

VCH-FC
MAB: D
R457

**METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS EN CELULAS DE
MUSCULO ESQUELETICO EN CULTIVO: EFECTO DEL POTENCIAL DE
MEMBRANA Y DE LA ESTIMULACION COLINERGICA.**

Tesis

entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

VICTOR ROBERTO REYES CATALAN

Junio de 1995

Director de Tesis: Dr. Enrique Jaimovich Perez.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

VICTOR ROBERTO REYES CATALAN

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día de de 1995.

Director de Tesis:

Dr. Enrique Jaimovich

.....


Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Mario Luxoro

Dra. Catherine Connelly

Dra. Veronica Nassar

Dr. Andrés Stutzin

Dra. Cecilia Hidalgo

.....

.....

.....

.....

A la memoria de mis padres...

A Valentina...

AGRADECIMIENTOS

Al final de todo trabajo, e independientemente del alcance y de los resultados de este, existen personas que lo enriquecieron o facilitaron, ya sea por su aporte técnico o por su apoyo personal en las fases más críticas (este es con frecuencia el más crucial...). Esta tesis no constituye una excepción. Siendo así deseo agradecer en primer lugar al Dr. Enrique Jaimovich por darme la oportunidad de realizar la tesis con él; a los Dres. Pablo Caviedes, Benjamín Suarez y Jorge Hidalgo cuya buena disposición fue fundamental en la comprensión y realización de los controles electrofisiológicos. Deseo agradecer también a los Dres. Raúl Caviedes y Andrés Stutzin por facilitarme la infraestructura necesaria para realizar cultivos celulares en distintas etapas de esta tesis, así como a la Dra. María Angélica Carrasco por permitir el uso de parte de su instrumental de laboratorio. Doy gracias a los Dres. Rolf Thieleczek, Ludwig Heilmeyer y Geor Mayr así como a los que laboran en el Institut für Physiologische Chemie de la Ruhr-Universität en Bochum, Alemania, por hacer de mi estadía algo productivo y muy grato. Una mención aparte va dirigida a José Luis Liberona por su ayuda constante en los experimentos de determinación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y por su calidad humana como compañero de trabajo. En este ámbito debo mencionar también a Carmen Alcayaga por su amistad y sus gestos de apoyo desinteresado en los momentos difíciles. No puedo dejar de mencionar a Mónica Videla por su gentileza y buena voluntad en la impresión de esta tesis y en el trabajo cotidiano en general. Existen más nombres dentro y fuera del departamento de fisiología que por razones de espacio me veo obligado a omitir. Para todos ellos, mis sinceros agradecimientos.

INDICE DE MATERIAS.

	página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
INDICE DE MATERIA.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
SUMMARY.....	XVII
INTRODUCCION.....	1
A. El metabolismo de fosfoinositidos como vía de transducción de señales: características generales del sistema.....	1
B. El metabolismo de fosfoinositidos y la liberación de calcio en músculo esquelético.....	2
1. Síntesis y degradación de polifosfoinositidos e inositolpolifosfatos en músculo esquelético.....	2
2. Potencial de membrana y metabolismo de fosfoinositidos.....	6
3. Farmacología del metabolismo de fosfoinositidos en músculo esquelético.....	9

4. Rol fisiológico de Ins(1,4,5)P ₃ en músculo esquelético.....	9
C. El modelo de estudio: los miotubos de rata en cultivo primario.....	12
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y METODOS.....	15
A. Reactivos y animales de experimentación.....	15
B. Técnicas de cultivo.....	17
1. Cultivo primario de músculo esquelético de rata.....	17
2. Cultivo primario de fibroblastos de rata.....	18
C. Incorporación de marca radiactiva en inositolpolifosfatos.....	19
D. Estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos y determinación de inositolfosfatos.....	19
1. Estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos.....	19
2. Separación de inositolesfosfato por cromatografía de intercambio aniónico en Dowex-formiato.....	21
3. Determinación de masa de Ins(1,4,5)P ₃ por ensayo de desplazamiento de ³ H-Ins(1,4,5)P ₃ en membranas de cerebelo de rata o ensayo de radiorreceptor.....	22
3.1. Preparación de membranas de cerebelo de rata.....	23
3.2. Ensayo de radiorreceptor.....	23
4. Determinación de inositolpolifosfatos por HPLC con derivatización complejométrica postcolumna.....	24
4.1. Preparación de la muestra.....	24
4.2. Análisis por HPLC.....	25
E. Determinación de la variación de calcio citosólico.....	26
F. Ligamen de ³ H-QNB a fracción de microsomal de miotubos de rata en cultivo primario.....	27

1. Preparación de fracción microsomal.....	27
2. Ligamen de ³ H-QNB.....	27
G. Determinación del potencial de membrana.....	28
H. Cuantificación de los productos radiactivos.....	29
I. Determinación de proteínas.....	29
J. Tratamiento estadístico de los resultados.....	29
 RESULTADOS.....	 30
 A. Determinación de masa de isómeros de inositolfosfatos por HPLC en células de músculo esquelético de rata en cultivo primario.....	 30
B. Determinación de masa de Ins(1,4,5)P ₃ por ensayo de desplazamiento de ³ H-Ins(1,4,5)P ₃	 30
C. Incorporación de marca radiactiva en cultivos celulares de músculo esquelético.....	 36
D. Determinación del potencial de membrana bajo condición de reposo y de despolarización con potasio.....	 37
E. Efecto de la despolarización con potasio sobre el metabolismo de fosfoinositidos en cultivos celulares.....	 39
1. Determinación de isómeros de inositolpolifosfatos por HPLC en células despolarizadas con potasio.....	 39
2. Efecto de la despolarización con potasio sobre los niveles de Ins(1,4,5)P ₃ medida por ensayo de radiorreceptor.....	 41
3. Influencia del calcio extracelular.....	45
4. Efecto de la liberación de calcio intracelular.....	48

5. Evaluación de la influencia del flujo de entrada de iones sodio	48
F. Efecto de la estimulación colinérgica sobre el metabolismo de fosfoinosítidos.....	53
1. Efecto de carbacol sobre inositolfosfatos.....	53
2. Efecto de atropina y tracríum sobre la estimulación mediada por carbacol.....	56
3. Efecto de muscarina y de nicotina.....	60
4. Efecto de oxotremorina M, pirenzepina y 4-DAMP.....	62
5. Unión de QNB a fracción microsomal de miotubos de rata.....	62
 DISCUSION.....	 69
 A. Inositolpolifosfatos y masa de Ins(1,4,5)P₃ en reposo.....	 69
B. Potencial de membrana y metabolismo de fosfoinosítidos.	70
C. Receptores colinérgicos y metabolismo de fosfoinosítidos.....	78
D. Acerca de la función fisiológica del metabolismo de fosfoinosítidos en músculo esquelético.....	83
 CONCLUSIONES.....	 87
 BIBLIOGRAFIA.....	 90

LISTA DE TABLAS.

	página
TABLA 1. Masa de inositolfosfatos y de otros compuestos fosforilados detectada por HPLC en miotubos de rata en cultivo primario.....	32
TABLA 2. Desplazamiento de ³ H-QNB unido a fracción microsomal de miotubos de rata por ligandos muscarínicos.....	68

LISTA

DE ESQUEMAS Y FIGURAS.

	página
Esquema I. Metabolismo parcial de fosfolípidos de inositol e inositolfosfatos.....	3
Figura 1. Análisis de inositolpolifosfatos por HPLC con derivatización postcolumna.....	31
Figura 2. Curva estándar de desplazamiento de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por acción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ frío en membranas de cerebelo de rata.....	34
Figura 3. Incorporación de $^3\text{H-inositol}$ sobre inositolfosfatos de miotubos de rata.....	38
Figura 4. Efecto de la concentración extracelular de potasio sobre el potencial de membrana en miotubos de rata.....	40
Figura 5. Masa de isómeros de inositolpolifosfatos en miotubos de rata despolarizados con potasio.....	42

Figura 6.	Efecto de la concentración de potasio extracelular sobre los niveles de Ins(1,4,5)P ₃	43
Figura 7.	Efecto de la despolarización con potasio sobre los niveles de Ins(1,4,5)P ₃	44
Figura 8.	Efecto de la despolarización con potasio sobre ³ H-inositolfosfatos.....	46
Figura 9.	Efecto de la despolarización con potasio sobre los niveles de Ins(1,4,5)P ₃ en ausencia de calcio extracelular agregado....	47
Figura 10.	Efecto de la despolarización con potasio en ausencia de calcio extracelular agregado sobre ³ H-inositolfosfatos.....	49
Figura 11.	Efecto de la despolarización con potasio en presencia de rianodina y ausencia de calcio extracelular.....	50
Figura 12.	Efecto de brevetoxina sobre la masa de Ins(1,4,5)P ₃ en miotubos de rata en cultivo primario.....	51

Figura 13.	Efecto de tetrodotoxina sobre el aumento de Ins(1,4,5)P ₃ inducido por brevetoxina....	52
Figura 14.	Efecto de la supresión del sodio sobre la síntesis de Ins(1,4,5)P ₃ inducida por potasio o brevetoxina.....	54
Figura 15.	Masa de inositolpolifosfatos en miotubos de rata estimulados con carbacol.....	55
Figura 16.	Efecto de carbacol sobre la masa de Ins(1,4,5)P ₃ en miotubos de rata.....	57
Figura 17.	Efecto de carbacol sobre los niveles de marca de inositolfosfatos en miotubos de rata.....	58
Figura 18.	Efecto de atropina y tracrיום sobre los niveles de ³ H-inositolfosfatos en miotubos de rata estimulados con carbacol..	59
Figura 19.	Síntesis de Ins(1,4,5)P ₃ estimulada por nicotina: efecto de sodio y calcio extracelulares.....	61

Figura 20.	Síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ estimulada por muscarina en miotubos de rata.....	63
Figura 21.	Efecto de agonistas y antagonistas muscarínicos sobre la síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en miotubos de rata.....	64
Figura 22.	Ligamen de QNB a fracción microsomal de miotubos de rata en cultivo primario.....	65
Figura 23.	Ligamen de QNB a fracción microsomal de fibroblastos de rata en cultivo primario...	67
Esquema II.	Metabolismo de fosfolípidos de inositol e inositolpolifosfatos propuesto para células de músculo esquelético de rata en cultivo primario.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS.

ATP	Adenosina 5-trisfosfato
CDP	Citidindifosfoglucosa
cpm	Cuentas por minuto
μCi	Microcurie
DAG	Diacilglicerol
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilenglicoltetraacético
Fru(1,6)P ₂	Fructosa 1,6-difosfato
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GTP	Guanosina 5'-trisfosfato
GTP- β -S	Guanosina 5'-(β -tio) trisfosfato
Hepes	Acido 2-hidroxietilpiperazina-N'-2- etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSID	Hexahidro-sila-difenidol
Ins	Mio-inositol
InsP	Mio-inositolmonofosfato
InsP ₂	Mio-inositoldifosfato
InsP ₃	Mio-inositoltrisfosfato
InsP ₄	Mio-inositoltetrakisfosfato

Ins(1)P	Mio-inositol 1-monofosfato
Ins(4)P	Mio-inositol 4-monofosfato
Ins(1,4)P ₂	Mio-inositol 1,4-difosfato
Ins(1,3,4)P ₃	Mio-inositol 1,3,4-trisfosfato
Ins(1,4,5)P ₃	Mio-inositol 1,4,5-trisfosfato
Ins(4,5,6)P ₃	Mio-inositol 4,5,6-trisfosfato
Ins(1,3,4,6)P ₄	Mio-inositol 1,3,4,6-tetrakisfosfato
Ins(1,3,4,5)P ₄	Mio-inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato
Ins(1,4,5,6)P ₄	Mio-inositol 1,4,5,6-tetrakisfosfato
Ins(1,2,4,5,6)P ₅	Mio-inositol 1,2,4,5,6-pentakisfosfato
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	Mio-inositol 1,3,4,5,6-pentakisfosfato
InsP ₆	Mio-inositolhexakisfosfato ó ácido íftico
MeOH	Metanol
MES	Acido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
PA	Acido fosfatídico
PI	Fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
POPOP	1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
QNB	Quinuclidilbenzilato
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

Se estudió el efecto de la despolarización con potasio y de la estimulación colinérgica sobre el metabolismo de fosfoinosítidos en miotubos de rata en cultivo primario. Se midió el efecto de estos estímulos sobre: a) la masa de los distintos isómeros de inositolpolifosfatos por HPLC con derivatización complejométrica postcolumna, b) la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por ensayo de desplazamiento de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y c) complementariamente se midieron los niveles de marca de $^3\text{H-inositolfosfatos}$ en cultivos premarcados con $^3\text{H-inositol}$.

Utilizando cualquiera de las tres técnicas de determinación de inositolfosfatos se detectó un aumento significativo y transitorio de los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (y adicionalmente de $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ e InsP) entre los 2 segundos (límite de resolución temporal del sistema) y los 60 segundos post estimulación. El aumento temprano de inositolfosfatos inducido por despolarización resultó al menos en parte independiente de la entrada de iones sodio o calcio a la célula o de un aumento de calcio citosólico ya que se obtuvo un aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ con potasio en presencia de rianodina, condición en que no se registró aumento significativo del calcio intracelular.

La estimulación colinérgica también produjo un aumento del recambio de fosfoinosítidos. Carbacol estimuló la

síntesis de inositolpolifosfatos, principalmente de InsP , $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ e $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$. La síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inducida por carbacol fue visible a los 2 segundos y se sostuvo hasta los 6 minutos de estimulación. Nicotina indujo un aumento rápido y transitorio de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y de calcio citosólico; el aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ desapareció al suprimir el sodio y el calcio del medio de incubación; un efecto similar se obtuvo con brevetoxina, un agonista de canales de sodio, sugiriendo que la despolarización inducida por el flujo de entrada de iones sodio sería responsable del aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Por otra parte, el efecto de carbacol fue antagonizado parcialmente por besilato de atracurio y atropina y tanto muscarina como oxotremorina M estimularon la síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. El efecto de muscarina fue antagonizado por pirenzepina. La unión específica del antagonista de alta afinidad quinuclidilbenzilato a microsomas de miotubos de rata mostró un máximo de 40 fmoles por mg de proteína y un $K_d \leq 0.7$ nM; estos datos, junto al aumento de calcio citosólico inducido por muscarina sugieren la coexistencia de receptores nicotínicos y muscarínicos de tipo M_1 en estas células.

Se concluye que existen 2 vías independientes de estimulación del metabolismo de inositolfosfatos en músculo esquelético en cultivo; una mediada por el potencial de membrana y otra mediada por receptores muscarínicos.

SUMMARY

The effect of potassium depolarization and cholinergic stimulation on phosphoinositide metabolism was studied in rat myotubes in primary culture. We measured: a) the mass of inositolpolyphosphate isomers separated by HPLC with complexometric postcolumn derivatization, b) the $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mass by radioreceptor assay and c) the ^3H -inositol phosphates labelled from ^3H -inositol prelabelled cultures.

A transient potassium-induced increase of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (and also $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ and InsP) was detected after 2 to 60 seconds post stimulation using all three methods. Two seconds was the resolution time limit of our experimental system. The depolarization-induced inositol phosphates increase was at least partly independent of sodium and calcium influx through the corresponding ion channels because suppression of both cations from the incubation medium did not prevent the effect. Results are also coherent with a K^+ -stimulating effect partly independent from intracellular calcium since we measured depolarization-induced $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ increase in the presence of ryanodine, when no cytosolic calcium increase was detectable.

Cholinergic stimuli also increased phosphoinositide turnover. Carbachol stimulated the inositolpolyphosphates synthesis, mainly that of InsP , $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$. Carbachol-induced increase of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

INTRODUCCION.

A. El metabolismo de fosfolípidos de inositol como vía de transducción de señales: características generales del sistema.

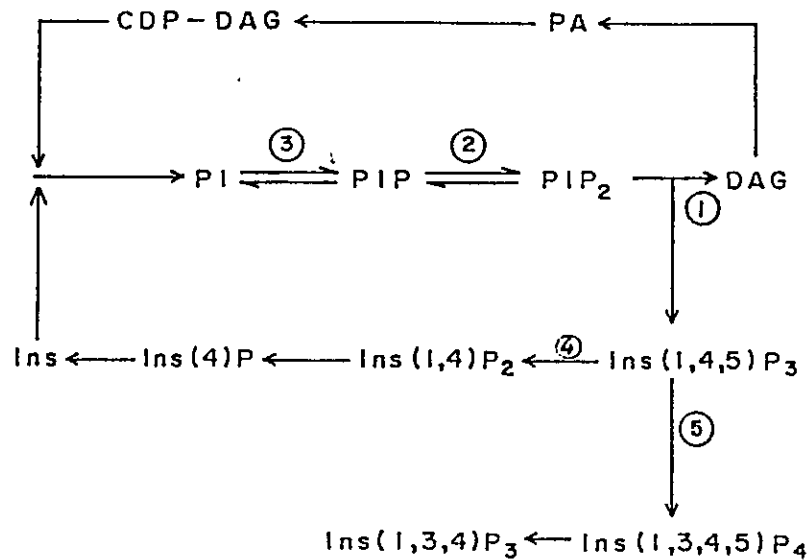
La llegada de un estímulo exterior apropiado activa receptores específicos en la superficie celular, gatillando una cascada de señales intracelulares que resultan finalmente en la activación de un sistema efector y la consiguiente expresión o control de una respuesta específica.

Diversos receptores que regulan el calcio intracelular se encuentran acoplados al metabolismo de fosfolípidos de inositol. Estos receptores activan la fosfoinositidasa C (o fosfolipasa C) vía proteína G o vía tirosina quinasa, directa o indirectamente, para hidrolizar polifosfoinositidos, preferentemente PIP_2 , y generar $Ins(1,4,5)P_3$ y DAG. La molécula de $Ins(1,4,5)P_3$ se une a un receptor intracelular liberando calcio desde depósitos intracelulares, mientras que DAG activa una larga lista de isoenzimas de proteína quinasa C que cataliza la fosforilación de proteínas (Cockroft y Thomas, 1992; Berridge, 1993). La vía de síntesis y reposición del PIP_2 consumido durante el estímulo ocurre por medio de quinasas específicas que catalizan secuencialmente la fosforilación de PI y PIP, mientras que la inactivación del $Ins(1,4,5)P_3$ neosintetizado suele ocurrir por desfosforilaciones a cargo de fosfatasas que lo degradan

sucesivamente hasta $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(4)\text{P}$ e inositol que es reutilizado para la síntesis de PI. Otra forma de inactivación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ocurre por fosforilación a cargo de una quinasa que cataliza la formación de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ que puede ser posteriormente fosforilado o desfosforilado para generar otros isómeros (Hughes y Michell, 1993). El esquema I proporciona una visión resumida del metabolismo de fosfoinosítidos, como resultado de numerosos estudios realizados en diferentes sistemas experimentales. Cabe señalar por lo tanto que la importancia relativa de las vías metabólicas mencionadas varía dependiendo del modelo de estudio y que, más aún, en vista de la gran cantidad de nuevos isómeros de inositolpolifosfatos identificados en estos últimos años, la existencia de otras vías no incluidas en este esquema es claramente posible.

- B. El metabolismo de fosfoinosítidos y la liberación de calcio en músculo esquelético.
1. Síntesis y degradación de polifosfoinosítidos e inositolpolifosfatos en músculo esquelético.

El músculo esquelético cuenta con toda la maquinaria bioquímica para la síntesis y degradación de segundos mensajeros derivados de la hidrólisis de fosfoinosítidos, consistente en PI quinasa, PIP quinasa, fosfolipasa C e inositolfosfatasas; la actividad específica de estas enzimas es comparable con aquellas de otros sistemas celulares donde



- ① Fosfolipasa C
- ② PIP quinasa
- ③ PI quinasa
- ④ Ins (1,4,5)P₃ 5-fosfatasa
- ⑤ Ins (1,4,5)P₃ 3-quinasa

Esquema I. Metabolismo parcial de los fosfolípidos de inositol e inositolfosfatos. Se presenta un esquema resumido que incluye únicamente las vías metabólicas más conocidas, con el fin de simplificar la presentación del problema. Otros fosfolípidos de inositol así como numerosos isómeros de inositolfosfatos descritos en variados sistemas se omitieron de este esquema inicial.

Ins(1,4,5)P₃ tiene una clara función reguladora del calcio intracelular (Hidalgo y cols, 1986; Carrasco y cols, 1988; Hidalgo y cols, 1990; Sanchez y cols, 1991; Asotra y cols, 1991; Windhofer y cols, 1992; Carrasco y cols, 1993). Sin embargo, los eventos que promueven la hidrólisis de fosfoinosítidos en músculo esquelético no están claramente definidos, y su importancia fisiológica tampoco está establecida.

En efecto, fracciones purificadas de membrana de retículo sarcoplasmático y de túbulo transversal de músculo anfibio fosforilan PI hasta PIP, mientras que la fosforilación de PIP hasta PIP₂ ocurre solo en el túbulo transversal (Hidalgo y cols, 1986; Carrasco y cols, 1988; Asotra y cols, 1991). La actividad de PIP quinasa es máxima a una concentración de calcio del orden de 2 μ M, similar a la alcanzada durante la activación contráctil, mientras que disminuye a una concentración de calcio submicromolar como la que se supone en el músculo en reposo (Carrasco y cols, 1988). Si esta propiedad se refleja *in vivo*, es posible pensar que la velocidad de síntesis de PIP₂ pudiera estar estimulada durante la contracción.

Existen pocos estudios directos sobre la actividad de fosfolipasa C en músculo esquelético. Preparaciones de túbulo transversal y de triadas, así como fracciones solubles de músculo esquelético de conejo y de rana hidrolizan PIP₂ (Varsanyi y cols, 1989; Carrasco y cols, 1993). En todos los

casos estudiados, la actividad es notoriamente estimulada por calcio en el rango fisiológico para PIP_2 , pudiendo utilizar además PIP y PI como sustratos a un pCa no fisiológico (Salviati y Betto, 1990; Carrasco y cols, 1993; Windhofer y cols, 1992).

Preparaciones de membrana sarcotubular y fracciones solubles de músculo de conejo, así como fracciones de túbulo transversal y de retículo sarcoplasmático de músculo anfibio desfosforilan $Ins(1,4,5)P_3$ secuencialmente, con actividades comparables a otros tejidos; en músculo de conejo esta actividad es sensible a cadmio y 2,3-DPG. (Milani y cols, 1988; Sánchez y cols, 1991).

Respecto a la fosforilación, en músculo de cerdo se ha descrito que $Ins(1,4,5)P_3$ se transforma en $Ins(1,3,4,5)P_4$. La actividad de esta 3 quinasa es estimulada por calcio y calmodulina en analogía a lo descrito para otros sistemas (Foster, 1994).

Por último, los datos sobre proteínas G en músculo esquelético son solo preliminares. El retículo sarcoplasmático y el túbulo transversal de músculo de conejo y de rana expresan varias proteínas G (Scherer y cols, 1987; Toutant y cols, 1988; Carrasco y cols, 1993), y en miotubos de pollo, la producción de inositolfosfatos es estimulada por $GTP-\gamma-S$ (Haggblad y Heilbronn, 1988). Sin embargo, ninguno de estos hallazgos permite concluir que existe alguna proteína G que regule directamente el metabolismo de fosfoinositidos.

2. Potencial de membrana y metabolismo de fosfoinositidos.

La célula de músculo esquelético es un sistema excitable que responde a la despolarización liberando calcio desde los depósitos intracelulares y generando contracción (Martonosi, 1984). Por otra parte la actividad eléctrica del músculo en desarrollo parece tener una función en el control de la miogénesis, proceso en el que la elevación del calcio mioplásmico constituye un paso esencial (Wakelam, 1985; Entwistle y cols, 1988). Estos hechos plantearon la necesidad de investigar la relación entre potencial de membrana y metabolismo de fosfoinositidos.

La línea de evidencia que sugiere que el potencial de membrana regula el metabolismo de fosfoinositidos puede resumirse en los siguientes puntos:

- i) Aumento de la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a PI en fibra muscular aislada y despolarizada con potasio (Novotny y cols, 1978).
- ii) Aumento de los niveles de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por estimulación tetánica de corta duración en fibra muscular aislada (Vergara y cols, 1985) y disminución de los niveles de $^{32}\text{P-PIP}_2$ con un procedimiento similar (Lagos y Vergara, 1990).
- iii) Aumento de la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y de otros inositolpolifosfatos en músculo estimulado tetánicamente (Mayr y Thiekeczek, 1991).
- iv) Aumento de la incorporación de $^3\text{H-inositol}$ a PI e inositolfosfatos y disminución de la marca en PIP y PIP_2 en músculo anfibio despolarizado con potasio. Aumento de la

marca de PIP y PIP₂ en este mismo sistema premarcado por tiempos cortos (Dong y cols, 1992).

La producción de inositolpolifosfatos promovida por despolarización se ha estudiado en otros sistemas como células adrenales de bovino (Sasakawa y cols, 1989), preparación de sinaptosomas de cobayo (Audigier y cols, 1988), ganglios y cortes de cerebro de rata (Bone y Michell, 1985; Kendall y Nahorsky, 1984) y músculo cardiaco (Poggioli y cols, 1985) entre otros. En ganglio, la respuesta parece estar mediada por la liberación de acetilcolina y un neuropéptido no identificado (Bone y Michell, 1985). En cortes de cerebro la respuesta es altamente dependiente de la activación de canales sensibles a voltaje ya que antagonistas de estos canales o la supresión del calcio del medio de incubación anulan el efecto (Kendall y Nahorsky, 1984). En la preparación sinaptosomas, la sensibilidad de la respuesta a bloqueadores del canal de sodio como tetrodotoxina, y a estimuladores del flujo de entrada de sodio como veratridina sugieren que la apertura de estos canales tendría un efecto importante sobre la hidrólisis de fosfoinositidos pero no permiten descartar un efecto directo de la despolarización posiblemente promovida por el flujo iónico (Gusovsky y cols, 1986).

