; Brenig, B. (1998).** cDNA cloning and sequencing of the human ryanodine receptor type 3 (RYR3) reveals a novel alternative splice site in the RYR3 gene. *FEBS Lett.* 423: 367 – 370.
- Lehmann-Horn, F.; Jurkat-Rott, K. (1999).** Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79: 1317-1372.
- Leong, P.; MacLennan, D. H. (1999).** Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins. *Biochem. Cell Biol.* 76: 681 – 694.
- Lipp, P.; Niggli, E. (1998).** Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in guinea-pig cardiac myocytes. *J. Physiol.* 508: 801 – 809.
- Marengo, J. J.; Bull, R.; Hidalgo, C. (1996).** Calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels from brain cortex endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 383: 59 – 62.
- Marengo, J. J.; Hidalgo, C.; Bull, R. (1998).** Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys. J.* 74: 1263 – 1277.

- Marks, A. R.; Tempst, P.; Hwang, K. S.; Taubman, M. B.; Inui, M.; Chadwick, C.; Fleischer, S.; Nadal-Ginard, B. (1989).** Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8683 – 8687.
- Mignen, O.; Shuttleworth, T. J. (2000).** *I*<sub>ARC</sub>, a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *J. Biol. Chem.* 275: 9114 – 9119.
- Moore, C. P.; Rodney, G.; Zhang, J. Z.; Santacruz-Toloza, L.; Strasburg, G. M.; Hamilton, S. L. (1999).** Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup> calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel. *Biochemistry* 38: 8532 – 8537.
- Nakashima, Y.; Nishimura, S.; Maeda, A.; Barsoumian, E. L.; Hakamata, Y.; Nakai, J.; Allen, P. D.; Imoto, K.; Kita, T. (1997).** Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor. *FEBS Lett.* 417: 157 – 162.
- O'Brien, J.; Valdivia, H. H.; Block, B. A. (1995).** Physiological differences between the  $\alpha$  and  $\beta$  ryanodine receptors of fish skeletal muscle. *Biophys. J.* 68: 471 – 482.
- Ogawa, Y. (1994).** Role of ryanodine receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 29: 229 – 274.
- Ogawa, Y.; Kurebayashi, N.; Murayama, T. (1999).** Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling. *Adv. Biophys.* 36: 27 – 64.
- Otsu, K.; Willard, H. F.; Khanna, V. K.; Zorzato, F.; Green, N. M.; MacLennan, D. H. (1990).** Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265: 13472 – 13483.

- Ottini, L.; Marziali, G.; Conti, A.; Charlesworth, A.; Sorrentino, V. (1996).**  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian RyR1 and RyR3. *Biochem. J.* 315: 207 – 216.
- Oyamada, H.; Murayama, T.; Takagi, T.; Iino, M.; Iwabe, N.; Miyata, T.; Ogawa, Y.; Endo, M. (1994).** Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 17206 – 17214.
- Percival, A. L.; Williams, A. J.; Kenyon, J. L.; Grinsell, M. M.; Airey, J.; Sutko, J. L. (1994).** Chicken skeletal muscle ryanodine receptor isoforms: ion channels properties. *Biophys. J.* 67: 1834 – 1850.
- Priori, S. G.; Napolitano, C.; Tiso, N.; Memmi, M.; Vignati, G.; Bloise, R.; Sorrentino, V. V.; Danieli, G. A. (2001).** Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 103: 196 – 200.
- Randall, D.; Burggren, W.; French, K. (2002).** “Eckert - Fisiología Animal - Mecanismos y Adaptaciones”. Traducción de la 4ª edición en inglés. Capítulos 3 y 10. McGraw-Hill/Interamericana©2002.
- Roberts, M. C.; Mickelson, J. R.; Patterson, E. E.; Nelson, T. E.; Armstrong, P. J.; Brunson, D. B.; Hogan, K. (2001).** Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RyR1). *Anesthesiology* 95: 716 – 725.
- Rubtsov, A. M.; Batrukova, M. A. (1997).** Ca-release channels (ryanodine receptors) of sarcoplasmic reticulum: structure and properties. A review. *Biochemistry (Moscow)* 62: 933 – 945.

- Schiefer, A.; Meissner, G.; Isenberg, G. (1995).**  $\text{Ca}^{2+}$  activation and  $\text{Ca}^{2+}$  inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *J. Physiol.* 489: 337 – 348.
- Sorrentino, V.; Volpe, P. (1993).** Ryanodine receptors: how many, where and why?. *Trends. Pharmacol. Sci.* 14: 98 – 103.
- Stokes, D. L.; Wagenknecht, T. (2000).** Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and ryanodine receptor. *Eur. J. Biochem.* 267: 5274 – 5279.
- Sutko, J. L.; Airey, J. A. (1996).** Ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels: does diversity in form equal diversity in function. *Physiol. Rev.* 76: 1027 – 1071.
- Takeshima, H.; Nishimura, S.; Matsumoto, T.; Ishida, H.; Kangawa, K.; Minamino, N.; Matsuo, H.; Ueda, M.; Hanaoka, M.; Hirose, T.; Numa, S. (1989).** Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439 – 445.
- Tiso, N.; Stephan, D. A.; Nava, A.; Bagattin, A.; Devaney, J. M.; Stanchi, F.; Larderet, G.; Brahmbhatt, B.; Brown, K.; Bauce, B.; Muriago, M.; Basso, C.; Thiene, G.; Danieli, G. A.; Rampazzo, A. (2001).** Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum. Mol. Genet.* 10: 189 – 194.
- Treves, S.; Chiozzi, P.; Zorzato, F. (1993).** Identification of the domain recognized by anti-(ryanodine receptor) antibodies which affect  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Biochem. J.* 291: 757 – 763.



- Williams, A. J.; West, D. J.; Sitsapesan, R. (2001).** Light at the end of the  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Quart. Rev. Biophys.* 34: 61 – 104.
- Witcher, D. R.; Kovacs, R. J.; Schulman, H.; Cefali, D. C.; Jones, L. R. (1991).** Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J. Biol. Chem.* 266: 11144 – 11152.
- Zhang, L.; Kelley, J.; Schmeisser, G.; Kobayashi, Y. M.; Jones, L. R. (1997).** Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 23389 – 23397.
- Zorzato, F.; Fujii, J.; Otsu, K.; Phillips, M.; Green, N. M.; Lai, F. A.; Meissner, G.; MacLennan, D. H. (1990).** Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265: 2244 – 2256.
- Zucchi, R.; Ronca-Testoni, S. (1997).** The sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors; drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* 49: 1 – 51.