

UCh-FC  
DOC- B.Mol-  
B275  
c1

**CAVEOLINA-3 EN TÚBULOS TRANSVERSALES  
DE MÚSCULO ESQUELÉTICO ADULTO Y SU  
POSIBLE FUNCIÓN EN EL ACOPLAMIENTO  
EXCITACIÓN CONTRACCIÓN**

**Tesis**

**Entregada a la  
Universidad de Chile  
en Cumplimiento Parcial de los Requisitos  
Para Optar al Grado de**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular  
Y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**GENARO CHRISTIAN BARRIENTOS BRIONES**

**DICIEMBRE, 2006**

**Directores de Tesis: Dra. Cecilia Hidalgo y Dr. Andrew Quest**



## INFORME DE APROBACION

### TESIS DE DOCTORADO

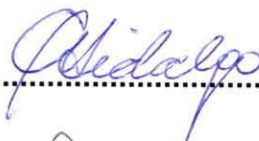
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

#### GENARO CHRISTIAN BARRIENTOS BRIONES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Diciembre de 2006.

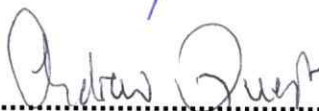
Director de Tesis:

Dra. Cecilia Hidalgo



.....

Dr. Andrew Quest



.....

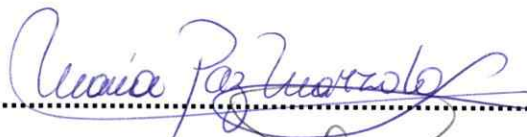
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Cecilia Vergara



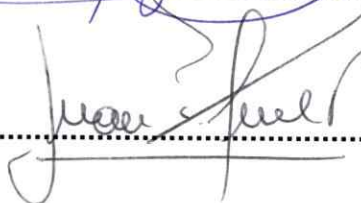
.....

Dra. Maria Paz Marzolo



.....

Dr. Juan Francisco Miquel



.....

Dedicada a mi familia



### Biografía

Nacido el 25 de septiembre de 1972 en la ciudad de Santiago, su familia está compuesta por su padres Bernarda Briones y Genaro Barrientos y sus hermanas Doris y Paula. En 1977 ingresa a la enseñanza básica en la escuela Martínez de Rosas y en 1985 inicia la enseñanza media en el Liceo Augusto Dalmar. En esta etapa se desarrolla su afición por la biología y la química que lo llevan a ingresar a la carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en 1991. Realiza su tesis de pregrado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile bajo la dirección de la Dra. Cecilia Hidalgo y obtiene el título de Bioquímico en el año 1998.

En el año 2001 ingresó al Programa de Doctorado en Ciencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Agradezco a mis directores de Tesis, en especial a la Dra. Cecilia Hidalgo por su confianza y apoyo profesional y humano durante todo este tiempo y al Dr. Andrew Quest por sus certeros comentarios.

Agradezco a toda la gente del laboratorio: Marianela Beltrán, Claudio Pérez, Alejandra Espinosa, Manuel Estrada, Paulina Donoso, Luis Montecinos, Alejandro Chamorro, Patricio Alvarado, Tatiana Adasme, Alexis Humeres, Lidia Fuenzalida, Gina Sánchez, Ricardo Bull, Fernando Mieres, Soledad Guzmán y Titina Cerda.

Agradezco a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

Agradezco a la comisión de tesis por su aporte constructivo durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a las excelentes personas del laboratorio del Dr. Caputo: Pura Bolaños, Alejandro Manno y Carolina.

Especiales agradecimientos a Paola Llanos por su cariño, ayuda y apoyo.

Financiado por el proyecto FONDAP 15010006 y Beca CONICYT de apoyo a tesis doctoral AT- 403021.

**A**

<b>Aislamiento de las membranas de TT, retículo sarcoplasmático pesado (HRS) y retículo liviano (LSR) desde músculo esquelético de conejo. ...</b>	<b>18</b>
<b>Aislamiento de Tr de músculo esquelético de conejo de rata.....</b>	<b>17</b>
<b>Aislamiento de TT de unión (JTT).....</b>	<b>19</b>
<b>Análisis de Western blots. ....</b>	<b>24</b>

**C**

<b>Carga y liberación de calcio en vesículas de Tr.....</b>	<b>21</b>
<b>Caveolas .....</b>	<b>1</b>
<b>Caveolina-3 en TT de músculo esquelético. ....</b>	<b>6</b>
<b>Caveolina-3 está asociada a los TT de animales adultos. ....</b>	<b>28</b>
<b>Caveolinas y señalización por calcio. ....</b>	<b>12</b>
<b>Caveolinas.....</b>	<b>3</b>
<b>Coolesterol en el músculo esquelético. ....</b>	<b>103</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>105</b>

**D**

<b>Determinación de las constantes de velocidad inicial de la liberación de calcio inducida por despolarización.....</b>	<b>22</b>
<b>Determinación de Proteínas.....</b>	<b>25</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>95</b>

**E**

<b>Efecto de insulina en el músculo esquelético.....</b>	<b>100</b>
<b>Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE) en gradiente (sistema Tris-glicina).....</b>	<b>23</b>
<b>Electrotransferencia de proteínas. ....</b>	<b>24</b>
<b>Ensayo de unión de [<sup>3</sup>H]-nitrendipina al equilibrio.....</b>	<b>25</b>

**H**

<b>Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
-----------------------	-----------

**I**

<b>Implicaciones funcionales.....</b>	<b>104</b>
---------------------------------------	------------

Inmunohistoquímica.....	26
Introducción.....	1

**M**

Materiales y métodos.....	17
Materiales.....	17
Medición de colesterol.....	23
Mediciones de la concentración de Calcio.....	21
Membranas de TT y BL.....	97
Métodos.....	17

**O**

Objetivo Específico 1.....	28
Objetivo Específico 2.....	61
Objetivo Específico 3.....	64
Objetivo Específico 4.....	73
Objetivo Específico 5.....	73
Objetivo Específico 6.....	76
Objetivos Específicos.....	16
Objetivos Generales.....	16
Obtención de una fracción liviana enriquecida en caveolina-3 y colesterol (Balsas lipídicas) por el método del Tritón X-100.....	20
Obtención de una fracción liviana por el método de Carbonato de sodio.....	21

**P**

Preparación de fibras musculares disgregadas.....	27
Presencia de caveolina-3 en TT adultos.....	95
Proyecciones.....	106

**R**

Referencias.....	108
Registro de fluorescencia en fibras musculares vivas.....	27
Resultados.....	28
Resumen.....	xiii

**S**

Summary.....	xv
--------------	----

**T**

<b>Tratamientos de animales con insulina .....</b>	<b>26</b>
<b>TT y glut4.....</b>	<b>9</b>
<b>Túbulos transversales aislados.....</b>	<b>44</b>

**Índice de Figuras**

FIGURA 1.....	7
FIGURA 2.....	30
FIGURA 3.....	31
FIGURA 4.....	32
FIGURA 5.....	36
FIGURA 6.....	37
FIGURA 7.....	38
FIGURA 8.....	41
FIGURA 9.....	42
FIGURA 10.....	43
FIGURA 11.....	46
FIGURA 12.....	47
FIGURA 13.....	48
FIGURA 14.....	50
FIGURA 15.....	51
FIGURA 16.....	52
FIGURA 17.....	53
FIGURA 18.....	54
FIGURA 19.....	55
FIGURA 20.....	56
FIGURA 21.....	58
FIGURA 22.....	59
FIGURA 23.....	60
FIGURA 24.....	62
FIGURA 25.....	63



FIGURA 26.....	66
FIGURA 27.....	67
FIGURA 28.....	68
FIGURA 29.....	69
FIGURA 30.....	70
FIGURA 31.....	71
FIGURA 32.....	72
FIGURA 33.....	75
FIGURA 34.....	78
FIGURA 35.....	79
FIGURA 36.....	81
FIGURA 37.....	82
FIGURA 38.....	83
FIGURA 39.....	85
FIGURA 40.....	86
FIGURA 41.....	87
FIGURA 42.....	89
FIGURA 43.....	90
FIGURA 44.....	91
FIGURA 45.....	92
FIGURA 46.....	93
FIGURA 47.....	94
FIGURA 48.....	95

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	10
--------------	----

## LISTADO DE ABREVIATURAS

$\alpha$ 1-DHPR	Subunidad conductora del DHPR
Acoplamiento EC	Acoplamiento excitación contracción
ATP	Adenosina trifosfato
BL	Balsas lipídicas
BL Tr	Balsas lipídicas obtenidas desde Tr aisladas
BL TT	Balsas lipídicas obtenidas desde TT aislados
BTS	N-bencil-p-toluenosulfonamida
CSQ	Calsecuestrina
DHPR	Receptor de voltaje de los TT que une dihidropiridina
EDB	Músculo <i>Extensor Digitorum Brevis</i>
EGF	Factor de crecimiento endotelial
EGTA	etilen glicol bis(2-aminoetil eter)-N,N,N'N'- ácido tetraacetico
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
Glut4	Transportador de glucosa sensible a insulina
HSR	Retículo sarcoplasmático pesado
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
InsR	Receptor de insulina
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptor para Inositol trifosfato
Ipp	Inmunoprecipitación
WB	Western blot
JTT	Túbulos transversales de unión
kDa	Peso molecular en kilo Daltons
LSR	Retículo sarcoplasmático liviano
M $\beta$ CD	Metilbeta-ciclodextrina
MBS	Tampón salino compuesto por MES y NaCl
MES	2-(N-morfolina)-etanosulfónico ácido

MOPS	Acido 3-N-Morfolina propanosulfónico
nNOS	Oxido nítrico sintasa neuronal
PBS	Tampón salino compuesto por fosfato y NaCl
PMCA	Bomba de calcio de la membrana plasmática
RyR	Canal de calcio del retículo Receptor de Ryanodina
SDS	Laurel sulfato de sodio
SDS/PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SERCA	Bomba de calcio del retículo sarco/endoplasmático
STD	Estándar
TBS	Tampón salino compuesto por Tris y NaCl
Tr	Triadas del músculo esquelético
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
Tritón	4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol
TT	Túbulos transversales del músculo esquelético
TT1	Fracción de los TT que se equilibra en la interfase 25/27.5 % de una gradiente de sacarosa discontinua
TT2	Fracción de los TT que se equilibra en la interfase 27.5/35 % de una gradiente de sacarosa discontinua

## Resumen

La caveolina-3 se expresa en músculo esquelético y participa en la formación de los túbulos transversales (TT) durante el desarrollo del tejido muscular. Sin embargo, la gran mayoría de los artículos publicados reporta que caveolina-3 no se encuentra presente en los TT de músculo adulto. Los TT se encuentran estrechamente unidos al retículo sarcoplasmático (RS) formando la estructura conocida como Triada (Tr), en la cual dos cisternas terminales del RS flanquean a un TT. En la tríada ocurre el acoplamiento excitación-contracción (acoplamiento EC), un proceso que acopla la señal eléctrica de despolarización de los TT a la liberación de calcio del RS que inicia la contracción muscular. En esta tesis se muestran resultados obtenidos por medio de fraccionamiento subcelular e inmunohistoquímica que indican que los TT de músculo esquelético adulto contienen caveolina-3, asociada a los TT que forman las triadas y que participan directamente en el acoplamiento EC. El tratamiento de Tr y TT aislados con 1 % de Tritón X-100 a 4 °C produjo un fracción liviana resistente a la solubilización, que denominamos balsas lipídicas (BL). Estas BL están enriquecida en colesterol y caveolina-3 y contienen a la subunidad  $\alpha 1$  del sensor de voltaje de los TT ( $\alpha 1$ -DHRP). Por medio de inmunohistoquímica se encontró, además, que estas dos proteínas colocalizan en fibras musculares intactas. La colocalización de caveolina-3 con  $\alpha 1$ -DHRP sugiere que la caveolina 3 podría participar en la regulación del acoplamiento EC. Los TT junto con su papel central en el acoplamiento EC, son los principales sitios de

translocación del transportador de glucosa dependiente de insulina, glut4. Para determinar si la translocación de glut4 hacia los TT en respuesta a insulina altera el acoplamiento EC, se evaluó la magnitud de los transitorios de calcio inducidos por potenciales de acción en fibras musculares disgregadas cargadas con la sonda fluorescente sensible a calcio MagFluo4. El tratamiento de las fibras con 200 nM de insulina produjo una disminución significativa de la magnitud de los transitorios de calcio respecto al control sin insulina. Para establecer si insulina induce la translocación de glut4 hacia los TT que forman parte de las Tr, se trataron conejos con insulina y se midieron los niveles de glut4 asociados a las Tr aisladas. Los resultados muestran que insulina *in vivo* promueve la translocación de glut4 hacia los TT asociados a las Tr. Estos resultados sugieren en conjunto que la translocación de glut4 a los TT podría modificar el acoplamiento EC. Para inducir el desensamble de las caveolas, y como una forma indirecta de ensayar la función de caveolina-3 en el acoplamiento EC, se extrajo el colesterol de las fibras musculares disgregadas y se midieron los transitorios de calcio inducidos por despolarización. Los resultados muestran que la extracción de colesterol provocó una severa disminución o una supresión total de los transitorios de calcio, sin aumentar la permeabilidad de las fibras al calcio. Estos resultados sugieren que los niveles de colesterol regulan el acoplamiento EC, posiblemente por una modulación de la actividad del DHPR por caveolina 3 que se perdería al remover el colesterol, o por una modificación de la estructura de la fase lipídica de la tríada.

## Summary

Caveolin-3 is expressed in skeletal muscle and takes part in the formation of the transverse tubules (TT) during the development of muscular tissue. Nevertheless, many articles have described that caveolin-3 is not present adults TT. The TT are narrowly appended to the sarcoplasmic reticulum (SR) forming the structure known as Triads (Tr), in which two terminal cisterns of the SR flank a TT. Excitation contraction coupling (EC coupling), a process that connects the TT depolarization to SR calcium release and induces muscular contraction occurs at the triad. In this work by mean of subcellular fractioning and immunohistochemistry we show that caveolin-3 is present in adult TT of skeletal muscle, associated with the TT that form the triads and that take part directly in EC coupling. The incubation of isolated Tr and TT with 1 % of TritonX-100 at 4 °C yielded a light fraction resistant to solubilization, that we name lipids rafts (BL). These BL are enriched in cholesterol and caveolin-3 and contain the  $\alpha$ 1 subunit of the TT voltage sensor ( $\alpha$ 1-DHPR). Additionally by means of inmunochemistry, we found these two proteins colocalized in muscular intact fibers. The colocalization of caveolin-3 with  $\alpha$ 1-DHPR suggests that caveolin-3 may play a role in the regulation of EC coupling. The TT system has a central role in EC coupling and is the principal translocation site of the insulin-dependent glucose transporter glu4. To determine if the translocation of glut4 towards the TT in response to insulin alters EC coupling, we assayed the magnitude of the calcium transients induced by actions potentials in muscle

fibers loaded with the fluorescent probe sensitive to calcium MagFluo4. The incubation of the fibers with 200 nM insulin induced a significant decrease in the magnitude of the calcium transients compared with controls without insulin. To establish if insulin induces the translocation of glut4 towards the TT that are a part of the Tr, rabbits were injected with insulin and the levels of glut4 associated with the isolated Tr were assayed. The results show that insulin *in vivo* promoted the translocation of glut4 towards the TT associated with the Tr. These results support the hypothesis that the translocation of glut4 to the TT might modify EC coupling. Disassembling of the caveolae is an indirect way of testing the function of caveolin-3 in the EC coupling. We depleted the skeletal muscle fibers of cholesterol and measured the calcium transient amplitudes induced by action potentials. The results show that the extraction of cholesterol induced a severe decrease or a complete suppression of the calcium transients, without increasing the calcium permeability of the fibers. These results suggest that the levels of cholesterol regulate the EC coupling process, possibly through a modulation of the DHPR activity by caveolin-3 that would vanish when cholesterol is removed, or through a modification of the structure of the lipid phase of the triads.

## Introducción

### Caveolas

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que poseen la forma de la letra omega y un diámetro de alrededor de 50 a 100 nm. Estas estructuras fueron observadas por primera vez en la década de los 50 por Palade y Yamada (Palade, 1953; Yamada, 1955). Este último fue quien propuso el nombre de caveolas, que significa pequeñas cavernas. Inicialmente se postuló que estas regiones de la membrana plasmática tenían como función el movimiento transcelular de moléculas (Milici y col., 1987; Simionescu, 1983). Posteriormente y gracias al desarrollo de métodos de purificación, la palabra caveola evolucionó de una definición morfológica a una que identifica regiones de la membrana que cumplen con un conjunto de criterios fisicoquímicos y de composición proteica y lipídica definida. Esto ha ampliado las funciones y morfologías posibles de las caveolas, pudiendo presentarse en su forma clásica de omega, plana u ondulada (Anderson, 1998).

La composición lipídica de las caveolas es similar a los denominados "rafts" o balsas lipídicas, que son regiones de la membrana plasmática resistentes a la solubilización a baja temperatura con detergentes no iónicos como Tritón X-100 (Brown y London, 1998). Debido a su comportamiento frente a los detergentes no iónicos las balsas lipídicas también han sido llamadas DRMS, por sus siglas en inglés **D**etergent **R**esistant **M**embranes o membranas enriquecidas en glicolípidos, conocidas por el acrónimo DIGS de las palabras en inglés **D**etergent **I**nsoluble **G**lycolipid enriched membranas (Shevchenko y



col., 1997); (Brown y London, 1998). Todas estas denominaciones describen regiones de la membrana que poseen una composición lipídica rica en esfingolípidos y colesterol y que participan en la transducción de señales entre otras funciones (Rietveld y Simons, 1998; Brown y London, 1998); (Galbiati y col., 2000a). En esta tesis se usará el término balsas lipídicas (BL) para nombrar estas regiones.

Los principales criterios que deben cumplir las BL aisladas son: a) resistencia a la solubilización con Tritón X-100 a 4°C, b) una baja densidad de flotación en gradientes de densidad y c) enriquecimiento en glicosfingolípidos (GSL), colesterol y proteínas ancladas por lípidos a la membrana (Chang y col., 1994), (Anderson, 1998); (Couet y col., 2001). Las caveolas representan un subtipo de BL cuyo principal marcador molecular son las proteínas denominadas caveolinas, que forman una familia de al menos tres miembros (Anderson 1988).

La purificación de caveolas se ha realizado por varios métodos, sin que exista consenso sobre cual es el método más adecuado (Shaul y Anderson, 1998). Estas preparaciones han sido efectuadas a partir de tejido y cultivos celulares. Los principales procedimientos utilizados se resumen a continuación:

- a) Flotación sobre gradientes de sacarosa de membranas solubilizadas con Tritón X-100 a 4°C (Lisanti y col., 1993).
- b) Flotación sobre gradientes de OptiPrep de membranas sonicadas (Smart y col., 1995).
- c) Centrifugación diferencial de tejido homogeneizado (Chang y col., 1994).

d) Recuperación de membranas de endotelio purificadas por adsorción a sílica cationizada, ya sea por centrifugación (Schnitzer y col., 1995) o por inmuno adsorción (Stan y col., 1997).

Las preparaciones obtenidas con estos distintos protocolos no son comparables. Además, hay que considerar que el contenido de caveolina-1 no es un buen indicador de pureza, dado que su concentración en las caveolas es variable (Anderson, 1998).

### **Caveolinas.**

La familia de las caveolinas está constituida por tres proteínas, caveolina 1, 2 y 3, que son codificadas por tres genes distintos y que presentan un peso molecular de 21 a 24 kDa (Couet y col., 2001; Okamoto y col., 1998). Las caveolinas, que son evolutivamente conservadas desde invertebrados hasta humanos (Tang y col., 1997), son proteínas integrales de la membrana plasmática que exponen sus extremos amino y carboxilo hacia la cara citosólica de la membrana plasmática, sin regiones expuestas al medio extracelular (Sargiacomo y col., 1995). Las caveolinas 1 y 3 son palmitoiladas en residuos de cisteína (Dietzen y col., 1995) y fosforiladas en residuos de tirosina (Aoki y col., 1999; Cao y col., 2002). En adipocitos la activación del receptor de insulina (InsR) induce la fosforilación de caveolina-1 (Razani y col., 2000; Couet y col., 2001) y se ha descrito que esta fosforilación puede ser catalizada directamente por el receptor de insulina (InsR). Sin embargo, aunque la función de esta modificación no está claramente establecida (Kimura y col., 2002), se

ha propuesto que serviría como sitio de anclaje de la quinasa Csk a la membrana (Cao y col., 2002).

Las caveolinas 1 y 2 se co-expresan principalmente en adipocitos, células endoteliales y fibroblastos, entre otras células. La caveolina-1 forma homoligómeros asociándose por medio de un dominio ubicado en el extremo N-terminal, generando así complejos de alrededor de 14 a 16 moléculas con una masa molecular de aproximadamente 350 kDa (Sargiacomo y col., 1995). Este complejo es resistente a la solubilización con SDS y puede ser separado por el tratamiento con agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol (Sargiacomo y col., 1995). La caveolina-1 puede formar heteroligómeros al asociarse con caveolina-2, que generalmente se coexpresa con la isoforma 1 (Scherer y col., 1997; Okamoto y col., 1998; Razani y col., 2000). En contraste, caveolina-3 forma homodímeros y se expresa principalmente en los músculos esquelético, cardíaco y liso (Song y col., 1996b), aunque un par de trabajos describen que caveolina-1 también se expresa en músculo esquelético (Kawabe y col., 2001; Li y col., 2001). Los oligómeros formados por las caveolinas se unen directamente a colesterol (Murata y col., 1995), que los estabiliza pues se ha demostrado que tanto la remoción de colesterol con filipina como el vaciamiento del colesterol intracelular suprimen las caveolas y desarman el complejo de caveolinas (Anderson, 1998; Monier y col., 1996). Además las caveolinas se asocian directamente a glicosfingolípidos (Li y col., 1996a). Este conjunto de

interacciones proteína-proteína y lípido-proteína, serían las fuerzas impulsoras para la formación de las caveolas (Sargiacomo y col., 1995).

Las caveolinas poseen un dominio andamio que les permite asociarse con proteínas de transducción de señales. Por esto se ha propuesto que las caveolinas son proteínas andamio que forman complejos preensamblados de transducción de señales (Okamoto y col., 1998; Shaul y Anderson, 1998; Smart y col., 1999). Algunas de las proteínas de transducción de señales con las cuales se asocian las caveolinas son: proteínas  $G\alpha$  hetero-triméricas, a las cuales la caveolina se asocia directamente dentro de las caveolas (Li y col., 1995); el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF); las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa: la inducible (iNOS) (Felley-Bosco y col., 2000), la endotelial (eNOS) (Feron y col., 1996; Garcia-Cardena y col., 1997), y la neuronal (nNOS) (Venema y col., 1997), y el receptor de insulina (InsR) (Yamamoto y col., 1998). La interacción de las tres isoformas de caveolina con NOS es inhibitoria (Couet y col., 2001). Esto ha sido comprobado para eNOS *in vivo* en ratones "knock-outs" para caveolina-1. En estos animales se presenta un aumento cercano al 30% en la actividad de eNOS y se produce un fenotipo hiperproliferativo, que concuerda con la inhibición de la proliferación atribuida a las caveolinas (Drab y col., 2001; Razani y col., 2001; Razani y col., 2001).

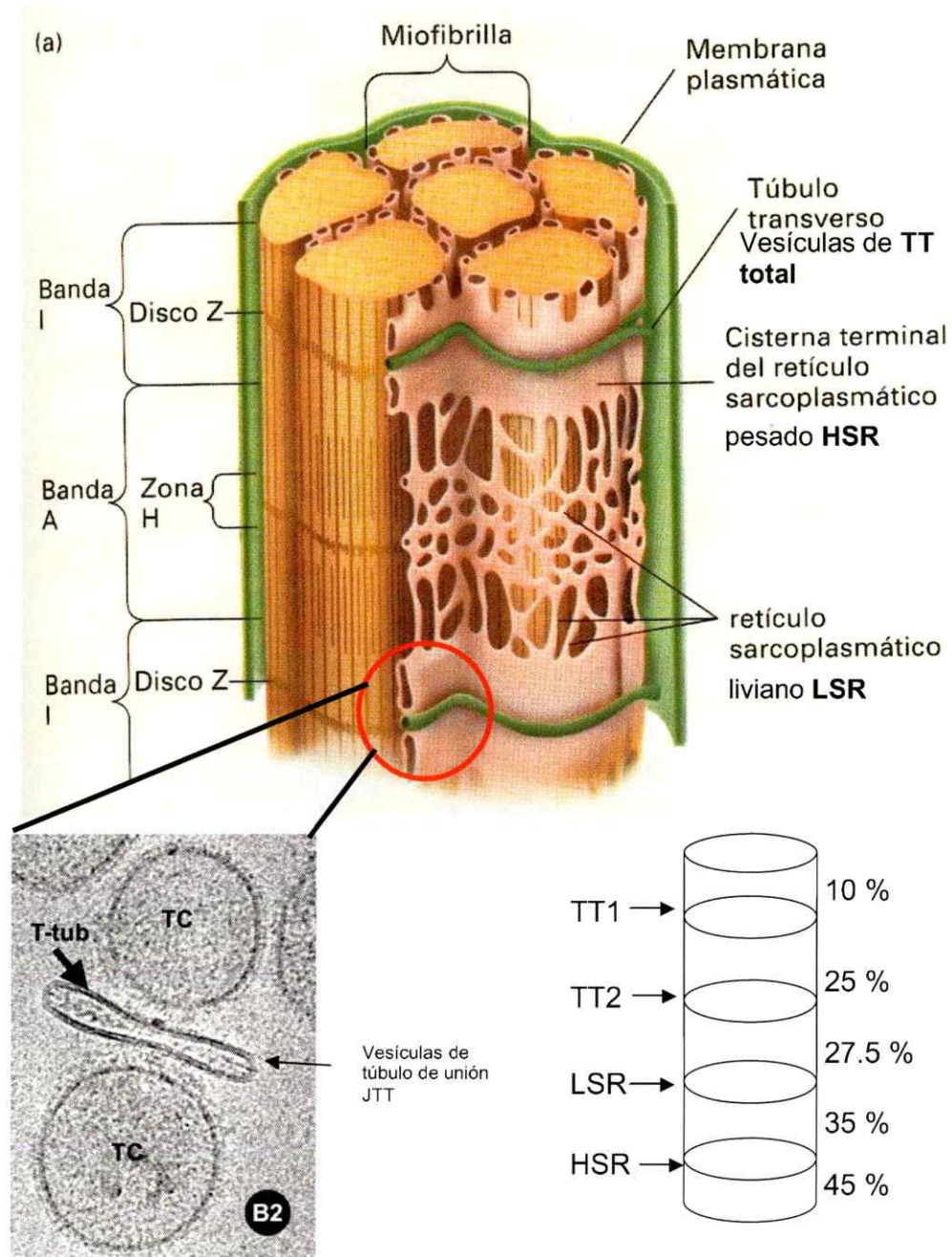
La mayoría de las proteínas que se asocian directamente al dominio andamio de caveolina poseen algunas de las siguientes secuencias consenso:  $\phi X\phi XXXX\phi XX\phi$ ,  $\phi XXXX\phi XX\phi$  y  $\phi X\phi XXXX\phi$ ; donde  $\phi$  es un aminoácido

aromático, fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptofano (W) y X es cualquier residuo (Couet y col., 1997).

### **Caveolina-3 en TT de músculo esquelético.**

Los túbulos transversales (TT) son invaginaciones de la membrana plasmática del músculo esquelético (**Figura 1**), a través de las cuales se propaga el potencial de acción al interior de la fibra muscular; la despolarización asociada genera un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático que produce la contracción muscular. Todo este proceso es conocido como acoplamiento excitación-contracción (acoplamiento EC) (Melzer y col., 1995). Este proceso tiene lugar en la estructura denominada triada (Tr), la cual está constituida de un TT flanqueado por dos cisternas terminales del retículo sarcoplasmático (**Figura 1**). Desde estas cisternas se libera el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  receptores de ryanodina (RyR), produciéndose la contracción muscular. Actualmente se acepta que el sensor de voltaje (DHPR) ubicado en la membrana de los TT cambia su conformación en respuesta a la despolarización asociada al potencial de acción, lo que provoca la apertura de los canales RyR mediante una interacción directa entre estas dos proteínas. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los RyR es regulada por múltiples factores tales como:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , fosforilación y estado de oxido-reducción tanto del RyR como de sus proteínas asociadas (Fill y Copello, 2002; Melzer y col., 1995).