Se distinguen al menos tres tipos de corrientes de calcio activadas por voltaje en músculo esquelético: una corriente de activación rápida y transitoria insensible a

dihidropiridinas, similar a las corrientes tipo T (Beam y cols, 1986), una corriente de activación rápida pero sostenida, también insensible a dihidropiridinas (Cota y Stefani, 1986), y una corriente de activación lenta sensible a dihidropiridinas o de tipo L, característica de músculo esquelético (Donaldson y Beam, 1983; Beam y cols, 1986, Cognard y cols, 1986), todas distinguibles por su cinética, dependencia de potencial y farmacología. Sin embargo la función del calcio extracelular en la contracción muscular es materia de controversia: no parece necesario para la sacudida muscular y/o liberación de calcio en la fibra muscular estimulada eléctricamente (Armstrong y cols, 1972), pero afecta al menos parcialmente la contractura inducida por potasio (Dulhunty y Gage, 1988; Avila-Sakar y cols, 1986). Por otra parte, existen canales de sodio presentes en membrana tubular y de superficie (Jaimovich, 1986), que propagan el potencial de acción a lo largo de la fibra muscular; manipulaciones que disminuyen las corrientes de sodio como su reemplazo por colina o la aplicación de tetrodotoxina disminuyen la tensión generada tetánicamente (Allard y Rougier, 1992). La influencia de estos flujos iónicos sobre el metabolismo de fosfoinositidos como fenómeno concomitante a la contracción muscular se desconoce.

3. Farmacología del metabolismo de fosfoinosítidos en músculo esquelético.

En músculo esquelético, la descripción de efectos mediados por receptores sobre el metabolismo de fosfoinosítidos es escasa y superficial. Estudios en células en cultivo o fibras musculares intactas sugieren que la estimulación de receptores α_1 -adrenérgicos, colinérgicos de tipo nicotínico, de vasopresina (V_1) y purinérgicos promueven la hidrólisis de fosfoinosítidos (Schadewalt y cols, 1987; Adamo y cols, 1985; Wakelam y cols, 1987; Haggblad y Heilbronn, 1988). Sin embargo, el mecanismo por medio del cual estos receptores putativos estimulan la fosfolipasa C, así como su significado fisiológico son desconocidos. En miotubos de rata, factores que promueven la elevación de los niveles de AMP cíclico como forskolina producen un aumento paralelo de la síntesis de inositolesfosfato sugiriendo una intercomunicación entre ambas vías de transducción (Laufer y Changeux, 1989).

4. Rol fisiológico de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en músculo esquelético.

En músculo esquelético, la función exacta de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en la regulación del calcio citosólico, la contracción muscular o la fusión de los mioblastos para formar miotubos maduros no está esclarecida (Foster, 1994; Wakelam, 1985).

La línea de evidencia que sugiere una función mediadora de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en el acoplamiento E.C. se resume así:

i) Contracción de fibras musculares peladas inducida por

Ins(1,4,5)P₃ y liberación de calcio desde cisternas terminales aisladas (Volpe y cols, 1985; Vergara y cols, 1985).

ii) Activación de canales de calcio inducida por Ins(1,4,5)P₃ en vesículas de retículo sarcoplasmático fusionadas en bicapas planas (Suarez-Isla y cols, 1988).

iii) Liberación de calcio inducida por Ins(1,4,5)P₃ en fibras permeabilizadas (Rojas y Jaimovich, 1990). Este efecto es antagonizado por bloqueadores de canales de calcio como rojo de rutenio.

iv) Estimulación del recambio de fosfoinosítidos al despolarizar fibras musculares, citados previamente en esta introducción (Vergara y cols, 1985; Lagos y Vergara, 1990; Novotny y cols, 1978; Dong y cols, 1992; Mayr y Thieleczek, 1991).

En conflicto con estos datos está el hecho de que en músculo esquelético, de las dos especies de canales de calcio intracelulares, el receptor de InsP₃ y el receptor de ryanodina, solo se ha podido demostrar la existencia de este último (Foster, 1994). De hecho, en un estudio preliminar, solo se pudo detectar un sitio de unión de baja afinidad para Ins(1,4,5)P₃ ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$) en cisternas terminales (Rojas e Hidalgo, 1990). Sin embargo es posible que tanto la afinidad como la sensibilidad del receptor putativo de Ins(1,4,5)P₃ dependan del estado de polarización de la fibra muscular (Donaldson y cols, 1988), como lo sugiere la liberación de calcio promovida por Ins(1,4,5)P₃ solo en fibra pelada o

- i) Contracción de fibras musculares peladas inducida por $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y liberación de calcio desde cisternas terminales aisladas (Volpe y cols, 1985; Vergara y cols, 1985).
- ii) Activación de canales de calcio inducida por $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en vesículas de retículo sarcoplasmático fusionadas en bicapas planas (Suarez-Isla y cols, 1988).
- iii) Liberación de calcio inducida por $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en fibras permeabilizadas (Rojas y Jaimovich, 1990). Este efecto es antagonizado por bloqueadores de canales de calcio como rojo de rutenio.
- iv) Estimulación del recambio de fosfoinosítidos al despolarizar fibras musculares, citados previamente en esta introducción (Vergara y cols, 1985; Lagos y Vergara, 1990; Novotny y cols, 1978; Dong y cols, 1992; Mayr y Thieleczek, 1991).

En conflicto con estos datos está el hecho de que en músculo esquelético, de las dos especies de canales de calcio intracelulares, el receptor de InsP_3 y el receptor de rianodina, solo se ha podido demostrar la existencia de este último (Foster, 1994). De hecho, en un estudio preliminar, solo se pudo detectar un sitio de unión de baja afinidad para $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$) en cisternas terminales (Rojas e Hidalgo, 1990). Sin embargo es posible que tanto la afinidad como la sensibilidad del receptor putativo de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ dependan del estado de polarización de la fibra muscular (Donaldson y cols, 1988), como lo sugiere la liberación de

y cols, 1990).

v) Reactivación de la fusión previamente bloqueada con inhibidores de la síntesis de prostaglandina E_1 , al estimular mioblastos con carbacol o al despolarizar con potasio (Entwistle y cols, 1988). Como se mencionara previamente, ambos estímulos promueven el recambio de fosfoinositidos (Adamo y cols, 1985; Dong y cols, 1992).

En términos generales, la diferenciación muscular es un proceso multifactorial y en su modulación concurren múltiples vías de señalización intracelular, posiblemente controladas no solo por la actividad eléctrica de la célula sino también por la activación de muchos receptores que se expresan en el curso del proceso mismo. La hidrólisis de fosfoinositidos controlada por potencial de membrana o por otro tipo de receptores permanece por lo tanto como una interrogante abierta en músculo esquelético.

C. El modelo de estudio: los miotubos de rata en cultivo primario.

El modelo de estudio de esta tesis es el cultivo primario de músculo esquelético de rata. Los mioblastos de rata en cultivo primario siguen espontáneamente el curso de la miogénesis, fusionándose para formar miotubos maduros y contráctiles bajo condiciones de cultivo adecuadas, presentando sarcómeros, túbulos transversales y retículo sarcoplasmático con una arquitectura molecular similar a la fibra entera (Flucher y cols, 1991). Durante este período el

potencial de reposo se hace progresivamente más negativo, variando desde -10 mV en mioblastos de 48 horas hasta -40 a -50 mV en miotubos maduros de 6 a 9 días de cultivo (Ritchie y Fambrough, 1975). Bajo estas condiciones, los miotubos maduros expresan varios de los marcadores moleculares típicos de músculo esquelético: receptores de dihidropiridinas y corrientes de calcio rápidas y lentas (Cognard y cols, 1986), corrientes de sodio sensibles a tetrodotoxina (Frelin y cols, 1984), receptores de acetilcolina de tipo nicotínico y miosina (Inestroza, 1982); estas células responden con un aumento rápido de calcio citosólico a la despolarización (Jaimovich y Rojas, 1994).

Desde el punto de vista de los estudios bioquímicos del metabolismo de fosfoinosítidos que se propone realizar a continuación, el cultivo primario de miotubos de rata constituye un modelo de célula intacta adecuado, permitiendo un fácil control del estímulo aplicado por cápsula y su distribución homogénea sobre la población celular por tratarse de una monocapa de células.

OBJETIVOS.

De acuerdo con los antecedentes proporcionados en la introducción, los objetivos que se plantean en esta tesis son:

- a) Conocer la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y de sus metabolitos en miotubos en miotubos de rata en cultivo primario.
- b) Estudiar el efecto de la despolarización con potasio sobre el metabolismo de fosfoinositidos en células de músculo esquelético en cultivo primario, con especial énfasis en la producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.
- c) Estudiar el efecto de la estimulación colinérgica sobre el metabolismo de fosfoinositidos. Se propone evaluar el efecto de agonistas y antagonistas colinérgicos muscarínicos y nicotínicos sobre la síntesis de inositolfosfatos, principalmente $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.
- d) Evaluar la participación de sodio y calcio sobre los efectos observados al despolarizar o estimular receptores colinérgicos.
- e) Plantear un mecanismo de estimulación y vías de síntesis y degradación de inositolesfosfato y polifosfoinositidos que integren los efectos observados por acción del potencial de membrana y la activación de receptores colinérgicos.

MATERIALES Y METODOS.

En términos generales, las técnicas utilizadas en esta tesis se encontraban montadas parcial o totalmente en el Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (caso del análisis de inositolfosfatos por cromatografía en Dowex-formiato y la determinación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por ensayo de radiorreceptor) o en el Institut für Physiologische Chemie de la Ruhr-Universität, en Bochum, Alemania (caso del análisis de inositolfosfatos por HPLC) y tuvieron que ser adaptadas para su utilización en el análisis de muestras procedentes de células en cultivo.

A. Reactivos y animales de experimentación.

Tris-HCl, HEPES, EDTA, EGTA, 2-mercaptoetanol, sacarosa, glucosa, PPO, POPOP, colagenasa (tipo V), carbacol, nicotina, muscarina, atropina, seroalbúmina de bovino (fracción V), ácido fólico fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Oxotremorina M, pirenzepina, 4-DAMP y quinuclidilbenzilato se obtuvieron de Research Biochemicals International.

4-(2-piridilazo) resorcinol, metanol, amoníaco, formiato de amonio, ácido perclórico, ácido tricloroacético, ácido fórmico y las sales y ácidos orgánicos e inorgánicos grado analítico de uso frecuente se adquirieron de E. Merck A.G.

Fluo3-AM se obtuvo de Molecular Probes Inc.

Los trazadores radiactivos mio(2-³H)-inositol (86 Ci/mmol), D-mio(2-³H)-inositol 1-monofosfato (1 Ci/mmol), D-mio(2-³H)-inositol 1,4-bisfosfato, D-mio(2-³H)-inositol 1,4,5-trisfosfato (1 Ci/mmol) y D-mio(2-³H)-inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (1 Ci/mmol) se adquirieron de Amersham. D-mio(2-³H)-inositol 1,4,5-trisfosfato (21 Ci/mmol) y L-(³H)-Quinuclidilbenzilato (43.5 Ci/mmol) se obtuvieron de New England Nuclear.

Los estándares Ins(1,4)P₂, Ins(1,4,5)P₃, Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(1,3,4,5,6)P₅, Fru(1,6)P₂ se obtuvieron de Boehringer Mannheim (FRG). Otros estándares de inositolfosfatos se obtuvieron a partir de un hidrolizado parcial de ácido fítico fraccionado por cromatografía de intercambio aniónico en Q-sefamosa (Pharmacia/LKB, 200 cm x 1.5 cm) y analizado según lo descrito por Phillipy y cols (1987).

Acido clorhídrico grado HPLC se obtuvo de Baker. Trietanolamina se obtuvo de Serva (Heidelberg, FRG).

La columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 se obtuvo de Pharmacia/LKB).

La resina de intercambio aniónico Dowex-formiato AG 1-X8 (100-200 mesh) se obtuvo de Bio-Rad.

Las ratas neonatas utilizadas para la preparación de cultivos primarios de músculo esquelético fueron de la cepa Sprague-Dawley, a excepción de los experimentos de determinación de inositoles fosfato por HPLC que se

realizaron a partir de cultivos primarios obtenidos de animales de la cepa Wistar.

B. Técnicas de cultivo.

1. Cultivo primario de músculo esquelético de rata.

Se utilizó una combinación de los métodos descritos por Kikodoro (1980) y Ruffolo y cols. (1978). Resumiendo, ratas neonatas (0-24 horas) se sacrificaron por decapitación, obteniéndose células de las extremidades posteriores de los animales por disección fina y disgregación mecánica del tejido muscular en un volumen pequeño de una solución estéril de composición 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.17 mM Na₂HPO₄, 0.22 mM KH₂PO₄ pH 7.2 (solución PBSA). El tejido muscular finamente disgregado se sometió a digestión enzimática en 8 ml de 0.2 % p/v colagenasa en PBSA durante 10-15 minutos con agitación suave, deteniendo la reacción por adición de igual volumen de medio de cultivo DMEM/Ham F12 (1:1 v/v), 10 % suero bovino, 2.5 % suero fetal, 15 mM HEPES (pH 7.2), 100 mg/l de penicilina, 50 mg/l de estreptomina y 2.5 mg/l de anfotericina B (medio completo); el tejido parcialmente digerido se filtró por mallas de nytex, y las células, colectadas por centrifugación, se resuspendieron en 10 ml de este mismo medio de cultivo y se transfirieron por 10 minutos a cápsulas Petri de 150 mm con el fin de limpiar parcialmente la suspensión celular de los fibroblastos que habitualmente sedimentan y se adhieren más rápido. El sobrenadante de la

transferencia en placas se contó utilizando el test de exclusión de azul tripan y se sembró a una densidad inicial de $3.5-5 \times 10^5$ células por cápsula de 35 mm, $6-9 \times 10^5$ células por cápsula de 60 mm (sobre cubreobjetos circulares para los experimentos de microscopía confocal) ó $2-3 \times 10^6$ células por cápsula de 150 mm, en medio completo. Entre el tercer y cuarto día de cultivo, los fibroblastos remanentes se eliminaron por adición de citosina arabinósido ($10 \mu\text{M}$ final) por 36 horas. Finalmente, este medio se reemplazó por medio de cultivo fresco sin citosina arabinósido y 1.8 % suero bovino fetal. Las células se mantuvieron en un incubador a 36°C , en una atmósfera con 10 % de CO_2 y 100 % de humedad. Bajo estas condiciones, se obtuvo miotubos contráctiles con una pureza estimada superior al 90 % alrededor del sexto día.

2. Cultivo primario de fibroblastos de rata.

Para obtener fibroblastos de rata en cultivo primario, se utilizó una variación de la técnica recién descrita, que permite la selección casi exclusiva de fibroblastos. La modificación consistió en sembrar las células colectadas luego de la digestión enzimática y filtración, sin preplaqueo previo, a baja densidad inicial, (2.5×10^6 células por cápsula de 60 mm) y omitir el tratamiento posterior con citosina arabinósido. El resto del procedimiento es idéntico al descrito previamente para obtener miotubos de rata.

C. Incorporación de marca radiactiva en inositolpolifosfatos.

Para la marcación de cultivos con ^3H -inositol el medio completo con citosina arabinósido se reemplazó por medio Ham-F10, con 10 % de suero bovino, 1.8 % de suero bovino fetal, 15 mM Hepes (pH 7.2), 100 mg/l de penicilina, 50 mg/l de estreptomycin, 2.5 mg/l de anfotericina B y 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -inositol, incubando a 36 °C por los tiempos indicados en cada experimento.

D. Estimulación del metabolismo de fosfoinositidos y determinación de inositolfosfatos.

1. Estimulación del metabolismo de fosfoinositidos.

Células de músculo esquelético de rata en cultivo primario de 7 días se lavaron y preincubaron por 20 minutos con una solución conteniendo 58 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 3 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 0.5 mM EDTA, 60 mM LiCl, 10 mM glucosa y 20 mM Hepes pH 7.4 (solución de reposo estándar) a temperatura ambiente. Luego se aplicaron las condiciones de estimulación cambiando la solución de reposo por una solución de KCl elevado (desde 15 hasta 82 mM según lo indicado en cada experimento) con reducción equimolar de NaCl y/o de LiCl o por solución de reposo estándar conteniendo carbacol, nicotina, muscarina, oxotremorina o brevetoxina a la concentración y por los tiempos indicados en cada experimento. Para ensayar el efecto de la supresión del

calcio extracelular sobre los estímulos aplicados, la solución de reposo estándar se reemplazó por una solución de reposo sin calcio 2-3 minutos antes de la estimulación. El NaCl se elevó a 62.5 mM en la solución de reposo sin calcio y a 20.2 mM en la solución de despolarización sin calcio, para conservar la osmolaridad; también se realizaron experimentos de supresión del calcio extracelular utilizando 0.1 mM EGTA como quelante; la concentración de calcio libre bajo condiciones estándar y de supresión de calcio con 0.5 mM EDTA, calculadas por medio del programa computacional CATLIG (Goldstein, 1979) fue de 2.5 mM y 0.18 μ M (estimando 30 μ M de calcio contaminante en el agua destilada) respectivamente, mientras que la concentración calculada en los experimentos con 0.1 mM EGTA fue de 0.61 nM. La concentración de calcio libre verificada con electrodos de calcio en los medios sin calcio exógeno fue de 0.17 μ M y 0.12 μ M respectivamente. De manera análoga, el efecto de la supresión del sodio extracelular se ensayó por reemplazo equimolar de NaCl por cloruro de colina (soluciones de reposo y de despolarización sin sodio). Para ensayar el efecto de antagonistas colinérgicos o bloqueadores de canales iónicos sobre los estímulos aplicados, el antagonista se adicionó durante la preincubación a la solución de reposo correspondiente, 4 minutos antes de la aplicación del estímulo, a excepción de pirenzepina y 4-DAMP que se aplicaron solo 2 minutos antes de estimular las células, considerando esta condición como un

control adicional. En estos experimentos, una vez removida la solución de reposo con el antagonista, el estímulo (despolarización o adición de agonista) se aplicó siempre conjuntamente con el antagonista para evitar su desplazamiento del receptor por dilución.

La reacción se detuvo por aspiración rápida del medio de estimulación, adición de 0.8 M ácido perclórico ó 10 % ácido tricloroacético y congelamiento rápido con nitrógeno líquido. Se dejó descongelar en hielo el extracto celular de ácido perclórico o de ácido tricloroacético, se sonicó por 20 segundos y se centrifugó a 800 x g por 10 minutos, transfiriendo el sobrenadante ácido a otro tubo para el posterior análisis de inositoles fosfato.

2. Separación de inositolfosfatos por cromatografía de intercambio aniónico en Dowex-formiato.

El extracto celular soluble de ácido perclórico conteniendo los inositolfosfatos tritiados se neutralizó hasta pH 6.0 con una solución de KOH 2M, MES 0.1M, EDTA 15 mM, separando el precipitado de perclorato de potasio resultante por centrifugación a 800 x g durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a la separación de los inositolfosfatos por cromatografía en Dowex-formiato según lo descrito por Downes y Mitchell (1981) y Biden y cols (1987). El extracto soluble neutralizado se ajustó a un volumen final de 5 ml y a una concentración final de inositol frío de 5 mM, midiendo la radiactividad en una alícuota de 250 μ l del

extracto soluble total y cargando el remanente en una columna rellena con 1.7 ml de Dowex-formiato (1-X8 AG, 100-200 mesh, Bio-Rad) previamente calibrada con estándares de $^3\text{H-Ins}$, $^3\text{H-Ins(1)P}$, $^3\text{H-Ins(1,4)P}_2$, $^3\text{H-Ins(1,4,5)P}_3$ y $^3\text{H-Ins(1,3,4,5)P}_4$. y equilibrada con 5 mM inositol. La columna se eluyó 4 veces con 5 ml de cada una de las siguientes soluciones: 5 mM inositol, 60 mM formiato de sodio/5 mM tetraborato de sodio, 0.2 M formiato de amonio/ 0.1 M ácido fórmico, 0.4 M formiato de amonio/ 0.1 M ácido fórmico, 0.8 M formiato de amonio/0.1 M ácido fórmico y 1.5 M formiato de amonio/ 0.1 M ácido fórmico. Finalmente, se midió la radiactividad correspondiente a cada fracción en un contador de centelleo líquido. La radiactividad recuperada en cada fracción de inositolfosfato se normalizó respecto a la radiactividad total recuperada en el extracto soluble y los resultados se expresaron como porcentaje con respecto a la condición de reposo o control.

3. Determinación de masa de Ins(1,4,5)P_3 por ensayo de desplazamiento de $^3\text{H-Ins(1,4,5)P}_3$ en membranas de cerebelo de rata o ensayo de radiorreceptor.

Se utilizó la técnica descrita por Bredt y cols. (1989) con leves modificaciones, consistente en un ensayo de desplazamiento de $^3\text{H-Ins(1,4,5)P}_3$ previamente ligado a receptores específicos presentes en membranas de cerebelo de rata por acción de Ins(1,4,5)P_3 frío procedente de estándares o de muestras biológicas.

3.1. Preparación de membranas de cerebelo de rata.

Se obtuvo el cerebelo de 2 a 4 ratas macho, estos se pesaron y resuspendieron en 30 volúmenes (p/v) de una solución compuesta por 50 mM tris-HCl pH 7.7, 1 mM EDTA y 1 mM 2-mercaptoetanol (solución A) y se homogeneizaron por 5 a 10 pasadas en Potter con vástago de vidrio. El homogeneizado se centrifugó a 20.000 x g durante 15 minutos y el pellet se lavó con igual volumen de solución A, y se volvió a centrifugar por 3 veces. En la última centrifugación el pellet se resuspendió en la mitad del volumen original en 50 mM tris-HCl pH 7.7, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol y 0.3 M sacarosa. Se midió la concentración de proteína y la preparación se guardó congelada en alícuotas a -80°C hasta su uso.

3.2. Ensayo de radiorreceptor.

El ensayo se realizó en un volumen final de 500 μ l de una mezcla conteniendo: 50 mM tris-HCl pH 8.4, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 1.6 nM ^3H -Ins(1,4,5) P_3 ($1.67 \times 10^2 \mu\text{Ci}$) y 250 μ l de extracto soluble neutralizado; esta mezcla se princubó por 5 minutos en hielo y la reacción se inició por adición de 150 μ g de proteína de cerebelo, incubando en hielo por otros 30 minutos. En cada serie de ensayos se realizaron tubos conteniendo 2 μ M final de Ins(1,4,5) P_3 frío para determinar la unión inespecífica, y tubos sin Ins(1,4,5) P_3 frío ni muestra para determinar la unión máxima de ^3H -Ins(1,4,5) P_3 a las membranas. En cada preparación se realizó

una curva de calibración con Ins(1,4,5)P₃ frío entre 2.5 nM y 120 nM. La reacción se detuvo por centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos, aspirando cuidadosamente el sobrenadante y resuspendiendo el pellet de membranas en 50 µl de 10 % SDS, para medir su radiactividad por centelleo líquido.

4. Determinación de inositolpolifosfatos por HPLC con derivatización complejométrica postcolumna.

Se utilizó la técnica descrita por Mayr (1990) con leves modificaciones. Esta técnica consiste en la formación de un complejo entre los inositolpolifosfatos separados en una columna de intercambio aniónico tipo Mono-Q y el metal de transición itrio, en presencia de un indicador colorimétrico cuya absorbancia a 546 nm cuando está formando un complejo con itrio, cambia al ser desplazado por la formación de un nuevo complejo entre un determinado inositolfosfato y el itrio, siendo el cambio de absorbancia proporcional al grado de complejamiento producido.

4.1. Preparación de la muestra.

En este caso la reacción de estimulación de las células se detuvo por adición de 10 % ácido tricloroacético y congelamiento con N₂ líquido, ya que esta metodología mejora la posterior recuperación de los inositolpolifosfatos superiores (InsP₃ e InsP₆). Una vez descongelado, el extracto celular se sonicó por 15 segundos y centrifugó a 800 x g por 10 minutos, resuspendiendo el pellet en 1M KOH para determinación de proteínas. El sobrenadante se incubó a 40°C

por 20 minutos para destruir la fosfocreatina presente en el extracto y potencialmente interferente con el análisis cromatográfico y luego se transfirió a un tubo conteniendo 1/100 de volumen de 0.1 M NaF, 0.02 M EDTA realizando 5 extracciones con 5 volúmenes de éter dietílico hasta pH 4.0-5.0 y liofilizando a sequedad. El liofilizado se resuspendió en 500 μ l de 1 mM EDTA, 5 mM NaF ajustando nuevamente el pH a 5.0 con ácido acético. Se realizaron 3 extracciones con 40 μ l de una suspensión de 20 % de carbón activado en 0.1 M NaCl y una vez más el extracto se liofilizó a sequedad. Finalmente, previo a la inyección se resuspendió en 1.1 ml de una solución filtrada de 2.5 mM acetato de sodio, 1 mM NaF.

4.2. Análisis por HPLC.

Se utilizó una columna Mono Q HR 20/5 con una precolumna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia/LKB) y un gradiente cóncavo desde 0.2 mM HCl, 15 μ M YCl₃ hasta 0.5 M HCl, 15 μ M YCl₃ a un flujo de 1ml/min, controlado por una bomba inteligente Pharmacia 2150 y un controlador Pharmacia 2152 (Pharmacia/LKB). La solución de derivatización conteniendo 1.6 M trietanolamina-HCl pH 9.0, 300 μ M 2-piridilazo resorcinol se inyectó por una segunda bomba a un flujo de 0.5 ml/min a una cámara de mezcla a la salida de la columna a contar del minuto 9 del gradiente cuya duración total fue de 75 minutos. Se midió paralelamente la absorbancia a 280 nm y a 546 nm (con inversión de la polaridad en este caso) usando dos detectores en línea con el sistema registrando los cromatogramas resultantes en un

integrador de 2 canales Shimadzu CR5A. Cada serie de análisis cromatográficos fue antecedita por 5 inyecciones de una dilución seriada de un estándar de hidrolizado parcial de ácido fítico de composición conocida conteniendo la más concentrada de ellas entre 39 y 1970 pmoles de los siguientes isómeros de inositoles fosfato: $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(4,5,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ e InsP_6 . La inyección de esta dilución seriada se utilizó para realizar la cuantificación mediante una curva de calibración individual para cada isómero, mediante un ajuste no lineal y substracción de línea base por medio del programa HPLC (Mayr, datos sin publicar).

E. Determinación de la variación de calcio citosólico.

La variación de calcio citosólico se midió determinando los cambios de fluorescencia por microscopía confocal (microscopio Carl Zeiss de la central de equipamiento mayor de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile) en células cargadas con Fluo3. Las células se incubaron por 30 minutos a 37 °C en solución de reposo estándar conteniendo 5.4 μM Fluo3-AM (stock preparado en ácido plurónico 20%-DMSO). La membrana celular es permeable al colorante esterificado que es convertido a su forma libre por esterasas endógenas.

Los cubreobjetos con células se montaron en una cámara plástica de 1 ml de capacidad y se excitaron usando un rayo láser de argón a 488 nm de longitud de onda, colectando las imágenes fluorescentes con el sistema de adquisición de datos del equipo.

F. Ligamen de ^3H -QNB a fracción microsomal de miotubos de rata en cultivo primario.

1. Preparación de fracción microsomal.

Las células se lavaron 3 veces con un tampón conteniendo 1 mM EDTA, 0.25 M glucosa y 20 mM Tris-HCl pH 7.4, raspadas en presencia de 300 μl del mismo tampón por cápsula de 60 mm, y homogeneizadas mediante 10-20 pasadas en Potter con vástago de teflón. El extracto total fue centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos y el sobrenadante de esta centrifugación fue vuelto a centrifugar a 5.000 x g por otros 10 minutos. Finalmente el segundo sobrenadante fue centrifugado a 100.000 x g por 60 minutos descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet de microsomas en el tampón de homogeneización.

2. Ligamen de ^3H -QNB.

El ensayo se realizó en 1 ml final de solución de ligamen de composición 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 y 20 mM HEPES-tris pH 7.4, conteniendo adicionalmente 0.1-10 nM ^3H -QNB en presencia y en ausencia de

1 μM QNB. La reacción se inició por adición de 500 μg de fracción microsomal, incubando 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, se filtraron en duplicado 400 μl de la mezcla de reacción en filtros Whatman GF/B lavando 2 veces con 2.5 ml de solución de ligamen fría y contando la radiactividad retenida en los filtros.

G. Determinación del potencial de membrana.

El potencial de membrana se midió utilizando un microelectrodo con KCl acoplado a un amplificador y a un osciloscopio de acuerdo a lo descrito en técnicas electrofisiológicas estándar (Halliwell y Whitaker, 1987). La determinación se realizó usando concentraciones crecientes de KCl con reducción equimolar de NaCl de acuerdo a lo descrito previamente, registrando los potenciales estables bajo estas condiciones en células tomadas de al menos 2 preparaciones independientes, y verificando la reversión de los valores registrados en células despolarizadas al volver a ponerlas en contacto con la solución de reposo.

Alternativamente, se utilizó la técnica de registro de voltaje con fijación de corriente (current clamp) según lo descrito por Hamill y cols (1981) utilizando una solución de registro intracelular constituida por 110 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-NaOH pH 6.9, 11 mM EGTA-KOH, 10 mM glucosa.

H. Cuantificación de los productos radiactivos.

La radiactividad de las fracciones orgánicas y de los productos extraídos de placas cromatográficas se midió en un contador de centelleo líquido Tracor con 5 ml de una solución de centelleos compuesta por 4 g de PPO, 0.1 g de POPOP por litro de tolueno más medio litro de arcopal.

La radiactividad del pellet de membranas resuspendido en SDS proveniente de los ensayos de radiorreceptor se contó en 5 ml de solución de centelleos más 0.5 ml de agua destilada.

La marca de las fracciones acuosas provenientes del eluido de la cromatografía en Dowex-formiato se midió tomando alícuotas de 2 ml y se contó en 10 ml de solución de centelleos. La radiactividad del extracto soluble total proveniente de células marcadas con ^3H -inositol se midió en una alícuota de 250 μl ajustada a 2 ml con inositol 5 mM utilizando 10 ml de solución de centelleos.

I. Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se realizó según el método descrito por Hartree (1972).

J. Tratamiento estadístico de los resultados.

El análisis de significancia de los resultados obtenidos se llevó a cabo por medio del test de Student (Freund and Walpole, 1980).

RESULTADOS.

A. Determinación de masa de isómeros de inositolfosfatos por HPLC en células de músculo esquelético de rata en cultivo primario.

Las figuras 1 A y B muestran el análisis por HPLC de un hidrolizado de ácido fítico de composición conocida utilizado como estándar y del extracto soluble de un cultivo primario en condición de reposo. El sistema resolvió una mezcla compleja de inositolpolifosfatos desde InsP_2 hasta InsP_6 (1 A). La tabla 1 presenta un resumen de la masa de los distintos isómeros de inositolfosfatos detectados mediante esta técnica en cultivos primarios en condición de reposo. $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ e InsP_6 fueron las especies detectadas en mayor cantidad. Otras especies, descritas en cantidades menores en músculo esquelético adulto (Mayr y Thieleczek, 1991), como $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$ e $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$ no fueron detectadas en un número suficiente de análisis como para ser consideradas significativas.

B. Determinación de masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por ensayo de desplazamiento de $^3\text{H-InsP}_3$.

Puesto que de los cuatro metabolitos más abundantes $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ e InsP_6 , $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

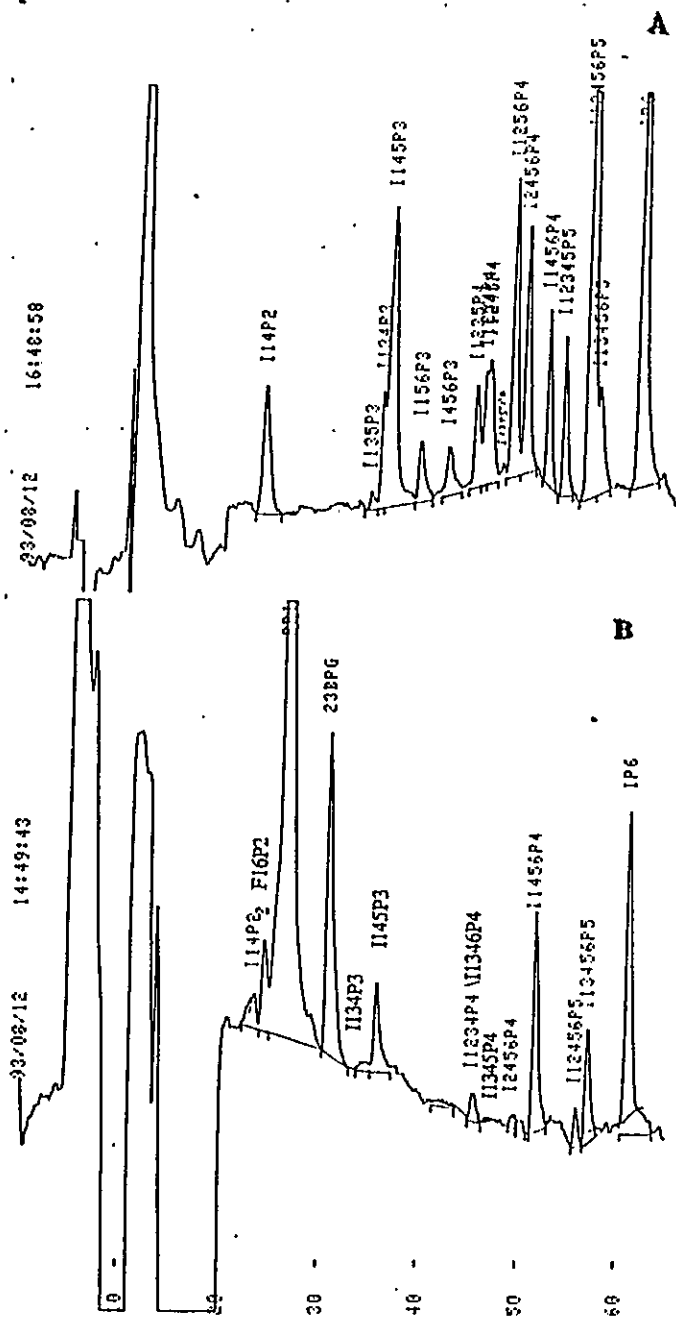


Figura 1. Análisis de inositolpolifosfatos por HPLC con derivatización post-columna. El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna Mono Q y un gradiente desde 0.2 mM hasta 0.5 M HCl según lo indicado en Materiales y Métodos. A. Hidrolizado parcial de ácido fítico utilizado como estándar. B. Extracto soluble de cultivo primario de microtubos de rata de 7 días bajo condición de reposo. La muestra, equivalente a 5 mg de proteína celular se preparó para el análisis según lo descrito en Materiales y Métodos.

COMPUESTO	MASA
Ins-(1,4)-P ₂	32.4 ± 8.0 (n=7)
Fru-(1,6)-P ₂	1002 ± 506 (n=12)
Pirofosfato	>0.5 x 10 ⁶ (n=11)
2,3-DPG	424 ± 245 (n=12)
Ins-(1,3,4)-P ₃	10.3 ± 3.3 (n=7)
Ins-(1,4,5)-P ₃	68.1 ± 16.8 (n=10)
Ins-(4,5,6)-P ₃	9.0 ± 4.7 (n=10)
Ins-(1,3,4,6)-P ₄	7.4 ± 2.4 (n=7)
Ins-(1,3,4,5)-P ₄	5.5 ± 3.3 (n=10)
Ins-(1,4,5,6)-P ₄	19.4 ± 10.7 (n=11)
Ins-(1,2,4,5,6)-P ₅	16.4 ± 6.5 (n=9)
Ins-(1,3,4,5,6)-P ₅	53.9 ± 17.6 (n=10)
InsP ₆	153.2 ± 29.0 (n=11)

Tabla 1. Masa de inositolfosfatos y de otros compuestos fosforilados detectada por HPLC en miotubos de rata en cultivo primario. Los valores (pmoles/mg de proteína celular) corresponden a promedio ± desviación estándar para el número de análisis indicado entre paréntesis. Las determinaciones se realizaron en cultivos en condición de reposo, llevando a cabo el experimento y las determinaciones según lo descrito en materiales y métodos. Se omiten aquellos compuestos que fueron detectables en menos de 7 análisis.

presenta una importancia central como producto directo de la hidrólisis de PIP_2 y como potencial mensajero químico, se recurrió a un ensayo de ligamen y desplazamiento de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ a membranas de cerebelo.

La figura 2 muestra una curva de calibración estándar para un ensayo de desplazamiento de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ unido a receptores específicos de membrana de cerebelo de rata usando concentraciones crecientes de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ frío. El método detectó satisfactoriamente cantidades en el rango de 2 a 25 pmoles totales de inositoltrisfosfato. Su sensibilidad, más alta que la registrada por HPLC (sobre 30 pmoles), permitió mediciones individuales de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en células cultivadas en cápsulas pequeñas (60 mm de diámetro), y fue el método de elección para experimentos que requirieron mayor número de determinaciones. Un estudio realizado sobre una población amplia (29 cultivos, 83 mediciones) reveló claramente una distribución bifásica de los niveles basales de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, con un 72 % de las muestras en el rango de 9 - 50 pmoles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por mg de proteína celular (media: 28.4 ± 10.6) y un 28 % de ellas con niveles basales mayores de 50 pmoles por mg de proteína celular (media: 82.6 ± 17.6); 18 de 21 cultivos (85 %) que presentaron basales en el rango bajo 50 pmoles por mg de proteína celular respondieron a potasio con un aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (ver más adelante), mientras que solo 3 de 8 (37 %) de los cultivos con basales en el rango alto respondieron positivamente.

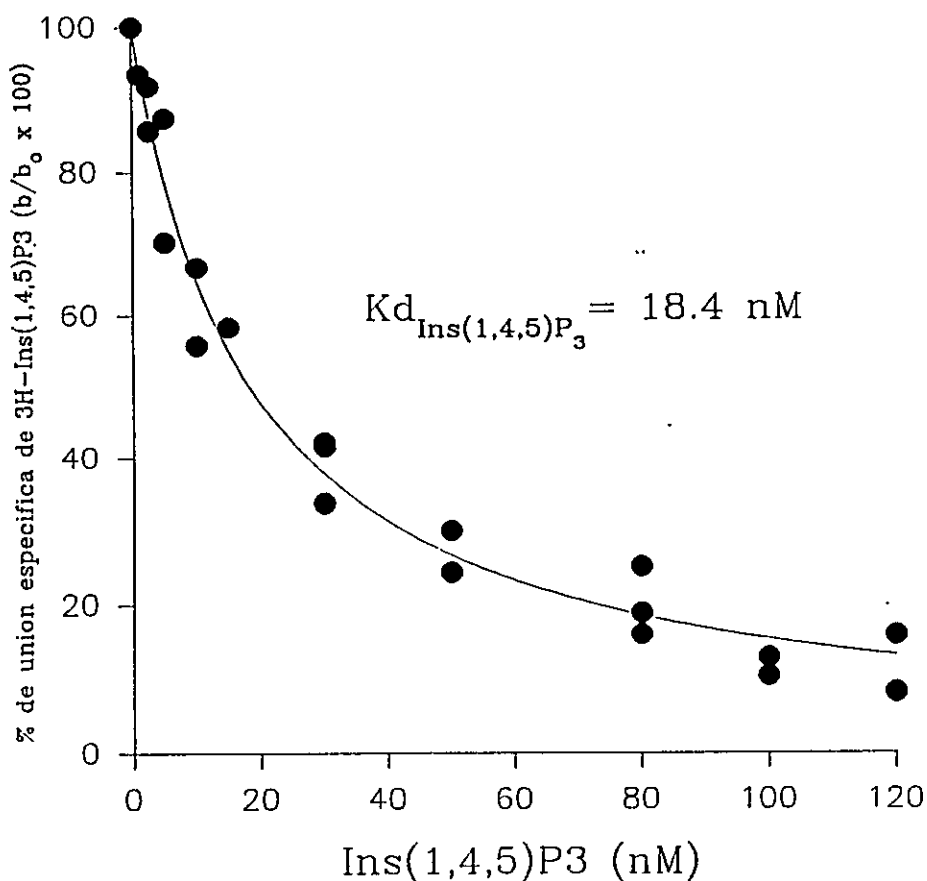


Figura 2. Curva estándar de desplazamiento de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por acción de $\text{ins}(1,4,5)\text{P}_3$ frío en membranas de cerebelo de rata. Se incubaron 150 μg de proteína de cerebelo con 1.6 nM final de $^3\text{H-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ($1.67 \times 10^{-2} \mu\text{Ci}$) y con 2-120 nM $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ frío de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Se midió la radiactividad unida a la fracción de membranas y se expresó como % de unión con respecto al total.

Se evaluó si la diferencia entre la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ detectada por HPLC y aquella detectada por ensayo de radiorreceptor podía ser atribuida a una diferencia en los valores de proteína celular, ya que en el primer caso (medición por HPLC), con el fin de medir fosfoinositidos, el pellet celular se sometió a una extracción orgánica de los fosfolípidos antes de la medición de proteínas, mientras que en el segundo caso (medición por ensayo de radiorreceptor), se midieron las proteínas resultantes inmediatamente después de la recuperación del pellet celular resultante de la precipitación acida. Se detectó una diferencia significativa en las proteínas celulares recuperadas desde cápsulas de 60 mm por ambos métodos: $230 \pm 17 \mu\text{g}$ ($n = 5$) al realizar la extracción orgánica vs. $406 \pm 17 \mu\text{g}$ ($n = 5$) sin extracción. Si se corrige la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ detectada por HPLC por este factor el valor de reposo resultante por esta metodología sería de 38.6 ± 9.5 pmoles por mg de proteína celular. Por otra parte, un estudio acerca del grado de dispersión de la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ corregida, en 21 cápsulas de 7 cultivos independientes, mostró 4 cultivos con basales en el rango de 25 - 50 pmoles por mg de proteína celular (promedio corregido: 35.0 ± 7.1) de los cuales 3 respondieron con un aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ a la despolarización y 3 cultivos con basales sobre 50 pmoles por mg de proteína celular (promedio corregido: 64.9 ± 7.3) de los cuales solo 1 presentó respuesta a potasio. El conjunto

de datos sugiere que el rango basal de Ins(1,4,5)P₃ bajo 50 pmoles por mg de proteína celular es el que presenta relevancia para este estudio y los valores obtenidos con ambos métodos (28.4 ± 10.6, 21 cultivos, 60 mediciones y 35.0 ± 7.1, 4 cultivos, 12 mediciones) no difieren significativamente.

C. Incorporación de marca radiactiva en cultivos celulares de músculo esquelético.

La marcación específica en células vivas de los metabolitos derivados de inositol con ³H-inositol constituyó una aproximación metodológica secundaria para corroborar el efecto de algunos estímulos sobre inositolmonofosfato e inositolfosfatos totales. Este enfoque no permite conocer los niveles de los compuestos marcados en términos de masa pero permite una estimación porcentual de las variaciones observadas con respecto a una condición control.

El perfil de separación de una mezcla de estándares de InsP, Ins(1,4)P₂, Ins(1,4,5)P₃ e Ins(1,3,4,5)P₄, luego de cromatografía en Dowex-formiato resolvió claramente InsP de Ins(1,4)P₂ pero solo mostró resolución parcial entre Ins(1,4)P₂, Ins(1,4,5)P₃ e Ins(1,3,4,5)P₄ (datos no mostrados). Por esta razón los resultados utilizando esta metodología de separación se expresan como InsP e InsP_i totales (InsP + InsP₂ + InsP₃ + InsP₄).

La figura 3 A muestra la incorporación de marca en el extracto soluble total, mientras que la figura 3 B muestra la incorporación en InsP y en InsP_i totales. La máxima incorporación de marca se alcanza alrededor de las 40 horas. Alrededor de un 85 % de la marca final se recuperó como inositol libre, en tanto que un 5.3 % y un 5.4% se recuperaron como InsP e (InsP₂ + InsP₃ + InsP₄) respectivamente, correspondiendo la suma de ambos (10.7%) a InsP_i totales. El aumento de incorporación de marca en inositolfosfatos mantuvo buena correlación con el aumento de la marca en fosfoinositidos, PI, PIP y PIP₂ (datos no mostrados). Como rutina, los experimentos de marcación con ³H-inositol se realizaron incubando por 48 horas con el trazador.

D. Determinación del potencial de membrana bajo condición de reposo y de despolarización con potasio.

Puesto que uno de los objetivos de esta tesis consiste estudiar el efecto de la despolarización con potasio sobre el metabolismo de fosfoinositidos, se midió el potencial de membrana bajo condición de reposo y de despolarización con potasio en los miotubos de rata en cultivo primario.

El potencial de reposo medido con microelectrodos en los miotubos de rata diferenciados (1.8 % de suero fetal), fue de aproximadamente -40 mV (rango -36 a -64 mV). Como se observa

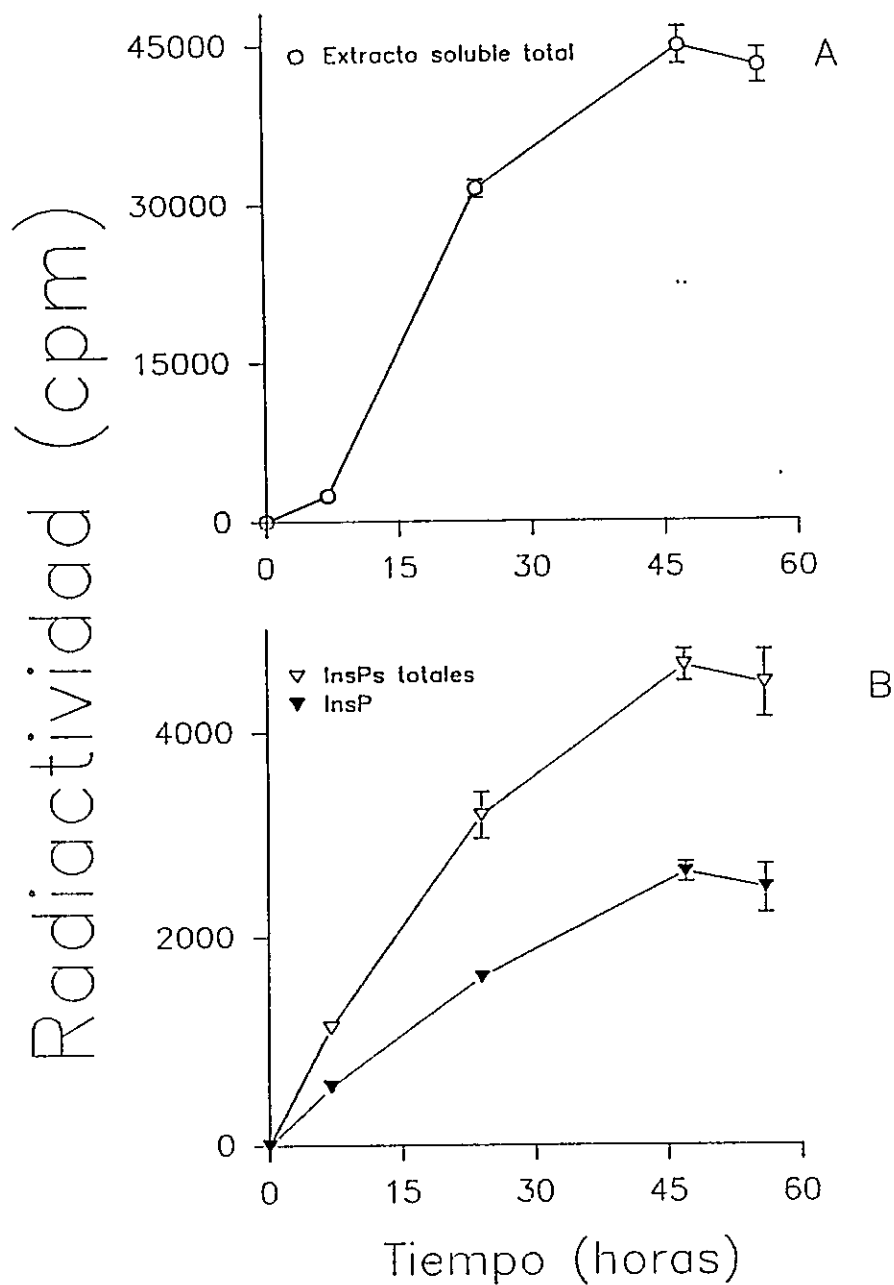


Figura 3. Incorporación de ^3H -inositol sobre inositolfosfatos de miotubos de rata. Células de 5 días de cultivo se incubaron con $2.5 \mu\text{Ci/ml}$ de medio a 36°C , deteniendo la reacción con 0.8 M PCA y analizando la distribución de la marca luego de neutralización y cromatografía en Dowex-formiato según lo indicado en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio y el error estándar de un experimento realizado por triplicado.

en la figura 4 este valor disminuyó gradualmente con la concentración de potasio hasta alrededor de -10 mV a 47 mM potasio. El reemplazo de LiCl por NaCl en la solución de reposo no cambió sustancialmente el valor observado inicialmente midiéndose un promedio de -43 mV bajo estas condiciones.

Un resultado similar se obtuvo de la medición realizada mediante la técnica de fijación de corriente, midiéndose entre -40 mV y -47 mV bajo condición de reposo, -15 mV a 47 mM potasio y $+1$ mV a 83 mM potasio.

E. Efecto de la despolarización con potasio sobre el metabolismo de fosfoinosítidos en cultivos celulares.

1. Determinación de isómeros de inositolpolifosfatos por HPLC en células despolarizadas con potasio.

En primer lugar se identificaron los isómeros de inositolfosfatos que cambian en respuesta a la despolarización. La despolarización con 47 mM potasio produjo un aumento temprano en la masa de $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ e $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, a los 4 segundos de despolarización; este aumento aún resultaba visible luego de 60 segundos de estímulo (figura 5 A). Los niveles de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ e $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ no variaron significativamente (figura 5 B); tampoco variaron los niveles de $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ e InsP_6 (Figura 5 C).