**Figura 1.**  
**Esquema de los sistemas membranosos de las fibras musculares y su Aislamiento por centrifugación diferencial.**



Microfotografía electrónica de tríadas aisladas (Wagenknecht y cols., 2002)

Separación en una gradiente discontinua de sacarosa de los componentes que forman la fracción microsomal de músculo esquelético (Roseblatt y cols., 1981).

Se describió inicialmente que la caveolina 3 se asocia transitoriamente a los TT durante el desarrollo del músculo esquelético (Parton y col., 1997), y se propuso luego que participa en la formación de los TT (Galbiati y col., 2001).. Sin embargo, por medio de microscopia confocal y electrónica, se describió que caveolina-3 colocaliza con glut4 en los TT del músculo esquelético adulto (Ralston y Ploug, 1999), y se encontró también asociada a membranas de TT aisladas de músculo adulto (Muñoz y col., 1996). Pese a esto, estos dos trabajos (Ralston y Ploug, 1999; Muñoz y col., 1996) han sido ignorados posteriormente, y la visión actual es que en animales adultos caveolina-3 desaparece de los TT (Le Lay and Kurzchaliaref 2005). En los animales nulos para caveolina-3 la morfología de los TT se encuentra severamente alterada y el sensor de voltaje, DHPR, presenta una distribución anómala respecto a los animales normales (Galbiati y col 2001). Todos estos antecedentes sugieren que la presencia de caveolina-3 es importante para mantener la adecuada arquitectura de los TT y una correcta localización y funcionamiento del DHPR.

Si bien se ha descrito que la caveolina 3 está asociada a TT aislados (Muñoz y col., 1996), no se ha determinado a que región de los TT se asocia, si al túbulo de unión con el retículo sarcoplasmático, que es donde ocurre el acoplamiento EC, al túbulo libre o a ambos. De encontrarse en la región del túbulo adulto que forma las Tr, la caveolina-3 podría formar parte de un complejo que participará en la regulación del proceso de acoplamiento EC. Un interesante dato a considerar a este respecto es que la composición lipídica de los TT (Roseblatt y col., 1981) es muy similar a la de las BL (Smart y col.,

1999), con un alto contenido de colesterol y esfingomielina, por lo cual es posible que estas membranas sean una gran BL con caveolina-3. Por lo anteriormente expuesto, caveolina-3 podría tener una función hasta ahora no descrita en el acoplamiento EC en músculo esquelético adulto.

### **TT y glut4**

En mamíferos, el músculo esquelético es el principal responsable de la captación de glucosa en respuesta a insulina, que al unirse a su receptor inicia una cascada de señalización que promueve la translocación de glut4 principalmente a la membrana de los TT (Dohm y Dudek 1998, Bickel, 2002; Klip y Marette, 1992; Wang y col., 1996; Ploug y col., 1998). Además, se ha observado translocación de glut4 a los TT en respuesta a ejercicio, contracción muscular e hipoxia (Goodyear, 1998; Hayashi y col., 1997); en estos casos la translocación de glut4 es independiente de la activación de Pi3-quinasa, a diferencia de la producida por insulina (Lund y col., 1995; Yeh y col., 1995). Pese a lo anterior, existe escasa información sobre este proceso en músculo esquelético, pues gran parte del conocimiento de la translocación de glut4 en respuesta a insulina proviene de trabajos efectuados en adipocitos (Watson y col 2004) Por lo tanto, el estudio de la translocación de glut4 a los TT del músculo adulto en respuesta a insulina constituye un aporte importante al entendimiento de la fisiología de este proceso. Además, no está claramente establecido si la translocación de glut4 se produce en forma homogénea en la membrana de los TT o si se concentra en alguna región específica de estos.



Tabla 1

<b>Fracción</b>	<b>Colesterol mol %</b>	<b>Esfingomielina mol %</b>
Túbulo Transversal <sup>2</sup>	35.4	14.7
Membrana Plasmática <sup>2</sup>	21.9	4.4
Retículo Pesado <sup>2</sup>	6.7	0.8
Fracción resistente a Detergente (BL) <sup>1</sup>	30.0	14.0

Comparación del contenido de colesterol de las diferentes fracciones subcelulares obtenidas de músculo esquelético y de los BL reportadas en la literatura (1 Smart y col 1999; 2 Roseblatt y col., 1981).

Si caveolina-3 es un componente de los TT de animales adultos, es importante estudiar en estas membranas su posible colocación con glut4. En fracciones aisladas de músculo esquelético glut4 se encuentra asociado en mayor proporción a las membranas de los TT que al sarcolema (Burdett y col., 1987). Sin embargo, en fracciones de membranas intracelulares se ha detectado una baja colocación (menos del 10%) de glut4 con caveolina-3 (Muñoz y col., 1996). Más aún, la inmunoprecipitación con un anticuerpo para caveolina de las fracciones intracelulares obtenidas desde músculo esquelético no demuestra coprecipitación de glut4, y en BL aisladas desde este tejido no se encuentran cantidades apreciables de glut4 (Muñoz y col., 1996). Pero al no existir un protocolo establecido para la preparación de BL (Anderson, 1998), es posible que con otra metodología se encuentren resultados distintos. Por otra parte, glut4 y caveolina-3 podrían estar presentes en distintas regiones del TT que no sean diferenciadas por los protocolos de aislamiento de TT. Otro aspecto adicional a considerar es que los experimentos realizados por Muñoz y cols. (Muñoz y col., 1996) fueron efectuados con un anticuerpo genérico contra caveolinas y no con uno específico contra la isoforma-3 que es la que se expresa en el músculo esquelético. Como se ha descrito que caveolina-1 también se expresa en músculo esquelético (Kawabe y col 2001), los resultados de Muñoz y col (Muñoz y col., 1996) pueden reflejar el comportamiento de caveolina-1 y no de caveolina-3. Por lo tanto, es importante realizar estos ensayos con el anticuerpo específico contra caveolina-3.

La fosforilación de caveolina-1 tendría un rol de anclaje y reclutamiento de proteínas hacia la membrana (Kimura y col., 2002). Sin embargo, la función de una posible fosforilación de caveolina-3 inducida por insulina en músculo esquelético está pobremente entendida. Si consideramos la alta homología entre las isoformas 1 y 3 de caveolina, es posible que la fosforilación de caveolina-3 también funcione como sitio de anclaje para proteínas. Esto podría modificar el complejo multiproteico de caveolina con otras proteínas y así modular las moléculas de transducción de señales. De esta forma si caveolina-3 participa en la modulación del acoplamiento EC, su fosforilación inducida por insulina podría representar una vía de acción de insulina sobre este proceso.

#### **Caveolinas y señalización por calcio.**

Existen múltiples reportes que localizan en las caveolas a las proteínas que regulan los niveles de  $Ca^{2+}$ . Utilizando inmunohistoquímica, se localizó el receptor de  $IP_3$  en las caveolas de músculo liso (Fujimoto y col., 1992). El intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , que es un importante regulador de los niveles de  $Ca^{2+}$  del músculo cardíaco, se localiza en las caveolas e interacciona con caveolina-3 (Bossuyt y col., 2002). También se ha descrito que la entrada capacitativa de  $Ca^{2+}$  estaría en parte regulada por la distribución en las caveolas de las proteínas involucradas en este proceso (Smith y col., 2002). Además, en preparaciones de caveolas aisladas desde endotelio pulmonar de rata, se ha reportado un enriquecimiento en  $Ca^{2+}$ -ATPasa (PMCA) e  $IP_3R$  (Schnitzer y col., 1995). En músculo cardíaco, en tanto, se ha propuesto que las caveolas

podrían proveer una estructura para relacionar DHPR y RyR y permitir los "sparks" de  $\text{Ca}^{2+}$  que se iniciarían en las caveolas (Lohn y col., 2000). Estos "sparks" de  $\text{Ca}^{2+}$  son aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular localizados (2 a 4  $\mu\text{m}$ ) y de muy corta duración (30 a 100 ms). Además, mediante estudios de inmunohistoquímica se describió la presencia del DHPR en las caveolas en músculo esquelético en desarrollo (Yuan y col., 1991), y se ha demostrado que caveolina-3, DHPR y RyR colocalizan en tejido cardíaco (Scriven y col., 2002). No obstante, en las revisiones existentes no aparece DHPR en la lista de proteínas que se localizan en las caveolas (Shaul y Anderson, 1998; Anderson, 1998; Smart y col., 1999).

Considerando el papel central del DHPR en el acoplamiento EC en el músculo esquelético, es importante determinar si la caveolina-3 se encuentra asociada a DHPR, pues no existen estudios de la función de caveolina-3 en la regulación de la señalización por calcio en el acoplamiento EC músculo esquelético. En la secuencia de la subunidad  $\alpha 1$  del DHPR existe una secuencia de unión al dominio andamio de caveolina. Además, experimentos de remoción de colesterol en fibras de músculo esquelético, muestran una alteración de la función del DHPR (Launikonis y Stephenson, 2001). Una interpretación de estos antecedentes es que la remoción del colesterol desensamble el complejo de caveolina-3 y que esto afecte la función del DHPR. También reviste importancia investigar si ambas proteínas están presentes en las preparaciones de BL aisladas desde músculo esquelético, y por esta razón

este punto se propuso como uno de los objetivos iniciales de esta tesis. Un trabajo publicado en estos últimos meses, cuando la presente tesis se encontraban bastante avanzada, describe que la subunidad  $\alpha 1$ -DHPR cardíaca está presente en BL aisladas de músculo cardíaco y coprecipita con caveolina-3 (Balijepalli y col., 2006).

En músculo esquelético el canal RyR de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra unido directamente al DHPR (Haarmann y col., 2005). Existe la posibilidad que caveolina-3 también se una directamente a RyR y module su actividad, pues este canal posee seis secuencias de unión al dominio andamio de caveolina ubicadas en su extremo carboxilo que corresponden a regiones reguladoras del canal (Fill y Copello, 2002). Sin embargo, la topología del RyR no está bien establecida (Fill y Copello, 2002). Por lo que no es posible saber si estas presuntas secuencias de unión a caveolina-3 están en regiones adecuadas para permitir la interacción con el dominio andamio de caveolina-3.

En el presente trabajo se exploró la presencia de caveolina-3 y su posible función en los TT de músculo adulto por medio de fraccionamiento subcelular, inmunohistoquímica y estudios funcionales en fibras disgregadas. Además se estudió en fibras excitables el efecto sobre el acoplamiento EC de la translocación de los glut4 a los TT en respuesta a insulina.

**Hipótesis**

En el músculo esquelético adulto la caveolina-3 está presente en los TT de unión que forman las tríadas, donde colocaliza con DHPR, InsR y glut4 tanto en fibras intactas como en BL, formando un complejo multiproteico que regula el acoplamiento EC. En respuesta a insulina glut4 se transloca a las balsas lipídicas de los TT que forman las Triadas e interfiere con el acoplamiento EC.

**Objetivos Generales.**

1. Identificar algunas de las proteínas asociadas a las BL obtenidas a partir de preparaciones de Tr o TT aisladas de músculo esquelético adulto.
2. Estudiar la función de caveolina-3 en el acoplamiento EC.
3. Determinar si glut4 se transloca a los TT que forman las Tr y si esto altera los niveles de colesterol por dilución.
4. Estudiar el efecto de insulina y de la extracción de colesterol en el acoplamiento EC en fibras vivas.

**Objetivos Específicos.**

1. Establecer si caveolina-3 está presente en TT y Tr aisladas desde músculo esquelético adulto, y en BL obtenidas de estas preparaciones.
2. Establecer si caveolina-3 forma un complejo con la subunidad  $\alpha 1$ -DHPR.
3. Determinar si caveolina-3 modula directa o indirectamente el acoplamiento EC en vesículas de Tr aisladas.
4. Titular la remoción de colesterol desde vesículas Tr y TT aislados con metilbetaciclodextrina.
5. Determinar a que región de los TT (libre o de unión) se encuentra asociada caveolina-3.
6. Estudiar el efecto de insulina y de la extracción de colesterol sobre el acoplamiento EC en músculo esquelético.

## **Materiales y métodos**

**Materiales.** Todos los reactivos utilizados durante el desarrollo de este trabajo de tesis fueron de grado analítico. Las sondas de calcio Calcium Green-5N, Calcium Green-2N y MagFluo4 fueron adquiridas en Molecular Probes (Eugene, OR). Los demás reactivos fueron obtenidos en SIGMA-ALDRICH Chemical Co (St. Louis, MO).

### **Métodos.**

**Animales.** Conejos machos adultos (6 meses de edad) de la cepa New Zealand fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital, de acuerdo con las regulaciones del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En los experimentos de medición de los transitorios de  $Ca^{2+}$  en fibras aisladas, que se realizaron en el IVIC, Caracas, Venezuela, se utilizaron ratones de la cepa IVIC de 6 semanas de edad. En los experimentos de Inmunohistoquímica, se utilizaron ratones Balb/c de 6 semanas de edad.

**Aislamiento de Tr de músculo esquelético de conejo de rata.** Las Tr de rata fueron aisladas desde músculo esquelético de ratas macho de 10 semanas de edad de la cepa Sprague Dawley, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación para músculo de conejo.

Las vesículas de Tr de conejo se prepararon según métodos desarrollados en el laboratorio (Hidalgo y col., 1993). Brevemente, se homogeniza muy finamente el



músculo esquelético en cuatro volúmenes (p/v) de la solución tampón (en mM: 150 KCl, 5 MgSO<sub>4</sub>, 20 MOPS-Tris, pH 6.8) suplementada con inhibidores de proteasas (1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina, 0.4 benzamidina, 1 fenilmetilsulfonilfluoruro). La suspensión es centrifugada a 1500 x g, el sedimento obtenido es extraído nuevamente como al principio y los sobrenadantes son mezclados y centrifugados a 17000 x g. Las membranas sedimentadas se resuspenden en el volumen inicial de tampón, se pasan por un homogeneizador vidrio-vidrio y son centrifugadas a 1500 x g para eliminar las proteínas contráctiles y las mitocondrias. El sobrenadante es sedimentado a 17000 x g, resuspendido en una solución con sacarosa (en mM: 300 sacarosa, 20 MOPS-Tris, pH 6.8 más 1 µg/ml leupeptina y 0,4 benzamidina) y sedimentado una vez más a 17000 x g. Las membranas resultantes se resuspenden en la misma solución. Se fraccionan en pequeños volúmenes y se congelan a -80 °C hasta su uso.

**Aislamiento de las membranas de TT, retículo sarcoplasmático pesado (HRS) y retículo liviano (LSR) desde músculo esquelético de conejo.** Las vesículas TT y RS fueron preparadas como previamente descrito (Roseblatt y col. 1981) (**Figura 1**). Brevemente, se homogeneizó músculo esquelético en cuatro volúmenes de tampón (en mM: 20 MOPS-Tris, 100 KCl, pH 7.0). La suspensión obtenida es centrifugada a 10000 x g y el sedimento es reextraído con el mismo tampón, los sobrenadantes resultantes son llevados a 0.6 M KCl

final por adición de la sal sólida y centrifugados 1 hora a 100.000 x g. Las membranas sedimentadas son resuspendidas en el tampón inicial con inhibidores de proteasas (leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, benzamidina 0.4, mM fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM), homogeneizadas en vidrio-vidrio y sedimentadas a 100.000 x g, el sedimento es resuspendido en tampón sacarosa (en mM: 300 sacarosa, 20 MOPS-Tris, pH 7.0 más 1 µg/ml leupeptina y 0,4 benzamidina) y centrifugado a 100.000 x g, luego el sedimento es resuspendido nuevamente en el tampón sacarosa antes descrito, cargado en una gradiente discontinua de sacarosa 45, 35, 27.5 y 25% p/v y centrifugado a 100.000 x g toda la noche, y se colectan las fracciones que corresponden al túbulo transversal, LSR y HSR (ver Figura 1). Las fracciones colectadas se lavan por centrifugación en tampón sacarosa, se resuspenden en un mínimo volumen del tampón antes descrito, se congelan con N<sub>2</sub> líquido y se almacenan a -80°C hasta su uso.

**Aislamiento de TT de unión (JTT).** Las vesículas de Tr de conejo, fueron cargadas en una gradiente de densidad de sacarosa libre de iones con el objetivo de obtener túbulos transversales de unión (JTT) como se describe en (Horgan y Kuypers, 1987). Brevemente, la gradiente de densidad de sacarosa fue preparada desde las soluciones stock de 0.74 M y 1.4 M de sacarosa. Las fracciones enriquecidas en Tr fueron cargadas en la parte superior de la gradiente y centrifugada durante toda la noche (16 h) a 4 °C a 100000 x g. Las

fracciones resultantes fueron colectados y diluidas con: 20 mM MOPS(Tris) pH 7.2 mas los inhibidores de proteasas y centrifugadas a 150000 x g por 1 hora El sedimento fue resuspendido en 0.3 M de sacarosa; 20 mM MOPS(Tris) pH 7.2 con los inhibidores de proteasas y congelado a -80 °C hasta su posterior uso.

**Obtención de una fracción liviana enriquecida en caveolina-3 y colesterol (Balsas lipídicas) por el método del Tritón X-100:** Las BL fueron preparadas desde las fracciones enriquecidas en Tr y TT, como se describe en (Bender y col., 2002; Brown y Waneck, 1992; Sargiacomo y col., 1993) con mínimas modificaciones. Brevemente, fracciones enriquecidas en Tr o TT fueron incubadas con 2 ml del tampón Mes salino (MBS) compuesto por (en mM: 25 Mes, pH 6.5, 150 NaCl) conteniendo 1 % Tritón X-100 y un cóctel de inhibidores de proteasas (leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1µg/ml, benzamidina 0.4 mM fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM). La mezcla fue homogeneizada en homogenizador vidrio/vidrio e incubada durante 15 minutos a 4 °C. Se ajustó a 40 % sacarosa agregando de 2 ml de 80 % sacarosa preparada en MBS enfriada en hielo y puesta en el fondo de un tubo de ultracentrifugación. Una gradiente de sacarosa discontinua de 5 y 30 % fue formada sobre el solubilizado, todas las soluciones utilizadas fueron previamente enfriadas en hielo. Posteriormente, las gradientes fueron centrifugadas a 100000 x g por 20 horas. Una banda opalescente liviana fue confinada a la interfase 5-30 % la

cual fue colectada, diluida tres veces con MBS y centrifugada a 100000 x g por 1 hora. Los fracciones así obtenidas fueron resuspendidos en 20 mM MOPS/Tris pH 7.2 mas leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1µg/ml, benzamidina 0.4 mM fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM) y sacarosa 0.3 mM y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su uso.

#### **Obtención de una fracción liviana por el método de Carbonato de sodio.**

Este método es similar al previamente descrito. Sin embargo, permite la purificación de BL sin el uso de detergente. Para ello, Tritón X-100 fue reemplazado por una solución de carbonato de sodio (500 mM; pH 11). Los pasos posteriores son idénticos a los realizados con Tritón X-100, con la única diferencia que al tampón MBS se le adicionó 250 mM de carbonato de sodio (Bender y col., 2002; Song y col., 1996a).

**Mediciones de la concentración de Calcio.** La concentración del máximo de calcio fue obtenida a partir de la ecuación  $[Ca^{2+}] = K_D (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ , donde  $F$  corresponde a la intensidad de fluorescencia medida en una longitud de onda única,  $K_D$  es la constante de disociación del indicador de calcio,  $F_{max}$  y  $F_{min}$  corresponden a las intensidades de fluorescencia máxima a calcio saturante y mínima a cero calcio nominal, respectivamente.

#### **Carga y liberación de calcio en vesículas de Tr.**

Vesículas de Tr a 0,2 mg/ml proteína fueron incubadas en el tampón: 20 mM MOPS pH 7,2, 100 mM KCl, 1.8 mM ATP, 2.2 mM MgCl<sub>2</sub>, (ATP libre 0.244 mM, Mg<sup>2+</sup> libre 0.598 mM), 10 mM fosfocreatina, 15 U/ml de creatina quinasa y 100 nM de Calcium Green-5N. Se estimó que el calcio contaminante es ≈10 μM. Las mediciones fueron hechas a 25 °C en un FluoroMax-2 (Isa Jobin Yvon-Spex Instruments S.A. USA) excitando a 506 nm y leyendo la emisión a 538 nm. La liberación de Ca<sup>2+</sup> se indujo con 4 mM final de cafeína. Para calcular [Mg<sup>2+</sup>] y [ATP<sup>2-</sup>] libre presentes durante la liberación de calcio se utilizó el programa computacional WinMaxC ([www.stanford.edu/~cpatton/winmaxc2.html](http://www.stanford.edu/~cpatton/winmaxc2.html)).

**Determinación de las constantes de velocidad inicial de la liberación de calcio inducida por despolarización.** Las mediciones de cinética rápida de liberación de Ca<sup>2+</sup> fueron realizadas en un espectrofotómetro de flujo detenido SX.18MV (Applied Photophysics Ltd. Leatherhead, UK). Las vesículas de Tr a 1mg/ml fueron activamente cargadas con calcio antes de iniciar la liberación en la siguiente solución: 1.8 mM ATP y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> que producen 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> y 0.157 mM ATP libre). La carga de Ca<sup>2+</sup> fue iniciada por la adición de ATP/Mg y la mezcla fue incubada por 20 min a 25 °C en una solución conteniendo: 20 mM MOPS-Tris, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM KGluconato, 15 mM NaGluconato y el sistema regenerador de ATP compuesto por 10 mM fosfocreatina más 15 U/ml creatina quinasa. La liberación de calcio fue iniciada por la mezcla de 1 volumen de Tr cargadas con 10 volúmenes de una solución

compuesta por (en mM) 20 MOPS-Tris, pH 7.2, 160 mM NaGluconato, 1.8 mM ATP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 μM de la sonda fluorescente Calcium green-2.

**Medición de colesterol.** El colesterol total en las distintas fracciones fue medido a través del kit Colesterol total LS (Valtek diagnostic) modificado con una etapa de solubilización de las fracciones con de 1 % Tritón X-100. Brevemente, el colesterol se determina por acción de las enzimas Colesterol ester hidrolasa y Colesterol oxidasa. La primera libera el colesterol de los ésteres de colesterol, y la segunda oxida el colesterol libre produciéndose peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de la enzima peroxidasa reacciona con el sistema cromogénico dando origen a un compuesto coloreado que absorbe a 505 nm. En algunos experimentos el colesterol fue determinado con el kit Amplex Red Colesterol Assay de Molecular Probes número de catálogo A12216. En este método la oxidación del colesterol es acoplada a la formación de un compuesto fluorescente que absorbe a 571 y emite a 585 nm.

**Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE) en gradiente (sistema Tris-glicina).** Se utilizaron geles de 1 mm de espesor con el sistema descrito por Laemmli y col., con el gel concentrador al 4 % de acrilamida y el separador en gradiente 3-15 % de acrilamida. Las proteínas fueron separadas por electroforesis durante 1-2 h a 80-120 V a temperatura ambiente. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa o teñidos con azul de

Coomassie. Algunos geles fueron fijados con 50 % metanol toda la noche, luego lavados con 25 % de isopropanol para remover el SDS y teñidos con 0.0025 % Stains All en 25 % isopropanol 7.5 % formamida y 30 mM Tris pH 8.8 (Campbell y cols 1983).

**Electrotransferencia de proteínas.** Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 1 h a 4°C en tampón de transferencia 25 mM Tris 192 mM glicina, pH 8.5. Para verificar que la transferencia fue apropiada las membranas fueron teñidas con una solución al 3 % de rojo Ponceau en 3 % de ácido tricloroacético. El colorante fue removido por lavado con el tampón 20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.5 (TBS).

**Análisis de Western blots.** Las muestras previamente sujetas a electroforesis, se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS, durante 1-2 horas a temperatura ambiente y bajo agitación rotatoria constante. Las membranas bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario en dilución 1:2000 en TBS-T y fueron lavadas 3 veces por 5 min con TBS-T. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano en dilución 1:2000 en TBS-T y lavadas 3 veces por 5 min con TBS-T. La reacción proteína/anticuerpo fue revelada utilizando el kit ECL (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, EEUU).

Las imágenes fueron escaneadas y analizadas con el software Quantity One® (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

La detección de caveolina-3 se efectuó por medio de Western blots con dos anticuerpos comerciales distintos. Un anticuerpo monoclonal BD Biosciences y otro policlonal de Sta. Cruz Biotechnology. Los Western blots fueron incubados con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y revelados con un kit comercial para quimioluminiscencia (ECL).

**Ensayo de unión de [<sup>3</sup>H]-nitrendipina al equilibrio.** Preparaciones de vesículas de Tr, TT y BL, preincubadas o no con diversos modificadores como se detalla en el texto, fueron incubadas con [<sup>3</sup>H]-nitrendipina 10 nM a 10 °C por 30 minutos en una solución que contenía 40 mM Tris/HCl pH 7.5. La unión no específica se determinó en presencia de 1 μM de nifedipina fría. La nifedipina unida fue separada de la libre mediante filtración al vacío con filtros de fibra de vidrio Whatman GFB. Los filtros se lavaron 2 veces con 2.5 ml de tampón de lavado: 40 mM Tris/HCl pH 7.5, cloruro de colina 0.2 M. La radioactividad asociada a los filtros fue cuantificada mediante centelleo líquido.

**Determinación de Proteínas.** Se realizó según el método descrito por Hartree (Hartree, 1972) o por el método del ácido bicinconínico (Smith y col., 1985) usando albúmina de suero de bovino como estándar.



**Inmunohistoquímica.** Las fibras musculares provenientes del músculo rápido *flexor digitorum brevis* de ratones fueron fijadas con 4% paraformaldehído en el tampón PBS compuesto por 134 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, permeabilizadas con 0.05 % de Tritón X-100 y bloqueadas con 5% albúmina en PBS. Las fibras fueron incubadas toda la noche ya sea con anti-caveolina (1:100), anti-DHPR (1:100) y/o anti-glut4 (1:100) a 4 °C. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas 5 veces por 30 minutos con PBS más albúmina y agitación. Posteriormente, se incubó a 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con rodamina o Alexa Fluor® 488 (1:500) y se lavó con agitación 5 veces por 30 minutos con PBS antes de ser montadas en cubreobjetos cubiertos con el medio de montaje Vectashield®. Como control negativo se utilizaron las fibras incubadas en ausencia de anticuerpo primario. Las fibras inmunoteñidas fueron visualizadas usando microscopia confocal (Microscopio invertido. LSM 5 Pascal. Zeiss. Alemania). Los datos fueron analizados con el programa Image J versión 1.32j.

**Tratamientos de animales con insulina.** Conejos machos adultos (6 meses de edad) de la cepa New Zealand fueron anestesiados con una dosis de ketamina (50 mg/kg) después de un ayuno prolongado de 12 h. Posteriormente, se les administró D-glucosa por vía intraperitoneal (1 g/Kg de peso corporal) e insulina por vía intravenosa (10 unidades/kg de peso corporal)

30 min antes de la remoción del tejido muscular, el cual fue utilizado para la obtención de fracciones subcelulares como se detalló anteriormente.

**Preparación de fibras musculares disgregadas.** El método de disociación enzimática fue similar a la descrita por Carroll y col, 1995. Brevemente, los ratones fueron sacrificados por una rápida dislocación cervical, el músculo flexor digitorum brevis (FDB) fue disecado cuidadosamente desde tendón a tendón e incubado en solución Ringer: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 10 Hepes; pH 7.4, conteniendo 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 4 mg ml<sup>-1</sup> de colagenasa por una hora a 37 °C con agitación. Posteriormente, los músculos fueron lavado tres veces con esta solución Ringer, las fibras fueron separadas suavemente desde los tendones pasando los músculos a través de una pipeta Pasteur con los bordes pulidos en una llama y montados sobre cubreobjetos (Figura 35).

**Registro de fluorescencia en fibras musculares vivas.** Las fibras disgregadas fueron cargadas con 10 µM de MagFluo-4AM (Kd: 22 µM) en solución Ringer por 30-40 min. a temperatura ambiente. La señal fue recogida desde un área de aproximadamente 12 µm de diámetro, con un fotomultiplicador conectado a un amplificador Nikon P1. Este procedimiento permite registrar desde numerosas fibras dentro del campo visual, puesto que la iluminación es focalizada. Los potenciales de acción fueron inducidos por la aplicación de pulsos de corrientes rectangular supraumbral de 70 mV y 3 ms de

duración a través de dos electrodos de platino sobre cada lado de la cámara de registro. Los datos fueron adquiridos y analizados usando el programa pCLAMP6 Axon Instruments.

## **Resultados.**

**Objetivo Específico 1.** Establecer si caveolina-3 está presente en TT, Tr y BL obtenidos desde músculo esquelético adulto.