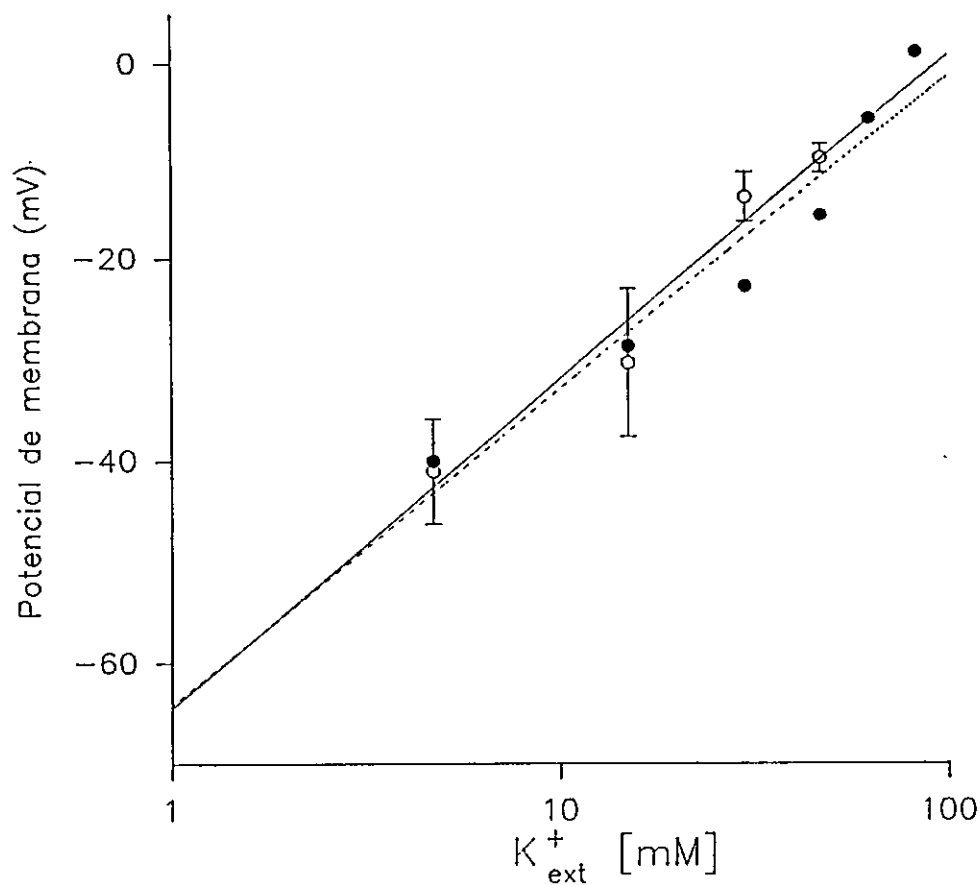


Figura 4. Efecto de la concentración extracelular de potasio sobre el potencial de membrana en miotubos de rata. Se midió el potencial de membrana en miotubos de rata de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los símbolos vacíos con línea continua representan el promedio \pm desviación estándar de las determinaciones directas realizadas con microelectrodos intracelulares para un mínimo de 10 células individuales y un máximo de 28 tomadas de dos cultivos independientes, mientras que los símbolos llenos con la línea punteada representan el promedio de duplicados de mediciones realizadas fijación de corriente usando sellos de alta resistencia en configuración célula entera.

2. Efecto de la despolarización con potasio sobre los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ medidos por ensayo de radiorreceptor.

Puesto que al despolarizar con potasio solo se detectaron cambios significativos en la masa de $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ e $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, se midió el efecto de distintas concentraciones de potasio sobre los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ determinados mediante ensayo de radiorreceptor (Figura 6). El aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inducido por 4 segundos de despolarización con potasio fue significativo alrededor de 20 mM potasio, ajustándose a una distribución de Boltzmann que se saturó alrededor de los 40 mM potasio en analogía a lo observado para el calcio citosólico (Jaimovich y Rojas, 1994), sugiriendo como indicada la concentración 47 mM potasio utilizada en los experimentos de despolarización estándar. Al medir los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por ensayo de radiorreceptor en miotubos despolarizados con 47 mM potasio (figura 7) se observó un aumento temprano de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, a los 2 segundos de despolarización (véase el recuadro en la figura 7), que constituyó el límite de resolución temporal del sistema experimental utilizado. A tiempos de despolarización largos (6 minutos), no se observaron cambios significativos. El efecto estimulante de 47 mM potasio también se observó midiendo los niveles de $^3\text{H}\text{-InsP}$ y $^3\text{H}\text{-InsP}_2$ totales provenientes de miotubos premarcados con $^3\text{H}\text{-inositol}$ (Figura 8), mientras que solo se observó un leve aumento o falta de cambios significativos en la marca de PIP_2 (datos no mostrados).

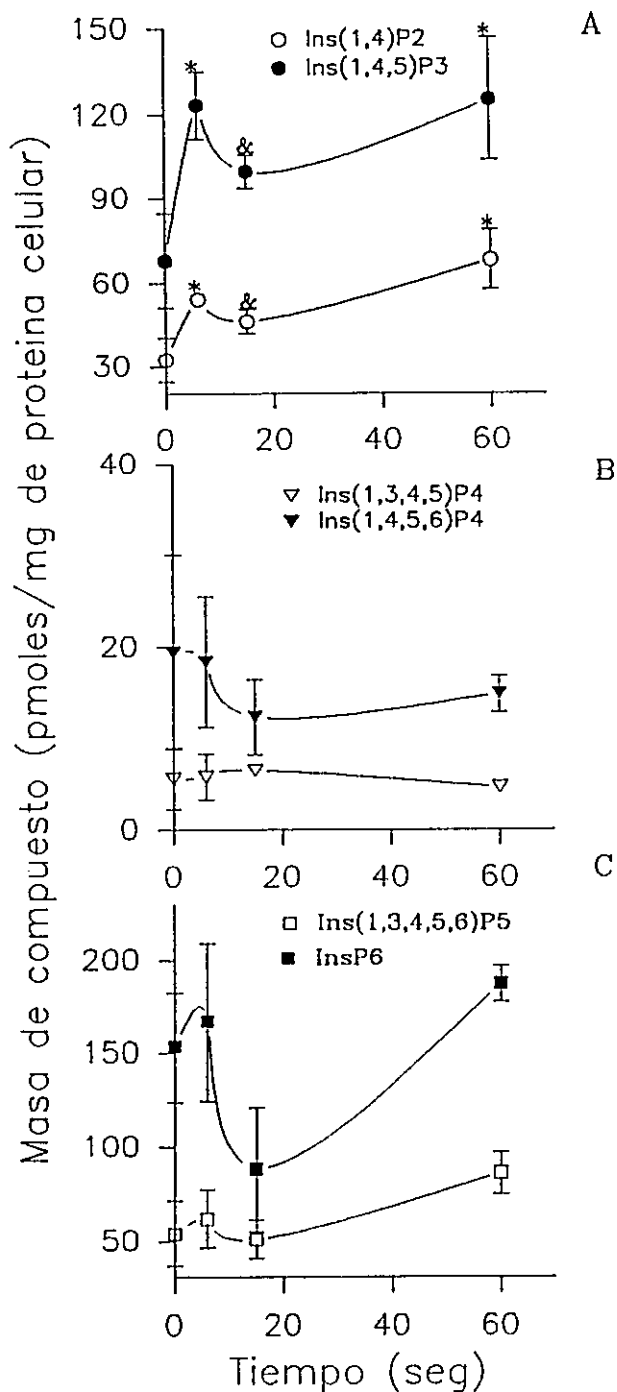


Figura 5. Masa de isómeros de inositolpolifosfatos en miotubos de rata despolarizados con potasio. Las células se preincubaron en solución de reposo durante 20 minutos, se despolarizaron con 47 mM potasio por los tiempos indicados, y el extracto soluble se analizó por HPLC según lo descrito en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de un mínimo de 3 análisis y un máximo de 10. (*, $p < 0.002$ y $p < 0.05$; test de Student).

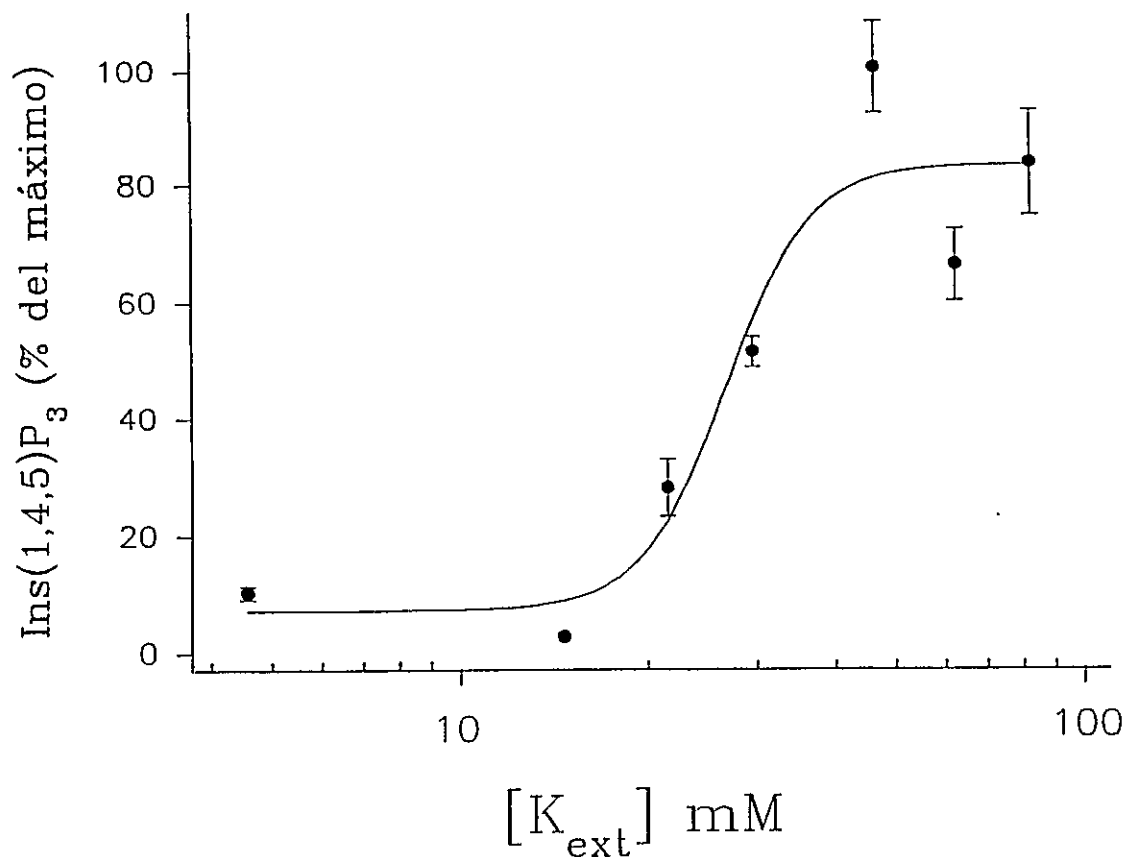


Figura 6. Efecto de la concentración de potasio extracelular sobre los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Las células se preincubaron en solución de reposo y se despolarizaron usando las siguientes concentraciones milimolares de potasio externo: 4.7 (control), 15, 22, 30, 47, 63 y 83. La reacción se detuvo a los 4 segundos con 0.8 M PCA frío y el extracto soluble se analizó por ensayo de radioreceptor según lo indicado en Materiales y Métodos. Los símbolos representan el promedio y el error estándar de triplicados provenientes de 2 experimentos independientes.

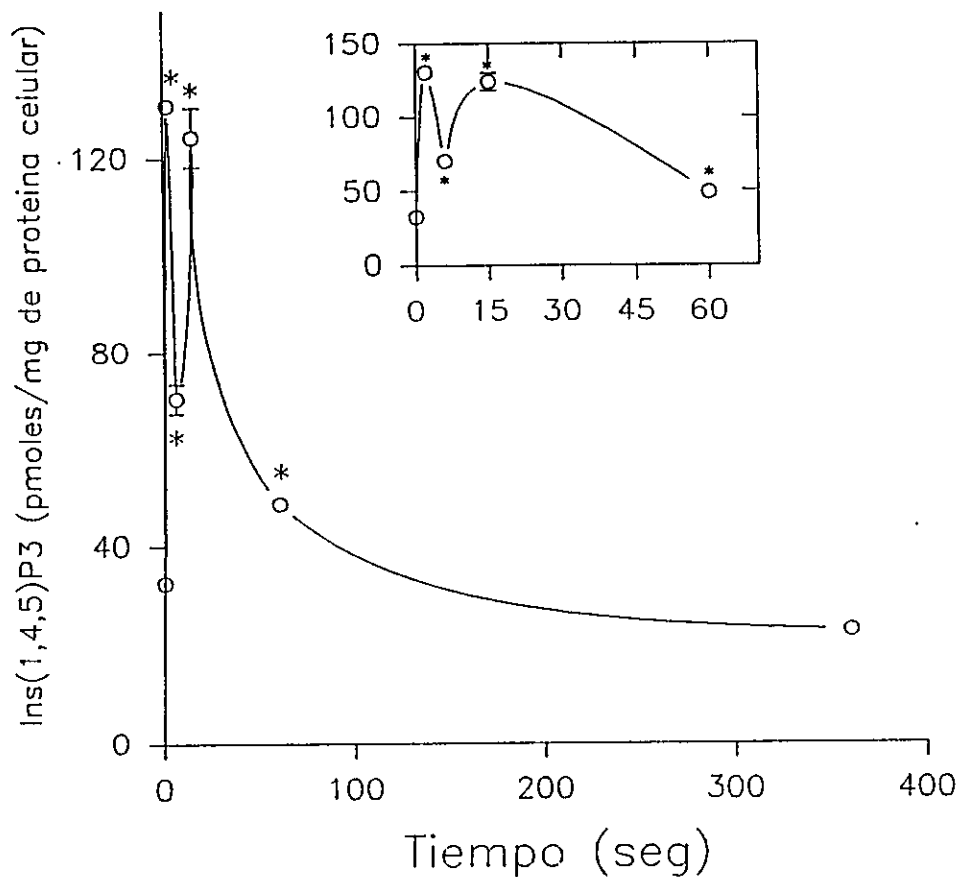


Figura 7. Efecto de la despolarización con potasio sobre los niveles de Ins(1,4,5)P₃ en miotubos de rata en cultivo primario. Las células se preincubaron por 20 minutos en solución de reposo, se despolarizaron con 47 mM potasio bajo condición estándar y se determinó la masa de Ins(1,4,5)P₃ en el extracto soluble por ensayo de radiorreceptor. Cada punto corresponde al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. (*, $p < 0.001$; test de Student).

3. Influencia del calcio extracelular.

La supresión del calcio extracelular no previno el aumento temprano de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inducido por potasio (figura 9). El aumento máximo expresado en términos de porcentaje con respecto al basal presentó solo pequeñas diferencias con respecto a la condición estándar: $399 \pm 1 \%$ en presencia de calcio externo y $339 \pm 60 \%$ en ausencia de calcio agregado. De hecho los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ basales en ausencia de calcio, tomados de 12 cápsulas provenientes de otros 5 cultivos independientes no variaron sustancialmente con respecto a la condición estándar promediando 24.3 ± 9.2 pmoles por mg de proteína celular. Por otra parte, tamponando el calcio con EGTA se obtuvo un basal de 24.6 ± 5.7 pmoles por mg de proteína celular (3 cultivos) y un valor de 57.4 ± 10.7 pmoles por mg de proteína celular a los 5 segundos de despolarización; este último valor no difiere significativamente de los 70.7 ± 3.1 pmoles por mg de proteína celular observados al despolarizar por 5 segundos en presencia de calcio. A tiempos de despolarización largos (6 minutos), tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a la condición de reposo. En analogía a lo observado bajo condición estándar, los niveles de $^3\text{H}\text{-InsP}$ y $^3\text{H}\text{-InsP}$, totales provenientes de miotubos premarcados con $^3\text{H}\text{-inositol}$ también fueron estimulados por 47 mM potasio en ausencia de calcio extracelular (figura 10), y solo se vió un leve aumento o ausencia de cambios significativos en la marca

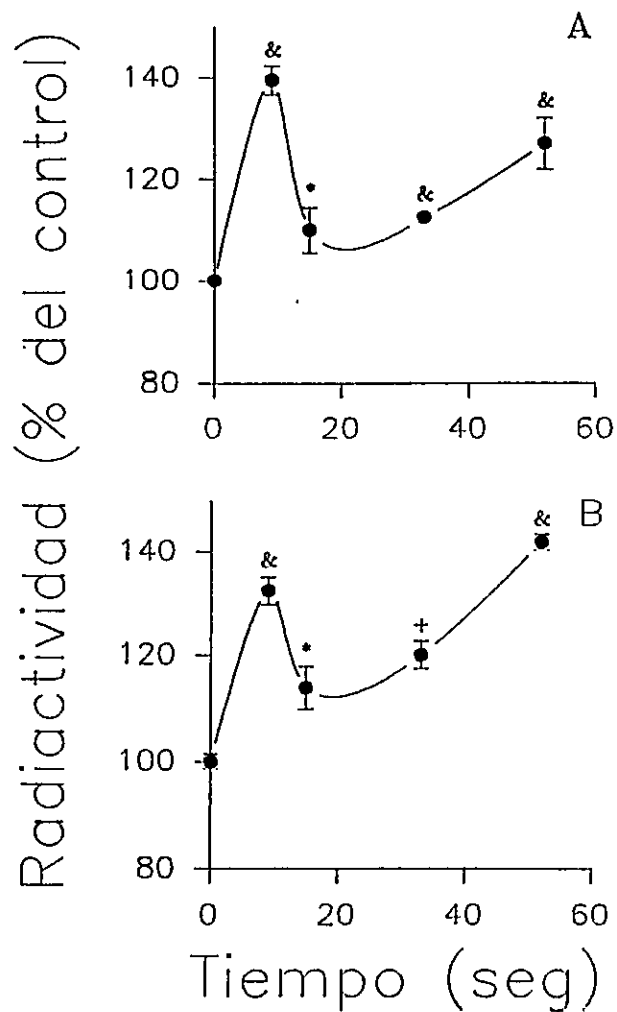


Figura 8. Efecto de la despolarización con potasio sobre ^3H -InsP (A) y ^3H -InsP totales (B) en miotubos de rata en cultivo primario. Las células se preincubaron con solución de reposo, se despolarizaron con 47 mM potasio por los tiempos indicados, y la marca correspondiente a cada inositolfosfato se cuantificó luego de cromatografía del extracto soluble en Dowex-formiato según lo descrito en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados en triplicado (&, $p < 0.001$; +, $p < 0.01$ y *, $p < 0.05$; test de Student).

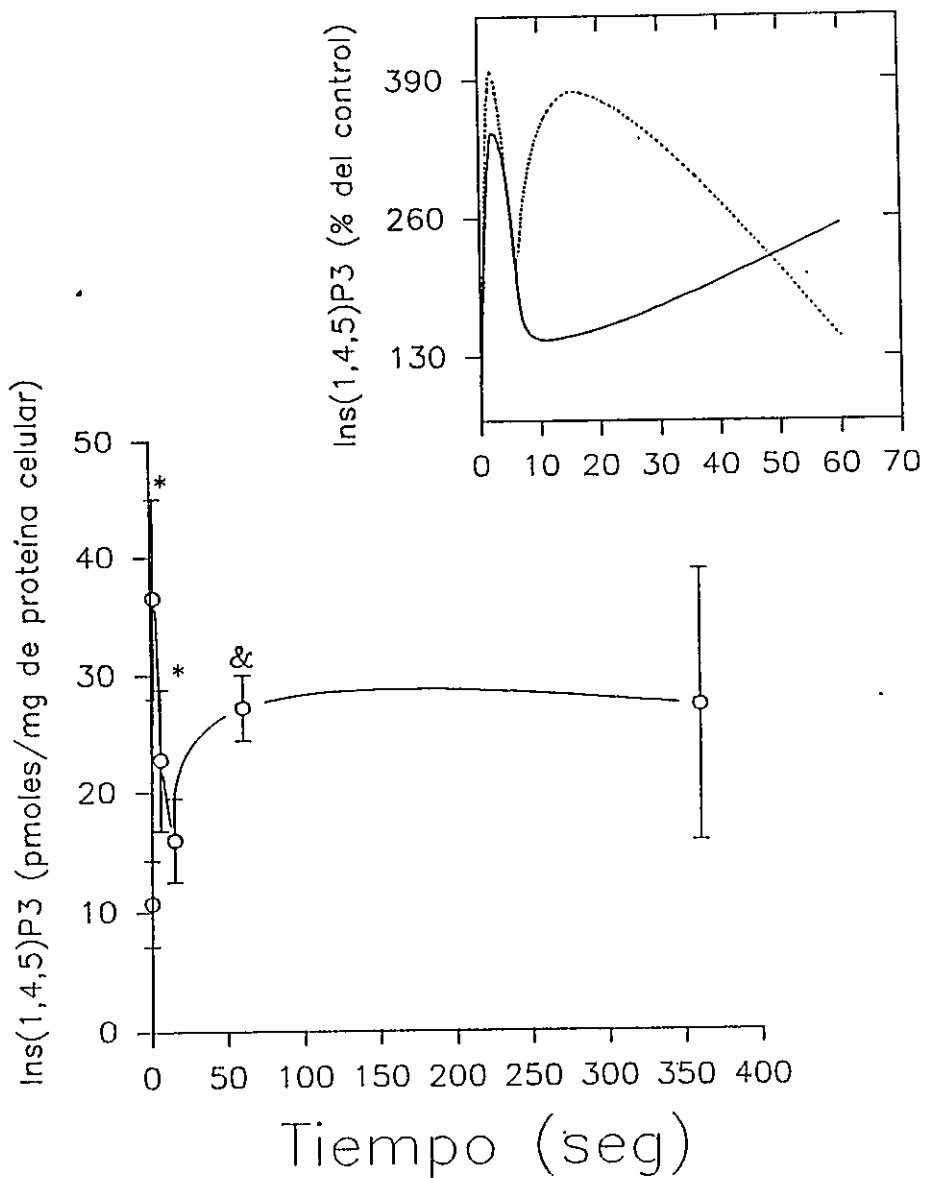


Figura 9. Efecto de la despolarización con potasio sobre los niveles de Ins(1,4,5)P₃ en ausencia de calcio extracelular. Las células se preincubaron por 18 minutos en solución de reposo estándar y luego por 2 minutos en solución de reposo sin calcio. Luego se despolarizaron con 47 mM potasio sin calcio agregado y se midió el Ins(1,4,5)P₃ en el extracto soluble por ensayo de radiorreceptor según lo indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 3 experimentos por triplicado (*, p<0.001 y &, p<0.02, test de Student). En el recuadro con escala ampliada se representan el efecto normalizado de potasio bajo condiciones estándar mostrado en la figura anterior y el efecto sin calcio agregado de esta figura.

de polifosfoinositidos (datos no mostrados).

4. Efecto de la liberación de calcio intracelular.

La preincubación de miotubos con rianodina en presencia de EGTA y ausencia de calcio en el medio extracelular permite el vaciamiento de los depósitos de calcio intracelulares e inhibe una liberación posterior inducida por potasio (Figura 11, recuadro; Coronado y cols, 1994). Bajo estas condiciones se produjo un aumento de los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ basales y una respuesta adicional al despolarizar con potasio (figura 11), lo que sugiere que el aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ es parcialmente independiente de la liberación de calcio, aunque esta última sería capaz de producir una respuesta *per se*.

5. Evaluación de la influencia del flujo de entrada de iones sodio.

Uno de los objetivos planteados inicialmente es la evaluación de la participación del flujo de entrada de iones sodio sobre el metabolismo de fosfoinositidos. El experimento de la figura 12 muestra que el agonista de canales de sodio brevetoxina indujo un aumento transitorio de alrededor 2 a 3 veces en los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en tiempos de 10 a 15 segundos. El efecto fue bloqueado por tetrodotoxina (figura 13) confirmando un efecto vía canales de sodio. Sin embargo, pese a que el reemplazo de iones sodio por colina también previno la acción de brevetoxina, no tuvo el mismo efecto sobre la estimulación de la síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mediada por potasio (figura 14) sugiriendo un efecto vía

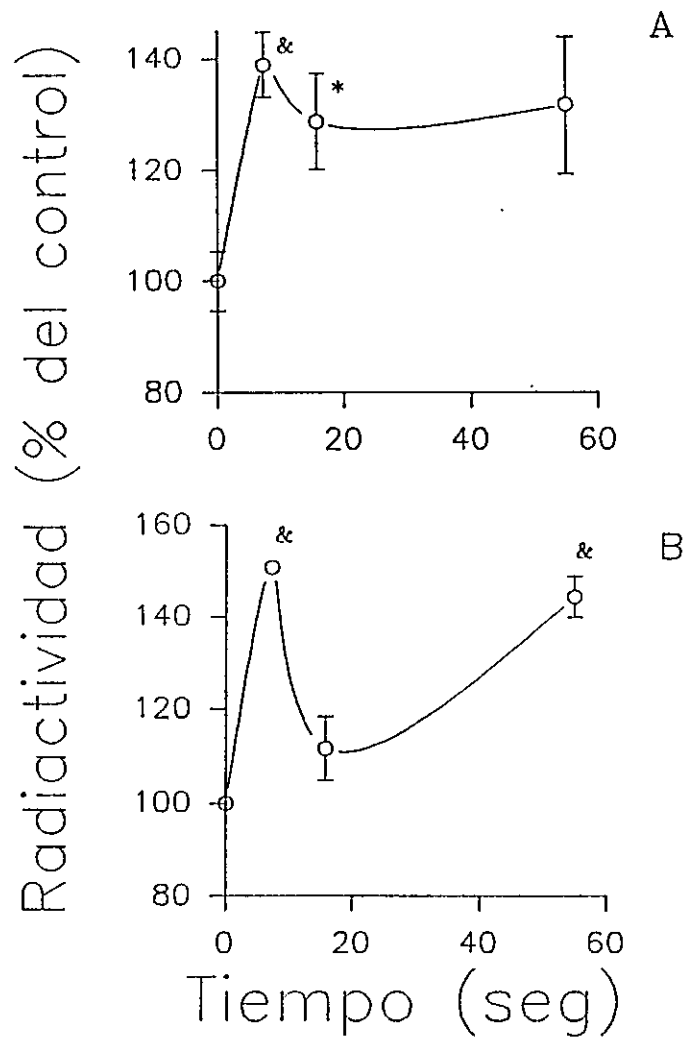


Figura 10. Efecto de la despolarización con potasio en ausencia de calcio sobre ³H-InSP (A) y ³H-InSP, totales (B) en miotubos de rata en cultivo primario. Las células se preincubaron con solución de reposo, se despolarizaron con 47 mM potasio en ausencia de calcio agregado en el medio, y la marca de cada inositolfosfato se midió luego de cromatografía del extracto soluble en Dowex-formiato según lo descrito en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados en triplicado. (&, $p < 0.01$ y *, $p < 0.05$; test de Student).