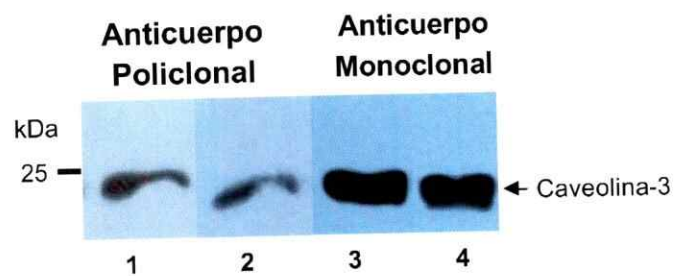
### **Caveolina-3 está asociada a los TT de animales adultos.**

Se encontró una abundante expresión de caveolina-3 en TT aislados de músculo esquelético de conejo (**Figura 2**). Tanto un anticuerpo monoclonal como uno policlonal disponibles comercialmente, reconocieron una banda de aproximadamente 25 kDa que concuerda con el peso molecular de caveolina-3 descrito en la literatura (Way y Parton, 1996; Chang y col., 1994). La marca está enriquecida en TT aislados si se compara con la marca encontrada en las preparaciones de Tr (**Figura 2**). Esto es consistente si se considera que la preparación de Tr, cuyas vesículas están constituidas por un TT flanqueado por dos cisternas terminales, contiene alrededor de un 10% de TT, en tanto que la preparación de TT está altamente enriquecida en estas membranas (Hidalgo y col., 1986). En algunos experimentos se encontraron bandas con pesos moleculares correspondientes a dímeros, trímeros y tetrámeros de caveolina-3 (**Figura 3 y 4**). Esto concuerda con los antecedentes bibliográficos, puesto que se ha descrito que las caveolinas forman agregadas resistentes a SDS (Li y

col., 1996b). La aparición de estos agregados fue mucho más frecuente en preparaciones almacenadas por más de un mes a  $-80^{\circ}\text{C}$  (datos no mostrados).

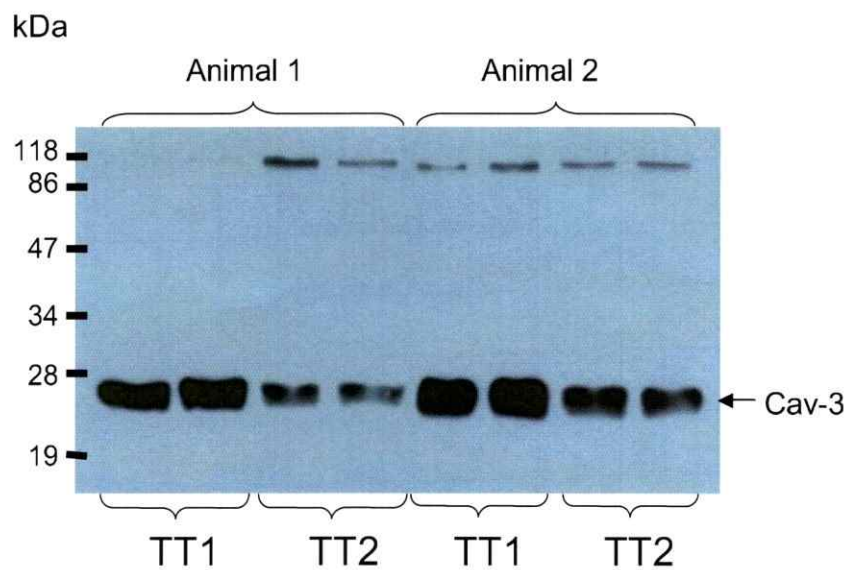
**Figura 2.**

**Expresión de Caveolina-3 en fracciones enriquecidas en triadas y TT  
Obtenidas de músculo esquelético adulto.**



**Figura 2.** La presencia de caveolina-3 en fracciones enriquecidas en triadas y TT fue ensayada por Western blot con dos anticuerpos comerciales distintos. El revelado se efectuó por quimioluminiscencia. Todos los carriles fueron cargados con 25  $\mu$ g de proteína. Carriles 1 y 3: TT y carriles 2 y 4: Tr.

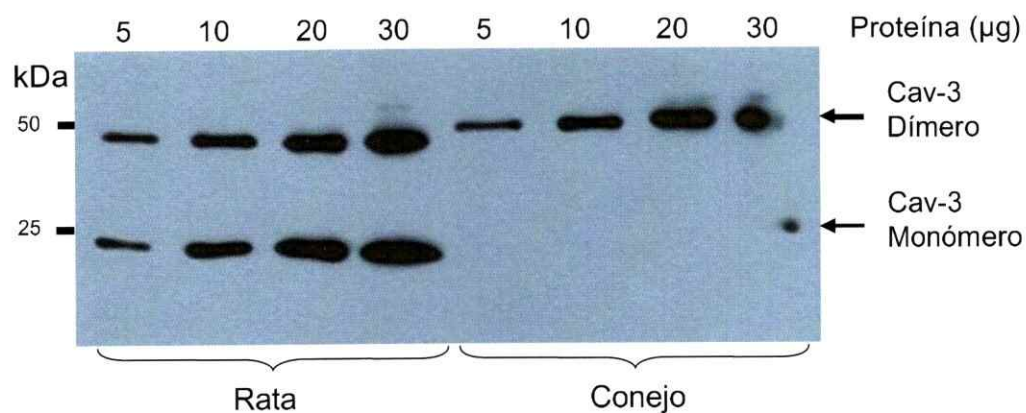
**Figura 3.**  
**Caveolina-3 se encuentra en fracciones aisladas de TT1 y TT2**



**Figura 3.** Túbulos transversales obtenidos de dos conejos fueron analizados por duplicado tras SDS/PAGE de un gel, en que cada carril fue cargado con 20  $\mu\text{g}$  de proteína. Se detectó caveolina-3 por Western blot mediante ECL (para detalles ver materiales y métodos).

**Figura 4.**

**Caveolina-3 se encuentra presente en triadas obtenidas desde  
Músculo esquelético de conejo y rata.**



**Figura 4.** Un gel en gradiente de poliacrilamida 3-15 % fue cargado con distintas cantidades de triadas obtenidas de conejo y rata. Tras SDS/PAGE, el gel fue transferido a nitrocelulosa y se ensayó para la detección de caveolina-3 por Western blot.

El TT, por su alto contenido lipídico posee una densidad de equilibrio en un gradiente de sacarosa menor que el retículo liviano. La preparación de TT produce dos fracciones enriquecidas en  $\alpha$ 1-DHPR, que es el marcador específico de los TT (**Figura 1 y 4**). La principal diferencia entre dos estas fracciones, que se obtienen en la interfase entre 10 y 25 % y en la interfase entre 25 y 27.5 % de sacarosa y que se han denominado TT1 y TT2, respectivamente, es su contenido relativo de TT. TT1 contiene TT altamente purificado y TT2 posee además de TT bajos niveles de contaminación con retículo liviano (Hidalgo y col., 1986). Ambas fracciones fueron positivas para la detección de caveolina-3 (**Figura 3**).

Para determinar si la presencia de caveolina-3 en las Tr de músculo esquelético de conejo era un fenómeno dependiente de la especie, se prepararon Tr desde músculo esquelético de rata. Puesto que esta preparación no estaba caracterizada, se determinó la presencia de algunas proteínas marcadoras propias de las Tr. Las Tr obtenidas de los músculos dorsales y de las patas de las ratas presentan sitios de unión para  $^3\text{H}$ -Nitrendipina que es un ligando de alta afinidad ( $K_d$  1.7 nM) del DHPR (**Figura 5**), además se detectó la presencia de la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR mediante Western blot (**Figura 6**). Calsecuestrina es una proteína intraluminal de las cisternas terminales de las Tr que posee un alto número de sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad (1 mM) (Franzini-Armstrong y col., 1987; Ikemoto y col., 1974). Para determinar si esta proteína se encuentra presente en la fracción pesada de rata, se resolvieron las



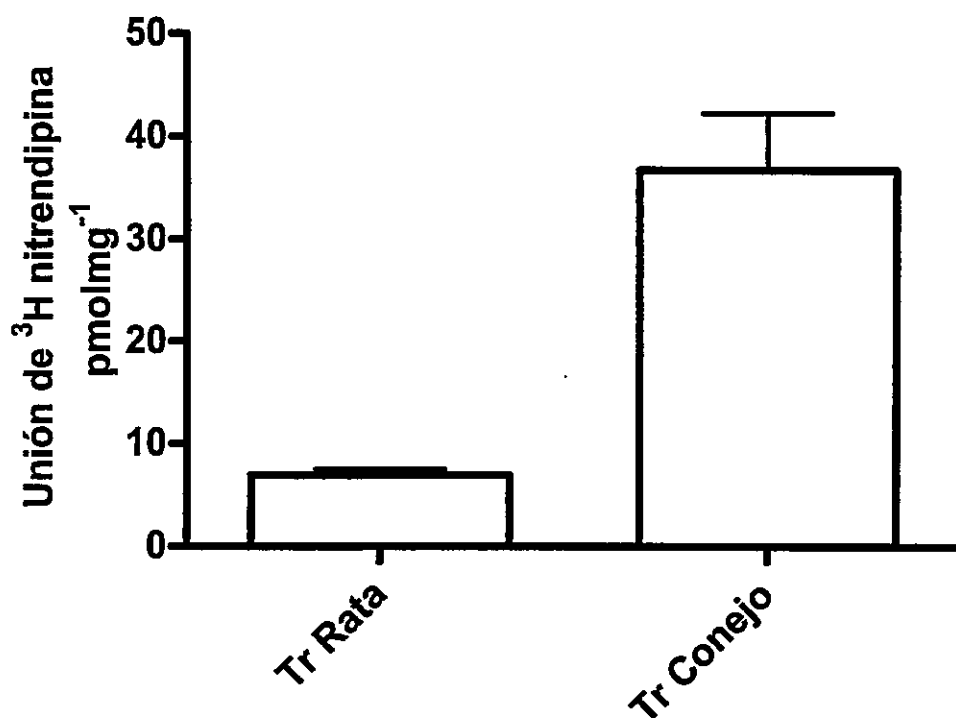
proteínas de Tr de rata y conejo en SDS/PAGE y fueron teñidas con Stains All. Este compuesto tiñe la calsequestrina de color azul y levemente rosadas el resto de las proteínas (Campbell y col., 1983). Las Tr de rata, carril 3 **Figura 7**, se tiñen en forma casi idéntica a las Tr de conejo carril 2 de la misma figura, aunque presenta una leve diferencia en la movilidad eletroforética. Adicionalmente, se ensayó la presencia de calsecuestrina mediante Western blot, el ensayo mostró una banda en el peso molecular de calsecuestrina, pero además junto con otras bandas de pesos moleculares distintos (datos no mostrados).

Una característica funcional de las vesículas de Tr aisladas es que en presencia de ATP/Mg son capaces de bombear  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de las cisternas terminales. En estas vesículas, las cisternas terminales se encuentran selladas y pueden acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior, esto es una prueba funcional de la presencia de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo SERCA. Además pueden liberar parte del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en respuesta a agonistas del RyR como cafeína, siendo una prueba funcional de la presencia de RyR en las vesículas. Para determinar funcionalmente la presencia de RyR y SERCA en las Tr de rata se realizaron experimentos de carga y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron seguidos con el colorante sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Calcium green 5N en su forma de sal de potasio. En estos experimentos, las Tr de rata se comportan de manera muy similar a las Tr de conejo (**Figura 8**). En presencia de ATP/Mg captan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio de incubación, que previo al bombeo es de alrededor de 20  $\mu\text{M}$ . La actividad de la

SERCA lleva la concentración del medio extravascular a ~ 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La posterior adición de 4 mM cafeína, que es el agonista clásico de los RyR, produce una liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  muy parecida a la que se produce en la preparación de conejo (**Figura 8 y 43**). El bombeo de calcio fue suprimido totalmente por la adición de 2  $\mu\text{M}$  de tapsigargina, un inhibidor altamente selectivo de la SERCA (datos no mostrados). En conjunto estas evidencias funcionales sugieren que las Tr obtenidas desde músculo esquelético de rata son análogas a las obtenidas desde músculo de conejo.

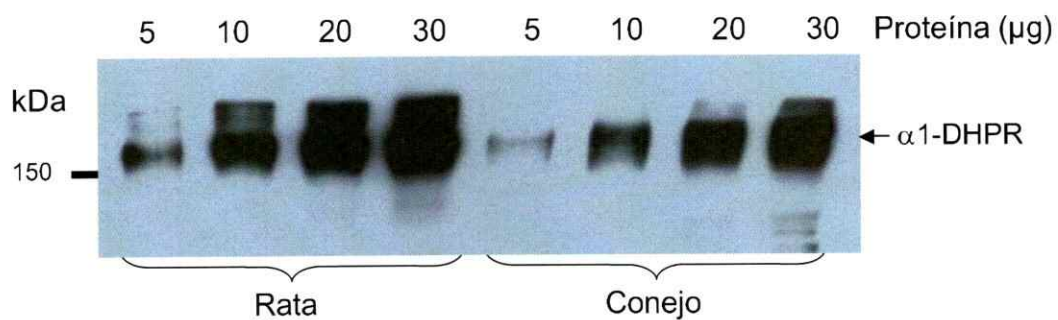
Figura 5.

Unión de [ $^3\text{H}$ ] nitrendipina a vesículas de triadas aisladas desde músculo Esquelético de rata y conejo.



**Figura 5.** Vesículas de triadas aisladas desde músculo esquelético de rata y conejo, fueron ensayadas para la unión [ $^3\text{H}$ ]-Nitrendipina, un ligando de alta afinidad para el DHPR. El gráfico muestra el resultado de dos preparaciones distintas. Cada determinación se fue hecha por triplicado y se muestra el promedio con su desviación estándar.

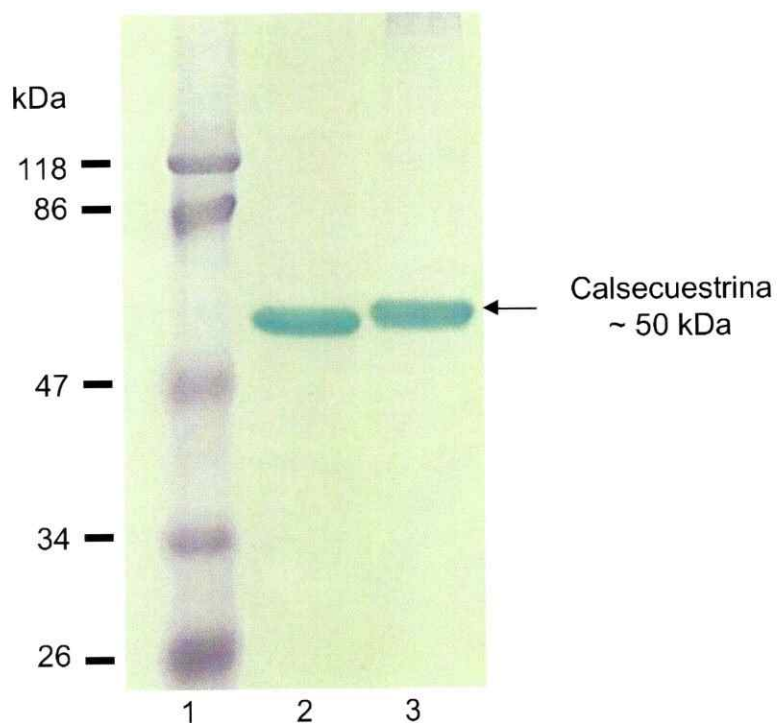
**Figura 6.**  
**El marcador de TT,  $\alpha$ 1-DHPR, se encuentra presente en Triadas obtenidas desde músculo esquelético de conejo y rata.**



**Figura 6.** Un gel en gradiente de poliacrilamida 3-15 % fue cargado con distintas cantidades de triadas obtenidas de músculo esquelético de conejo y rata (como se detalla en la figura). Tras SDS/PAGE el gel fue transferido a nitrocelulosa y se ensayó para la detección de  $\alpha$ 1-DHPR por Western blot.

**Figura 7.**

**Triadas aisladas de músculo esquelético de conejo y de rata contienen cantidades similares de calsecuestrina.**



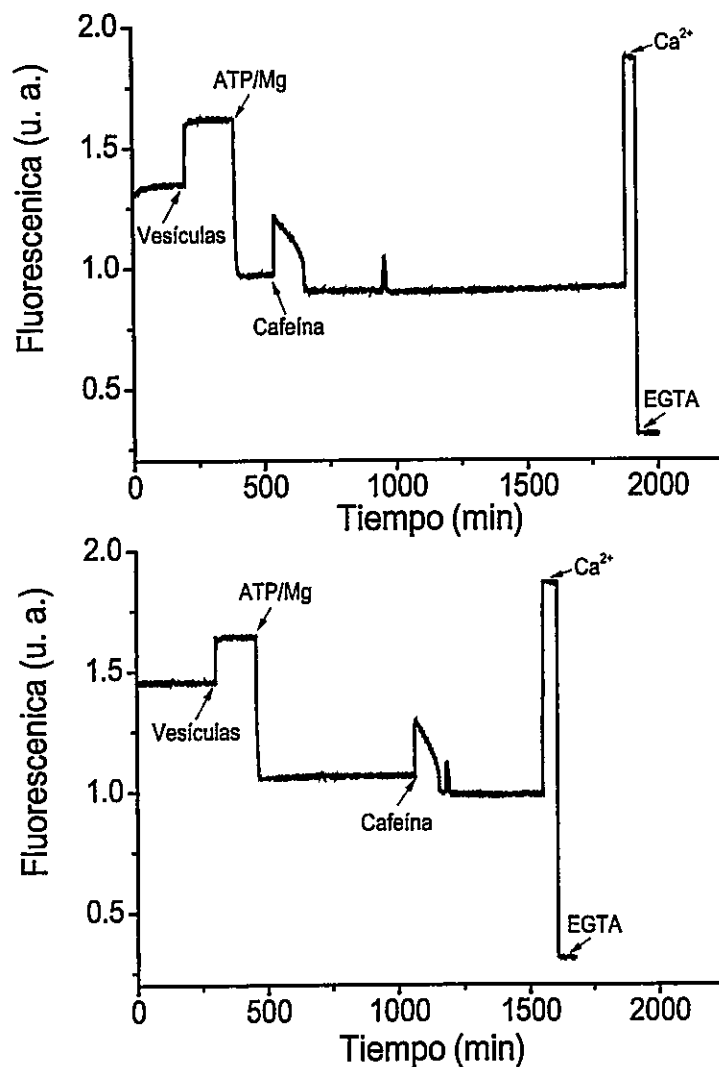
**Figura 7.** Un gel en gradiente de poliacrilamida 3-15 % sometido a SDS/PAGE contenía en el **carril 1**: STD de peso molecular, **carril 2**: 25  $\mu\text{g}$  de la fracción enriquecida en triadas obtenida desde músculo esquelético de conejo y **carril 3**: 25  $\mu\text{g}$  de la fracción enriquecida en triadas obtenida desde músculo esquelético de rata. El gel fue teñido con *Stains All* que marca azul proteínas ácidas como calsecuestrina, que se encuentra en el lumen de las cisternas terminales.

El perfil de proteínas resueltas por SDS/PAGE y teñidas con azul de Coomassie mostró que ambas preparaciones son muy similares (**Figura 9**). Las vesículas de rata presentan las tres bandas características de las Tr: calsecuestrina de aproximadamente 50 kDa, SERCA de alrededor de 100 kDa y el RyR en  $\sim$  500 kDa (**Figura 9**). Las Tr de rata presentan un nivel de caveolina-3 comparable al de las Tr de conejo (**Figura 4**). Algo similar ocurre con el transportador de glucosa glut4 que también se encuentra presente en las Tr de rata (**Figura 10**). En resumen, las Tr de rata al igual que las de conejo contienen  $\alpha$ 1-DHPR, calsecuestrina, SERCA, RyR, glut4 y caveolina-3.

Puesto que evidencia muy reciente sugiere que caveolina-3 podría estar asociada a la membrana del retículo (Li y col., 2006), se ensayó la presencia de esta proteína en las distintas fracciones membranosas obtenidas desde músculo esquelético por centrifugación diferencial y gradientes de densidad (ver esquema en **Figura 1**). Estas fracciones son: Tr, TT, retículo pesado (HSR) y retículo liviano (LSR). HSR corresponde a las cisternas terminales disociadas de las Tr, que contienen calsecuestrina, SERCA y RyR. HSR presenta niveles despreciables de proteínas tubulares, además en gradientes de sacarosa, se equilibra en una alta densidad, dada su alta proporción de proteína versus lípido (Roseblatt y col., 1981). LSR corresponde al retículo longitudinal que está altamente enriquecido en SERCA y prácticamente no contiene calsecuestrina. Presenta una densidad de equilibrio en gradientes de sacarosa menor que HSR (**Figura 1**). El análisis de estas fracciones por medio de Western blot muestra

que caveolina-3 está asociada solo a Tr y TT, pues no se encuentra marca positiva ni en HSR ni en LSR (**Figura 11**).

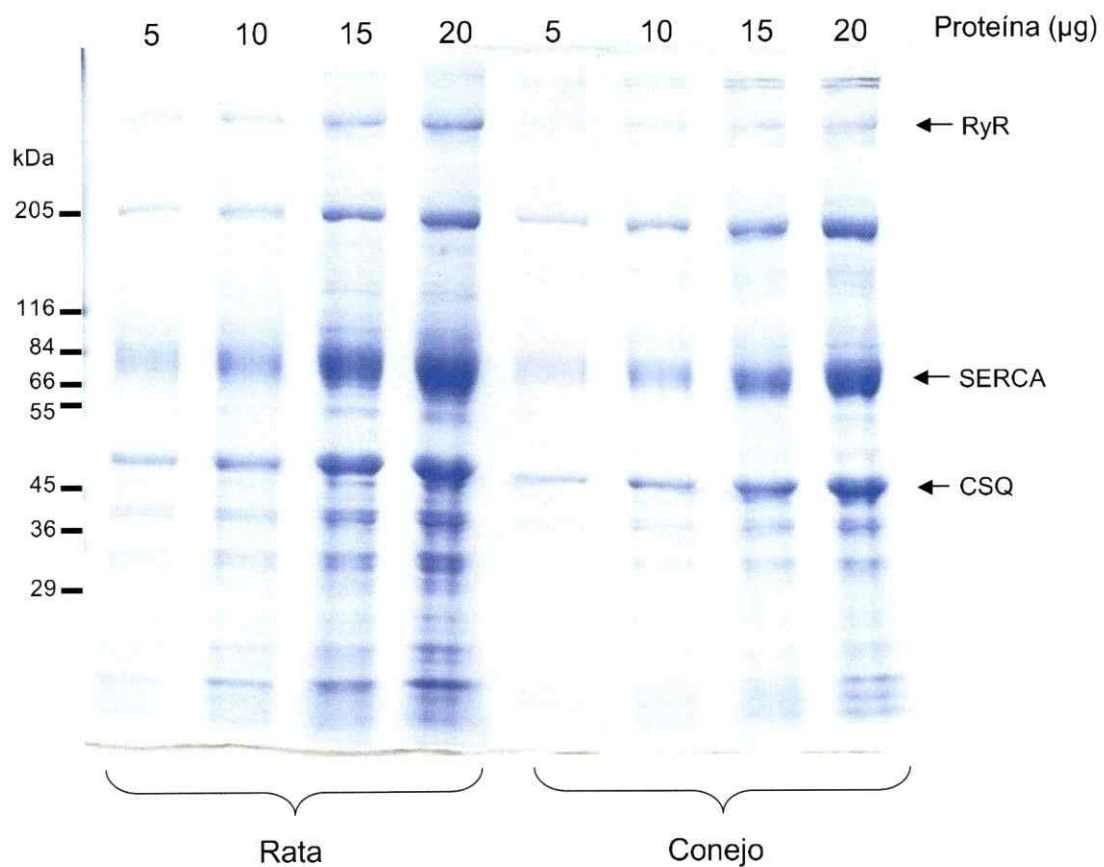
**Figura 8.**  
**Carga y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde triadas obtenidas desde músculo**  
**Esquelético de rata.**



**Figura 8.** Registros del  $\text{Ca}^{2+}$  extra vesicular de triadas de músculo esquelético de rata a 0.2 mg/ml de proteína. La solución contiene un sistema regenerador de ATP y la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Calcium green 5-N. La carga de  $\text{Ca}^{2+}$  fue inducida por la adición de ATP/Mg y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  fue estimulada por la adición de cafeína 4 mM final. Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  máximo y mínimo fueron evaluados por la adición de 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  final y 5 mM EGTA respectivamente. Se muestran registros característicos de dos preparaciones distintas.

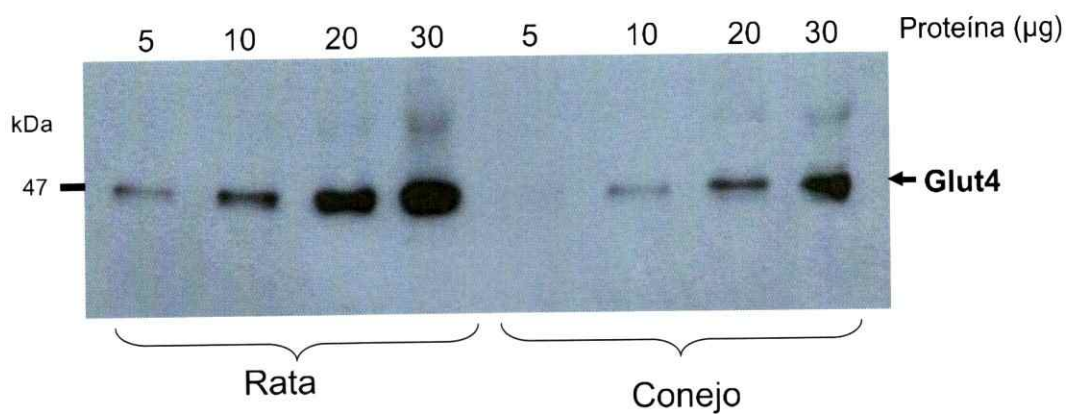


**Figura 9.**  
**Perfil proteico de triadas obtenidas desde músculo**  
**Esquelético de conejo y rata.**



**Figura 9.** Cantidades crecientes de las fracciones enriquecidas en triadas fueron resueltas por SDS/PAGE en geles en gradiente de 3-15 % de acrilamida. El gel fue fijado y teñido con azul de Coomassie.

**Figura 10.**  
**Glut4 se encuentra presente en triadas obtenidas desde músculo**  
**Esquelético de conejo y de rata.**



**Figura 10.** Gel en gradiente de poliacrilamida 3-15 % cargado con cantidades crecientes de triadas obtenidas desde músculo esquelético de conejo y rata. Tras SDS/PAGE el gel fue transferido a nitrocelulosa y se ensayó para la detección de glut4 por Western blot.

Para determinar si caveolina-3 se encuentra en los TT en el tejido muscular adulto intacto se realizaron experimentos de inmunohistoquímica. Fibras musculares de ratones adultos fueron disgregadas en forma mecánica, fijadas y permeabilizadas para ser incubadas con los distintos anticuerpos y luego fueron visualizadas por medio de microscopía confocal. Estos experimentos muestran que caveolina-3 marca el sarcolema y estructuras internas de la fibra muscular que colocalizan parcialmente con la marca para  $\alpha$ 1-DHPR, que es el marcador característico de los TT (**Figuras 12 y 13**). Estas figuras muestran dos cortes característicos de fibras obtenidas de distintos animales.