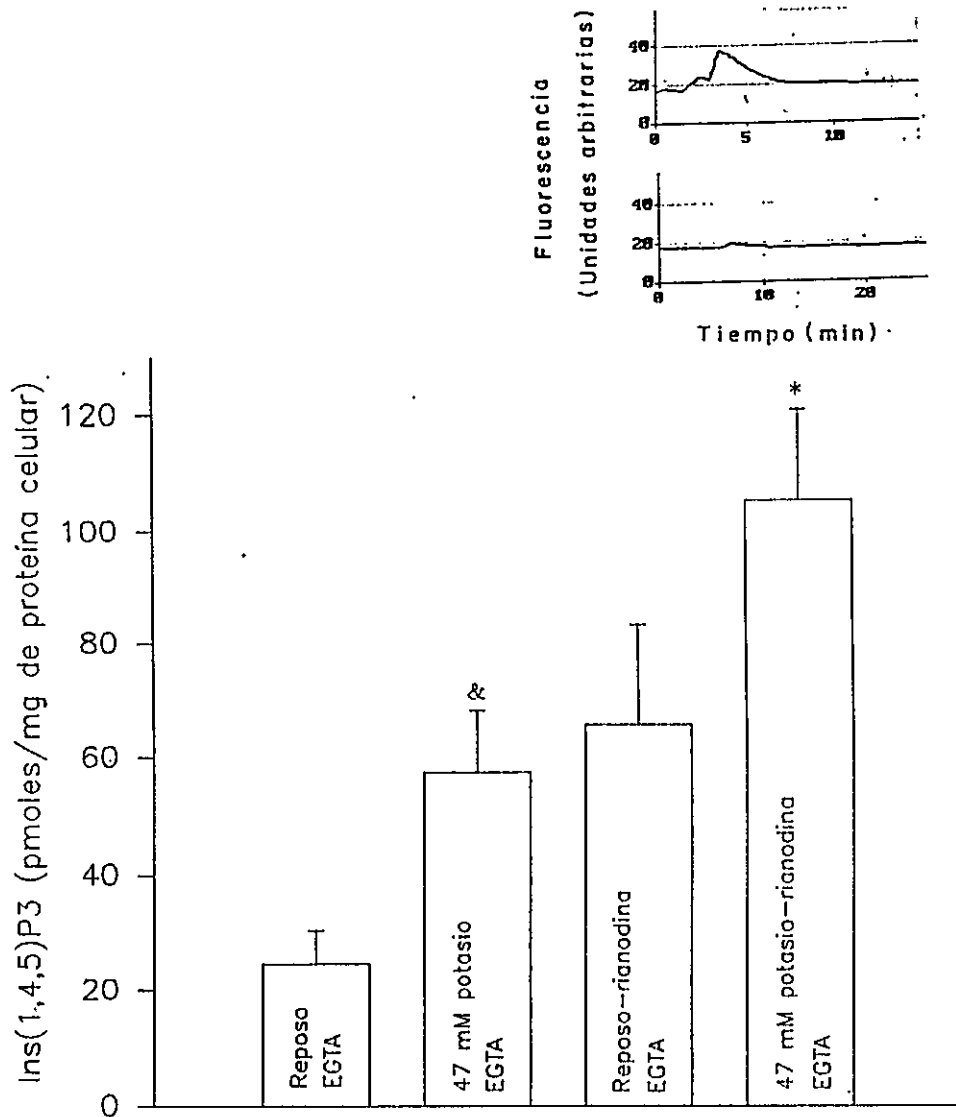


Figura 11. Efecto de la despolarización con potasio en presencia de rianodina y ausencia de calcio extracelular. Las células se preincubaron por 10 minutos en solución de reposo estándar y luego 2 minutos más en solución de reposo con EGTA y sin calcio. Luego se sometieron a cada una de las siguientes situaciones experimentales: a) 4 segundos de reposo o despolarización con EGTA (las 2 barras de la izquierda), b) 4 segundos de despolarización con EGTA seguidos de 6 minutos en solución de reposo con EGTA y rianodina, y finalmente 4 segundos en solución de reposo o despolarización con EGTA y rianodina (las 2 barras de la derecha). La reacción se detuvo con 0.8 M PCA y el Ins(1,4,5)P₃ se midió por ensayo de radioreceptor de acuerdo a Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio y desviación estándar de 3 determinaciones en duplicado o triplicado. (&, p<0.01 y *, p<0.05, test de Student); las figuras del recuadro muestran la fluorescencia de calcio citosólico al despolarizar con EGTA en ausencia (trazo superior) y en presencia de rianodina (trazo inferior) respectivamente.

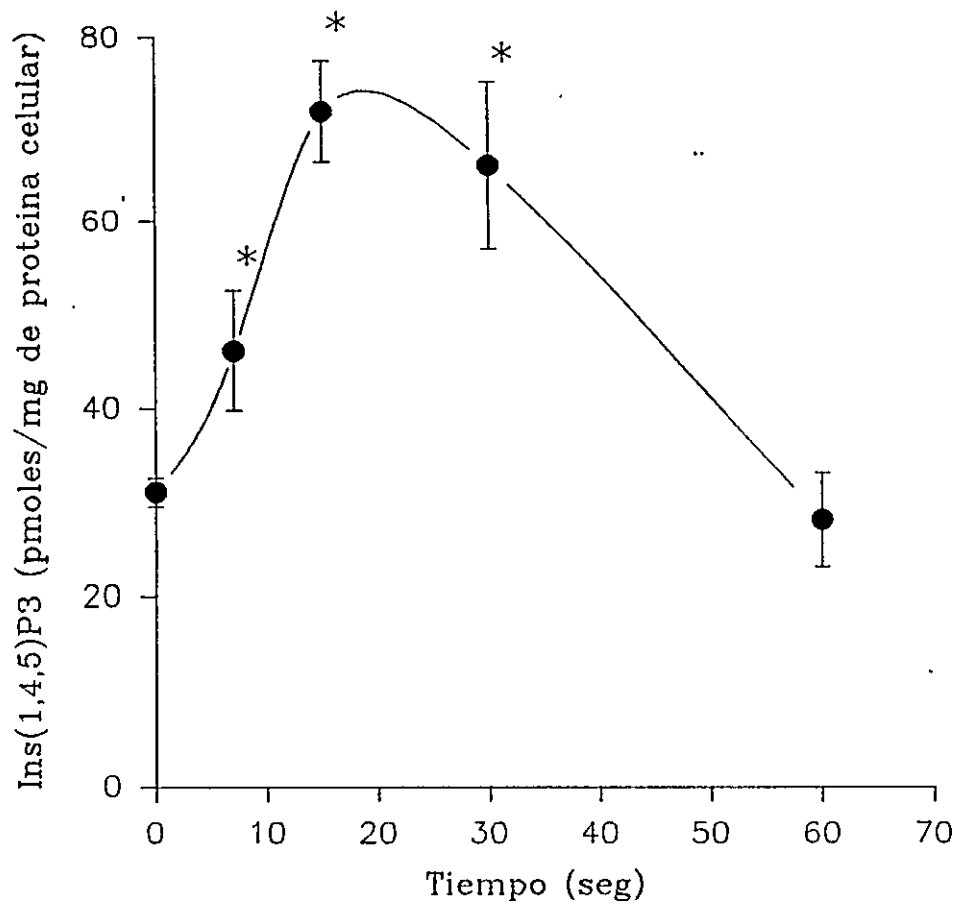


Figura 12. Efecto de Brevetoxina sobre la masa de Ins(1,4,5)P₃ en miotubos de rata en cultivo primario. Las células preincubadas en solución de reposo se estimularon con brevetoxina (1 μ M final en solución de reposo) por los tiempos indicados, midiendo la masa de Ins(1,4,5)P₃ por ensayo de radioreceptor según lo indicado en Materiales y Métodos. Cada punto corresponde al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos realizados por triplicado (*, $p < 0.02$; test de Student).

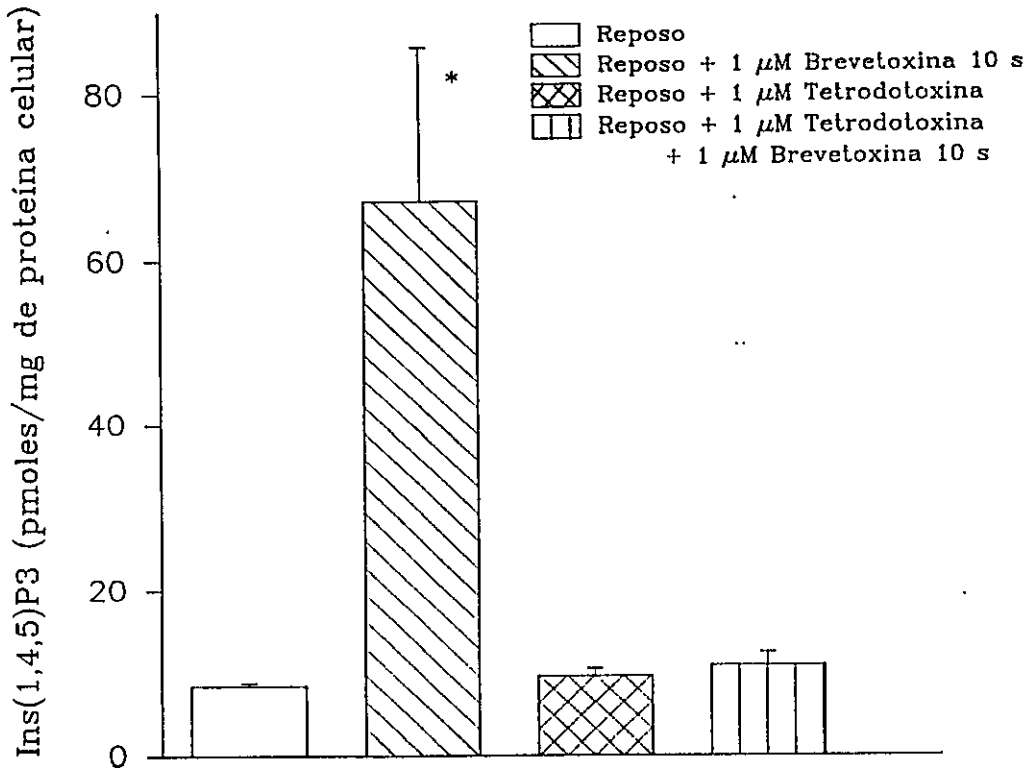


Figura 13. Efecto de tetrodotoxina sobre el aumento de Ins(1,4,5)P₃ inducido por brevetoxina. Miotubos de rata en cultivo primario preincubados en solución de reposo se estimularon por 10 segundos con 1 μ M brevetoxina en presencia o en ausencia de tetrodotoxina (1 μ M final), midiendo la masa de Ins(1,4,5)P₃ por ensayo de radioreceptor de acuerdo con lo indicado en Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos por triplicado (*, $p < 0.01$; test de Student).

despolarización en lugar de un efecto directo de sodio. Dosis similares de brevetoxina (0.3 - 1.2 μM) despolarizan el músculo diafragmático de rata y células de neuroblastoma, efecto parcialmente revertido por 0.4 μM tetrodotoxina en el último caso (Desphande y col, 1993; Sheridan y Adler, 1989).

F. Efecto de la estimulación colinérgica sobre el metabolismo de fosfoinosítidos.

1. Efecto de carbacol sobre inositolfosfatos.

Las figuras 15 A, B y C muestran el efecto de 100 μM carbacol sobre los niveles de $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ - $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ - $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ e $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ - InsP_6 respectivamente. Concentraciones entre 30 y 100 μM producen efecto máximo en una serie de otros tejidos como músculo liso, cerebro y nervio vago (Salmon y Bolton, 1988; Eva y Costa, 1986; Sierro y col, 1992; Sasaguri y Watson, 1988). En los miotubos, esta dosis de carbacol produjo un aumento significativo de $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ a tiempos largos (6 minutos) de incubación mientras que el aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ fue visible tanto a tiempos cortos (6 segundos) como a tiempos largos (6 minutos) de incubación con el agonista. No se registraron aumentos significativos en la serie de los InsP_4 ni en InsP_6 , detectándose sin embargo un aumento pequeño pero significativo en $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ a los 6 minutos de estimulación.

La figura 16 muestra el efecto de 100 μM carbacol sobre

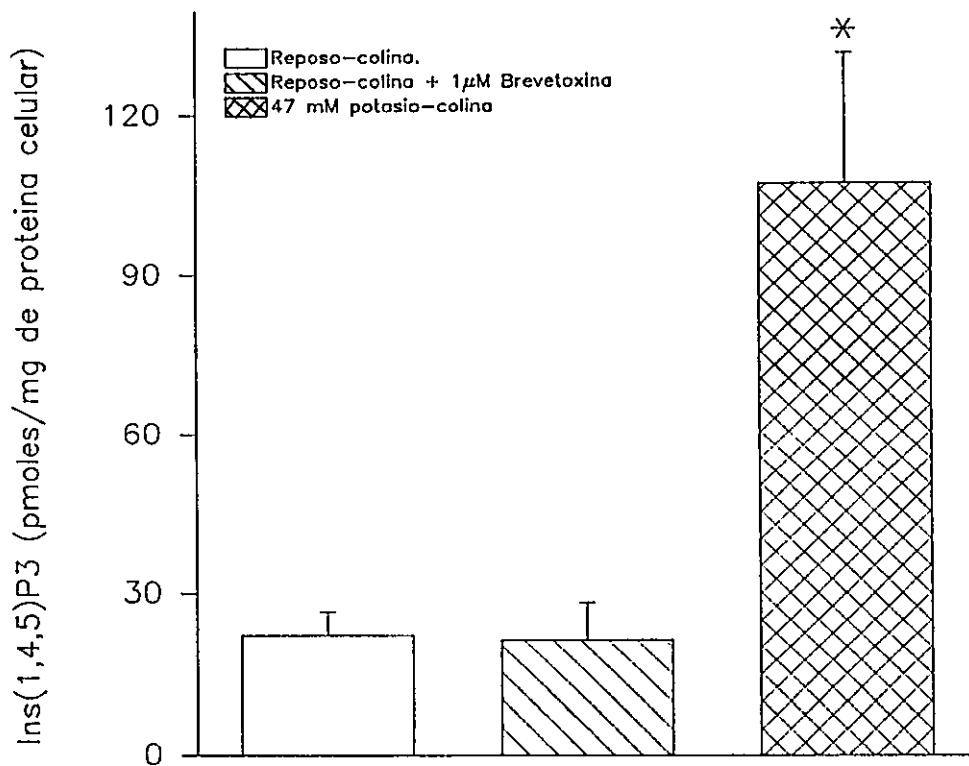


Figura 14. Efecto de la supresión del sodio sobre la síntesis de Ins(1,4,5)P₃ inducida por potasio o brevetoxina. Miotubos de rata en cultivo primario se preincubaron en solución de reposo estándar y luego en solución de reposo sin sodio (reemplazo equimolar por cloruro de colina), siendo estimulados con 1 µM brevetoxina ó 47 mM potasio en ausencia de sodio, por 10 y 5 segundos respectivamente. Se midió la masa de Ins(1,4,5)P₃ por ensayo de radioreceptor según lo descrito en Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio ± desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (*, p<0.01; test de Student).

Masa de compuesto (pmoles/mg de proteína celular)

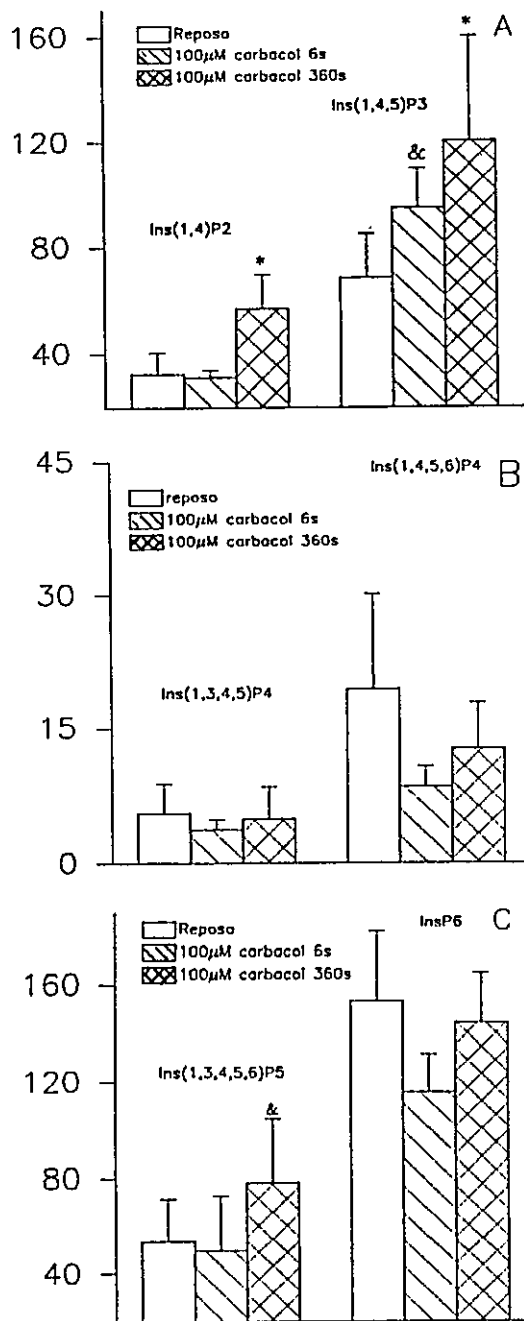


Figura 15. Masa de inositolpolifosfatos en miotubos de rata estimulados con carbaccol. Las células se preincubaron en solución de reposo y luego se estimularon con carbaccol (100 μM final) por los tiempos indicados, analizando el contenido de inositolpolifosfatos por HPLC en el extracto soluble de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio ± desviación estándar para un mínimo de 3 análisis y un máximo de 12 (*, p<0.005 y p<0.05; test de Student).

los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, medido por ensayo de radiorreceptor. El aumento primario observado fue significativo a los 2 segundos, alcanzando un máximo poco después del minuto de incubación, que se sostuvo a los 6 minutos de exposición al agonista. La aplicación de carbacol sobre miotubos premarcados con ^3H -inositol produjo un aumento temprano y sostenido de ^3H - InsP y ^3H - InsP_2 totales, similar al observado previamente sobre $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (figura 17), que no se acompañó de cambios significativos en la marca de polifosfoinositidos (datos no mostrados).

2. Efecto de atropina y tracrיום sobre la estimulación mediada por carbacol.

Se evaluó la sensibilidad del efecto mediado por carbacol a la acción de besilato de atracurio (o tracrיום), un bloqueador neuromuscular no despolarizante de los receptores nicotínicos (Miller y col, 1984), y a atropina, un antagonista de los receptores de tipo muscarínico, utilizando miotubos premarcados con ^3H -inositol.

Las figuras 18 A y B muestran el efecto de estos agentes sobre la producción de inositolfosfatos estimulados por 6 minutos con carbacol. Atropina produjo un bloqueo total del efecto máximo de carbacol en InsP e InsP_2 totales, tracrיום en cambio, produjo un bloqueo parcial del efecto, (48 % y 31 % de estimulación en presencia del antagonista, contra 110 % y 124 % en ausencia del antagonista respectivamente), pese a que la concentración $10 \mu\text{M}$ utilizada es casi 10 veces mayor

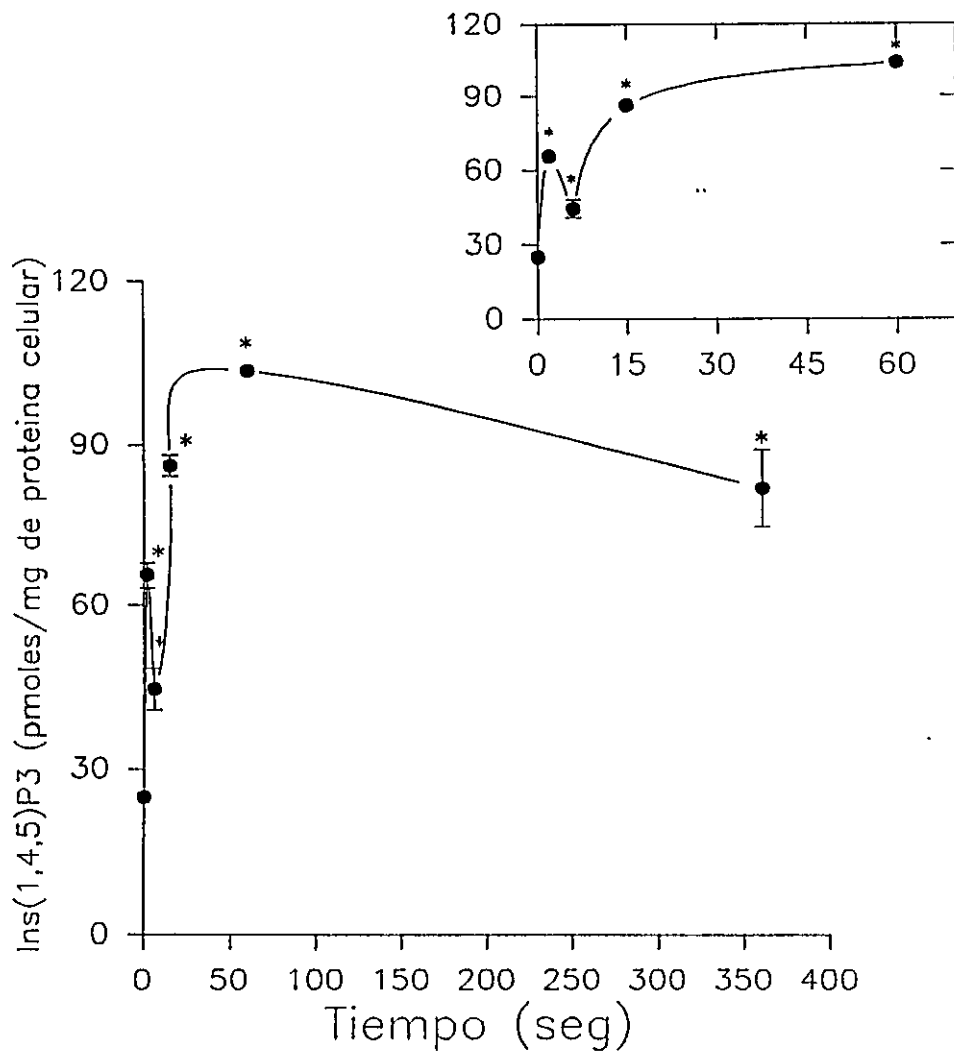


Figura 16. Efecto de carbacol sobre la masa de Ins(1,4,5)P₃ en miotubos de rata. Las células se preincubaron en solución de reposo y luego se estimularon con carbacol (100 μ M final), determinando la masa de Ins(1,4,5)P₃ por ensayo de radiorreceptor en el extracto soluble de acuerdo a Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes por duplicado o triplicado (*, p<0.01; test de Student).

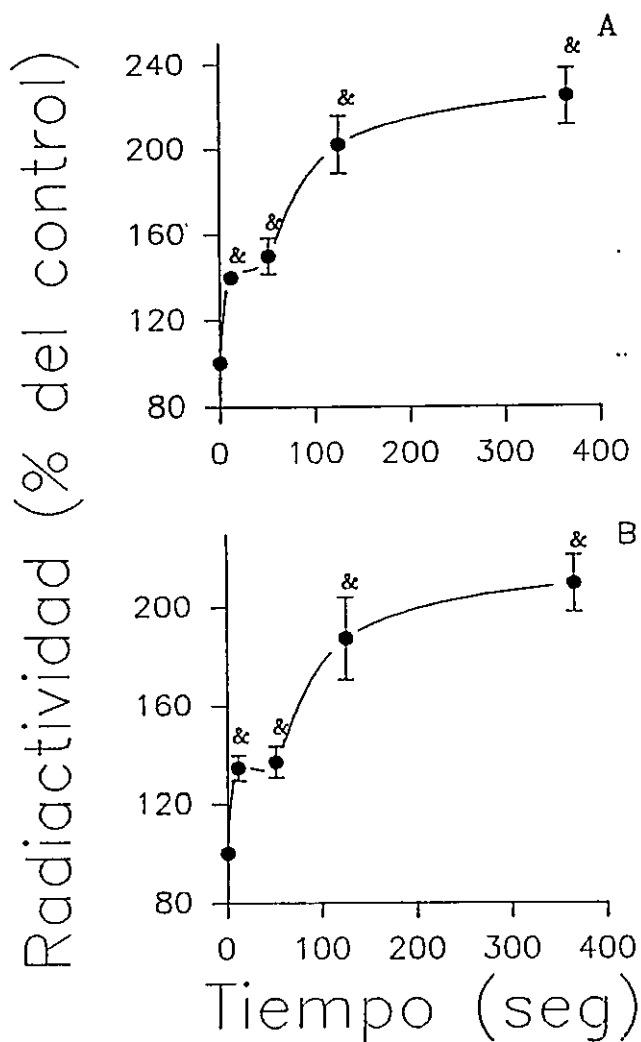


Figura 17. Efecto de carbachol sobre los niveles de marca de inositolfosfatos en microtubos de rata. Las células premarcadas con ^3H -inositol se preincubaron en solución de reposo y luego se estimularon con carbachol ($20 \mu\text{M}$ final), midiendo la radiactividad correspondiente a InsP (A) y InsP, totales (B) en el extracto soluble luego de cromatografía en Dowex-formiato de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos en triplicado (&, $p < 0.01$; test de Student).