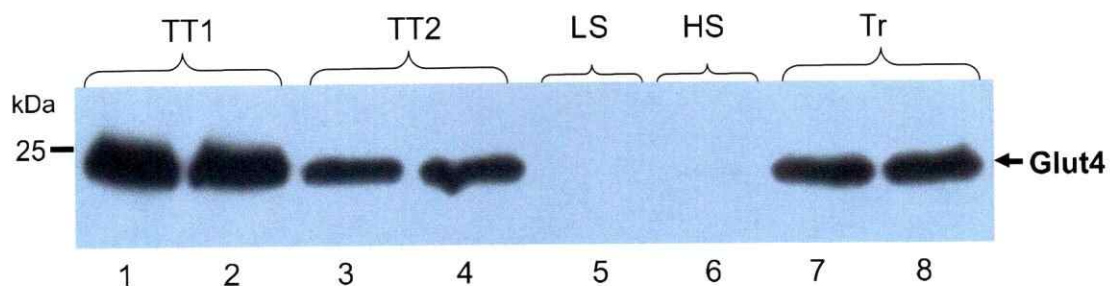
#### **Túbulos transversales aislados.**

La preparación de fracciones insolubles en Tritón X-100 se realizó mediante el ensayo de flotación en un gradiente de sacarosa (Chang y col., 1994). Como material de partida se utilizaron Tr y TT1 aislados de conejo y rata. La solubilización de TT1 resultó en una banda nítida visible a simple vista en ~16 % sacarosa situada en la interfase entre 5 y 30 % sacarosa (**Figura 14**). Esta fracción que se denominó BLTT, y está altamente enriquecida en caveolina-3 (**Figura 23**) y presenta un nivel de colesterol cuatro veces mayor que los TT1 (**Figura 16 y 17**). Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en literatura para las fracciones insolubles en Tritón X-100 (Chang y col., 1994). La solubilización de Tr también produjo una fracción nítida visible a simple vista, enriquecida en colesterol (**Figura 16 B**) y caveolina-3 (**Figura 28**), pero en menor medida que la obtenida desde TT (**Figura 16 B**). Sin embargo, su

densidad es significativamente mayor y se equilibra en 28% de sacarosa; esta fracción fue denominada BLTr (**Figura 18**). Estas BL atípicos fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión. Las muestras aparecen como vesículas unilamelares frecuentemente asociadas a material electrodensos (**Figura 18**). Parte de la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR (**Figura 15**) y glut4 (**Figura 20**) se encuentran en estas fracciones insolubles.

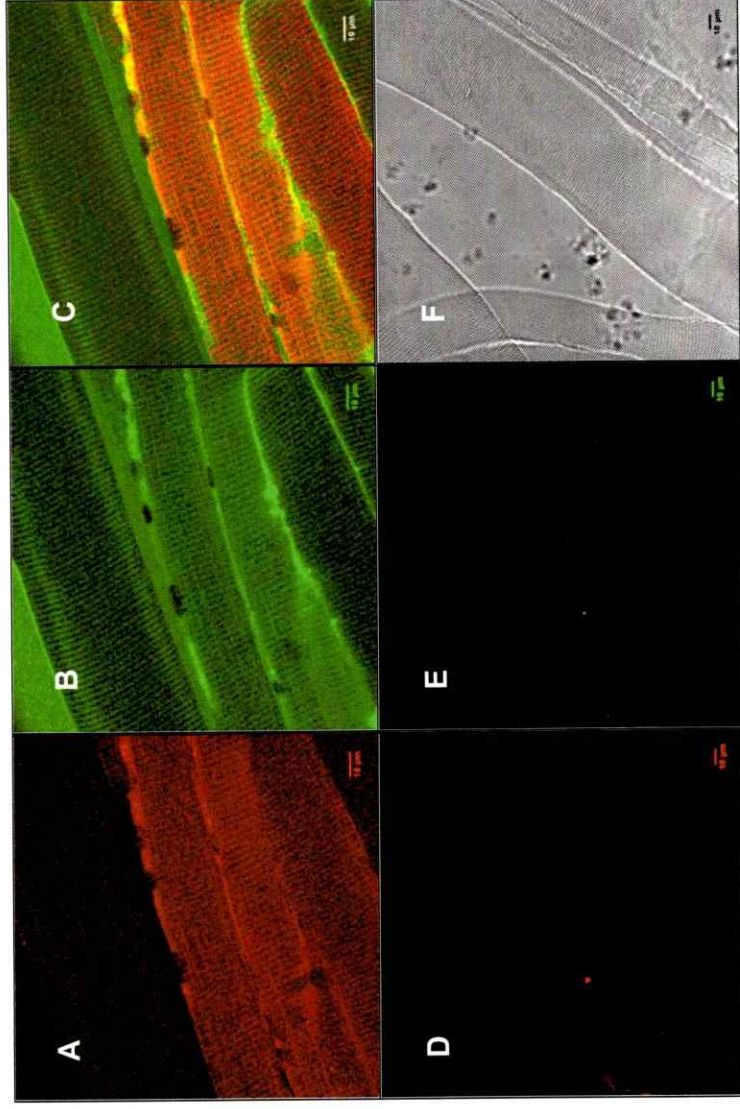
**Figura 11.**

**Caveolina-3 se encuentra asociada sólo a las fracciones que contienen Membranas de TT y no al retículo sarcoplasmático.**



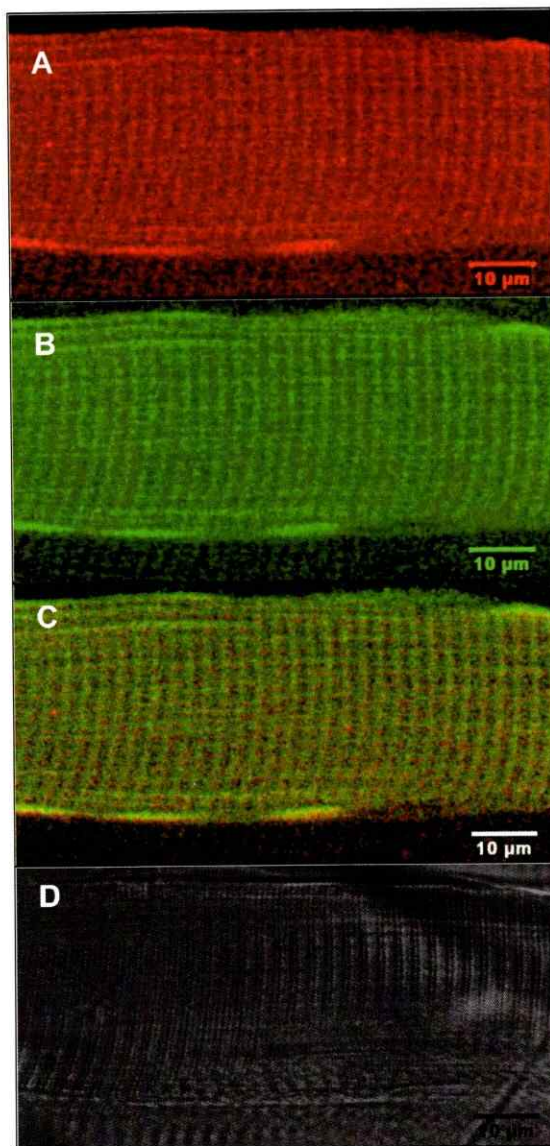
**Figura 11.** Fracciones subcelulares obtenidas desde músculo esquelético de conejo fueron separadas en sus componentes por SDS/PAGE y ensayadas para la presencia de caveolina-3 por medio de Western blot. Cada una de los carriles fue cargado con 20  $\mu\text{g}$  de proteína. **Carriles 1 y 2:** TT1, **carriles 3 y 4:** TT2, **carril 5:** LSR, **carril 6:** HSR, **carriles 7 y 8:** Tr.

Figura 12.



**Figura 12.** Inmunohistoquímica de fibras musculares de ratón disgregadas en forma mecánica. Las fibras de músculo FDB fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas. El panel **A** muestra en rojo la marca obtenida con el anticuerpo para caveolina-3. El panel **B** muestra en verde la imagen obtenida con el anticuerpo para la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR. El panel **C** corresponde a la superposición de las imágenes A y B. Los paneles **D** y **E** corresponden a los controles sin el anticuerpo primario. El panel **F** muestra la imagen transmitida.

**Figura 13.**  
**Caveolina-3 colocaliza con la subunidad**  
 **$\alpha$ 1-DHPR en fibras musculares de ratón.**



**Figura 13.** Inmunohistoquímica de fibras musculares de ratón disgregadas en forma mecánica. Las fibras del músculo FDB de ratón fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas. El panel **A** muestra en rojo la marca obtenida con el anticuerpo contra caveolina-3. El panel **B** en verde la imagen obtenida con el anticuerpo contra  $\alpha$ 1-DHPR. El panel **C** corresponde a la sobreposición de las imágenes A y B. El panel **D** muestra la imagen transmitida.

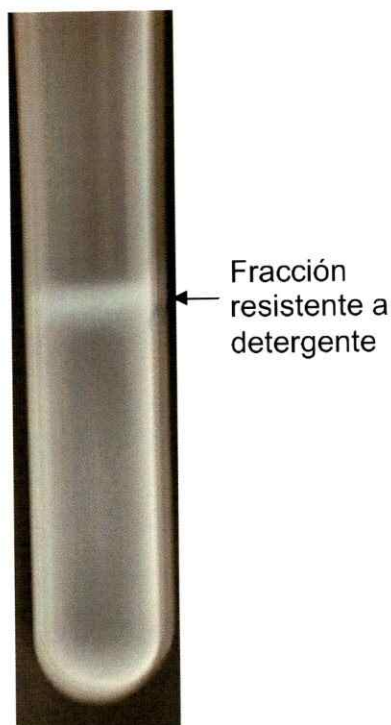
El tratamiento de Tr de rata con 1 % de Tritón X-100 también produce una fracción resistente a la solubilización similar a la obtenida con Tr de conejo (**Figura 27**). Esta fracción se encuentra enriquecida en caveolina-3 respecto a las Tr y es positiva para la presencia de la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR (**figura 27 y 28**).

La razón  $\mu\text{g}$  colesterol/mg de proteína de los BLTr es de  $184.3 \pm 9.8$ , mientras que la de los BLTT es de  $1233 \pm 139$ ; esto representa una diferencia de aproximadamente 6 veces y podría explicar la diferencia de densidades a las cuales se equilibran ambos BL (**Figura 18**). El análisis de la composición proteica de BLTT y BLTr por SDS/PAGE y tinción con Azul de Coomassie, mostró que ambas fracciones están enriquecidas en distintas proteínas (**Figura 21**). Algunas proteínas presentes en los TT no se encuentran en los BLTT, algo similar ocurre para los BLTr en los cuales se pierden proteínas que estaban en las Tr (**Figura 22**).



**Figura 14.**

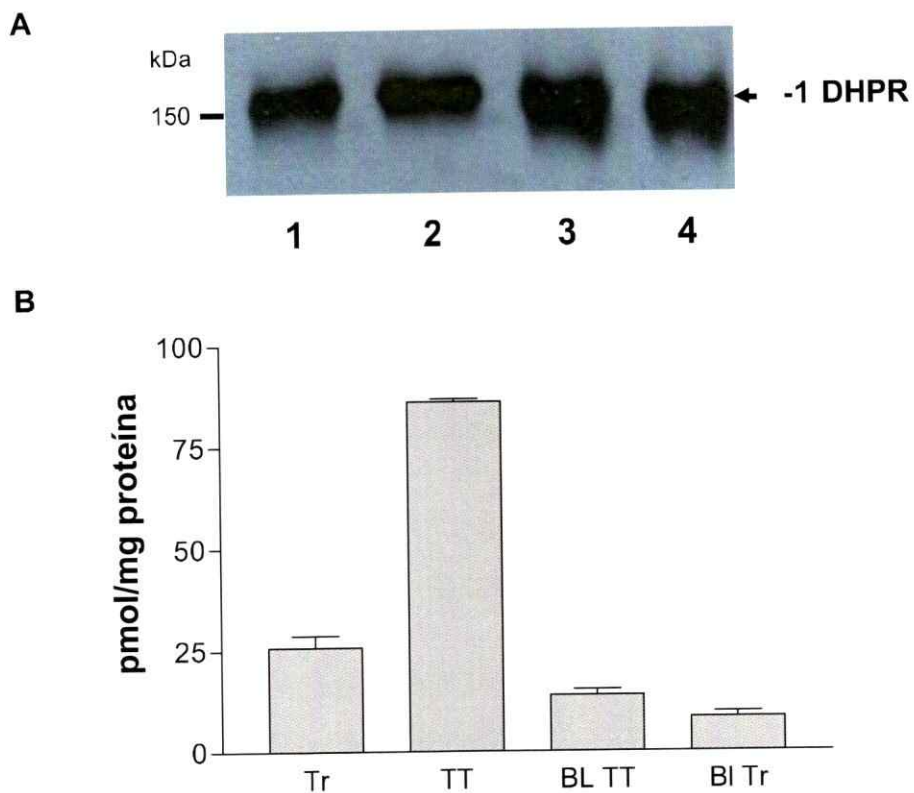
**El tratamiento de TT aislados con 1% de Tritón X-100 produce una Fracción liviana resistente a la solubilización.**



**Figura 14.** Vesículas de TT aislados fueron incubadas con 1 % de Tritón X-100 por 10 minutos a 4 °C. La mezcla fue ajustada a 40 % sacarosa y depositada en el fondo de un tubo de ultracentrifuga. Sobre la muestra se formó una gradiente de sacarosa discontinua de 30 % y 5 %. La muestra fue centrifugada 20 horas.

Figura 15.

La subunidad  $\alpha$ -1 del DHPR está presente en la Fracción resistente a detergente.

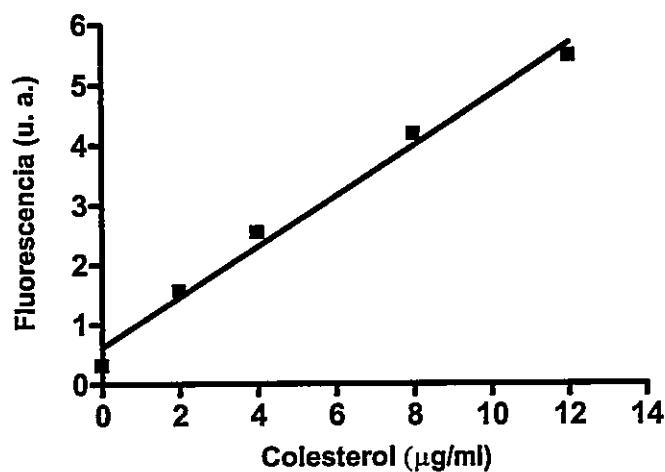


**Figura 15.** (A) Las fracciones enriquecidas en Caveolina-3 obtenidas de triadas, carriles 1 y 2 (13  $\mu$ g de proteína) o TT, carriles 3 y 4 (6  $\mu$ g of proteína) fueron analizadas por Western blot para la subunidad  $\alpha$ -1 del DHPR. (B) Densidad de sitios de unión de [ $^3$ H]-nitrendipina, un ligando de alta afinidad para el DHPR en Triadas (Tr) (0.1 mg/ml), túbulos transversales (TT) (0.01 mg/ml) y en fracciones enriquecidas en caveolina-3 obtenidas desde TT (BL TT) o desde triadas (BL Tr). Todas las fracciones fueron incubadas con 10 nM de [ $^3$ H]-nitrendipina. Los valores mostrados correspondientes a la unión específica (unión total menos la unión inespecífica). Se muestra la determinación en una preparación; cada punto corresponde al promedio de un triplicado más la desviación estándar.

**Figura 16.**  
**Contenido de colesterol de las distintas fracciones obtenidas.**

A

Curva de calibración



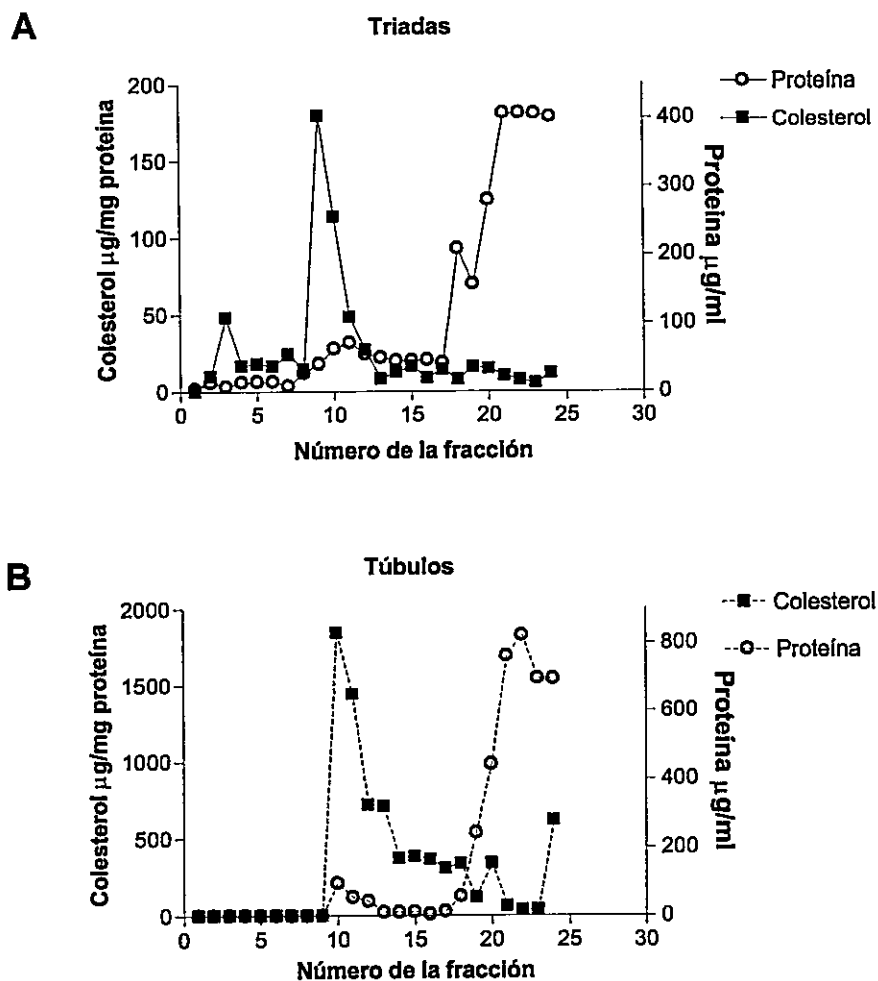
B

<b>Fracción</b>	<b>Colesterol</b> <i>µg/mg proteína</i>
TT1	271.8 ± 34.6 n = 2
BL TT1	1233.0 ± 139.1 n = 4
Triadas	41.5 ± 4.6 n = 4
BL Triadas	184.3 ± 9.8 n = 4
TT2	108.1 ± 39.4 n = 2

**Figura 16.** Determinación del colesterol total en fracciones enriquecidas en triadas, TT, BL TT y BL de triadas. Las fracciones fueron obtenidas como se describe en materiales y métodos. El colesterol fue medido con un kit comercial obtenido de Molecular Probes. (A) Muestra la gráfica de la curva de calibración de colesterol. (B) Cantidad de colesterol (µg/mg de proteína) de las diferentes fracciones obtenidas. Los resultados se muestran como el promedio más la desviación estándar y el número de preparaciones en las que se hizo la determinación.

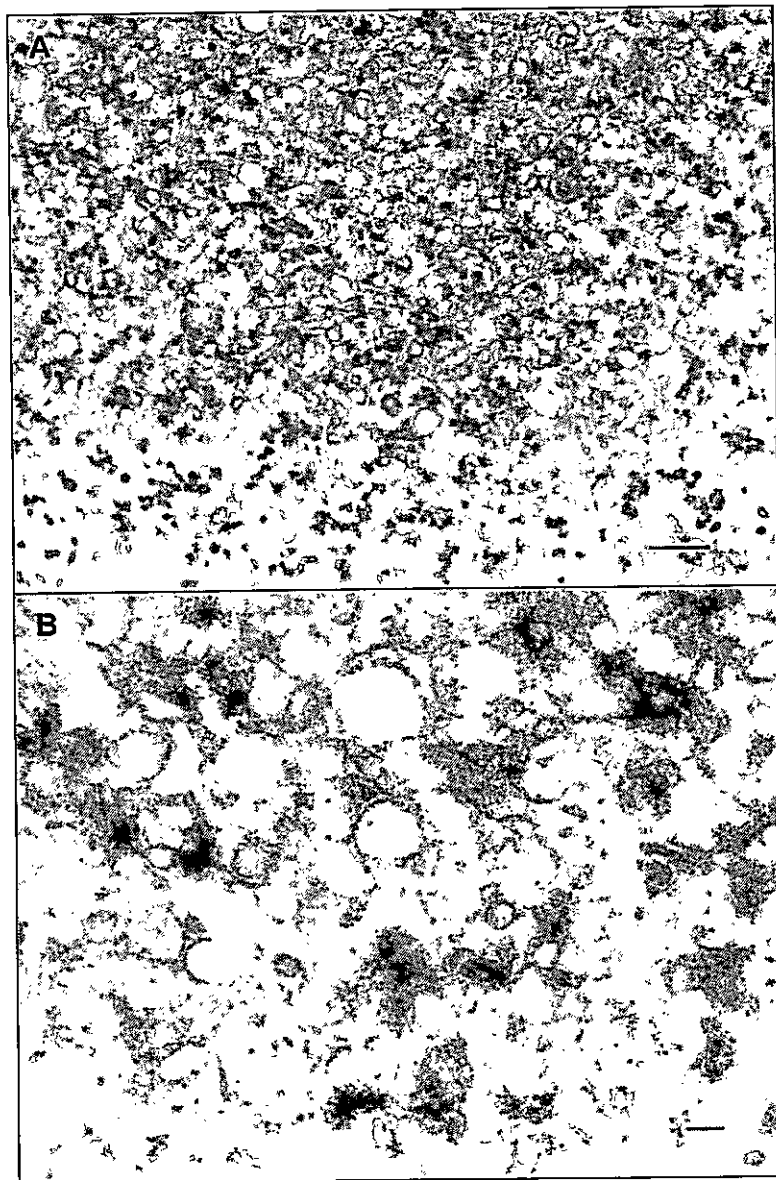
Figura 17.

La incubación de triadas y TT con 1 % Tritón X-100 produce  
Una fracción liviana enriquecida en colesterol.



**Figura 17.** Fracciones enriquecidas en triadas y TT fueron incubadas con 1 % de Tritón X-100 a 4° C y cargadas en el fondo de una gradiente de sacarosa discontinua (capas de 5 % y 30 %). Las muestras fueron centrifugadas 20 horas x 100,000 x g y fraccionadas desde la parte superior. Las concentraciones de proteína y colesterol fueron determinadas en cada una de las fracciones. (A) Fracciones obtenidas desde en triadas incubada con 1 % de Tritón X-100. (B) Fracciones obtenidas desde TT incubada con 1 % Tritón X-100.

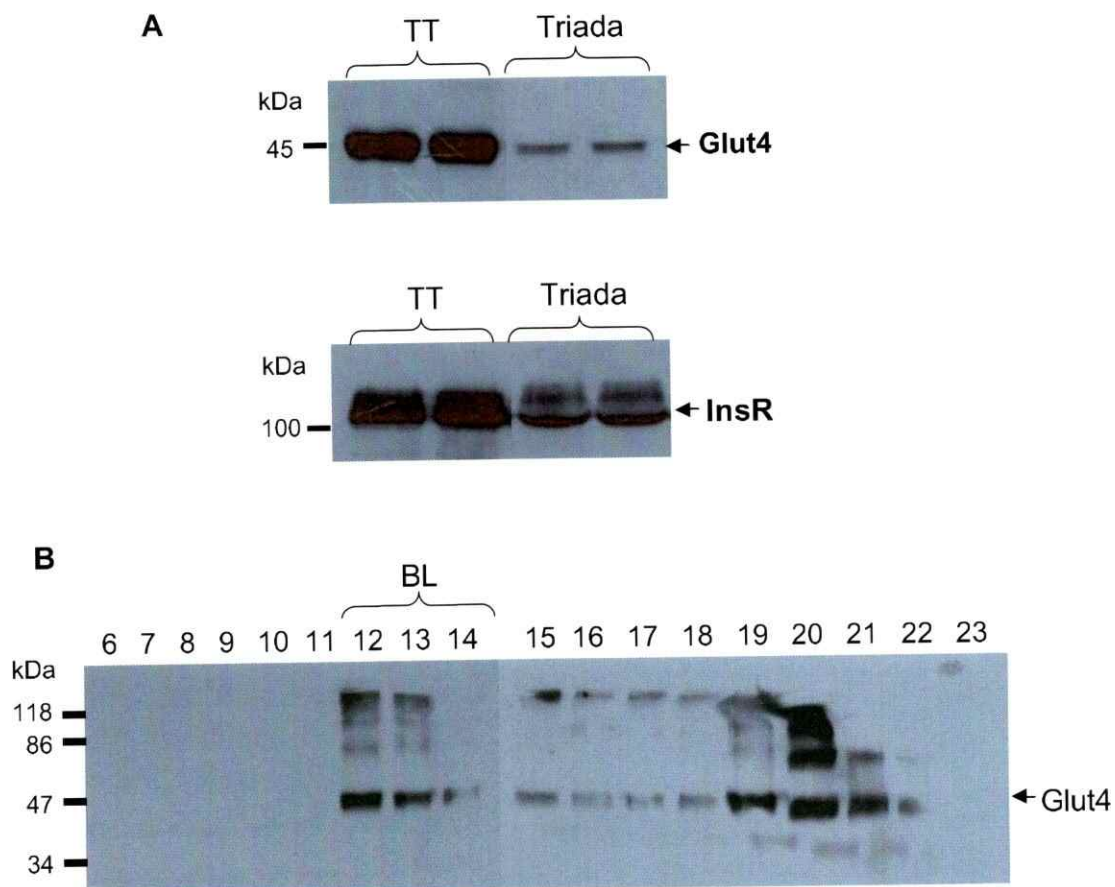
**Figura 18.**  
**Las BL obtenidos desde triadas están**  
**Compuestos por vesículas unilamelares.**



**Figura 18.** Fracciones livianas obtenidas por tratamiento de triadas aisladas con 1 % de Tritón X-100 fueron estudiadas por microscopía electrónica de transmisión. El panel (A) muestra vesículas unilamelares asociadas con material electro denso; la amplificación es 35 000X, la barra indica 170 nm. En el panel (B) se muestra una amplificación de 150 000X; la barra indica 20 nm.

Figura 19.

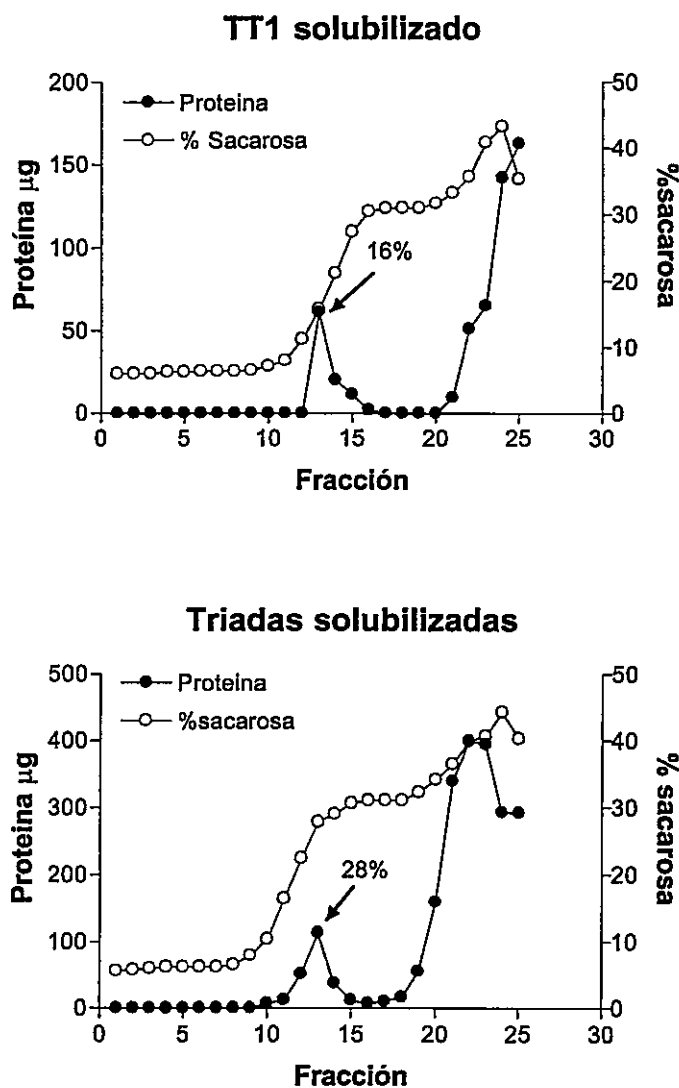
**Glut4 y el receptor de insulina están presentes en los TT y triadas aisladas. Glut4 colocaliza parcialmente en las BL Obtenidos de estas fracciones**



**Figura 19.** (A) Triadas y TT aislados fueron resueltos por SDS/PAGE en geles al 12 % de acrilamida y se ensayaron para glut4 por medio de Western blot, cada carril fue cargado con 25  $\mu$ g de proteína. (B) Se incubaron triadas con 1% de Tritón X-100 por 10 minutos a 4 °C y se ajustó la concentración de sacarosa a 40 %. La mezcla fue depositada en el fondo de un tubo de centrifuga y sobre ella se formó un gradiente de sacarosa discontinua de 30/5 %. Se colectaron fracciones desde la parte superior y una alícuota de cada una de ellas se analizó para glut4 por medio de Western blot.

Figura 20

Las BL obtenidos desde Triadas se equilibran a una Densidad de sacarosa mayor que los obtenidos desde TT.



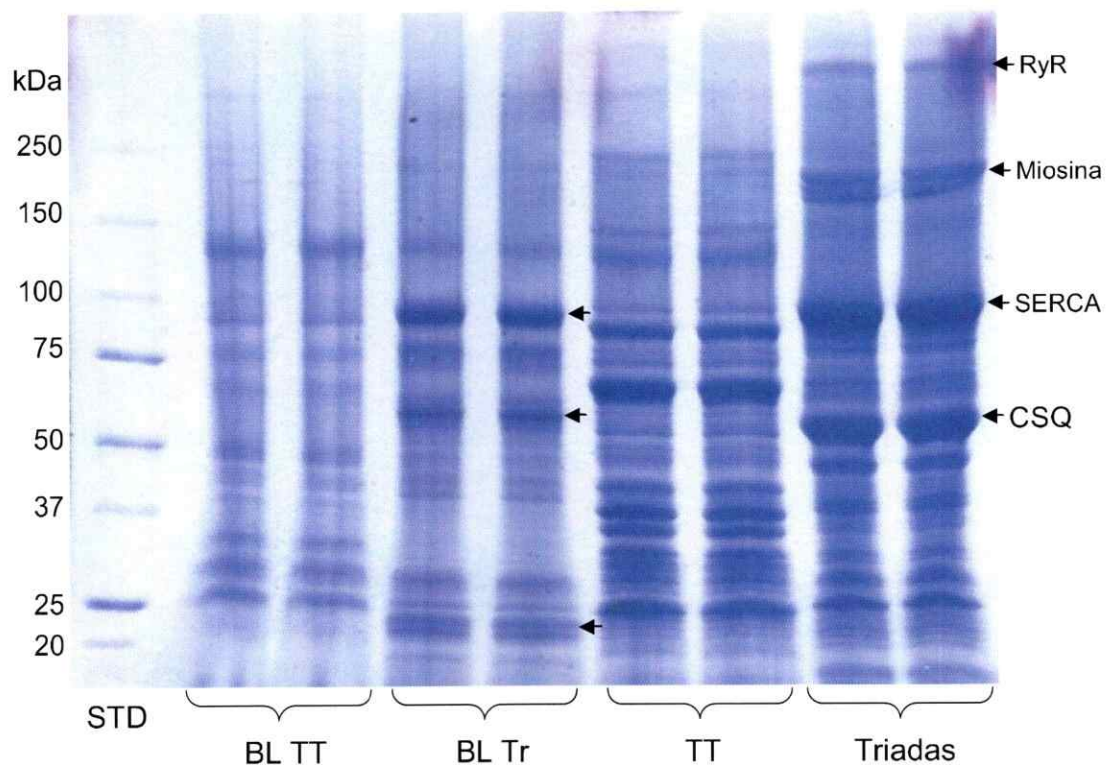
**Figura 20.** Triadas y TT fueron incubados con 1 % de Tritón X-100 y se ajustó la concentración de sacarosa a 40 %. La mezcla fue puesta en el fondo de un tubo de centrifuga y sobre la muestra se formó una gradiente discontinua de sacarosa de 30/5 %. La muestra fue centrifugada 20 horas a 100 000 x g y se colectaron fracciones desde la parte superior de los tubos. A cada una de las fracciones se les midió proteína y la concentración de sacarosa.

El ensayo de solubilización con Tritón X-100 se efectuó a distintas concentraciones de detergente (0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 %) y se determinó el porcentaje de proteína resistente a la solubilización. El resultado mostró que con 1 y 2% de Tritón X-100 alrededor del 10% de los TT1 es resistente a la solubilización (**Figura 22**). El análisis de estas fracciones por SDS/PAGE y tinción con Azul de Coomassie, mostró que todas ellas poseen una composición proteica similar. Sin embargo, la cantidad de proteína total resistente disminuye a medida que aumenta la concentración de Tritón X-100 (**figura 23 A**). Todas las fracciones insolubles en detergente fueron positivas para caveolina-3 (**Figura 23 B**).

Como método alternativo de preparación de las BL se usó la técnica de solubilización con carbonato a pH alcalino (Song y col., 1996a). De esta forma se obtuvo una fracción que se equilibra en la interfase 5/30% sacarosa y que contiene caveolina-3 y  $\alpha$ 1-DHPR (datos no mostrados).

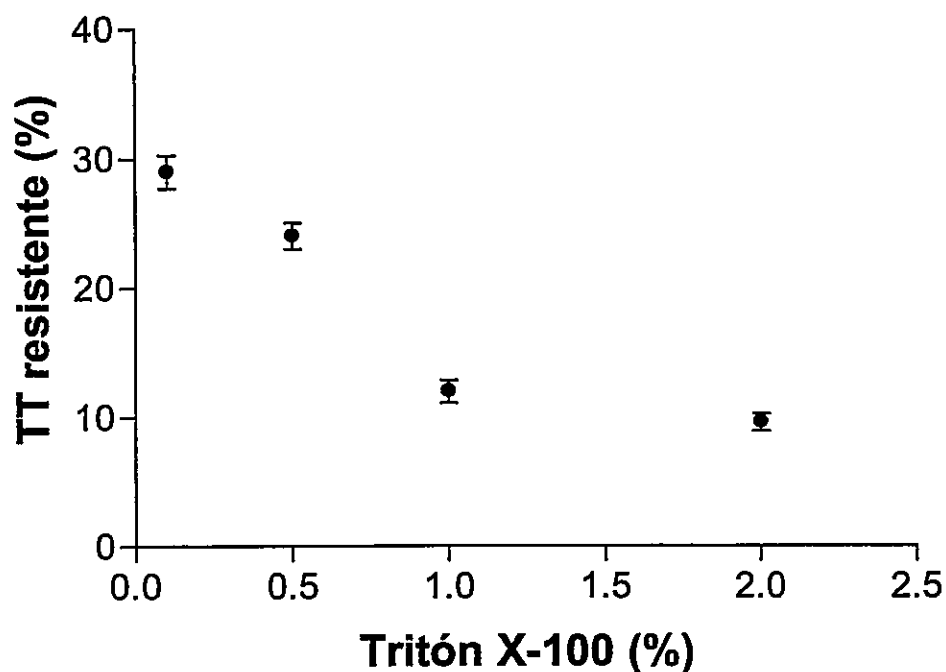


**Figura 21.**  
**Perfil proteico de BL obtenidos desde fracciones**  
**Enriquecidas en triadas y túbulos transversales.**



**Figura 21.** Gel en gradiente 3-15 % de acrilamida teñido con azul de Coomassie tras SDS/PAGE. Las muestras fueron cargadas por duplicado. Los carriles de BL TT y BL Tr fueron cargados con 5  $\mu$ g. Los carriles de TT y Triadas fueron cargados con 10  $\mu$ g de proteína.

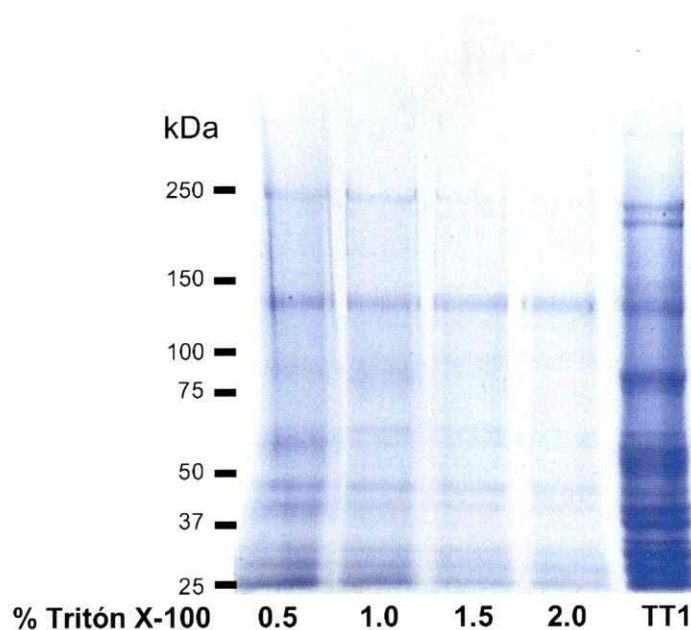
**Figura 22.**  
**Tratamiento de vesículas de TT aislados con**  
**Distintas concentraciones de Tritón X-100.**



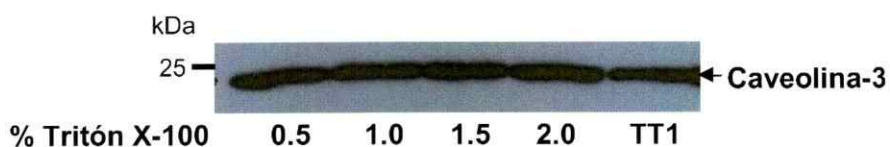
**Figura 22.** Vesículas de TT aislados fueron incubadas con distintas concentraciones de Tritón X-100 por 10 minutos a 4 °C. Luego se ajustó la concentración de sacarosa a 40 % y la mezcla se depositó en el fondo de un tubo de centrifuga. Sobre la muestra se formó una gradiente de sacarosa discontinua 30/5 % que se centrifugó 20 horas a 100 000 x g. La fracción resistente a solubilización fue colectada y se determinó la concentración de proteína. El gráfico muestra el promedio más la desviación estándar de tres preparaciones distintas.

**Figura 23**  
**Análisis de las BL obtenidos a distintas**  
**Concentraciones de detergente.**

**A**



**B**



**Figura 23.** Vesículas de TT aislados fueron incubadas con distintas concentraciones de Tritón X-100 por 10 minutos a 4 °C, se ajustó la concentración de sacarosa a 40 % y la mezcla se depositó en el fondo de un tubo de centrifuga. Sobre la muestra se formó una gradiente de sacarosa discontinua 30/5 % y fue centrifugada 20 horas a 100,000 x g. La fracción resistente a solubilización fue colectada y se determinó la concentración de proteína. Las proteínas fueron resueltas por SDS/PAGE y teñidas con azul de Coomassie (A) o analizadas por Western blot (B). Los carriles fueron cargados con (de izquierda a derecha) 17, 14, 8 y 6  $\mu$ g

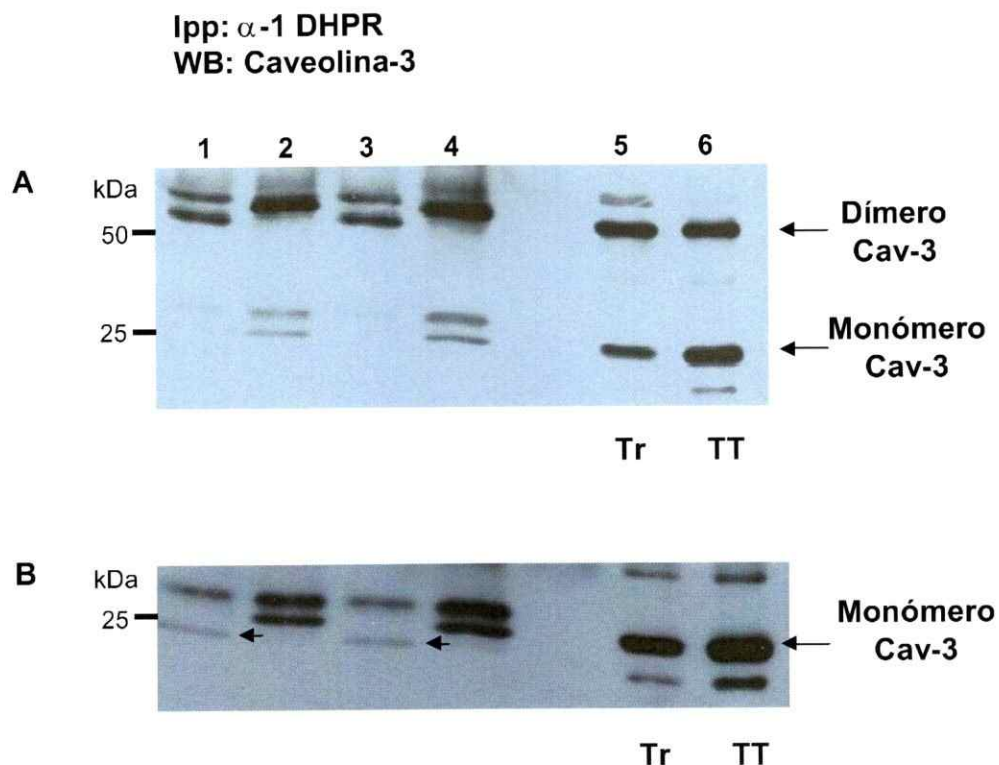
### **Objetivo Específico 2.**

Establecer si caveolina-3 y  $\alpha$ 1-DHPR colocalizan y forman un complejo proteico.

Los experimentos en fibras musculares de ratón muestran que caveolina-3 y  $\alpha$ 1-DHPR colocalizan a nivel de los TT (**Figuras 12 y 13**). Para determinar si estas proteínas forman un complejo, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación (co-ipp) con anticuerpos contra caveolina-3 y contra la subunidad  $\alpha$ 1 del DHPR.

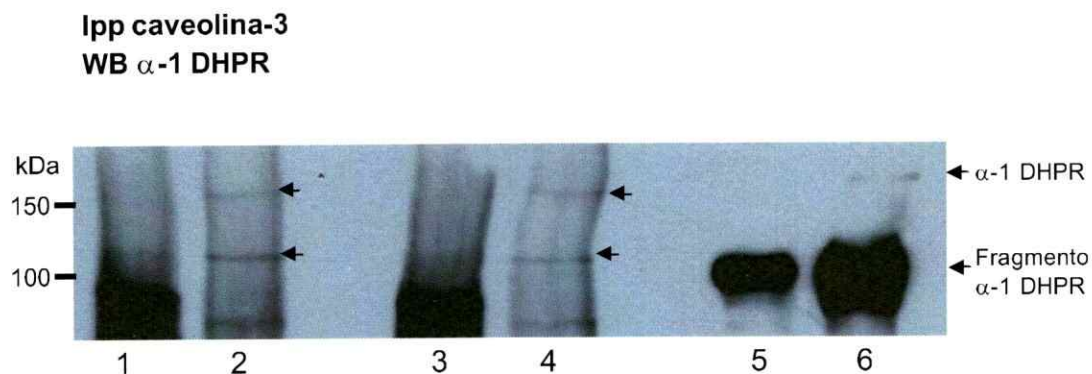
Las muestras para la co-ipp fueron incubadas con un anticuerpo específico para caveolina-3 y con el respectivo suero preinmune como control. Los complejos fueron separados con proteína *A/G plus* unida a esferas de agarosa. En la inmunoprecipitación con el anticuerpo para  $\alpha$ 1-DHPR (**Figura 24**) se puede apreciar una banda que puede corresponder al dímero de caveolina-3 (**Figura 24 panel A**). En el panel B se puede apreciar una banda tenue que migra más abajo que la banda que se encuentra en la carril control y que podría corresponder al monómero de caveolina-3 (**Figura 24 panel B**). En la inmunoprecipitación con el anticuerpo para caveolina-3 (**Figura 25**), se aprecia una banda tenue que se ubica en el peso molecular de  $\alpha$ 1-DHPR intacto (**Figura 25 carriles 2 y 4**) y otra a la altura del fragmento proteolítico presente en las muestras control (**Figura 25 carriles 5 y 6**).

**Figura 24.**  
**Inmuno precipitación de caveolina-3 con anti DHPR.**



**Figura 24.** 100  $\mu$ l de triadas a 1 mg/ml fueron inmunoprecipitados con 25  $\mu$ g/ml de anti  $\alpha$ -1 DHPR o 25  $\mu$ g/ml de un anticuerpo control. El complejo fue separado con proteína AG-sefarosa y analizado por Western blot para caveolina-3. **Carriles 1 y 3:** anti  $\alpha$ -1 DHPR; **carriles 2 y 4:** anticuerpo control; **carriles 5 y 6:** controles positivos, 10  $\mu$ g de vesículas triadas o de túbulos transversales respectivamente. **(A)** y **(B)** son diferentes tiempos de exposición. La figura muestra dos experimentos independientes con dos preparaciones distintas.

**Figura 25.**  
**Coinmunoprecipitación de caveolina-3 con  $\alpha$ 1-DHPR.**



**Figura 25.** 100  $\mu$ l de triadas a 1 mg/ml fueron inmunoprecipitados con 25  $\mu$ g/ml de anti caveolina-3 o 25  $\mu$ g/ml de un anticuerpo control. El complejo fue separado con proteína AG-sefariosa y analizado por Western blot para caveolina-3. Carriles 1 y 3: anticuerpo control; carriles 2 y 4 anticuerpo para  $\alpha$ -1 DHPR; carriles 5 y 6: controles positivos, 10  $\mu$ g de vesículas de triadas y 10  $\mu$ g de túbulos transversales respectivamente. Las cabezas de flecha muestran la posición de la subunidad  $\alpha$ 1 del DHPR de largo total (flecha superior) y del fragmento (flecha inferior). La figura muestra dos experimentos independientes con dos preparaciones distintas.

Se utilizaron distintos protocolos de co-ipp para mejorar el resultado, pero en los controles con el suero preinmune frecuentemente aparecía la banda de caveolina-3 o  $\alpha 1$  del DHPR. En los experimentos de co-ipp con anti caveolina-3, el uso de 0,05 o 0,1% de SDS en el tampón produjo la desaparición de  $\alpha 1$ -DHPR en el control y en la inmunoprecipitación con anti caveolina-3. Esto sugiere que el SDS rompe la posible interacción entre caveolina-3 y  $\alpha 1$ -DHPR (datos no mostrados).

Mediante inmunohistoquímica de fibras disgregadas de ratón, se encontró que caveolina-3 colocaliza parcialmente con la subunidad  $\alpha 1$ -DHPR que es un marcador específico de TT (**Figura 13 y 14**). Glut4 y el receptor de insulina colocalizan con  $\alpha 1$ -DHPR en las fibras disgregadas (**Figuras 26 y 29**). Además, tanto glut4 como el receptor de insulina se encuentran en las Tr aisladas (**Figuras 30 y 20**).

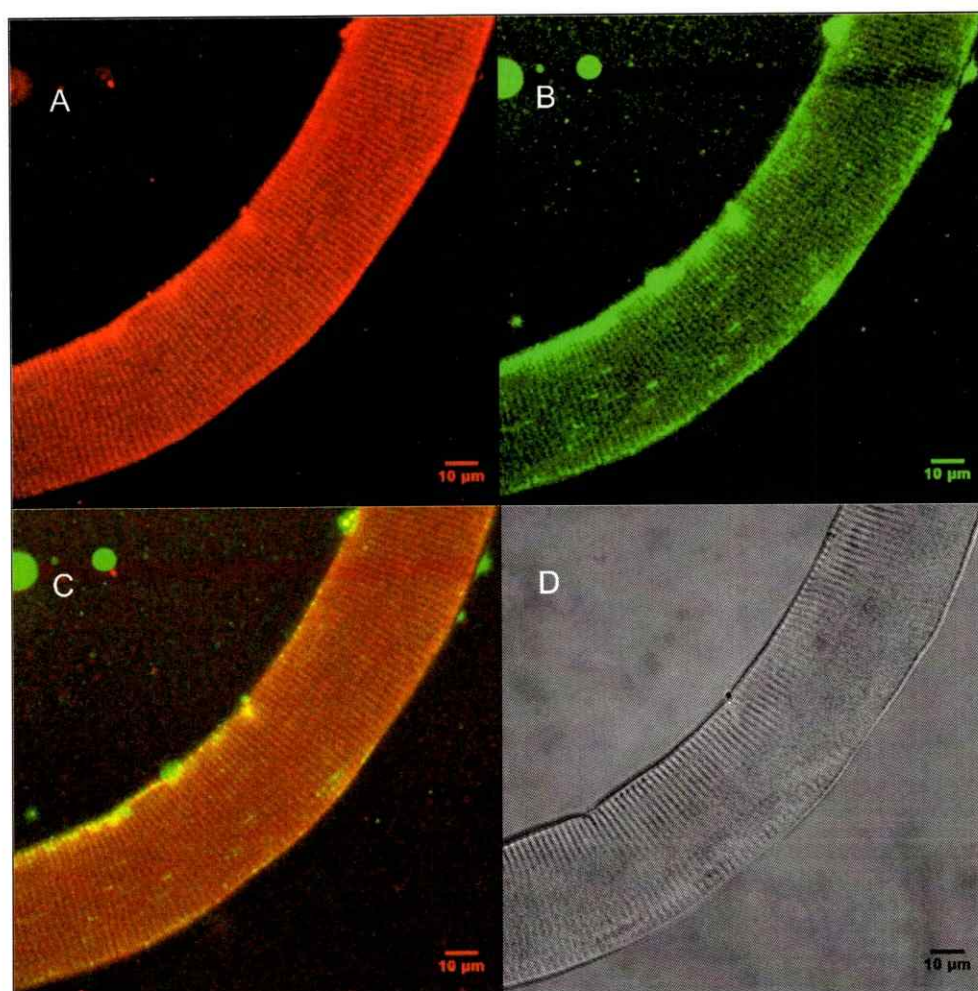
**Objetivo Específico 3.** Determinar si caveolina-3 modula directa o indirectamente el acoplamiento EC en vesículas de Tr aisladas.

Para abordar este objetivo se intentó poner a punto la técnica de liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por despolarización de las vesículas de Tr aisladas descrita por Ikemoto y col (Ikemoto y col., 1994). Para esto se usaron Tr de conejo y rata. Sin embargo, la técnica resultó poco reproducible y se obtuvieron resultados positivos en un número muy reducido de preparaciones (**Figuras 31**

y 32). Por lo anterior no se pudo ensayar el efecto de la remoción del colesterol ni de péptidos con la secuencia de unión a caveolina-3.

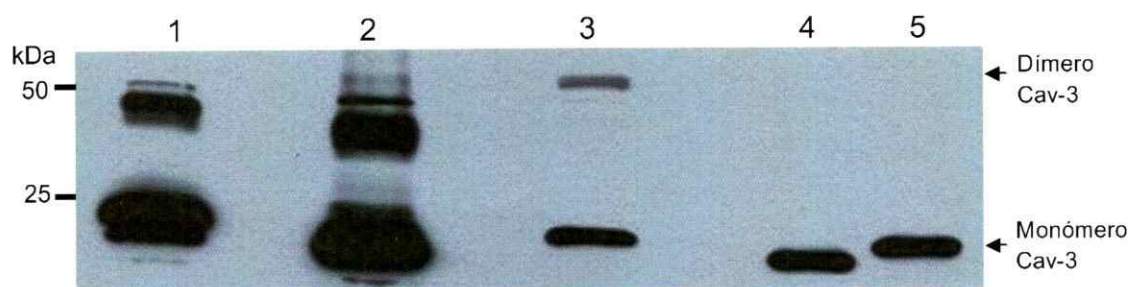


**Figura 26.**  
**Glut4 y  $\alpha$ 1-DHPR colocalizan en fibras**  
**Musculares disgregadas de ratón.**



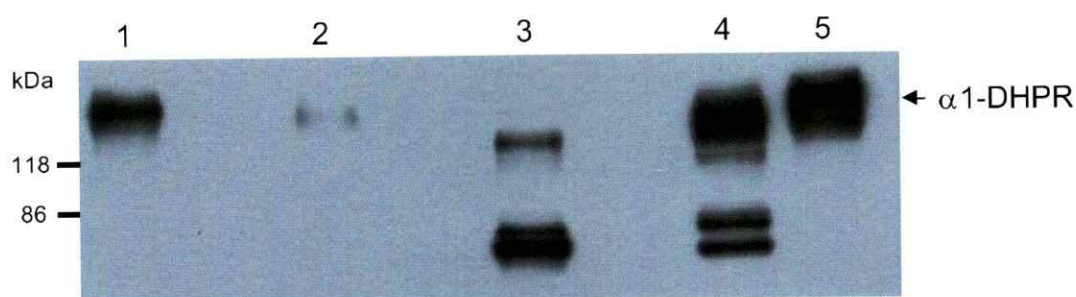
**Figura 26.** Inmunohistoquímica de fibras musculares de ratón disgregadas en forma mecánica. Las fibras fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas. El panel **A** muestra en rojo la marca obtenida con el anticuerpo para Glut4. El panel **B** muestra en verde la imagen obtenida con el anticuerpo para la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR. El panel **C** corresponde a la superposición de las imágenes A y B. El panel **D** es la imagen transmitida. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal.

**Figura 27.**  
**Las BL obtenidos desde vesículas de triadas de**  
**Rata están enriquecidos en caveolina-3.**



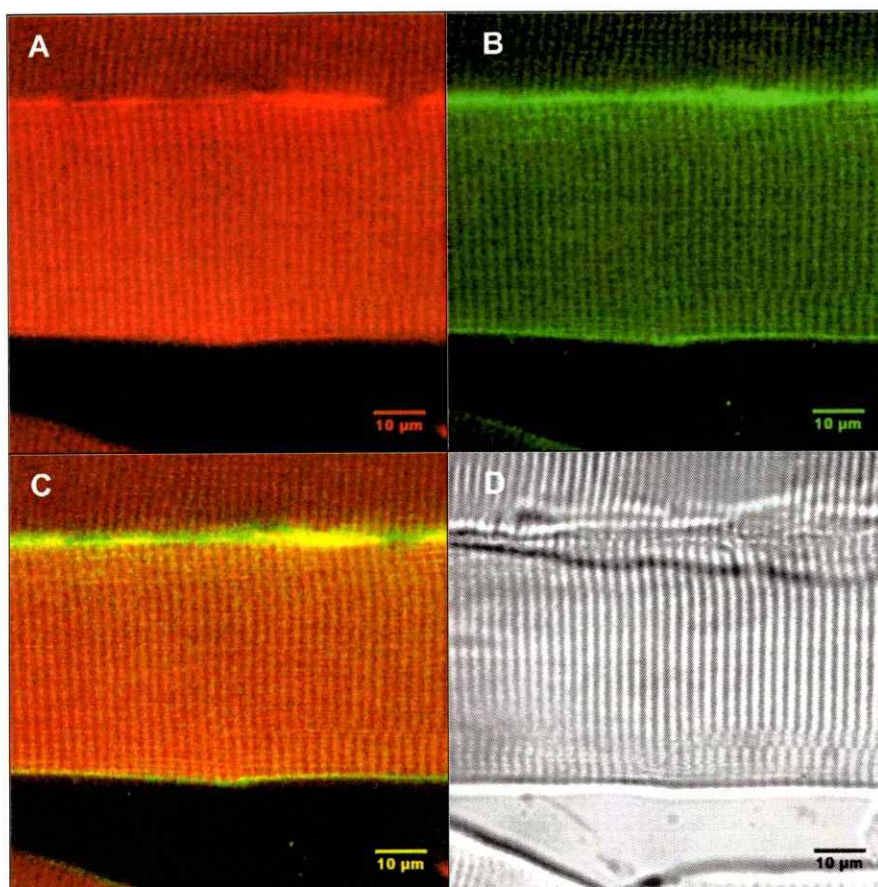
**Figura 27.** Triadas de rata fueron incubadas con 1 % Tritón X-100 10 minutos a 4 °C y luego se ajustó la concentración del medio a 40 % de sacarosa. La mezcla fue puesta en el fondo de un tubo de centrifuga y se formó una gradiente de sacarosa discontinua 30/5 %. La fracción liviana resistente fue colectada y sedimentada a 100 000 x g. La proteína obtenida fue resuelta por SDS/PAGE en gradiente de poliacrilamida 3-15% seguido de Western blot para caveolina-3. **Carriles 1 y 2:** 15 µg de BL obtenidos desde triadas de conejo, y desde triadas de rata respectivamente, **carril 3:** 15 µg TT de unión de rata, **carriles 4 y 5:** 20 µg de triada de rata y de conejo, respectivamente. Las bandas ubicadas cerca de 50 kDa corresponden a dímeros de caveolina-3.