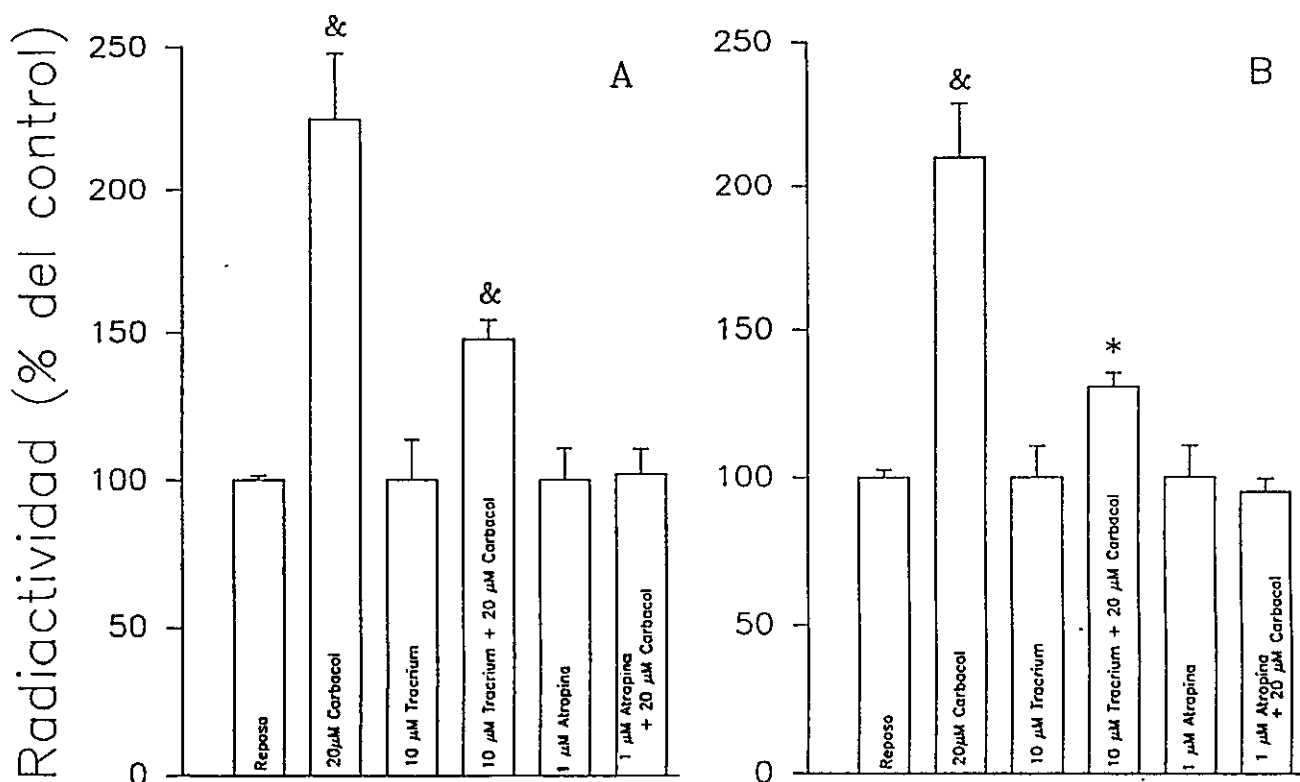


Figura 18. Efecto de atropina y tracrium sobre los niveles de ^3H -inositolfosfatos en miotubos de rata estimulados con carbacol. Las células premarcadas con ^3H -inositol se preincubaron en solución de reposo en presencia o en ausencia de 10 μM tracrium ó 1 μM atropina y luego se estimularon con 20 μM carbacol por 6 minutos, midiendo la radiactividad correspondiente a InSP (A) y InSP, totales (D) en el extracto soluble luego de cromatografía en Dowex-formiato. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado (&, $p < 0.02$ y *, $p < 0.05$; test de Student).

que la necesaria para suprimir totalmente una sacudida muscular ($0.6 \mu\text{g/ml}$ que equivale a $1.2 \mu\text{M}$; Ward y Wright, 1983). Estos resultados sugieren 2 posibilidades: una acción inespecífica de atropina, ya que dosis nanomolares previenen parcialmente el efecto de carbacol en nervio (Sierro y col, 1992) o la coexistencia de receptores muscarínicos y nicotínicos en las células de músculo esquelético de rata en cultivo primario.

3. Efecto de muscarina y de nicotina.

Para corroborar la posibilidad de coexistencia de efectos nicotínicos y muscarínicos, se midió el efecto de agonistas sobre la masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por ensayo de radiorreceptor. La figura 19 muestra el aumento de masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inducido por $100 \mu\text{M}$ nicotina utilizando esta metodología. La misma dosis de nicotina produce un aumento de calcio citosólico en la línea celular C_2C_{12} (Grassi y cols, 1993) y en este sistema (datos no mostrados). Al incubar con $100 \mu\text{M}$ nicotina se encontró un aumento significativo cuyo máximo fue alrededor de los 20 segundos. Este efecto desapareció al reemplazar sodio por colina y retirar el calcio del medio de incubación.

Al medir los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ luego de incubación con muscarina por diferentes tiempos (figura 20) también se observó aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$; en este caso el efecto fue más lento, con un máximo alrededor de los 60 segundos, disminuyendo a niveles cercanos a los basales a los 2

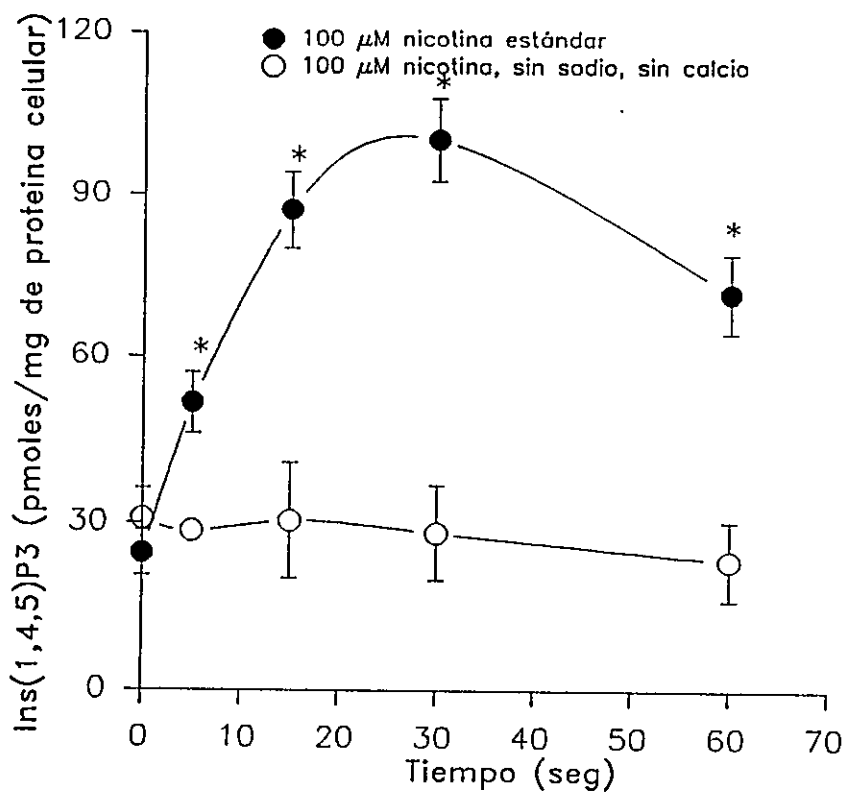


Figura 19. Síntesis de Ins(1,4,5)P₃ estimulada por nicotina: efecto de sodio y calcio extracelulares. Miotubos de rata preincubados en solución de reposo se estimularon con 100 μ M nicotina en presencia o en ausencia de sodio y calcio (reemplazo equimolar por colina), determinando la masa de Ins(1,4,5)P₃ del extracto soluble por ensayo de radiorreceptor de acuerdo a Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos realizados en triplicado (*, $p < 0.02$; test de Student).

minutos. Este aumento también se acompañó de un aumento de calcio (recuadro figura 20) de duración considerablemente mayor que el inducido por potasio.

4. Efecto de oxotremorina M, pirenzepina y 4-DAMP.

La figura 21 A muestra que 1 minuto de incubación con 10 μM oxotremorina M ($\text{ED}_{50}=2.6 \mu\text{M}$, Sierro y col, 1992) un agonista muscarínico de tipo M_1 , aumentó los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ de manera similar a 20 μM muscarina. En concordancia, 100 nM del antagonista M_1 pirenzepina ($K_d=5-30$ nM, Brown y col, 1985) previno la estimulación mediada por muscarina (21 B), mientras que 100 nM del antagonista M_3 4-DAMP no antagonizó el efecto (21 C).

5. Unión de QNB a fracción microsomal de miotubos de rata.

Puesto que los miotubos de rata presentaron una respuesta de tipo muscarínico, se procedió a evaluar la unión de QNB, un antagonista muscarínico de alta afinidad, a una fracción microsomal de miotubos de rata (Figuras 22 A y B). En la unión específica de ^3H -QNB el ajuste usado es a una curva de unión para un solo sitio del tipo $B = B_{\text{max}} \cdot x / K_d + x$ con una unión máxima (B_{max}) de 40 fmoles por mg de proteína y una constante de disociación (K_d) 0.7 nM (figura 22 B). En un ensayo de unión control realizado con una preparación de fibroblastos de rata no se detectó una unión total distinguible de la unión inespecífica (figura 23). Otros ligandos ensayados en su capacidad de desplazar una concentración fija de ^3H -QNB unido a microsomas de miotubos

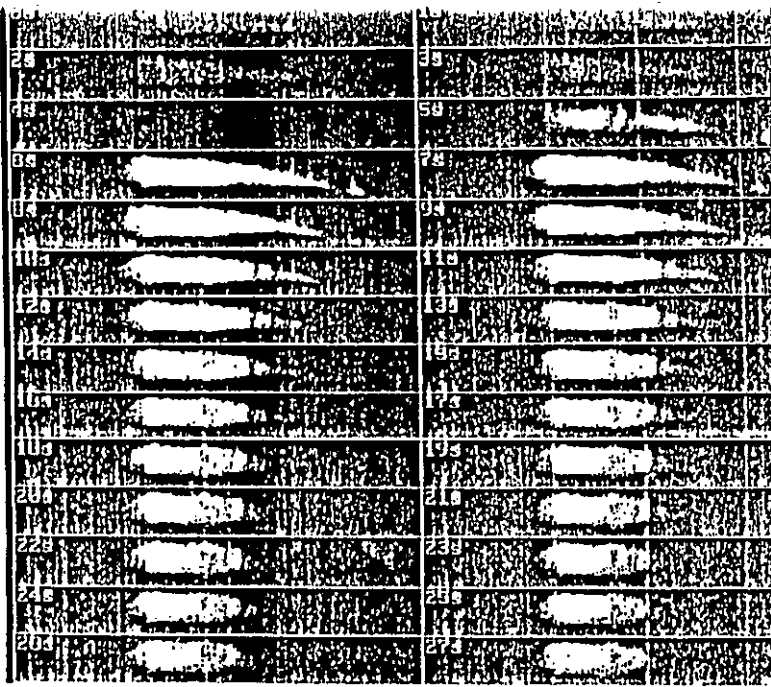
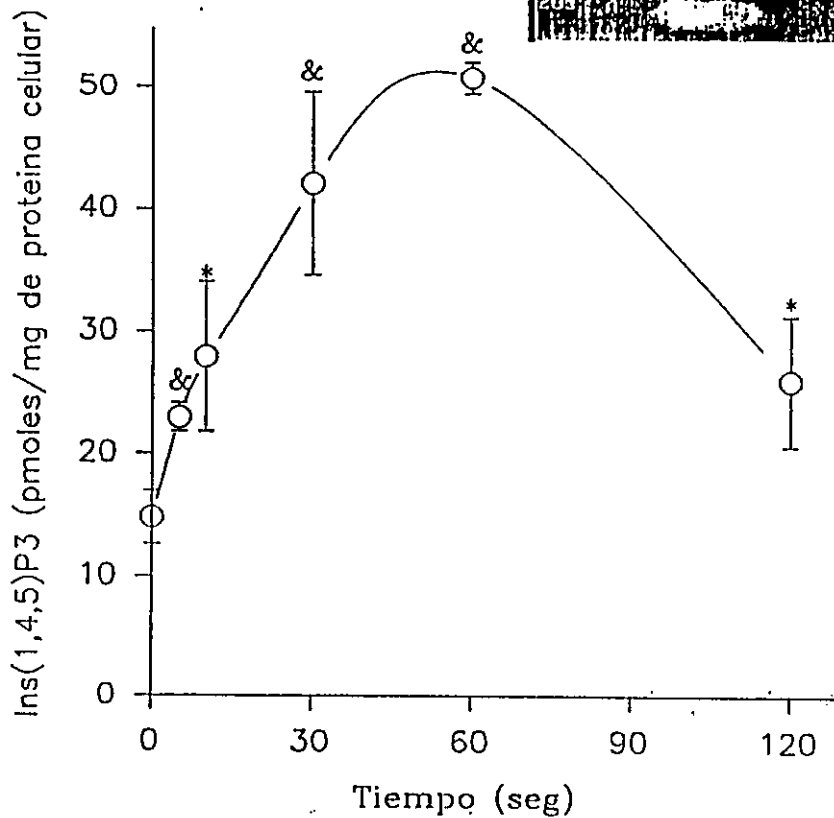


Figura 20. Síntesis de Ins(1,4,5)P₃ estimulada por muscarina en miotubos de rata. Las células preincubadas en solución de reposo se estimularon con 20 μ M muscarina, determinando la masa de Ins(1,4,5)P₃ en el extracto soluble por ensayo de radioreceptor de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos realizados en triplicado (&, $p < 0.005$ y $p < 0.05$; test de Student). La figura del recuadro muestra una secuencia de microscopía confocal (cada 1 segundo de izquierda a derecha) de la fluorescencia de calcio inducida por muscarina agregada a los 2-4 segundos en miotubos preincubados con fluo-3.

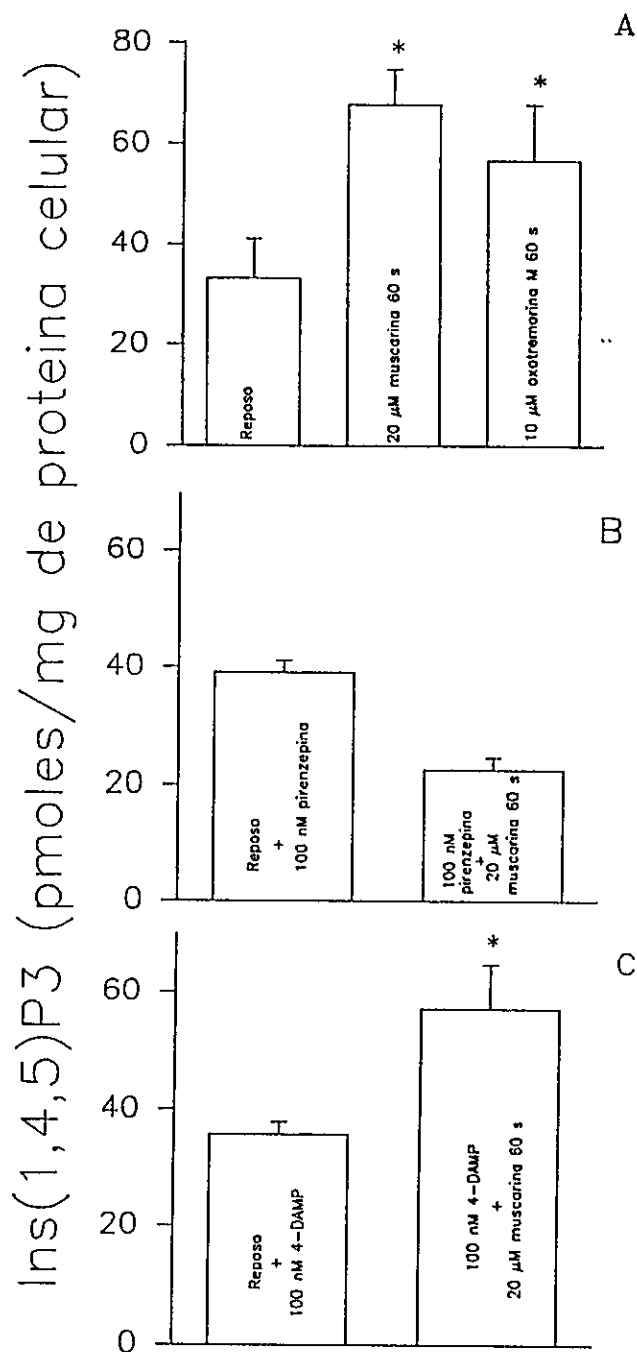


Figura 21. Efecto de agonistas y antagonistas muscarínicos sobre la síntesis de Ins(1,4,5)P₃ en miotubos de rata. Las células preincubadas en solución de reposo fueron estimuladas durante 60 segundos con 20 μM muscarina o 10 μM oxotremorina M (A); en las pruebas de antagonismo, 100 nM pirenzepina (B) ó 100 nM 4-DAMP (C) fueron adicionados 2 minutos antes de la estimulación con muscarina, determinando la masa de Ins(1,4,5)P₃ en el extracto soluble por ensayo de radiorreceptor de acuerdo a Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio ± desviación estándar de 3 experimentos en triplicado (*, p<0.05; test de Student).

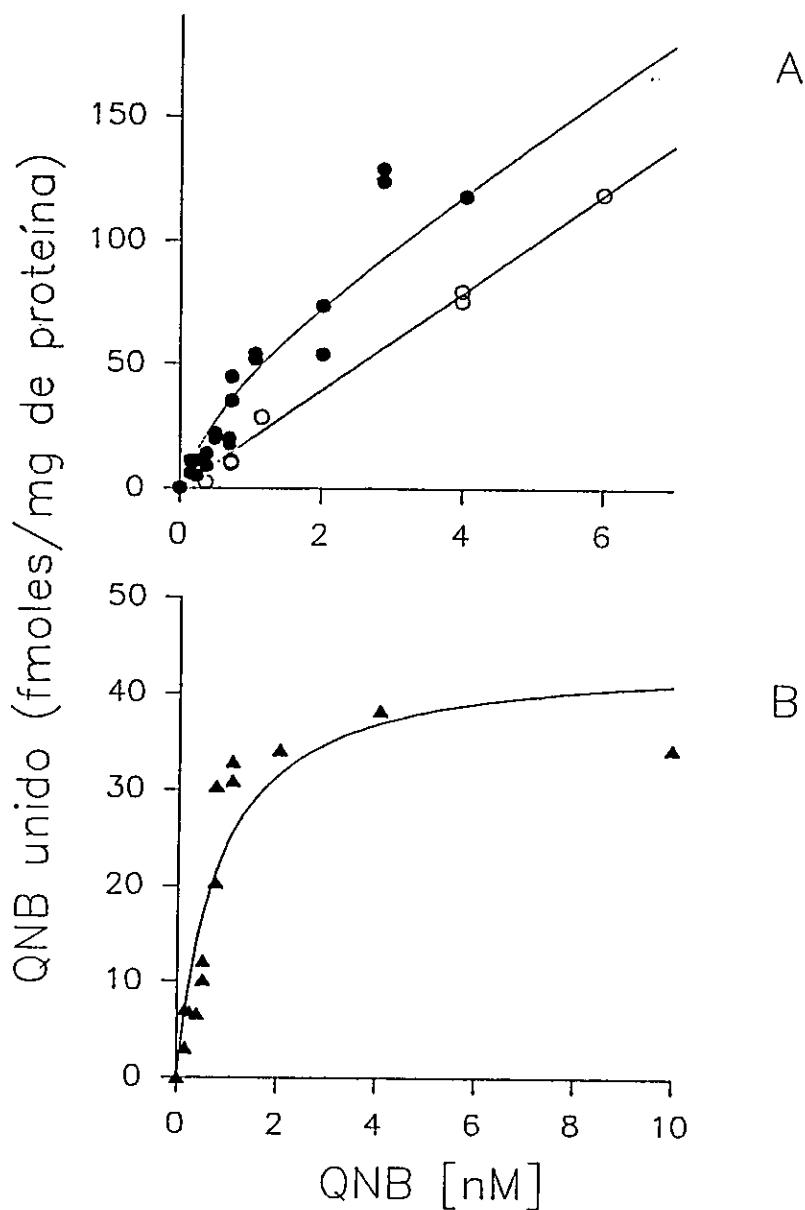


Figura 22. Ligamen de QNB a fracción microsomal de miotubos de rata en cultivo primario. Se incubaron 500 μg de proteína microsomal con 0.1 -10 nM de ^3H -QNB (43.5 Ci/mmol) en presencia o en ausencia de 1 μM QNB frío durante 40 minutos a temperatura ambiente, filtrando una alícuota en filtros de fibra de vidrio de acuerdo a Materiales y Métodos. A: ligamen total (símbolos llenos) e inespecífico (símbolos vacíos) y B: ligamen específico.

de rata como HSID y oxotremorina M funcionaron con igual o similar eficiencia mientras que atropina y muscarina lo hicieron solo en un 40 y un 20 % respectivamente (tabla 2).

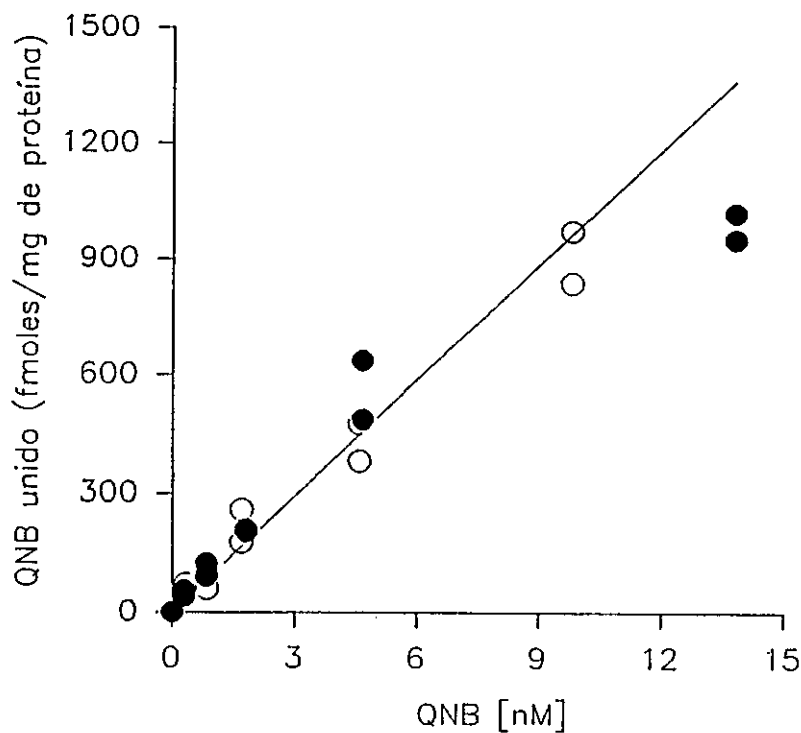


Figura 23. Ligamen de QNB a fracción microsomal de fibroblastos de rata en cultivo primario. Se incubaron 400 μg de proteína microsomal con 0.1-14 nM de ^3H -QNB (43.5 Ci/mmol) en presencia o en ausencia de 1 μM QNB frío durante 40 minutos a temperatura ambiente, filtrando una alícuota en filtros de fibra de vidrio de acuerdo a Materiales y Métodos. Los símbolos llenos representan el ligamen total y los símbolos vacíos el ligamen inespecífico.

LIGANDO	% de desplazamiento
Atropina 10 μ M	42.0
HSID 10 μ M	100.0
Oxotremorina M 10 μ M	74.0
Acetilcolina 10 μ M	4.0
Muscarina 10 μ M	20.3
QNB 1 μ M	100.0

Tabla 2. Desplazamiento de 3 H-QNB unido a fracción microsomal de miotubos rata por ligandos muscarínicos. Se incubaron 100-300 μ g de proteína de fracción microsomal de miotubos de rata con 5 nM de 3 H-QNB en presencia y en ausencia de los ligandos fríos a las concentraciones indicadas en la tabla. El resto del ensayo de ligamen se efectuó de acuerdo a Materiales y Métodos. Los porcentajes de desplazamiento (la fracción del total que es desplazada por el ligando frío) se normalizaron al desplazamiento por QNB considerando el porcentaje de desplazamiento de este último como 100%. Los resultados representan el promedio de 2 mediciones.