**Figura 28**  
**Las BL obtenidos desde triadas de rata**  
**Contienen la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR.**



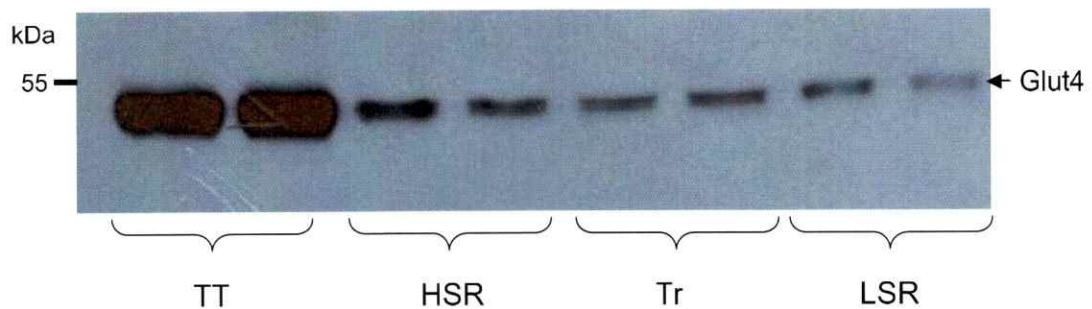
**Figura 28.** Triadas de rata fueron incubadas con 1 % Tritón X-100 10 minutos a 4 °C y se ajustó la concentración a 40 % de sacarosa. La mezcla fue puesta en el fondo de un tubo de centrifuga y se formó una gradiente de sacarosa discontinua 30/5 %. La fracción liviana resistente fue colectada y sedimentada a 100 000 x g. La proteína obtenida fue resuelta por SDS/PAGE en gradiente de poliacrilamida 3-15% seguido de Western blot para  $\alpha$ 1-DHPR. **Carriles 1 y 2:** 15  $\mu$ g de BL obtenidos desde triadas de conejo, y desde triadas de rata respectivamente, **carril 3:** 15  $\mu$ g TT de unión de rata, **carril 4 y 5:** 20  $\mu$ g de triada de rata y de conejo respectivamente. Las bandas cerca de 84 kDa corresponden a fragmentos proteolíticos.

**Figura 29**  
**La caveolina-3 colocaliza con el receptor de insulina en**  
**Fibras musculares de ratón disgregadas.**



**Figura 29.** Inmunohistoquímica de fibras musculares de ratón disgregadas en forma mecánica. Las fibras fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con 0.1 % de Tritón-X100. El panel (A) muestra en rojo la marca obtenida con el anticuerpo para caveolina-3. El panel (B) muestra en verde la imagen obtenida con el anticuerpo para la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina. El panel (C) corresponde a la sobreposición de las imágenes A y B. El panel (D) a la imagen transmitida.

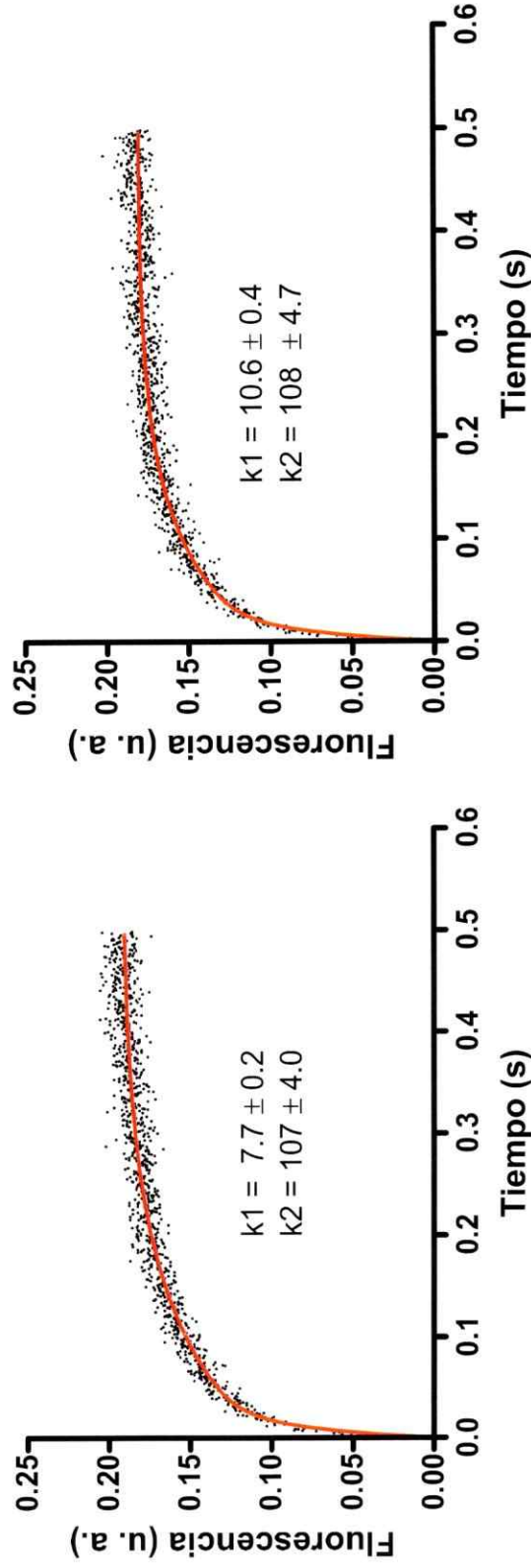
**Figura 30.**  
**Distribución de glut4 en fracciones subcelulares**  
**Aisladas desde músculo esquelético de conejo.**



**Figura 30.** Fracciones subcelulares obtenidas desde músculo esquelético fueron resueltas por SDS/PAGE y ensayadas para glut4 por Western blot. Los carriles fueron cargados por duplicado con 25  $\mu$ g de proteína. **TT:** túbulo transversal, **HSR:** retículo pesado, **Tr:** triadas y **LSR:** retículo liviano.

Figura 31.

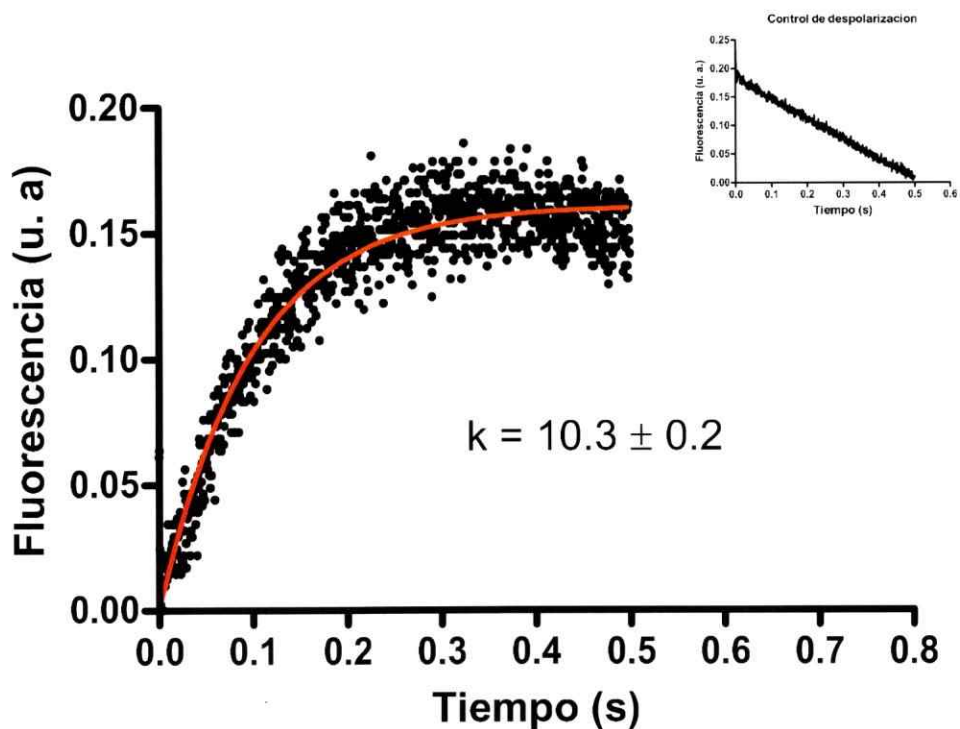
Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por despolarización de triadas aisladas.



**Figura 31.** Triadas en KGluconato con  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extravesicular cargadas en forma activa, fueron despolarizadas por dilución en un medio con NaGluconato. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  fue seguida en un aparato de flujo detenido con la sonda fluorescente calcium green-2. Las curvas de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vs tiempo fueron ajustadas a una doble exponencial, se muestran las constantes de tiempo  $k1$  y  $k2$  obtenidas desde el ajuste a la doble exponencial. La figura muestra dos registros tipo de dos preparaciones distintas. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea roja continua es el ajuste a una doble exponencial.

Figura 32.

La despolarización de vesículas de triadas de rata con Gluconato de sodio induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 32.** Fracciones enriquecidas en vesículas de triadas de rata, fueron cargadas activamente con  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ATP/Mg a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un medio con alto  $\text{K}^{+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  extravésicula fue medido con la sonda fluorescente Calcium green-2 en un equipo de flujo detenido. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se indujo por dilución en un medio rico en sodio. En el inserto se muestra el control de dilución sin despolarización que se obtuvo mezclando las vesículas sin alterar la concentración final de  $\text{K}^{+}$ .

**Objetivo Específico 4.** Titular la remoción de colesterol desde vesículas Tr y TT aislados con metilbetaciclodextrina.

TT aislados fueron tratados con distintas concentraciones de metilbetaciclodextrina (M $\beta$ CD), un compuesto ampliamente utilizado para remover el colesterol desde membranas (Llangumaran y Hoessli, 1998). El colesterol de las preparaciones fue titulado mediante un kit fluorescente. En las condiciones ensayadas, 4.5 % de M $\beta$ CD extrae gran parte del colesterol de los TT, en tanto que en Tr 2 % de este compuesto remueve prácticamente todo el colesterol desde TT aislados (**Figura 33**).

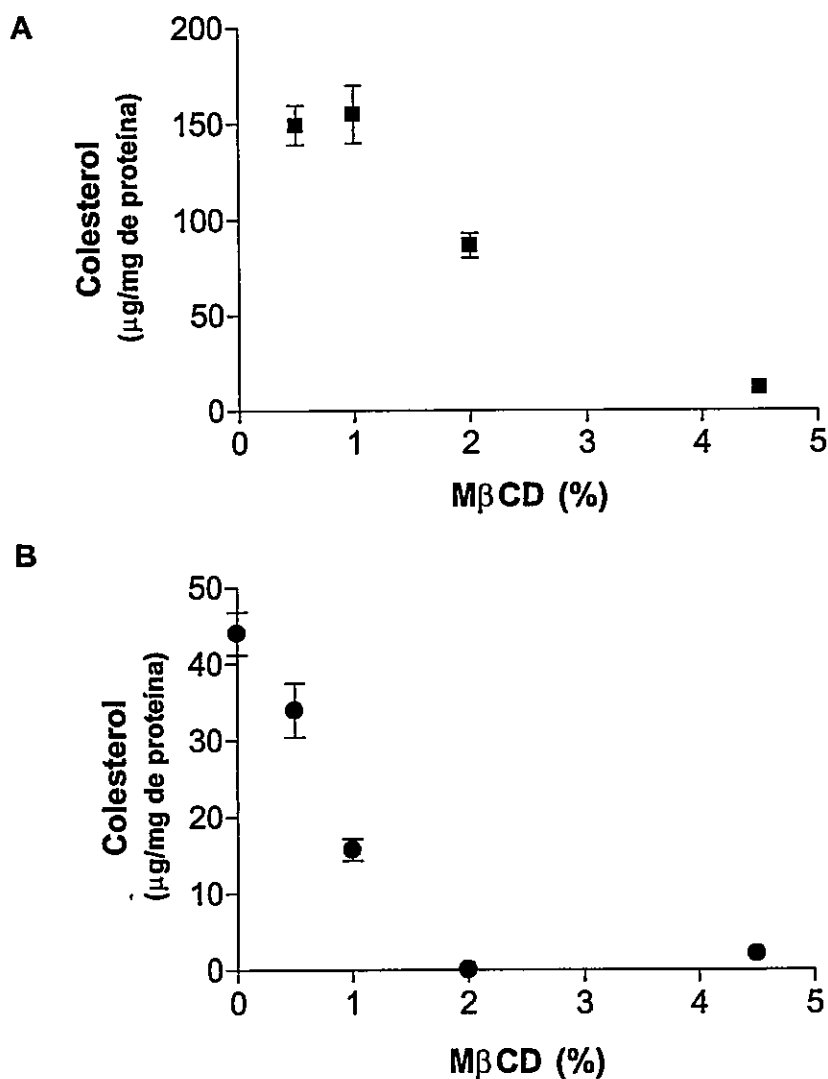
**Objetivo Específico 5.** Determinar a que región de los TT (libre o de unión) se encuentra asociada caveolina-3.

Los TT son el principal sitio de translocación del transportador de glucosa glut4 en respuesta a insulina (Dohm y col., 1993) y los TT totales aislados contienen glut-4 y el receptor de insulina (**Figura 20 A**). La centrifugación de Tr en un gradiente de sacarosa libre de sales produce la separación de las cisternas terminales y los TT asociados o TT de unión (Horgan y Kuypers, 1988). De esta forma es posible aislar los TT de unión (JTT) y compararlos con los TT totales aislados mediante la preparación de Roseblatt y col que produce una



mezcla de JTT y TT libre (**Figura 1**). La técnica de Horgan y Kuypers efectivamente separa el TT de unión de las Tr y produce una banda nítida en la gradiente sin iones . Esta fracción presenta la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR, el principal marcador de TT, y además contiene caveolina-3 (**Figura 34**).

**Figura 33**  
**Extracción de colesterol con cantidades crecientes**  
**De M $\beta$ CD desde Triadas y TT asilados.**



**Figura 33.** TT (A) y Triadas (B) aislados fueron incubados a 1 mg/ml de proteína con distintas concentraciones de MbCD e incubados por 30 minutos a 4 0C. Tras ser centrifugados a 100 000 x g 5 minutos, se determinó la concentración de colesterol y proteína de los sedimentos. Se muestra el promedio más la desviación estándar de dos determinaciones independientes, cada una realizada por duplicado.

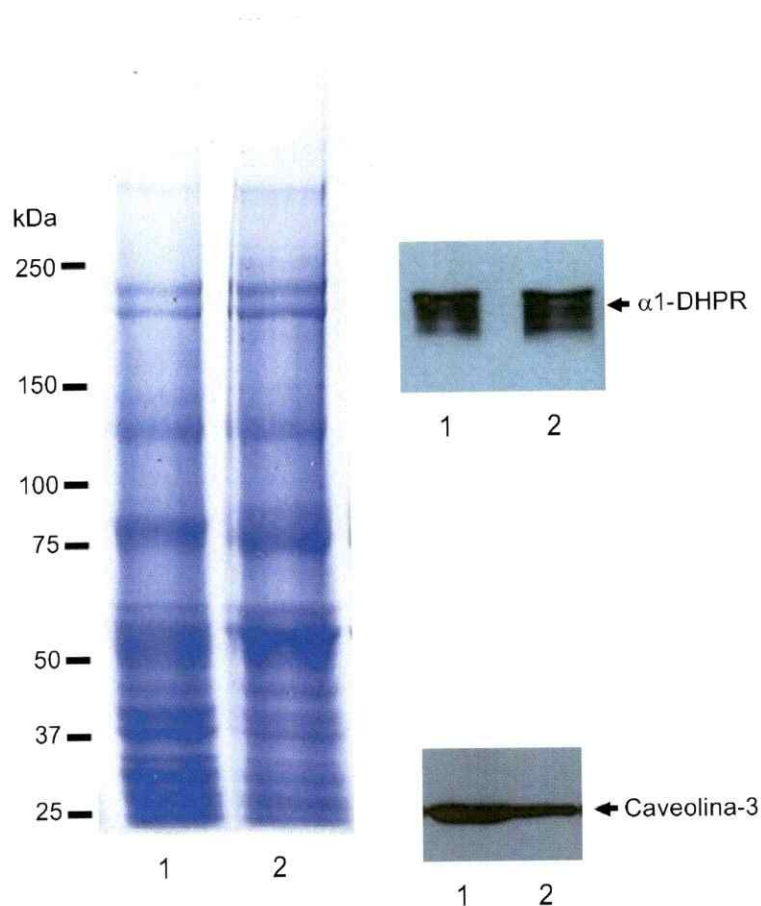
**Objetivo Específico 6.** Estudiar el efecto de insulina y de la extracción de colesterol sobre el acoplamiento EC en músculo esquelético.

Para abordar este objetivo se aislaron fibras musculares esqueléticas intactas desde músculo rápido de ratones adultos. Las fibras se obtuvieron desde el músculo rápido FDB mediante digestión con colagenasa y disgregación mecánica (**Figura 35**) (para más detalle ver la sección materiales y métodos). Las fibras fueron cargadas con la forma esterificada Mag-Fluo-4, un colorante fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  que presenta una  $K_d$  de  $22 \mu\text{M}$ . La afinidad relativamente baja de esta sonda permite una medición apropiada de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  de las fibras musculares, que pueden llegar a  $10 \mu\text{M}$  (Caputo y col., 2004). A estas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  los colorantes convencionales se encuentran saturados y además no permiten apreciar la cinética real de los cambios, puesto que su velocidad de disociación es relativamente lenta respecto a la cinética de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  que tienen una duración total de alrededor de 50 ms (Caputo y col., 2004).

Las fibras aisladas fueron cargadas con  $5 \mu\text{M}$  de Mag-Fluo-4 AM a temperatura ambiente. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  fue inducida por despolarización eléctrica de campo con un pulso cuadrado de 70 mV de 3 ms de duración. Se analizó la amplitud de los transitorios que se expresó como el máximo de fluorescencia  $\Delta F$  dividido por la fluorescencia basal  $F_0$  ( $\Delta F/F_0$ ). Esta forma de

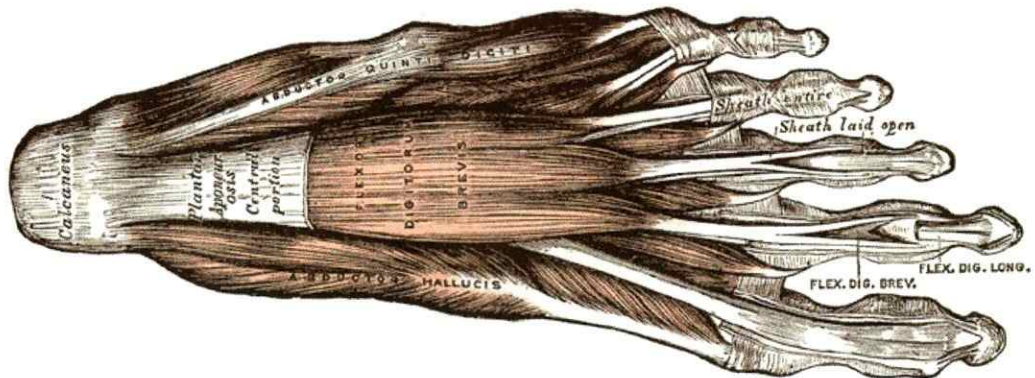
expresar los datos permite comparar los cambios en distintas fibras, puesto que el nivel de sonda fluorescente en el interior de las fibras es variable.

**Figura 34.**  
**Perfil proteico de la preparación de TT totales y de unión.**



**Figura 34.** A la izquierda se muestra un gel teñido con azul de Coomasie tras SDS/PAGE. El **carril 1** fue cargado con 20  $\mu$ g de TT total. El **carril 2** fue cargada con 20  $\mu$ g de TT de unión obtenido por disociación de la fracción enriquecida en triadas. A la derecha se muestra el Westen blot de un gel equivalente al de la izquierda que fue transferido y ensayado con anticuerpos para caveolina-3 y el marcado de TT 1-DHPR.

**Figura 35.**  
**Obtención de fibras musculares disgregadas**  
**Por digestión con colagenasa.**

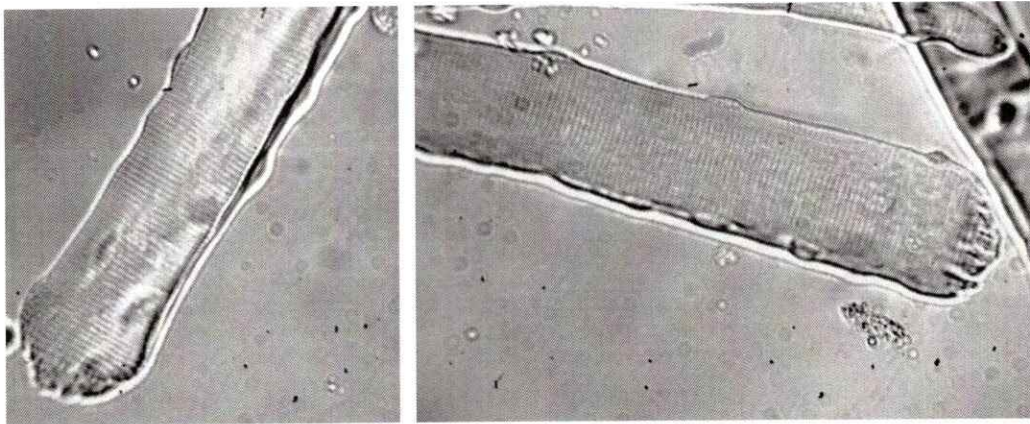


1- Disección

2- Colagenasa



**B**

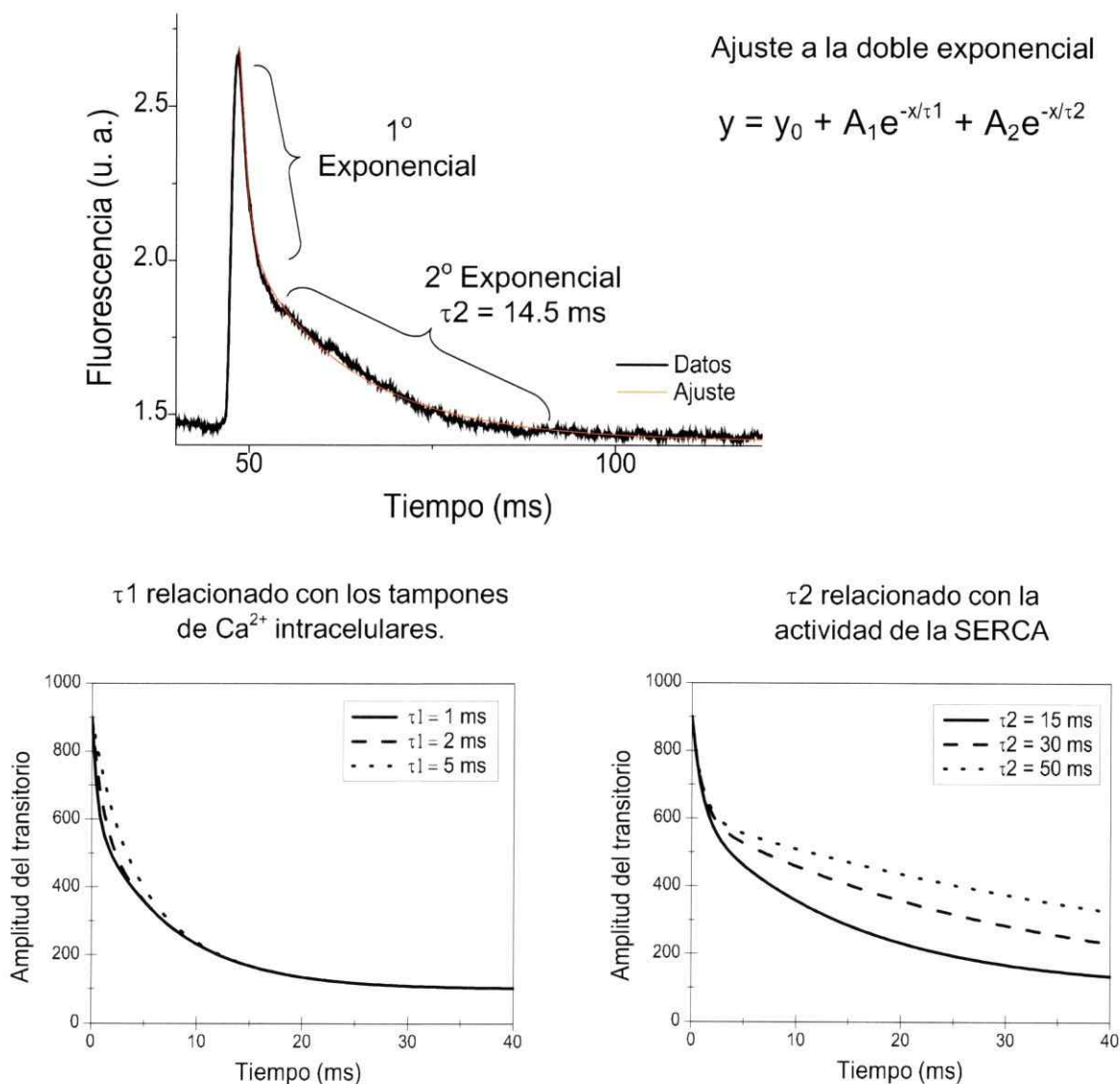


**Figura 35.** Obtención de fibras disgregadas desde el *Flexor Digitorum Brevis* de ratones adultos. La **figura (A)** muestra esquema del músculo utilizado, la **figura (B)** muestra una microfotográfica de las fibras disociadas.

La fase de decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  fue ajustada a una doble exponencial, en cual la fase rápida corresponde a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a las proteínas citoplasmáticas. La fase lenta de decaimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  corresponde a la etapa de bombeo hacia el retículo mediada por la SERCA (Caputo y col., 2004). Desde los ajustes de los datos experimentales, se obtienen las constantes  $\tau_1$  para la fase rápida y  $\tau_2$  para la fase lenta (**Figura 36**). Los resultados muestran que el tratamiento con insulina de las fibras musculares aisladas no produce un cambio significativo en las constantes  $\tau_1$  o  $\tau_2$  (datos no mostrados). La despolarización eléctrica de las fibras aisladas produce un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  que dura alrededor de 50 ms y muestra el patrón de decaimiento tipo doble exponencial. La **Figura 37** muestra 10 registros sucesivos separados por 10 segundos. La contracción de las fibras en algunos casos produce un artefacto de movimiento en la medición de la fluorescencia (**Figura 38**), esto ocurre en las fibras que no se adhieren a la cámara de registro. En estos casos se utilizó 20  $\mu\text{M}$  de N-bencil-p-toluenosulfonamida (BTS) como inhibidor de la contracción muscular, pues este compuesto inhibe la actividad ATPasa de la miosina, bloqueando de manera reversible la contracción muscular sin alterar de manera significativa los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bruton y col., 2006; Pinniger y col., 2005).

Figura 36

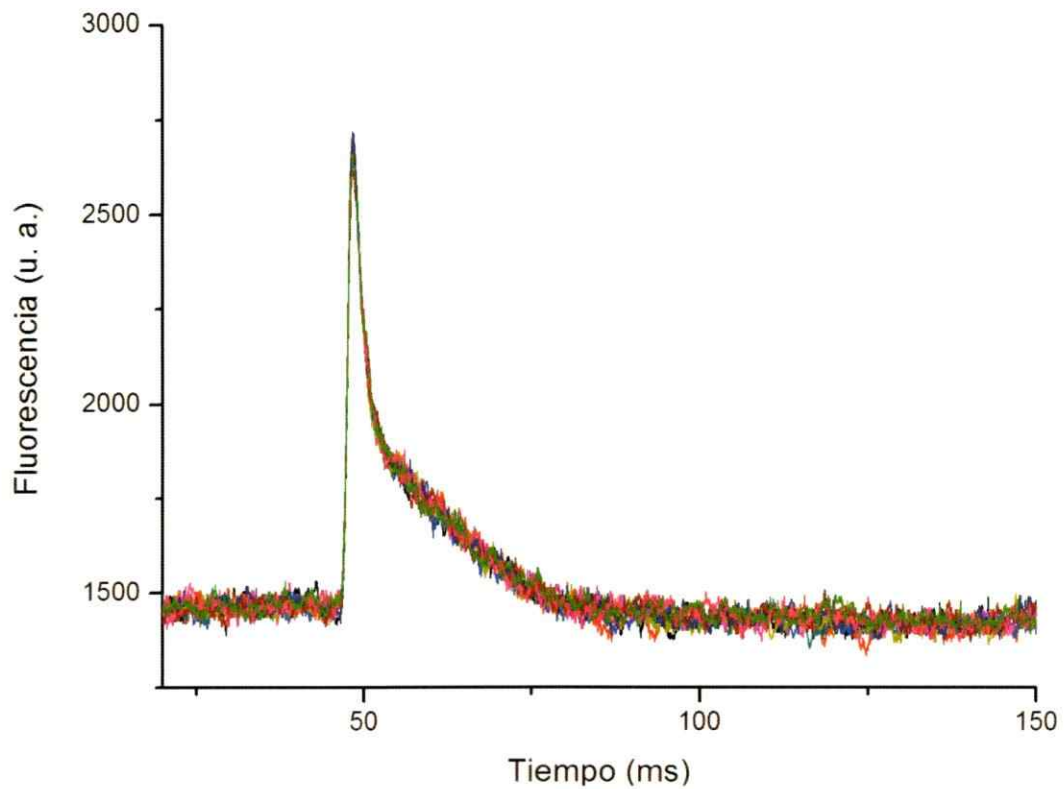
**Análisis matemático de la fase de decaimiento de los Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por despolarización.**



**Figura 36.** La fase de decaimiento de los transitorios de calcio inducidos por despolarización se puede ajustar a una función de doble exponencial. La primera exponencial ( $\tau_1$ ) representa la fase de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a las proteínas del citoplasma y la segunda exponencial ( $\tau_2$ ) representa la actividad de la SERCA.

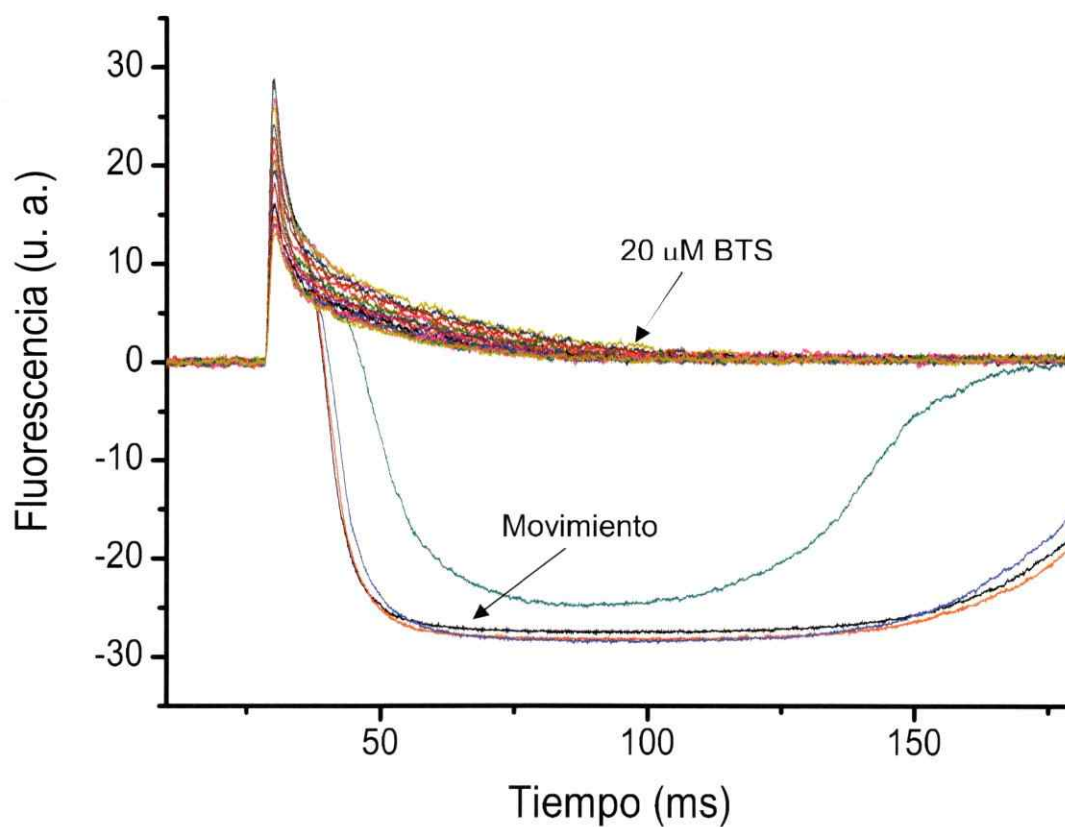


**Figura 37.**  
**Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a despolarización en**  
**Fibras disgregadas enzimáticamente.**



**Figura 37.** Fibras disgregadas desde el músculo rápido *Flexor Digitorum Brevis*, fueron cargadas con la sonda rápida de calcio Mag-Fluo-4 AM ( $k_d \text{Ca}^{2+} 22 \mu\text{M}$ ) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las señales de calcio fueron inducidas por despolarización eléctrica de campo. El gráfico muestra 10 transitorios sucesivos sobrepuestos cada uno separado por 10 segundos.

**Figura 38**  
**Artefacto de movimiento en la medición de los**  
**Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por despolarización.**

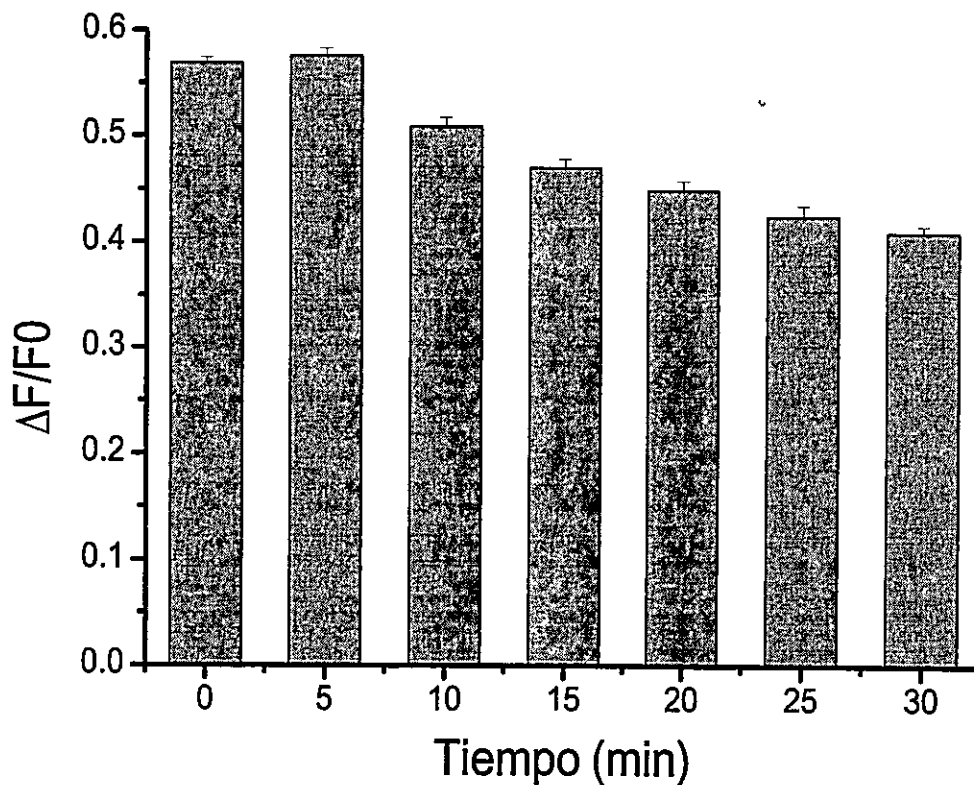


**Figura 38.** Efecto del movimiento de contracción de las fibras sobre la medición de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por despolarización. Fibras disgregadas enzimáticamente fueron cargadas con MagFluo-4AM y se midieron los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a despolarización. El artefacto de movimiento es suprimido por el inhibidor reversible de la contracción muscular BTS.

El tratamiento de las fibras aisladas con 200 nM insulina produce una disminución de la amplitud de los transitorios (**Figura 39**). Para determinar si el protocolo de estimulación y el tiempo de registro disminuyen los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  por si mismos, se midieron los transitorios en las mismas condiciones pero en ausencia de insulina. Los resultados muestran que en las condiciones experimentales los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  no disminuyen en forma espontánea (**Figura 40**). Resultados similares fueron observados en seis fibras control. La respuesta a insulina se dividió en dos poblaciones. En la primera el tratamiento con insulina disminuyó la amplitud del transitorio ( $\Delta F/F_0$ ) en un  $56 \pm 12.6$  % respecto a la misma fibra previo al tratamiento con insulina ( $n = 5$  fibras). En el otro grupo formado por 7 fibras, insulina produce una disminución de  $29 \pm 5.0$  % en la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  respecto a la misma fibra previo al tratamiento con insulina (**Figura 41**). En 8 fibras el tratamiento con insulina no disminuyó significativamente la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 41**). En resumen, de 20 fibras tratadas con insulina provenientes de 11 animales distintos, 12 fibras respondieron con disminución de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (60 %) y 8 fibras no respondieron (40 %). La incubación de las fibras disgregadas con 200 nM insulina no alteró significativamente la fluorescencia basal en 15 de las 20 fibras analizadas (datos no mostrados).

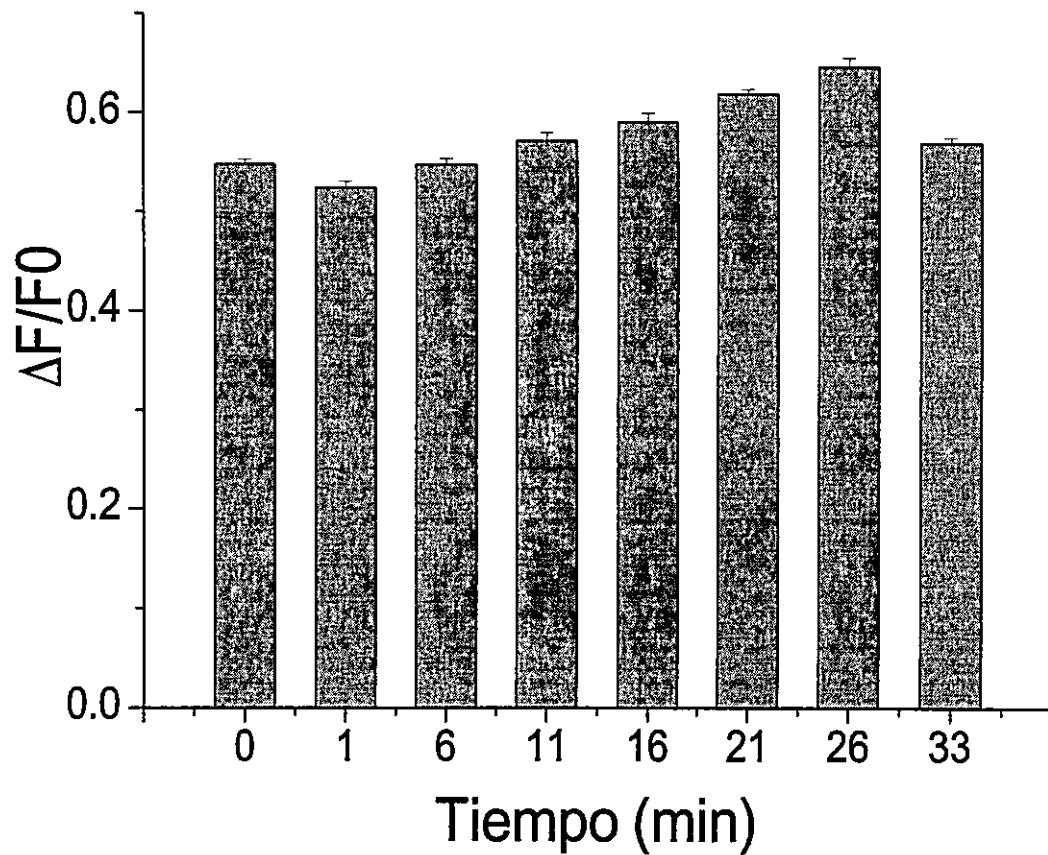
Figura 39

Tratamiento de las fibras con 200 nM de insulina disminuye la Amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por despolarización eléctrica.



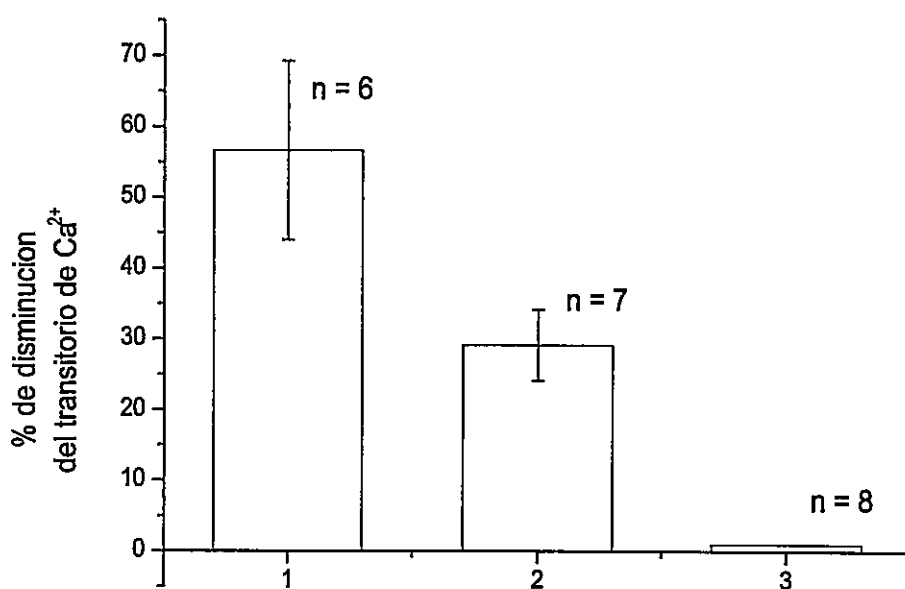
**Figura 39.** Fibras disgregadas enzimáticamente desde el músculo FDB de ratones adultos fueron cargadas con MagFluo-4AM. Las fibras fueron estimuladas eléctricamente y las amplitudes de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron medidas en ausencia (tiempo cero) y luego de la adición de 200 nM de insulina. Los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  son mostrados como la amplitud ( $\Delta F$ ) dividida por la fluorescencia basal ( $F_0$ ). El gráfico muestra la respuesta de una fibra tipo donde cada barra representa el promedio de 10 transitorios más la desviación STD.

**Figura 40**  
**Efecto del tiempo de registro sobre la amplitud de los**  
**Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  Inducido por despolarización.**



**Figura 40.** Fibras disgregadas enzimáticamente desde el músculo FDB de ratones adultos fueron cargadas con MagFluo-4AM. Las fibras fueron estimuladas eléctricamente y las amplitudes de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron medidas en ausencia de insulina. Los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  son mostrados como la amplitud ( $\Delta F$ ) dividida por la fluorescencia basal ( $F_0$ ). El gráfico muestra una fibra tipo donde cada barra representa el promedio de 10 transitorios con la desviación STD.

**Figura 41**  
**Efecto del tratamiento con 200 nM de insulina sobre los**  
**Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por despolarización.**



**Figura 41.** Fibras disgregadas enzimáticamente desde el músculo FDB de ratones adultos fueron cargadas con MagFluo-4AM. Las fibras fueron estimuladas eléctricamente y las amplitudes de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron medidas en la presencia de 200 nM de insulina. Las barras corresponden al promedio de los porcentajes de disminución de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  a los 30 minutos de tratamiento con insulina respecto al tiempo cero. Se promediaron las disminuciones que fueron significativas ( $p < 0.005$ ). Los valores corresponden al promedio más la desviación estándar, n corresponde al número de fibras analizadas. La barra número 3 representa las fibras en que el tratamiento con insulina no cambio la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ .

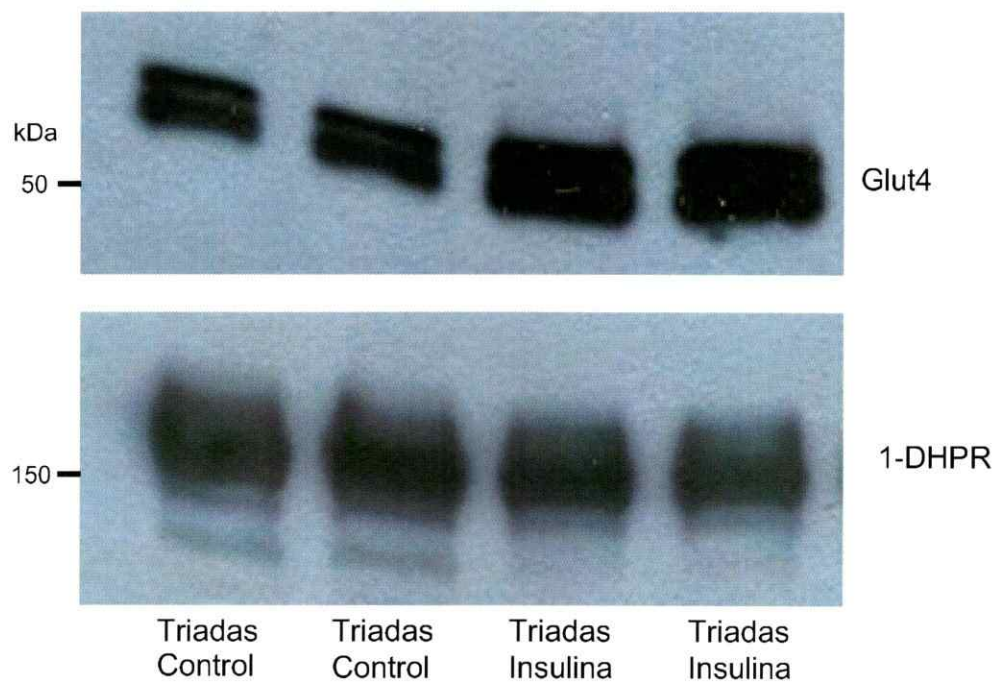
Para determinar si el tratamiento de las fibras musculares con insulina altera la función reticular, se aislaron Tr de músculo esquelético de conejos tratados con insulina. Las fracciones se sometieron a experimentos de carga y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y se midieron los niveles de glut4. Los resultados muestran que las fracciones provenientes de animales tratados con insulina poseen una mayor cantidad de glut4 medido por Western blots (**Figura 42**) y que el contenido total de colesterol de las Tr aisladas no cambia significativamente (**Figura 47**). Sin embargo, la preparación de BL desde las Tr de animales tratados con insulina produce una fracción liviana menos enriquecida en colesterol que el control sin tratamiento con insulina (**Figura 48**).

En los experimentos de carga y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  las vesículas de un animal tratado con insulina, se comportan de manera similar al control, pero el tiempo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es menor que el de los animales control (**Figura 43**). El tiempo de liberación es una medida del tiempo que permanecen abiertos los RyR. Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mínimo que alcanzan las vesículas de animales tratados con insulina y la velocidad inicial de disminución de la fluorescencia no presentaron cambios significativos (**Figura 43**).

La extracción de colesterol desde las fibras con 1 % de M $\beta$ CD produce una disminución significativa de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en todas las fibras tratadas (**Figura 44 y 45**). En 6 de 10 fibras el transitorio desapareció totalmente y en las cuatro fibras restantes el transitorio disminuyó a  $57.3 \pm 27.6$  % del control (**Figura 46**).

**Figura 42.**

**Insulina induce la translocación de glut4 a los TT Asociados a la fracción enriquecida en triadas.**

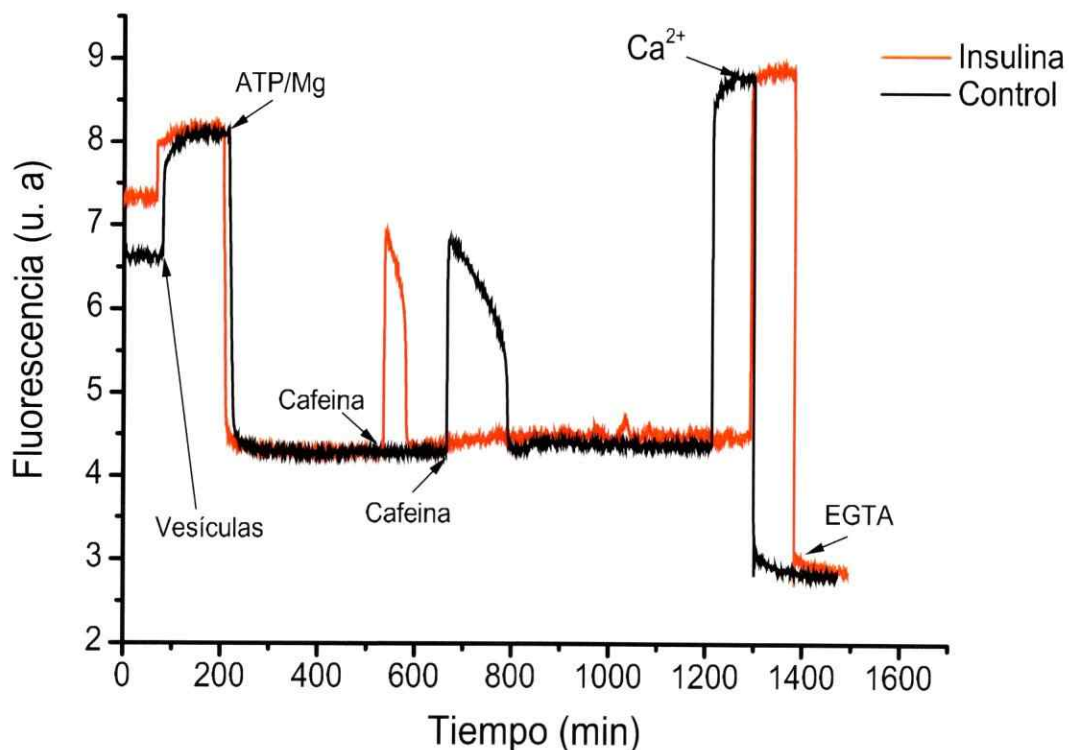


**Figura 42.** Se aislaron triadas desde animales mantenidos en ayunas por 12 horas (controles) y de animales tratados con insulina y glucosa. Se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína por carril, cada carril corresponde a un animal distinto. El panel superior muestra el Western blot para glut4 y el panel inferior muestra el Western blot para 1-DHPR como control de carga.



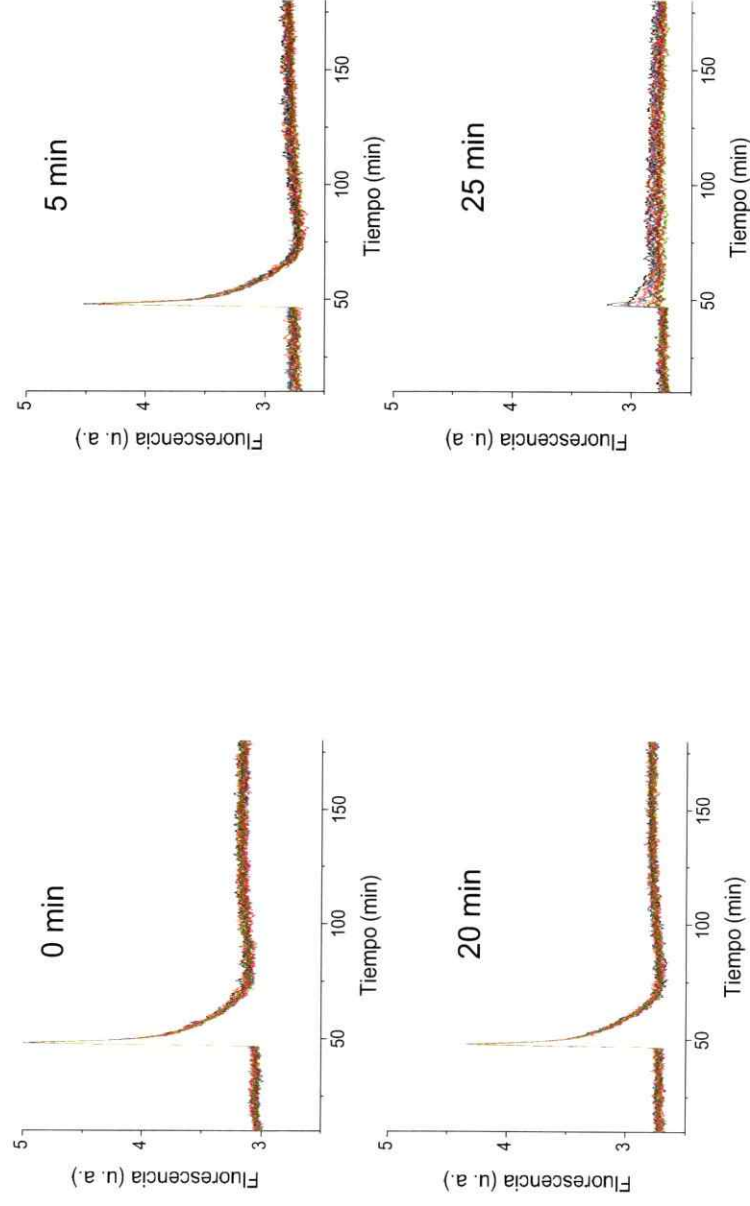
Figura 43.

**Efecto del tratamiento de animales con insulina sobre el Comportamiento de carga y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde triadas aisladas.**



**Figura 43.** Mediciones del  $\text{Ca}^{2+}$  libre extravesicular en fracciones de triadas aisladas. 0.2 mg/ml de proteína fueron incubadas a 22 °C en presencia de la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Calcium Green-2 en su forma de sal de potasio. La carga activa de  $\text{Ca}^{2+}$  fue inducida por la adición de  $\text{ATP/Mg}^{2+}$  (disminución de la señal) y la liberación fue estimulada por la adición de 4 mM cafeína final. La señal máxima y mínima de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  fue calibrada agregando 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y luego 2 mM de EGTA. Los registros corresponden a una preparación control (línea en negro) y una obtenida de un animal tratado con insulina (línea en rojo).

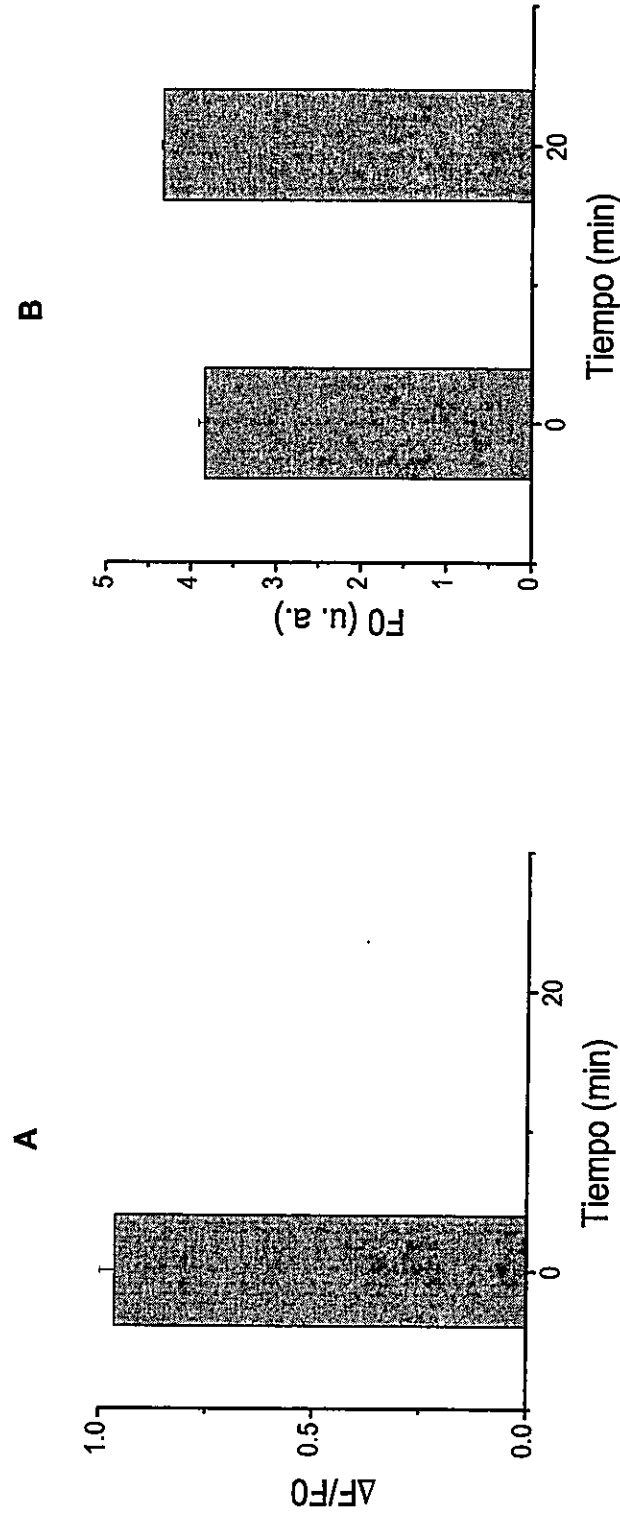
**Figura 44.**  
**El tratamiento con 1 % M $\beta$ CD de fibras musculares disgregadas**  
**Suprime los transitorios de Ca<sup>2+</sup> inducidos por despolarización eléctrica.**



**Figura 44.** Medición de los transitorios de Ca<sup>2+</sup> inducidos por despolarización eléctrica. Las fibras aisladas por digestión con colagenasa fueron cargadas con el colorante sensible a Ca<sup>2+</sup> MagFluo-4. El colesterol fue extraído mediante la incubación con 1 % de M $\beta$ CD. Cada gráfico muestra 10 registros tomados cada 10 segundos a tiempo 0 y luego de 5, 20 y 25 minutos de incubación con 1 % de M $\beta$ CD.