DISCUSION.

A. Inositolpolifosfatos y masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en reposo.

El espectro de isómeros de inositolesfosfato determinado por HPLC en células de músculo esquelético en cultivo primario resultó similar al descrito por Mayr y Thieleczek (1991) en músculo entero, salvo especies como $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$ e $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$, informadas en cantidades mínimas por estos autores en fibra muscular de rata y de rana, y no detectadas en este estudio. La masa de $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ en los miotubos de rata en cultivo primario fue 3 veces más alta que la de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$; Mayr y Thieleczek (1991) observaron esta proporción en músculo sóleo de rata, mientras que en músculo gastrocnemio de rata y en fibras musculares rápidas de rana la cantidad de ambos isómeros resultó similar. El origen de $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ puede explicarse por la presencia de una $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - 6 quinasa similar a la descrita en vegetales (Chattaway y cols, 1992) o por desfosforilación de $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ como se ha propuesto para una serie de sistemas eucariontes no vegetales (Hughes y Michell, 1993). Se requieren experimentos *in vitro* usando los sustratos específicos marcados para dilucidar este punto. En analogía a lo descrito para fibra muscular y para otros sistemas como eritrocitos y células GH_3 , se detectó InsP_6 en

cantidades elevadas (Mayr y Thieleczek, 1991; Radenberg y cols, 1989; Dean y Moyer, 1988) incluso mayores que $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. La síntesis de este compuesto puede ocurrir por fosforilación de $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_3$ (Hughes y Michell, 1993; Menniti y cols, 1993) o por fosforilación secuencial de inositol (Stephens e Irvine, 1990); tanto la masa de $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_3$, así como la elevada proporción de marca correspondiente a inositol libre, son compatibles con cualquiera de estas posibilidades en las células de músculo esquelético en cultivo primario.

Los niveles basales de masa de inositoltrisfosfato en reposo se distribuyen en dos poblaciones; una mayoritaria, con niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, relativamente bajos y que aumentan en respuesta a la estimulación con potasio y una población de cultivos con una masa de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, sobre 50 pmoles por mg de proteína celular pero con menor frecuencia de respuesta positiva a potasio. Las diferencias se manifiestan entre un cultivo y otro y no entre distintas placas de un mismo cultivo; tanto la amplitud del rango como la existencia de distintas poblaciones sugiere que diferencias del estado metabólico entre cultivos independientes pueden influir sobre los niveles basales de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Es posible que exista un valor límite de $\text{ins}(1,4,5)\text{P}_3$ basal por sobre el cual ya no se registran respuestas positivas, lo que explicaría la menor respuesta de poblaciones con basales elevados. En ocasiones,

estas diferencias hicieron necesario normalizar los datos provenientes de experimentos independientes para su comparación. Estos resultados sugieren por lo tanto que los cultivos con un rango de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en reposo entre 10 y 50 pmoles por mg de proteína celular son los apropiados para nuestro estudio. Nosek y cols (1990) informan para músculo esquelético diafragmático de rata un valor de 28 pmoles por mg de proteína, mientras que Mayr y Thieleczek (1991) reportan valores que fluctúan entre 0.7 y 1.5 nmoles por gramo de tejido húmedo en músculo de rata y de rana, los que convertidos a pmoles por mg de proteína suponiendo 50 mg de proteína por gramo de tejido húmedo según determinaciones realizadas con cultivos primarios en esta tesis (datos no mostrados), arrojan un rango de 14 a 30 pmoles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en reposo. Estos valores no presentan grandes diferencias con aquellos medidos en esta tesis. La masa en reposo de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ detectada por HPLC fue de 68 pmoles por mg de proteína celular (rango 43 - 95 pmoles/mg de proteína celular), mientras que el valor medido por ensayo de radiorreceptor presentó un promedio de 28.4 pmoles por mg de proteína celular. Sin embargo, considerando la menor recuperación de proteínas luego de la extracción orgánica de fosfolípidos del pellet celular en las muestras analizadas por HPLC y la distribución de los basales en 2 poblaciones, el valor promedio de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ obtenido por HPLC debe

corregirse a 35.0 ± 7.1 pmoles por mg de proteína celular (rango 25 - 50 pmoles/mg de proteína celular). Este valor se aproxima mucho más al valor promedio detectado por ensayo de radiorreceptor.

B. Potencial de membrana y metabolismo de fosfoinosítidos.

Los miotubos de rata en cultivo primario presentaron un potencial de reposo promedio del orden de -40.0 mV (rango -38 mV a -64 mV) al medir con microelectrodos. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Ritchie y Fambrough (1975), quienes estudiaron el potencial de membrana en miotubos de rata en cultivo primario bajo una serie de condiciones detectando valores promedio de reposo progresivamente más negativos con la edad del cultivo alcanzando máximos entre -40 y -50 mV entre los 6 y los 9 días de cultivo; ellos alcanzaron alrededor de -20 mV aproximadamente a 50 mM potasio, y se desviaron levemente de la linealidad con respecto al logaritmo de la concentración de potasio en analogía a lo observado en esta tesis. Nuestro promedio se obtuvo midiendo en un número considerable de células y existió un grado de dispersión importante, existiendo un número considerable de células con un valor cercano o igual al valor de -60 mV informado para células seleccionadas en diferentes preparaciones de células

musculares en cultivo (Boldin y cols, 1987; Light y cols, 1994) y bajo condiciones experimentales que incluyen en algunos casos la presencia de bloqueadores de canales de sodio como tetrodotoxina.

Midiendo las variaciones de inositolesfosfato con tres metodologías diferentes se demostró consistentemente que la despolarización con potasio promueve el aumento de los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y derivados, apoyando y extendiendo observaciones previas en fibra muscular aislada de rata y de rana (Vergara y cols, 1985; Mayr y Thieleczek, 1991; Dong y cols, 1992). El aumento máximo de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ se alcanzó alrededor de los 40 mM potasio (figura 6); una concentración similar de potasio (42 mM) promueve el aumento máximo de calcio en miotubos (Jaimovich y Rojas, 1994). El incremento de inositolfosfatos inducido por despolarización con 47 mM potasio resultó visible a los 5 segundos como masa de $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ e $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (figura 5 A) medidos por HPLC y fue detectable a los 2 segundos de despolarización (figura 7) al ser medida por ensayo de radiorreceptor, de mejor resolución temporal. A este aumento temprano parece seguir una disminución parcial y un nuevo aumento que resulta visible hasta los 60 segundos de despolarización (figuras 5 A y 7). El aumento temprano de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ promovido por potasio se reprodujo en ausencia de calcio en el medio de incubación (figura 9), con leves diferencias en la parte tardía del

efecto; sin embargo, se requieren experimentos cinéticos más detallados, con mayor número de puntos entre 0 y 60 segundos de despolarización para dilucidar si el efecto es realmente bifásico y si la "fase tardía" cambia significativamente al suprimir el calcio extracelular. Suponiendo un volumen de 0.58 ml/g de tejido húmedo (Baylor y cols, 1983) y por lo tanto de 9.7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de proteína celular (según datos obtenidos en este trabajo de tesis) y suponiendo una masa mínima de InsP a partir de los datos de distribución de ^3H -inositol y de la masa corregida medida por HPLC para otros inositolfosfatos, puede inferirse que InsP, Ins(1,4)P₂ e Ins(1,4,5)P₃ aumentaron desde una concentración de reposo de 2.8-4.0 μM , 1.2-2.3 μM y 2.0-5.0 μM hasta un máximo de 4.6-6.8 μM , 2.9-4.0 μM y 7.0-12.0 μM respectivamente; estos valores son semejantes a aquellos calculados por Mayr y Thieleczek (1991) en fibra muscular aislada, y suponen que la totalidad de los inositolesfosfatos se encuentra bajo forma soluble en el mioplasma. Sin embargo una serie de proteínas presentes en la tríada pueden unir inositolfosfatos con gran afinidad *in vitro*; aldolasa A y B unen inositolfosfatos y especialmente Ins(1,4,5)P₃ con una afinidad mayor pudiendo ser desplazados *in vitro* por el sustrato fructosa 1,6-difosfato que también aumenta durante la activación contráctil (Thieleczek y cols, 1989; Mayr y Thieleczek, 1991). También se detectaron grandes cantidades de Ins(1,4,5)P₃ unido a

preparaciones de túbulo transversal y de tríada de músculo anfibio (Hidalgo y cols, 1993). Si esto se verifica en los miotubos de rata y refleja la situación *in vivo*, es posible que en reposo, estas concentraciones sean menores, y que su incremento sea más notorio si se supone que la despolarización afecta no solo los niveles de síntesis de los inositolesfosfato sino que también la afinidad de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por estas estructuras (Hidalgo y Jaimovich, 1989, Mayr y Thieleczek, 1991; Hidalgo y cols, 1993). Por otra parte, el aumento de InsP , $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ e $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ sugiere que el catabolismo del inositoltrisfosfato recién sintetizado ocurriría preferentemente vía desfosforilación y no vía fosforilación de la molécula de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, ya que la masa de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ y de los restantes inositolpolifosfatos superiores no cambió con los estímulos; ello no implica la inexistencia de un flujo de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ hacia esta vía ya que se ha demostrado la existencia de actividades 3-quinasa significativas en músculo esquelético de rana y en células musculares en cultivo (Carrasco y cols, 1993a, Carrasco, comunicación personal). Se han descrito valores de K_m y V_{max} de 15 a 25 μM , y de .20 a 44 nmoles/mg/min para las actividades de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ fosfatasa de músculo esquelético de conejo y de rana respectivamente (Milani y cols, 1988; Sánchez y cols, 1991). No se ha caracterizado esta enzima para miotubos de rata en cultivo, pero suponiendo

características similares a las recién mencionadas y un comportamiento tipo Michaelis-Menten, a la concentración de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y derivados alcanzada en condiciones de estimulación, se deduce una capacidad de hidrolizar entre 100 y 200 pmoles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3/\text{mg}/\text{seg}$. Puesto que se generan no más de 65 pmoles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3/\text{mg}/\text{seg}$ sobre el valor basal al despolarizar con potasio, es posible suponer que el alza de InsP e $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ provenga de la desfosforilación del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ sintetizado. No se descarta sin embargo, un alza de InsP e $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ producto de la hidrólisis de PI y PIP respectivamente, aún cuando los requerimientos de calcio y los valores de K_m descritos para fosfolipasa C de músculo esquelético de conejo no favorecen el rol de estos compuestos como sustratos (Windhofer y cols, 1992). Finalmente, si bien la ausencia de calcio extracelular no elimina un aumento temprano de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ promovido por potasio, no se descarta la participación de un flujo de entrada de calcio en la modulación de la respuesta. La liberación de calcio desde reservorios intracelulares en músculo esquelético se produce en ausencia de calcio en el medio extracelular (Armstrong y cols, 1972; Mc Cleskey, 1985), fenómeno corroborado en miotubos en cultivo (Jaimovich y Rojas, 1994; recuadro de figura 12 de esta tesis). La observación de niveles basales de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ elevados en miotubos cuyos reservorios intracelulares de calcio han sido depletados y bloqueados por

preincubación con rianodina, y el aumento adicional de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por acción de potasio bajo estas condiciones, (figura 11) sugieren una acción del potencial de membrana *per se* sobre fosfolipasa C, independiente de que pueda existir una estimulación adicional de dicha respuesta por el calcio citosólico, en analogía a lo propuesto para células SH-SY5Y (Wojcikiewicz y Nahorski, 1993). Esta observación es compatible con la dependencia de calcio de PIP quinasa y fosfolipasa C descritas en músculo y en otros tejidos (Carrasco y cols, 1988; Fowler y Tiger, 1991; Fischer y cols, 1992; Carrasco y cols, 1993).

Estudios del metabolismo de fosfoinosítidos en otros sistemas excitables como cortes de cerebro y preparación de sinaptosomas demuestran una marcada sensibilidad a agonistas y antagonistas de los canales de sodio. Drogas que activan canales de sodio sensibles a voltaje, como veratridina y batracotoxina inducen una acumulación de inositolfosfatos, mientras que antagonistas como tetrodotoxina previenen el efecto (Audigier y cols, 1988; Gusovsky y cols, 1986). Esto permitió postular la posibilidad de un efecto activador o modulador de los iones sodio sobre la actividad de fosfolipasa C, ya sea por acción directa o indirectamente por activación del intercambiador de sodio-calcio (Gusovsky y Daly, 1988). En concordancia con estos datos, la aplicación de brevetoxina produjo un incremento transitorio de

Ins(1,4,5)P₃ en miotubos de rata (figura 12) que fue antagonizado por tetrodotoxina (figura 13). Sin embargo, pese a que el reemplazo de sodio y litio por colina previene el efecto de brevetoxina, no previene el efecto de potasio (figura 14) sugiriendo que en este sistema el flujo de entrada de iones sodio *per se* no sería responsable del aumento de la síntesis de Ins(1,4,5)P₃, y que el efecto de brevetoxina estaría mediado por despolarización de la membrana, producto de la entrada de sodio. La concentración de brevetoxina utilizada (1 μM) produce una despolarización en nervio frénico y músculo diafragmático de rata, así como en células de neuroblastoma, la que es antagonizada por tetrodotoxina (Desphande y cols, 1993; Sheridan y Adler, 1989).

C. Receptores colinérgicos y metabolismo de fosfoinosítidos.

Hasta ahora, solo se ha demostrado la expresión de receptores colinérgicos de tipo nicotínico en músculo esquelético, los que comienzan a expresarse durante la miogénesis temprana, siendo detectables en los mioblastos mononucleados, aumentando notoriamente durante la fusión de los mioblastos para formar miotubos multinucleados (Inestroza, 1982).

En esta tesis se ha demostrado claramente que carbacol

estimula la síntesis de inositolfosfatos en miotubos de rata en cultivo primario, confirmando y extendiendo observaciones preliminares realizadas en miotubos de pollo y en la línea celular C₂C₁₂ (Adamo y cols, 1985; Giovanelli y cols, 1991).

Carbacol induce el aumento de InsP, Ins(1,4)P₂, Ins(1,4,5)P₃ e Ins(1,3,4,5,6)P₅ (figuras 15, 16 y 17). Estos resultados concuerdan en general con el aumento de InsP descrito por Adamo y cols (1985) en miotubos de pollo y con el aumento de Ins(1,4,5)P₃ en la línea celular miogénica C₂C₁₂ (Giovanelli y cols, 1991) generado en ambos casos por acción de acetilcolina. Por otra parte, el aumento de Ins(1,3,4,5,6)P₅ por estimulación colinérgica constituye una observación tangencial en esta tesis; se han descrito aumentos de este inositolpolifosfato inducidos por estimulación de receptores en linfocitos T y en la línea celular HL-60 (Guse y Emmrich, 1992; Pittet y cols, 1989) y se ha propuesto que su síntesis ocurriría por la siguiente secuencia: Ins(1,4,5)P₃ - Ins(1,3,4,5)P₄ - Ins(1,3,4)P₃ - Ins(1,3,4,6)P₄ - Ins(1,3,4,5,6)P₅ según lo informado para cerebro de rata (Stephens y cols, 1990). Sin embargo, no se detecta la presencia de Ins(1,3,4,6)P₄ en miotubos de rata en cultivo primario (tabla 1) lo que sugiere que la síntesis de Ins(1,3,4,5,6)P₅ podría explicarse mejor por fosforilación sucesiva de Ins(1,4,5)P₃ primero en posición 6 y luego en posición 3 como se ha descrito para sistemas vegetales

(Chattaway y cols, 1992) o por fosforilación de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ según lo descrito para oocito de *Xenopus laevis* (Mc Intosh y Mc Intosh, 1990). Se requiere un estudio más detallado para resolver este punto.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que en miotubos de músculo esquelético de rata en cultivo primario existirían efectos colinérgicos de tipo nicotínico y muscarínico sobre la síntesis de inositolesfosfato. Esta es la primera vez que se plantea la existencia de efectos muscarínicos en células de músculo esquelético. En efecto, el antagonismo tanto de tracrimum como de atropina sobre la estimulación de la síntesis de inositolesfosfato mediada por carbacol (figura 18), y los aumentos de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inducidos por nicotina y por muscarina (figuras 19 y 20) son consistentes con la coexistencia de una vía muscarínica y una nicotínica en miotubos de rata en cultivo primario. Estos resultados no concuerdan con lo observado en la línea celular miogénica C_2C_{12} donde se pudo detectar una elevación de los niveles de calcio intracelular y de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ por acción de nicotina pero no de muscarina (Grassi y cols, 1993) a la misma concentración ($100 \mu\text{M}$) utilizada en parte de esta tesis. La discrepancia entre estos resultados tiene dos posibles explicaciones: primero, una diferencia propia del modelo de estudio ya que es posible que la línea celular no exprese la vía de tipo muscarínico mientras que al menos una

parte de la población de células en cultivo primario sí lo haga y la segunda, que la elevación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en la línea C_2C_{12} sea más lenta requiriendo tiempos de estimulación mayores de los 4 segundos utilizados por Grassi y cols (1993) para ser detectada. El efecto muscarínico es compatible con la elevación de calcio observada con muscarina sobre miotubos de rata en cultivo primario estudiados individualmente (figura 20, recuadro); en dicho estudio alrededor del 50% de la población celular respondió a muscarina. Por otra parte la unión específica y saturable de QNB a miotubos (figura 22) y la falta de ésta en fibroblastos, habitualmente presentes en un 5-10 % como contaminación (figura 23), refuerzan los hallazgos de efectos muscarínicos comunicados en esta tesis. El valor de K_d no está determinado con precisión debido al bajo número de receptores presentes en la preparación, por lo que la actividad específica del QNB tritiado disponible fue insuficiente para detectar con exactitud el ligamen en el rango de 0.015 a 0.15 nM de K_d informado para el receptor de miocardiocito (Brown y Goldstein, 1986; Cavey y cols, 1979). Nuestros datos en todo caso indicaron un K_d menor o igual a 0.7 nM.

Se han clonado cinco especies moleculares de receptores muscarínicos; solo las del tipo M_1 , M_3 y M_5 se encuentran asociadas a metabolismo de fosfoinositidos (Hosey, 1992; Gusovsky y cols, 1993). Sin embargo, desde el punto de vista

farmacológico solo es posible clasificar la serie $M_1 - M_2 - M_3$. El aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y el desplazamiento parcial de QNB inducidos por el agonista M_1 oxotremorina M , el bloqueo del efecto máximo de muscarina por acción del antagonista M_1 pirenzepina y la falta de efecto del antagonista M_3 4-DAMP constituyen evidencia adicional en favor de una vía de estimulación muscarínica acoplada al metabolismo de fosfoinosítidos en células de músculo esquelético de rata en cultivo primario, y sugieren una clasificación dentro del subtipo M_1 (figura 21), aunque no se puede descartar totalmente la presencia de receptores de otro tipo.

El experimento de la figura 19 muestra que el efecto de nicotina se suprime totalmente al eliminar el sodio y el calcio del medio de incubación, indicando que el flujo de estos iones a través del poro del receptor nicotínico activado es indispensable para el acoplamiento entre el receptor y la fosfolipasa C. Este resultado es compatible con la supresión de la señal de calcio inducida por nicotina al suprimir el sodio extracelular descrita en la línea C_2C_{12} por Grassi y cols (1993). Al excluir los cationes permeantes del medio de incubación se suprimen en consecuencia el flujo iónico y la despolarización resultantes, por lo tanto se hace consistente plantear que la activación nicotínica del metabolismo de fosfoinosítidos sería mediada por despolarización. En efecto, de observaciones preliminares

realizadas en miotubos de pollo se ha planteado que el curso temporal de la despolarización inducida por acetilcolina sería totalmente compatible con el curso temporal de la síntesis de InsP inducida por este agonista (Adamo y cols, 1985; Eusebi y cols, 1985). La independencia de la entrada de sodio y calcio en relación con el aumento de Ins(1,4,5)P₃ inducido por despolarización demostrados en esta tesis, constituyen respaldo adicional a esta interpretación. Sin embargo, una acción per se del flujo de sodio y/o calcio a través del canal nicotínico no puede ser totalmente descartada.

D. Acerca de la función fisiológica del metabolismo de fosfoinosítidos en músculo esquelético.

Una serie de estudios comentados más extensamente en la introducción de esta tesis, y centrados en la caracterización del metabolismo de fosfoinosítidos por una parte, y en las estructuras y la dinámica propias de los procesos de liberación de calcio inducidos por Ins(1,4,5)P₃ en diferentes modelos de estudio de músculo esquelético por otra, han aportado evidencia a favor y en contra de una función como mensajero químico para esta molécula (Vergara y cols, 1985; Volpe y cols, 1985; Hidalgo y Jaimovich, 1989; Jaimovich, 1991; Foster, 1994), o bien han permitido suponer un rol

modulador más que mediador de la contracción muscular. La pregunta sigue abierta.

Una requisito esencial para que $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ pueda ser mensajero químico en el acoplamiento E.C. es que su incremento anteceda el alza de calcio, es decir debe ocurrir en milisegundos (Vergara y cols, 1987). En este trabajo, la concentración de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aumentó hasta 4 veces a los 2 segundos de despolarización, la mejor resolución temporal alcanzable; no nos es posible descartar un incremento similar o mayor a tiempos menores. Esta falta de resolución temporal y la sensibilidad de la fosfolipasa C *in vitro* al calcio intracelular (Carrasco y cols, 1993; Windhofer y cols, 1992) hacen difícil discriminar si el aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ es causa o consecuencia del aumento de calcio concomitante. En este sentido, la respuesta a potasio observada en células preincubadas con rianodina, sugiere que al menos parte de la respuesta primaria no requiere de un aumento previo o simultáneo de calcio, pero los basales elevados en esos mismos experimentos sugieren que el calcio citosólico también puede afectar la respuesta. Un aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ posterior al aumento de calcio, podría tener una función moduladora, por ejemplo en la mantención de la respuesta contráctil. En consistencia con esta posibilidad, en una comunicación preliminar, se asocia la fatiga muscular una disminución del reservorio de polifosfoinositidos (Anderson

y Zavec, 1990). Otras funciones como el acoplamiento entre la contracción y la glicólisis en músculo oxidativo en una escala temporal de segundos tampoco pueden ser descartadas en este caso (Mayr y Thieleczek, 1991).

La concentración de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ se eleva por despolarización o por estimulación colinérgica de miotubos de rata en cultivo primario desde basales estimados del orden de 2 a 5 μM hasta máximos de 7 a 12 μM (figuras 5, 7 y 8); los canales de calcio de retículo sarcoplasmático incorporados en bicapas planas alcanzan la mitad de la activación máxima a concentraciones de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ del orden de 10 μM o menos (Suárez-Isla y cols, 1990). El potencial de membrana podría regular la sensibilidad del sistema de liberación de calcio de músculo esquelético a la acción del mensajero (Donaldson y cols, 1988; Hannon y cols, 1988, Rojas y Jaimovich, 1990), con lo que los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ alcanzados lograrían un mayor efecto. Por otra parte si la despolarización disminuyera la capacidad de unión de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ a proteínas de la tríada, resulta factible un incremento muy temprano del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ previamente formado antes de la activación de la fosfolipasa C, posibilitando su participación en respuestas rápidas como el acoplamiento E.C. (Hidalgo y cols, 1993).

Un resultado inesperado de esta tesis lo constituye el hallazgo de una respuesta muscarínica, farmacológicamente clasificable como de tipo M_1 (figuras 19 y 20) en los miotubos

de rata en cultivo primario. Su rol fisiológico en este sistema resulta desconocido pero puesto que no se ha detectado su presencia en músculo adulto, es posible que estos receptores tengan una función durante la miogénesis temprana, y que desaparezcan en el curso de la maduración de la célula muscular. En el futuro, resultaría interesante estudiar el cambio de la respuesta a muscarina en las distintas etapas de la miogénesis.

CONCLUSIONES.

Las conclusiones extraídas del conjunto de resultados presentados y discutidos en esta tesis pueden resumirse así:

1. Los miotubos de rata en cultivo primario cuentan con el ciclo metabólico completo para la síntesis y degradación de fosfoinosítidos e inositolfosfatos. La red metabólica de fosfoinosítidos e inositolfosfatos es compleja e incluye al menos 15 reacciones: se detectaron 11 inositolfosfatos y 3 fosfoinosítidos. Todas las posibles transformaciones metabólicas que conforman esta red se presentan sumariamente en el esquema II.
2. La masa promedio de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ de miotubos de rata en reposo medida con dos métodos diferentes, es entre 28 y 35 pmoles por mg de proteína celular lo que significa un rango de concentración de 2-4 μM si el compuesto estuviese libre en el citosol.
3. La despolarización con potasio estimula la síntesis de inositolfosfato en forma rápida (2 segundos) y transitoria. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aumenta 2-3 veces (de 2-4 μM a 7-12 μM).
4. Hay un aumento temprano de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ promovido por potasio que es independiente de los flujos de entrada de

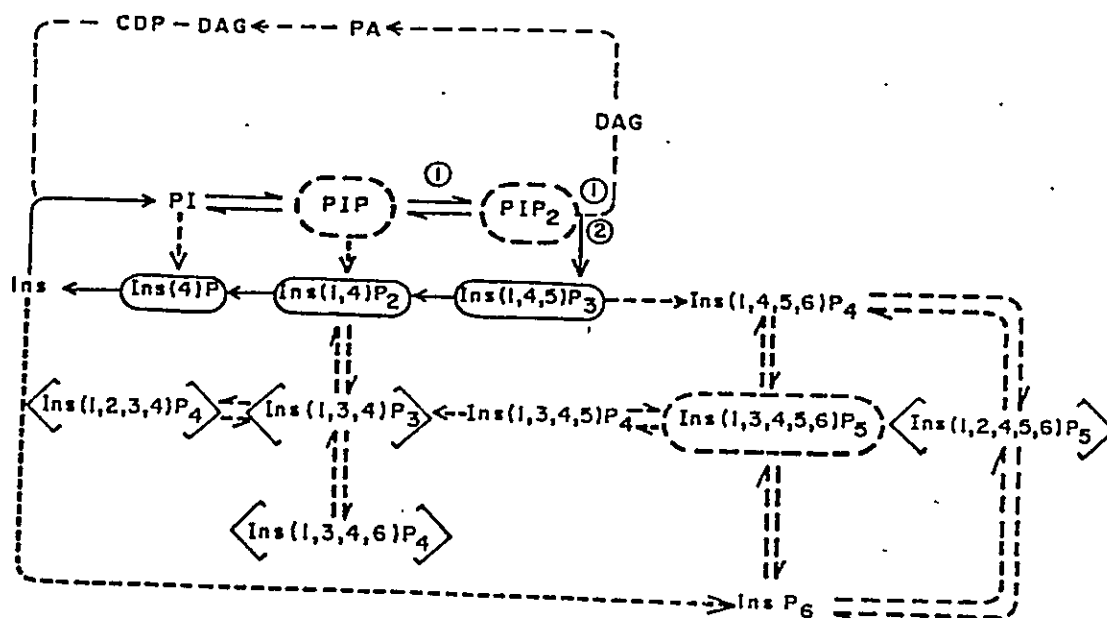
calcio o de sodio; por otra parte, si bien el aumento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ se acompaña en general de un aumento del calcio citosólico, se evidencia también en condiciones en que la variación de este último es mínima o inexistente.

5. El miotubo de rata tiene receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos (probablemente de tipo M_1). Estos últimos se encontrarían en bajo número (40 fmoles/mg de proteína microsomal) y su K_d para quinuclidilbenzilato sería inferior a 0.7 nM.

6. La estimulación muscarínica produce un aumento más lento de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (máximo alrededor de los 60 segundos) y más prolongado que la estimulación con potasio. Al mismo tiempo, la muscarina produce un aumento del calcio citosólico.

7. La estimulación nicotínica de la síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ depende de sodio y/o calcio extracelulares y ocurre probablemente vía despolarización de la membrana.

8. Existen al menos dos vías independientes de estimulación del metabolismo de inositolfosfatos en músculo esquelético en cultivo; una mediada por el potencial de membrana y otra mediada por receptores muscarínicos.



Estímulos : ① Despolarización (K^+ , Brevetoxina, nicotina)
 ② Receptor muscarínico M_1

- Cambios mayores con el estímulo
- Cambios menores con el estímulo
- Vías demostradas en músculo esquelético
- No estudiados
- Vías posibles de síntesis
- Cantidades en el límite de detección

Esquema II. Metabolismo de los fosfolípidos de inositol e inositolpolifosfatos propuesto para células de músculo esquelético de rata en cultivo primario. El esquema se propone en función del espectro de isómeros detectados por HPLC y de los cambios inducidos por despolarización o estimulación colinérgica principalmente sobre los inositolfosfatos y en segundo lugar sobre los fosfolípidos de inositol. Las reacciones con flecha en línea punteada denotan que el producto de las mismas solo fue detectado bajo condición de reposo mientras que las reacciones con flecha en línea continua señalan productos presentes en todas las condiciones ensayadas.

BIBLIOGRAFIA

- Adamo, S., Zani, B.M., Nervi, C., Senni, M.I., Molinaro, M. y Eusebi, F. (1985). Acetylcholine stimulates phosphatidylinositol turnover at nicotinic receptors of cultured myotubes. *FEBS. Lett.* 190: 161 - 164.
- Allard, B. y Rougier, O. (1992). Reappraisal of the role of sodium ions in excitation-contraction coupling in frog twitch muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 13: 117 - 125.
- Anderson, W. y Zavec, J. (1990). Effects of diaphragmatic fatigue on phosphoinositol metabolism. *Biophys.J.* 73: 1026 a.
- Armstrong, C.M., Bezanilla, F. y Horowicz, P. (1972). Twitches in the presence of ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 267: 605 - 608.
- Asotra, K., Lagos, N. y Vergara, J. (1991). Synthesis of polyphosphoinositides in transverse tubule and sarcoplasmic reticulum membranes of frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1081: 229 - 237.

Audigier, S.M.P., Wang, J.K.T. y Greengard, P. (1988). Membrane depolarization and carbamoylcholine stimulate phosphatidylinositol turnover in intact nerve terminals. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2859 - 2863.

Avila-Sakar, J., Cota, G., Gamboa-Aldeco, R., García, J., Huerta, M., Muñiz, J. y Stefani, E. (1986). Skeletal muscle Ca^{2+} channels. Journal of Muscle Research and Cell Motility 7: 291 - 298.

Baylor, S.M., Chandler, W.K. y Marshall, M.W. (1983). Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from Arsenazo III calcium transients. J. Physiol. (London). 344: 625 - 666.

Beam, K.G., Knudson, C.M. y Powell, J.A. (1986). A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. Nature 320: 168 - 170.

Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature. 362: 315 - 325.

Biden, T.J., Comte, M., Cox, J.A. y Wollheim, C.B. (1987). Calcium-calmodulin stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate metabolism from insulin secreting RIN m5F cells. J. Biol. Chem. 262: 9437 - 9440.

Boldin, S., Jager, U., Ruppertsberg, J.P., Pentz, S. y Rudel, R. (1987). Cultivation, morphology, and electrophysiology of contractile rat myoballs. *Pflugers Arch.* 409: 462 - 467.

Bone, E.A. y Michell, R.H. (1985). Accumulation of inositolphosphates in sympathetic ganglia. Effects of depolarization and of amine and peptide neurotransmitters. *Biochem. J.* 227: 263 - 269.

Bredt, D.S., Mourey, R.J. y Snyder, S.H. (1989). A simple sensitive and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5-trisphosphate in biological tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 976 - 982.

Brown, J.H. y Goldstein, D. (1986). Analysis of cardiac muscarinic receptors recognized selectively by nonquaternary but not by quaternary ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 580-586.

Brown, J.H., Goldstein, D. y Brown Masters, S. (1985). The putative M_1 muscarinic receptor does not regulate phosphoinositide hydrolysis. *Mol. Pharmacol.* 27: 525 - 531.

Carrasco, M.A., Sierralta, J. y Hidalgo, C. (1993). Phospholipase C activity in membranes and a soluble fraction isolated from frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1152: 44 - 48.

Carrasco, M.A., Magendzo, K., Jaimovich, E. y Hidalgo, C. (1988). Calcium modulation of phosphoinositide kinases in transverse tubule vesicles from frog skeletal muscle. Arch. Biochem. Biophys. 262: 360 - 366.

Carrasco, M.A., Sierralta, J. y Figueroa, S. (1993a). Production and removal of inositol(1,4,5)trisphosphate in frog skeletal muscle. Biophys.J. 64: 154 A.

Cavey, D., Vincent, J.P. y Lazdunski, M. (1979). The muscarinic receptor of heart cells membranes. FEBS.Lett. 84: 110 - 114.

Chattaway, J.A., Drobak, B.K., Watkins, P.A.C., Dawson, A.P., Letcher, A.J., Stephens, L.R. y Irvine, R.F. (1992). An inositol 1,4,5-trisphosphate 6-kinase activity in pea roots. Planta. 187: 542 - 545.

Cockroft, S. y Thomas, M.H. (1992). Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. Biochem. J. 288: 1 - 14.

Cognard, C., Lazdunsky, M. y Romey, G. (1986). Different types of Ca²⁺ channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. Proc.Natl.Acad.Sci. 83: 517 - 521.

Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M. y Vaughan, D.M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am.J.Physiol.* 266: C1485 - C1504.

Cota, G. y Stefani, E. (1986). A fast-activating inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog (*Rana montezume*). *J.Physiol.* 370: 151 - 163.

Dean, N.M. y Moyer, J.D. (1988). Metabolism of inositol bis-, tetrakis- and pentakis-phosphates in GH₃ cells. *Biochem. J.* 250: 493 - 500.

Desphande, S.S., Adler, M. y Sheridan, R.E. (1993). Differential actions of brevetoxin on phrenic nerve and diaphragm muscle in the rat. *Toxicon.* 31: 459 - 470.

Donaldson, P.L. y Beam, K.G. (1983). Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. *J.Gen.Physiol.* 82: 449 - 468.

Donaldson, S.K., Goldberg, N.D., Walseth, T.H. y Huettemann, D.A. (1988). Voltage dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in peeled skeletal muscle fibres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5749 - 5753.

Dong, Z., Chen, K. y Zhu, P. (1992). Effect of high K⁺ exposure on phosphoinositide metabolism in frog skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 767 - 772.

Downes, C.P. y Michell, R.H. (1981). The polyphosphoinositide phosphodiesterase of erythrocyte membranes. *Biochem. J.* 198: 133 - 140.

Dulhunty, A.F. y Gage, P.W. (1988). Effects of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 399: 63 - 80.

Entwistle, A., Zalin, R.J., Warner, A.E. y Bevan, S. (1988). The control of chick myoblast fusion by ion channels operated by prostaglandins and acetylcholine. *J. Cell. Biol.* 47: 1703 - 1712.

Eusebi, F., Molinaro, M. y Zani, B. (1985). Agents that activate protein kinase C reduce acetylcholine sensitivity in cultured myotubes. *J. Cell. Biol.* 100: 1339 - 1342.

Eva, C. y Costa, E. (1986). Potassium ion facilitation of phosphoinositide turnover activation by muscarinic receptor agonists in rat brain. *J. Neurochem.* 46: 1429 - 1435.

Fisher, S.K., Heacock, A.M. y Agranoff, B.W. (1992). Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. *J. Neurochem.* 58: 18 - 38.

Flucher, B.E., Terasaki, M., Chin, H., Beeler, T.J. y Daniels, M.P. (1991). Biogenesis of transverse tubules in skeletal muscle *in vitro*. *Dev.Biol.* 145: 77 - 90.

Foster, P.S. (1994). The role of phosphoinositide metabolism in Ca^{2+} signalling of skeletal muscle cells. *Int. J. Biochem.* 26: 449 - 468.

Fowler, C.J. y Tiger, G. (1991). Modulation of receptor-mediated inositol phospholipid breakdown in the brain. *Neurochem. Int.* 19: 171 - 206.

Frelin, C., Vijverberg, H., Romey, G., Vigne, P. y Lazdunsky, M. (1984). Different functional states of tetrodotoxin resistant Na^{+} channels occur during the *in vitro* development of rat skeletal muscle. *Pflugers.Arch.* 402: 121 - 128.

Freund, J.E. y Walpole, R.E. (1980). Hypothesis testing: applications en "Mathematical Statistics" (Editado por Prentice Hall, Inc, Englewood Cliffs, N.J.) pp 387 - 418. Prentice Hall, 3ª edición, 1980.

Giovanelli, A., Grassi, F., Mattei, E., Mileo, A.M. y Eusebi, F. (1991). Acetylcholine induces voltage-independent increase of cytosolic calcium in mouse myotubes. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10069 - 10073.

Goldstein (1979). Calculation of the concentrations of free cations and cation-ligand complexes in solutions containing multiple divalent cations and ligands. Biophys. J. 26: 235 - 242.

Grassi, F., Giovannelli, A., Fucsile, S. y Eusebi, F. (1993). Activation of the nicotinic acetylcholine receptor mobilizes calcium from caffeine-insensitive stores in C₂C₁₂ mouse myotubes. Pflugers Arch. 422: 591 - 598.

Guse, A.H. y Emmrich, F. (1992). Determination of inositol polyphosphates from human T-lymphocyte cell lines by anion-exchange high-performance liquid chromatography and post-column derivatization. J. Chromatog. 593: 157 - 163.

Gusovsky, F. y Daly, J.W. (1988). Formation of second messengers in response to activation of ion channels in excitable cells. Mol. Cell. Neurobiol. 8: 157 - 169.

Gusovsky, F., Hollingsworth, E.B. y Daly, J.M. (1986). Regulation of phosphatidylinositol turnover in brain synaptosomes: stimulatory effect of agents that enhance influx of sodium ions. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 3003 - 3007.

Gusovsky, F., Lueders, J.E., Kohn, E.C. y Felder, C.C. (1993). Muscarinic receptor-mediated tyrosine phosphorylation of phospholipase C- τ . An alternative mechanism for cholinergic-induced phosphoinositide breakdown. J. Biol. Chem. 268: 7768 - 7772.

Haggblad, J. y Heilbronn, E. (1988). P₂-purinoceptor-stimulated phosphoinositide turnover in chick myotubes. Calcium mobilization and the role of guanyl nucleotide-binding proteins. FEBS. Lett. 253: 133 - 136.

Halliwel, J.V. y Whitaker, M.J. (1987). Using microelectrodes en "Microelectrode Techniques" (Editado por Standen, N.B., Gray, P.T.A. & Whitaker, M.J.) pp 1 - 12. The Company of Biologists Limited Publishing, Cambridge, 1987.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current-recording from cells and cell-free membranes patches. Pflugers Arch. 391: 85 - 100.

Hannon, J.D., Lee, N.K. y Blinks, J.R. (1988). Calcium release by inositol trisphosphate in amphibian and mammalian skeletal muscle is an artifact of cell disruption, and probably results from depolarization of sealed-off T-tubules. *Biophys. J.* 53: 607 a.

Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422 - 427.

Hidalgo, C., Sanchez, X. y Carrasco, M.A. (1990). Metabolism of phosphoinositides in skeletal muscle membranes. En "Transduction in Biological Systems" (Editado por Hidalgo, C., Bacigalupo, J., Jaimovich, E. & Vergara, J.) pp. 449 - 462. Plenum Publishing Corporation.

Hidalgo, C. y Jaimovich, E. (1989). Inositol trisphosphate and excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 267 - 281.

Hidalgo, C., Carrasco, M.A., Magendzo, K. y Jaimovich, E. (1986). Phosphorylation of phosphatidylinositol by transverse tubule vesicles and its possible role in excitation-contraction coupling. *FEBS. Lett.* 302: 69 - 73.

Hidalgo, C., Jorquera, J., Tapia, V. y Donoso, P. (1993). Triads and transverse tubules isolated from skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268: 15111 - 15117.

Hosey, M.M. (1992). Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB. J.* 6: 845 - 852.

Hughes, P.J. y Michell, R.H. (1993). Novel inositol containing phospholipids and phosphates: their synthesis and possible new roles in cellular signalling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 383 - 400.

Inestroza, N. (1982). Differentiation of skeletal muscle cells in culture. *Cell. Struct. Func.* 7: 91 - 109.

Jaimovich, E. (1991). Chemical transmission at the triad: InsP_3 ? *J. Musc. Res. Cell. Motil.* 12: 316 - 320 (1991).

Jaimovich, E. (1986). The use of specific ligands to study sodium channels in muscle. En "Ionic channels in cells and model systems" (Editado por Ramón Latorre) pp. 89 - 100. Plenum Publishing Corporation.

Jaimovich, E. y Rojas, E. (1994). Intracellular Ca^{2+}

transients induced by high external K^+ and tetracaine in cultured rat myotubes. *Cell Calcium*. 15: 356 - 368.

Kendall, D.A. y Nahorsky, S.R. (1984). Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices. II: calcium requirement. *J. Neurochem*. 42: 1388 - 1394.

Keresztes, M., Haggblad, J. y Heilbronn, E. (1991). Basal and ATP-stimulated phosphoinositol metabolism in fusing rat skeletal muscle cells in culture. *Exp. Cell. Res.* 196: 362 - 364.

Kikodoro, Y. (1980). Developmental changes of spontaneous synaptic potential properties in the rat neuromuscular contact formed in culture. *Dev. Biol.* 78: 231 - 241.

Lagos, N. y Vergara, J. (1990). Phosphoinositides in frog skeletal muscle: a quantitative analysis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1043: 235 - 244.

Laufer, R. y Changeux, J.P. (1989). Calcitonin gene-related peptide and cyclic AMP stimulate phosphoinositide turnover in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 264: 2683 - 2689.

Light, P.E., Comtois, A.S. y Renaud, J.M. (1994). The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K^+_{ATP}

channel activation during fatigue. *J. Physiol.* 475: 495 - 508.

Martonosi, A.M. (1984). Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 64: 1240 - 1320.

Mayr, G.W. (1990). Mass determination of inositol phosphates by high-performance liquid chromatography with postcolumn complexometry (metal-dye detection) en "Methods in Inositide Research" (Editado por Irvine, R.F.) pp 83 - 108. Raven Press, Ltd., New York, 1990.

Mayr, G y Thieleczek, R. (1991). Masses of inositolphosphates in resting and tetanically stimulated vertebrate skeletal muscles. *Biochem. J.* 280: 631 - 640.

Mc Cleskey, E.W. (1985). Calcium channels and intracellular calcium release are pharmacologically different in frog skeletal muscle. *J. Physiol. (London)*. 361: 231 - 249.

Mc Intosh, R.P. y Mc Intosh, J.E.A. (1990). Formation of inositol pentakisfosfate by ovarian follicles of *Xenopus laevis* from metabolism of inositol (1,4,5)trisphosphate and inositol (1,3,4,5)tetrakisphosphate and from receptor activation. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 166: 380 - 386.

- Menniti, F.S., Oliver, K.G., Putney, J.W. y Shears, S.B. (1993). Inositol phosphates and cell signalling: news and views of InsP_6 and InsP_5 . Trends Biochem. Sci. 18: 53 - 56.
- Michell, R.H. (1992). Inositol lipids in cellular signalling mechanisms. Trends Biochem. Sci. 17: 274 - 276.
- Milani, D., Volpe, P. y Pozzan, T. (1988). D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate phosphatase in skeletal muscle. Biochem. J. 254: 525 - 529.
- Miller, R.D., Rupp, S.M., Fischer, D.M., Cronnelly, R., Fahey, M.R. y Sohn, M.D. (1984). Clinical Pharmacology of Vecuronium and Atracurium. Anesthesiology 61: 444-453.
- Nosek, T.M., Guo, N., Ginsburg, J.M. y Kolbeck, R.C. (1990). Inositol (1,4,5) trisphosphate (IP_3) within diaphragm muscle increases upon depolarization. Biophys. J. 57: 401 a.
- Novotny, I., Zivny, F. y Saleh, F. (1978). The effect of potassium depolarization on ^{32}P -labelling of phosphatidylinositol and phosphatidylserine in frog sartorius muscle. Physiol. Bohemoslov. 27: 477 - 483.
- Phillippy, B.Q., White, K.D., Johnston, M.R., Tao, S-H. y Fox, M.R.S. (1987). Preparation of inositol phosphates from

sodium phytate by enzymatic and nonenzymatic hydrolysis. Anal. Biochem. 162: 115 - 121.

Pittet, D., Schlegel, W., Lew, D.P., Monod, A. y Mayr, G. (1989). Mass changes in inositol tetrakis- and pentakisphosphate isomers induced by chemotactic peptide stimulation in HL-60 Cells. 264: 18489 - 18493.

Radenberg, T., Scholz, P., Bergmann, G. y Mayr, G. (1989). The quantitative spectrum of inositol phosphate metabolites in avian erythrocytes, analysed by proton n.m.r. and h.p.l.c. with direct isomer detection. Biochem. J. 264: 323 - 333.

Ritchie, A.K. y Fambrough, D.M. (1975). Electrophysiological properties of the membrane and acetylcholine receptor in developing rat and chick myotubes. J. Gen. Physiol. 66: 327 - 355.

Rojas, C. y Jaimovich, E. (1990). Calcium release modulated by inositol trisphosphate in ruptured fibers from frog skeletal muscle. Pflugers Arch. 416: 296 - 304.

Rojas, C. y Hidalgo, C. (1990). Inositol trisphosphate binds to heavy sarcoplasmic reticulum membranes isolated from frog skeletal muscle. Biophys. J. 57: 342 a.

Ruffolo, R.R., Eisenbarth, G.S., Thompson, J.M. y Nirenberg, M. (1978). Synapse turnover: a mechanism for acquiring synaptic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2281 - 2285.

Salmon, D.M.W. y Bolton, T.B. (1988). Early events in inositol phosphate metabolism in longitudinal smooth muscle from guinea-pig intestine stimulated with carbachol. Biochem. J. 254: 553 - 557.

Salviati, G. y Betto, R. (1990). Phospholipase C activity of isolated transverse tubule from rabbit skeletal muscle. Biophys. J. 57: 346 a.

Sanchez, X., Carrasco, M.A., Vergara, J. y Hidalgo, C. (1991). Inositol-1,4,5-trisphosphate phosphatase activity in membranes isolated from amphibian skeletal muscle. FEBS. Lett. 279: 58 - 60.

Santini, M.T., Indovina, P.L., Cantafora, A. and Blotta, I. (1990). The cesium-induced delay in myoblast membrane fusion is accompanied by changes in isolated membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta. 1023: 298 - 304.

Sasaguri, T. y Watson, S.P. (1988). Lowering of the extracellular Na⁺ concentration enhances high-K⁺-induced

formation of inositol phosphates in the guinea-pig ileum. *Biochem. J.* 252: 883 - 888.

Sasakawa, N., Nakaki, T., Yamamoto, S. y Kato, R. (1989). Calcium uptake-dependent and -independent mechanisms of inositol trisphosphate formation in adrenal chromaffin cells: comparative studies with high K^+ , carbamylcholine and angiotensin II. *Cell Signal.* 1: 75 a.

Schadewaldt, P., Stapper, N.J. y Staib, W. (1987). Effect of adrenergic agonists on phosphoinositide breakdown in rat skeletal muscle preparations. *FEBS. Lett.* 217: 45 - 48.

Scherer, N.M., Toro, M.J., Entman, M.L. y Birnbaumer, L. (1987). G-protein distribution in canine cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. Comparison to rabbit skeletal muscle membranes and to brain and erythrocyte G-proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 431 - 440.

Sheridan, R.E. y Adler, M. (1989). The actions of a red tide toxin from *Ptychodiscus brevis* on single sodium channels in mammalian neuroblastoma cells. *FEBS.Lett.* 247: 448 - 452.

Sierro, C.D., Vitus, J. y Dunant, Y. (1992). Effects of muscarinic agonists and depolarizing agents on inositol monophosphate accumulation in the rabbit vagus nerve.

J.Neurochem. 59: 456 - 466.

Stephens, L.R. y Irvine, R.F. (1990). Stepwise phosphorylation of myo-inositol leading to myo-inositol hexakisphosphate. *Nature*. 346: 580 - 583.

Suarez-Isla, B., Iribarra, V., Bull, R., Oberhauser, A., Larralde, L., Hidalgo, C. y Jaimovich, E. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.* 54: 737 - 741.

Suárez-Isla, B.A., Marengo, J.J., Iribarra, V. y Bull, R. (1990). Calcium channels in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from skeletal muscle en "Transduction in Biological Systems." (Editado por Hidalgo, C., Bacigalupo, J., Jaimovich, E. & Vergara, J.). pp 487 - 499. New York: Plenum Press.

Thieleczek, R., Mayr, G.W. y Brandt, N.R. (1989). Inositol polyphosphate-mediated repartitioning of aldolase in skeletal muscle triads and myofibrils. *J. Biol. Chem.* 264: 7349 - 7356.

Toutant, M., Barhanin, J., Bockaert, J. and Rouot, B. (1988). G-protein in skeletal muscle. Evidence for a 40 kd pertussis toxin substrate in purified transverse tubules. *Biochem. J.*

254: 405 - 409.

Varsanyi, M., Messer, M. y Brandt, N.R. (1989). Intracellular localization of inositol-phospholipid-metabolizing enzymes in rabbit fast-twitch skeletal muscle. Can D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate play a role in excitation-contraction coupling? Eur. J. Biochem. 179: 473 - 479.

Vergara, J., Asotra, K. y Delay, M. (1987). En "Cell Calcium and the Control of Membrane Transport". (Editado por Mandel, L.J. & Eaton, D.G.). pp 133 - 151. New York: Rockefeller University Press.

Vergara, J., Tsien, R.Y. y Delay, M. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6352 - 6356.

Volpe, P., Salviati, G., Di Virgilio, F. y Pozzan, T. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Nature. 316: 347 - 349.

Wakelam, M.J.O., Patterson, S. y Hanley, M.R. (1987). L6 skeletal muscle cells have functional V_1 -vasopressin receptors coupled to stimulated inositol phospholipid metabolism. FEBS.

Lett. 210: 181 - 184.

Wakelam, M.J.O. (1985). The fusion of myoblasts. *Biochem. J.* 228: 1 - 12.

Ward, S. y Wright, D. (1983). Combined pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a single bolus dose of atracurium. *Br.J.Anaesth.* 55: 35 S - 38 S.

Windhofer, V., Varsanyi, M. y Heilmeyer, L.M.G. (1992). Rabbit fast skeletal muscle phospholipase C. Molecular weight determination by renaturation after polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. *FEBS. Lett.* 313: 51 - 55.

Wojcikiewicz, R.J.H. y Nahorski, S.R. (1993). Modulation of signalling initiated by phosphoinositidase-C-linked receptors. *J.Exp.Biol.* 184: 145 - 159.