Figura 45

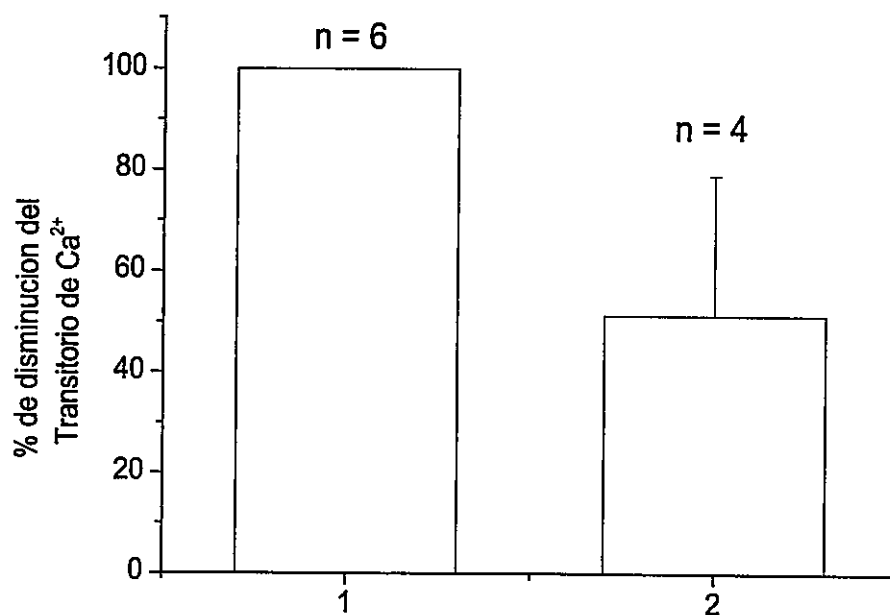
El tratamiento con 1 % M $\beta$ CD de fibras musculares disgregadas suprime los transitorios de Ca<sup>2+</sup> inducidos por despolarización eléctrica.



**Figura 45.** Fibras musculares de ratón fueron disgregadas enzimáticamente y cargadas con la sonda fluorescente sensible a Ca<sup>2+</sup> Magfluo-4AM. Las fibras fueron estimuladas eléctricamente y se midió la amplitud del transitorio de Ca<sup>2+</sup> ( $\Delta F$ ) que se normalizó por la fluorescencia basal ( $F_0$ ) y se muestra como  $\Delta F/F_0$ . En la figura (A) cada barra representa el promedio de 5 registros previos a la incubación con M $\beta$ CD (tiempo 0) y a los 20 minutos de incubación con 1 % de M $\beta$ CD. El tratamiento suprime completamente el transitorio de Ca<sup>2+</sup>. La figura (B) muestra el control de incubación sin M $\beta$ CD.

**Figura 46.**

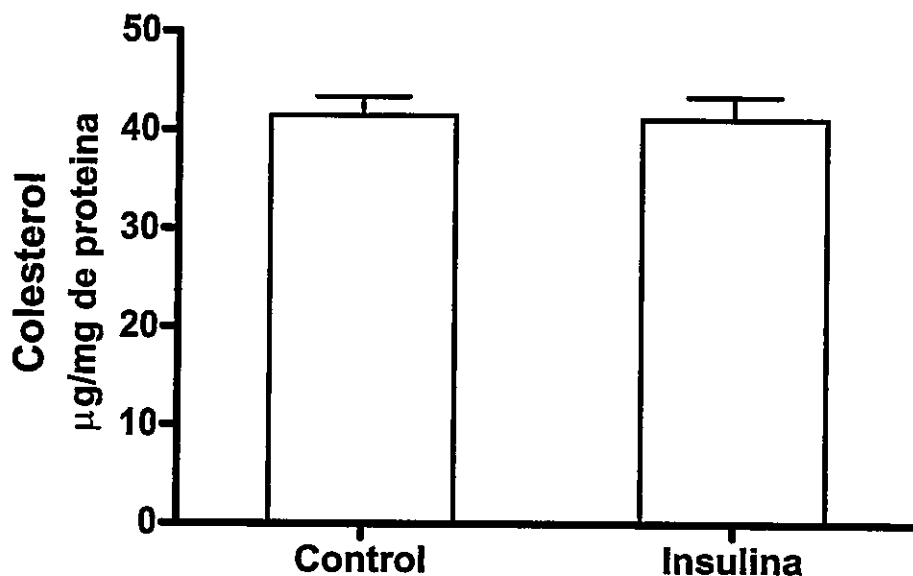
**La extracción de colesterol desde fibras aisladas con 1 % de  $M\beta CD$  reduce la amplitud de los transitorios de  $Ca^{2+}$ .**



**Figura 46.** Fibras musculares disgregadas fueron cargadas con MagFluo-4AM y se indujo la liberación de  $Ca^{2+}$  por despolarización eléctrica. Las fibras fueron incubadas con 1 % de  $M\beta CD$  y los transitorios de  $Ca^{2+}$  fueron medidos a los 20 minutos de incubación. El gráfico muestra el % de disminución de la amplitud del transitorio de calcio. Los valores corresponden a la media más la desviación estándar y n corresponde al número de fibras analizadas.

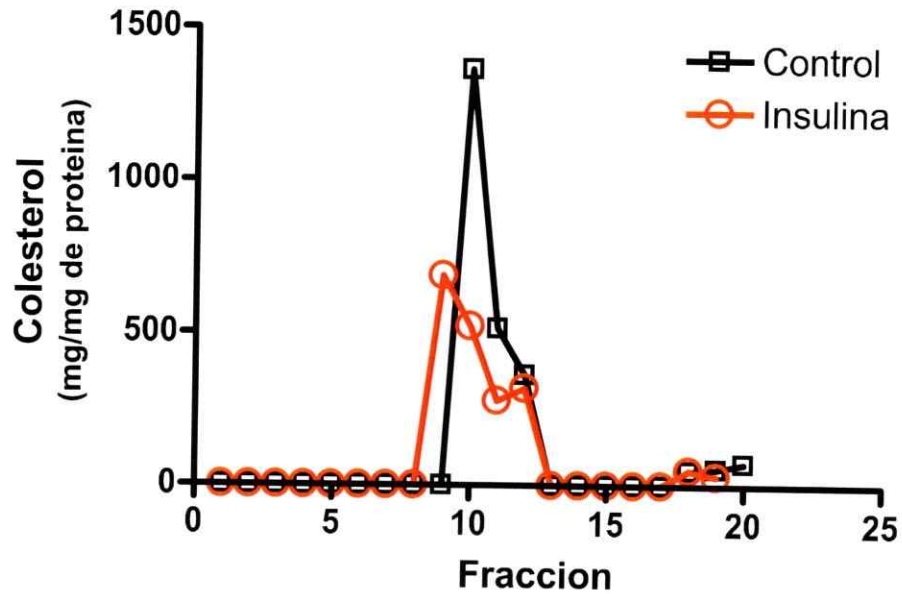
Figura 47

El tratamiento de animales con insulina no afecta el Contenido total de colesterol de las triadas aisladas.



**Figura 47.** El contenido de colesterol de triadas aisladas fue medido con un método enzimático. Las fracciones provenían de conejos controles mantenidos en ayunas por 12 horas ( $n = 6$ ) o de animales tratados con insulina ( $n = 2$ ). Cada medición fue realizada por duplicado. Los datos se muestran como la media más la desviación STD.

**Figura 48.**  
**Obtención de BL desde animales tratados con insulina.**



**Figura 48.** Fracciones enriquecidas en triadas obtenidas desde un animal tratado con insulina (rojo) y uno control (negro) fueron incubadas con 1 % de Tritón X-100 a 4 °C y cargadas en el fondo de una gradiente de sacarosa discontinua (capas de 5 % y 30 %). Las muestras fueron centrifugadas 20 horas a 100 000 x g y fraccionadas desde la parte superior. La concentración de proteína y colesterol fueron determinadas en cada una de las fracciones.

## **Discusión.**

### **Presencia de caveolina-3 en TT adultos**

Los resultados presentados en esta tesis muestran claramente que caveolina-3 está presente en los TT adultos de tres mamíferos distintos: conejo, ratón y rata. Estos resultados contrastan con descripciones actuales de la literatura, que ubican a caveolina-3 en los TT solamente durante la etapa de desarrollo y descartan su presencia en los TT adultos en base a resultados obtenidos por inmunohistoquímica (Parton y col., 1997; Song y col., 1996b). Sin embargo, otros resultados obtenidos también por inmunohistoquímica (Ralston y Ploug 1999) muestran claramente que caveolina-3 está presente en los TT de músculo esquelético adulto. La arquitectura y distribución de los sistemas membranosos en las fibras musculares (Figura 1) convierte a estas células en un sistema atípico. Por una parte, las membranas de los TT y las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático, que están separadas por una distancia de sólo 15 nm (Franzini-Armstrong, 2006), se encuentran unidas fuertemente (Corbett y col., 1985), lo que permite que la estructura de la triada resista los ciclos de contracción y relajación del músculo. Además, el pequeño espacio existente entre ambas membranas está densamente poblado por proteínas que tienen un papel activo en el acoplamiento EC, como el RyR y el DHPR, o que bien constituyen parte de las uniones estructurales que estabilizan la triada, como juntofilina y triadina, entre otras (Wagenknecht y col., 2002). Es posible, por lo tanto, que estos factores estructurales limiten el acceso de anticuerpos a la membrana de los TT, pues si algunos epítopes quedarán ocultos se

dificultaría su detección mediante inmunohistoquímica. De hecho, encontramos que para poder detectar caveolina-3 por inmunohistoquímica en músculo adulto es necesario establecer cuidadosamente las condiciones para permeabilizar las fibras y los tiempos de incubación con los anticuerpos. Incluso en algunos casos, cuando las condiciones de permeabilización e incubación con los anticuerpos no fueron las adecuadas, no logramos detectar por inmunohistoquímica la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR pese a que esta proteína es un componente específico de los TT (Melzer y col., 1995) (datos no mostrados).

Utilizando Western blots con dos anticuerpos distintos se detectó, además, caveolina-3 en todas las fracciones que contienen membranas de TT (Figuras 1, 2 y 9). Estas membranas de TT prácticamente no contienen membranas derivadas del sarcolema (Roseblatt y col, 1981) y presentan un gran enriquecimiento de la subunidad  $\alpha$ 1DHPR (Hidalgo y col, 1986), lo que hace poco probable que la caveolina-3 provenga de contaminación con sarcolema. Caveolina-3 también se encuentra presente en las fracciones enriquecidas en Tr, las que por su mayor densidad proteica se pueden aislar sin contaminación con microsomas del sarcolema (Hidalgo y col., 1993). Por otra parte, pese a que se ha descrito recientemente (Li y col., 2006) que caveolina-3 está asociada a las membranas del retículo sarcoplasmático pesado, que poseen una densidad proteica semejante a las Tr, en el presente trabajo se muestra que caveolina-3 fracciona con los TT y no con el retículo al disociar las Tr (Figura 24), indicando que caveolina-3 se encuentra en los TT que participan



directamente en el acoplamiento EC. Además, las fracciones de retículo desprovistas de TT (LSR y HSR) no contienen cantidades detectables de caveolina-3 (Figura 12), lo que descarta concluyentemente su presencia en el retículo.

Otros autores han demostrado que los animales nulos en caveolina-3 presentan alteraciones morfológicas de los TT en músculo esquelético (Galbiati y col., 2001) y cardíaco (Capozza y col., 2005). Sin embargo, como el músculo esquelético también parece expresar caveolina-1 (Li y col., 2001; Kawabe y col., 2001), cabe la posibilidad que si caveolina-1 estuviera presente en los TT, lo que se desconoce, pudiera reemplazar a caveolina-3 en estos animales nulos. Los animales nulos para caveolina-3 y caveolina-1 presentan una severa cardiopatía, pero los autores de este trabajo no muestran estudios funcionales del músculo esquelético (Park y col., 2002). Tampoco existen datos acerca del estado del acoplamiento EC o el desarrollo de fuerza en los modelos animales nulos para caveolina.

### **Membranas de TT y BL.**

La composición de esfingomiélin y colesterol de los TT aislados (Roseblatt y col., 1981) y de las BL (Schroeder y col., 2001) es muy similar (Tabla 1). Sin embargo, aproximadamente el 10 % de los TT es resistente a la solubilización con Tritón X-100 a 4°C (Figura 23). Las BL obtenidas a partir de TT aislados presentan un contenido mayor de colesterol que los descritos en la literatura (Schroeder y col., 2001) y están altamente enriquecidas en caveolina-

3 respecto al material de partida. Estos resultados sugieren que en las membranas de los TT podrían coexistir regiones solubles en Tritón X-100 con regiones con mayor contenido de colesterol que el de las BL convencionales. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cuidado, pues no es posible comparar las BL obtenidas de fracciones vesiculares aisladas con las BL descritas en la literatura, que se han aislado siempre de células completas y no de fracciones subcelulares. El tratamiento de Tr aisladas con 1 % de Tritón también produce una fracción liviana enriquecida en colesterol y caveolina-3 (Figura 21), aunque con un menor contenido de colesterol y caveolina-3 que el de las BL obtenidas desde TT (Figura 17 B). Puesto que en este trabajo se muestra que caveolina-3 no está presente en las fracciones de retículo, es muy probable que las BL de Tr provengan de los TT de unión. En esta región se encuentra un gran número de proteínas que participan directa o indirectamente en el acoplamiento EC (Melzer y col., 1995).

Las imágenes de microscopía electrónica de las BL provenientes de Tr muestran material electrodensito asociado a estas membranas (Figura 18). Esto sugiere que algunas de las proteínas del complejo de acoplamiento EC pueden mantenerse asociadas a las BL lo que disminuiría la proporción de colesterol aumentando la densidad a la cual se equilibran estas fracciones. Los TT aislados son obtenidos por tratamiento de la fracción microsomal de músculo esquelético con alta fuerza iónica (0.6 M KCl); esto disocia los TT de las cisternas terminales y elimina gran parte de las interacciones proteína-proteína presentes en las Tr intactas (Hidalgo y col., 1986). Por lo anterior los TT

aislados tienen menos interacciones proteína-proteína que las Tr, lo que hace que las BL obtenidas desde TT sean más livianas pues arrastran menos proteínas a la fracción resistente a la solubilización con Tritón X-100 que las BL que provienen de Tr.

La subunidad  $\alpha$ 1-DHPR se encontró asociada a las BL por medio de Western blots y ensayos de unión del ligando de alta afinidad [ $^3$ H]-nitrendipina (Figura 16). Además, en fibras musculares disgregadas caveolina-3 y  $\alpha$ 1-DHPR colocalizan parcialmente (Figuras 13 y 14). En los ensayos de co-inmunoprecipitación se aprecia una débil marca positiva para caveolina-3 y  $\alpha$ 1-DHPR (Figuras 25 y 26), que sugiere que una fracción de  $\alpha$ 1-DHPR podría formar un complejo con caveolina-3. Este posible complejo podría ser modulado por fosforilación de caveolina-3 o de alguna de las subunidades del DHPR, pero esto no se ha demostrado experimentalmente. En músculo cardíaco la actividad del DHPR es modulada por insulina (Maier y col., 1999) y el receptor de insulina se encuentra en membranas de TT aisladas de músculo esquelético (Burdett y col., 1987). Sin embargo, hasta ahora no se había demostrado la presencia del receptor de insulina en las Tr, donde es presumiblemente aportado por los TT de unión.

Estos antecedentes, junto con la presencia de una secuencia de unión a caveolina-3 en la subunidad  $\alpha$ 1-DHPR, sugieren que caveolina-3 podría interactuar directamente con  $\alpha$ 1-DHPR. En apoyo a esta sugerencia se ha descrito este año que caveolina-3 se ubica en los TT de corazón y que modula

el acoplamiento EC, y que el sensor de voltaje cardíaco DHPR, que es una isoforma similar a la presente en músculo esquelético, se encuentra en las BL y se asocia con caveolina-3 (Balijepalli y col., 2006).

### **Efecto de insulina en el músculo esquelético.**

Los TT son el principal sitio a cual se translocan los glut4 en respuesta a insulina, lo que es de vital importancia para el transporte de glucosa al interior de las fibras musculares (Dohm y Dudek, 1998). Los resultados del presente trabajo muestran que el receptor de insulina, glut4 y caveolina-3 se encuentran asociados a las Tr, que es el lugar donde ocurre el acoplamiento EC. Encontramos, además, que el tratamiento de los animales con insulina aumenta los niveles de glu4 presentes en las Tr aisladas, lo que podría alterar el acoplamiento EC por un efecto mecánico o por la vía de transducción del receptor de insulina. De hecho, nuestros experimentos muestran por primera vez que la insulina produce una disminución significativa de la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por despolarización en fibras disgregadas. La translocación en respuesta a insulina de los glut4 a los TT que participan en el acoplamiento EC podría alterar el entorno de las proteínas que participan en acoplamiento EC. De hecho, el tratamiento de animales con insulina produce un aumento de un 50 % en el diámetro de los TT respecto a los controles (Wang y col., 1996), lo que demuestra que insulina produce un cambio físico en los TT. Además, la inserción de glut4 podría perturbar la interacción entre las proteínas que mantienen la unión en la triada entre las membranas de TT y las

cisternas terminales del retículo, que es crítica para un apropiado acoplamiento EC. Por ejemplo, la disminución de la expresión de juntofilina, una proteína que contribuye a unir las membranas de los TT y las cisternas terminales, produce una alteración el acoplamiento EC y la señalización por calcio (Hirata y col., 2006)

Los niveles de caveolina-3 son críticos para el adecuado funcionamiento del músculo esquelético, ya que una disminución o un aumento en la expresión de esta proteína produce fenómenos patológicos (Galbiati y col., 2000b; Hagiwara y col., 2000). Tal es así que animales nulos en caveolina-3 y caveolina-1 presentan resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa y una captación de glucosa disminuida; esta condición es revertida por la reexpresión de estas proteínas (Capozza y col., 2005; Cohen y col., 2003). En animales nulos para caveolina-3 el receptor de insulina es inestable y la unión de insulina induce su degradación por lo que se sugiere que caveolina-3 estabilizaría el receptor de insulina (Capozza y col., 2005). Sin embargo, en ninguno de estos modelos animales se ha analizado el estado del acoplamiento EC. La sobreexpresión de caveolina-3 en músculo cardíaco produce cardiomiopatía, caracterizada por una severa degeneración del tejido, fibrosis, reducción de la función cardíaca y una disminución en la actividad de la oxido nítrico sintasa (Aravamudan y col., 2003).

El tratamiento de fibras disgregadas con insulina produce una disminución de la amplitud de los transitorios de  $Ca^{2+}$  inducidos por despolarización (Figura 42). El tratamiento de músculo esquelético con insulina

produce una disminución en el desarrollo de fuerza que es dependiente del tipo de fibra, pues en el soleus, que es un músculo lento, produce una disminución significativa en el desarrollo de tensión que no ocurre en el EDL, que es un músculo rápido (Holmberg y Waldeck, 1980). Sin embargo estos autores no midieron los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y puesto que las fibra lentas son más sensibles a insulina (Lillioja y col., 1987) y poseen una mayor expresión de glut4 (Gaster y col., 2000), es posible que los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  se reduzcan más aun que en las fibras rápidas, con el consiguiente deterioro de la contracción.

En el presente trabajo no se midió el desarrollo de tensión y por lo tanto desconocemos si la disminución observada en la amplitud de los transitorios inducida por insulina produce una disminución en el desarrollo de tensión. Todos estos antecedentes sugieren que en músculo esquelético caveolina-3 y el receptor de insulina podrían regular el acoplamiento EC. Aunque preliminares, los resultados mostrados en la Figura 43, muestran que el tratamiento de animales con insulina produce un cambio en la respuesta del RyR a cafeína. Cafeína activa directamente el RyR aumentando su sensibilidad a calcio (Gallant y col., 2004), esto sugiere que insulina produce una modificación directa del RyR o que es un efecto regulador del DHPR sobre el RyR (de la Torre, 2002). Además, las Tr de animales tratados con insulina producen BL menos enriquecidas en colesterol que las de animales control (Figura 48), pero el colesterol total de las Tr no se alteró (Figura 47). El contenido de glut4 aumenta en las Tr de animales tratados con insulina, lo que

sugiere que las membranas de GLUT4 que se incorporan a los TT tienen la misma razón colesterol/proteína que ellos.

### **Colesterol en el músculo esquelético.**

El desarrollo de transitorios de  $Ca^{2+}$  en respuesta a despolarización es muy sensible a la extracción de colesterol, pues encontramos que los transitorios de calcio desaparecieron luego de 20 minutos tras la adición de 1 % de M $\beta$ CD. Experimentos realizados en fibras de músculo esquelético de sapo disgregadas, a las que se les ha removido mecánicamente el sarcolema, indican que el tratamiento con 1 % de M $\beta$ CD produce la despolarización de los TT y una rápida pérdida de la capacidad de desarrollar fuerza; en cambio en fibras intactas el tratamiento con 1 % de M $\beta$ CD suprime el desarrollo de fuerza después de 270 minutos (Launikonis y Stephenson, 2001). En el presente trabajo no se midió el efecto de la extracción de colesterol sobre el potencial de membrana de las fibras musculares y es posible que la despolarización de las fibras de ratón adulto sea mucho más rápida que la de las fibras de anfibio o que en ratón el colesterol regule directamente la función del sensor de voltaje. En fibras fetales se ha demostrado que la remoción del colesterol con M $\beta$ CD no altera los potenciales de acción (Pouvreau y col., 2004). Sin embargo, estos autores no determinaron si el efecto de la remoción de colesterol era mediado por una asociación caveolina-3-DHPR.

### **Implicaciones funcionales**

Los resultados de este trabajo indican que la presencia de caveolina-3 en los TT de músculo adulto es una propiedad general de la musculatura esquelética. A este respecto, es interesante mencionar que se ha descrito en este tejido que la expresión de caveolina-3 aumenta con dietas altas en grasa y con el envejecimiento (Muñoz y col., 1996). Además, con el envejecimiento se produce un desacople de los DHPR con los RyR que debilita el acoplamiento EC (Renganathan y col., 1997). Aunque se desconoce si el aumento en la expresión de caveolina-3 altera la estructura y/o la función de los TT, se podría postular que un aumento en la expresión de caveolina-3, al secuestrar moléculas de proteínas que participan en el acoplamiento EC, contribuye al debilitamiento de este proceso. Por otra parte, caveolina-3 se une directamente a colesterol y esfingomielina por lo que un aumento de sus niveles podría alterar el entorno lipídico de los DHPR e interferir con su función en el proceso de acoplamiento EC. Un mecanismo similar operaría en el músculo cardíaco, donde se ha descrito que caveolina-3 regula las corrientes de potasio Kv 1.5 modulando el número de canales funcionales en la membrana (Folco y col., 2004). Sin embargo, el efecto de caveolina-3 en el envejecimiento y deterioro de la función del músculo esquelético no ha sido explorado.



## Conclusiones

1. Caveolina-3 se encuentra presente en TT de músculo esquelético adulto y esta asociada a los TT que participan directamente en el acoplamiento EC.
2. Las membranas de los TT aislados son parcialmente resistentes al tratamiento con Tritón X-100 produciendo una fracción altamente enriquecida en colesterol y caveolina-3.
3. Caveolina-3 y la subunidad  $\alpha$ -1 DHPR colocalizan en las BL y en fibras intactas probablemente formando un complejo proteico.
4. En animales vivos insulina induce la translocación de glut4 a los TT de que forman las triadas.
5. En fibras disgregadas el tratamiento con insulina produce una disminución en la amplitud de los transitorios de calcio evocados por despolarización. Esto sugiere que la translocación de los glut4 a los TT de las triadas podría interferir con el acoplamiento EC modificando la arquitectura o composición lipídica de los TT.

6. En fibras disgregadas la remoción de colesterol con M $\beta$ CD produce la supresión o disminución significativa de los transitorios de calcio inducidos por despolarización. Este resultado puede interpretarse como un efecto directo del colesterol sobre la maquinaria de acoplamiento EC o como resultado de la alteración de caveolina-3.

### **Proyecciones.**

Las proteínas llamadas juntofilinas participan en la formación del complejo que mantiene estrechamente unidas la membrana del retículo y la membrana plasmática en corazón, músculo esquelético y neuronas (Takeshima y col 2000). En músculo cardíaco caveolina-3 se asocia con juntofilina-2 y la disminución de los niveles de caveolina-3 esta asociada con el desarrollo de cardiomiopatía dilatada (Minamisawa y col 2004). En el presente trabajo concluimos que caveolina-3 se encuentra asociada a los TT adultos, por lo que es muy posible que se encuentre formado un complejo con juntofilina-2 similar al descrito en músculo cardíaco. Este complejo puede contribuir a mantener la estructura y composición lipídica de las triadas y a regular el acoplamiento EC. El alto nivel de colesterol de los TT puede ser necesario para el adecuado funcionamiento del acoplamiento EC y caveolina-3 podría mantener el colesterol asociado a los TT. De esta forma los TT de animales nulos para caveolina-3 podrían tener niveles de colesterol más bajos que los animales normales.

Actualmente la hipercolesterolemia y la dislipidemia son manejadas con el uso de las drogas conocidas como estatinas. Estos fármacos inhiben la síntesis de colesterol y reducen en forma significativa los niveles de colesterol plasmático disminuyendo la incidencia de patologías cardiovasculares (Curt y Furberg 1999). Sin embargo, uno de los efectos secundarios de las estatinas es la miopatía (Tiwari y col. 2006). Una de las posibles causas que no ha sido explorada es que estas drogas disminuyan los niveles de colesterol de los TT. La medición del contenido de colesterol de los TT de animales tratados con estatinas sería de interés para determinar si este compuesto modifica el contenido de colesterol de los TT y si esto afecta el acoplamiento EC y la localización de caveolina-3. La incidencia de miopatía en pacientes tratados con estatinas aumenta si los pacientes realizan ejercicio físico (Thompson y col., 1997). El alto nivel de colesterol y caveolina-3 de los TT podría conferirle resistencia mecánica y elasticidad a este sistema membranoso. Si el tratamiento con esta droga disminuye los niveles de colesterol y caveolina-3 asociados a los TT, esto podría debilitar la capacidad de los TT de resistir el estrés mecánico producido por la contracción y redundar en daño celular.

### Referencias

1. Anderson, R.G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:199-225.
2. Aoki, T., R.Nomura, y T.Fujimoto. 1999. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp. Cell Res.* 253:629-636.
3. Aravamudan, B., D.Volonte, R.Ramani, E.Gursoy, M.P.Lisanti, B.London, y F.Galbiati. 2003. Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 12:2777-2788.
4. Balijepalli, R.C., J.D.Foell, D.D.Hall, J.W.Hell, y T.J.Kamp. 2006. Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:7500-7505.
5. Bender, F., M.Montoya, V.Monardes, L.Leyton, y A.F.Quest. 2002. Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. *Biol. Res.* 35:151-167.
6. Bickel, P.E. 2002. Lipid rafts and insulin signaling. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 282:E1-E10.

7. Bossuyt, J., B.E.Taylor, M.James-Kracke, y C.C.Hale. 2002. The cardiac sodium-calcium exchanger associates with caveolin-3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976:197-204.
8. Brown, D. y G.L.Waneck. 1992. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3:895-906.
9. Brown, D.A. y E.London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
10. Bruton, J., G.J.Pinniger, J.Lannergren, y H.Westerblad. 2006. The effects of the myosin-II inhibitor N-benzyl-p-toluene sulphonamide on fatigue in mouse single intact toe muscle fibres. *Acta Physiol (Oxf)* 186:59-66.
11. Burdett, E., T.Beeler, y A.Klip. 1987. Distribution of glucose transporters and insulin receptors in the plasma membrane and transverse tubules of skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 253:279-286.
12. Campbell, K.P., D.H.MacLennan, y A.O.Jorgensen. 1983. Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J. Biol. Chem.* 258:11267-11273.
13. Cao, H., W.E.Courchesne, y C.C.Mastick. 2002. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on

- tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* 277:8771-8774.
14. Capozza, F., T.P.Combs, A.W.Cohen, Y.R.Cho, S.Y.Park, W.Schubert, T.M.Williams, D.L.Brasaemle, L.A.Jelicks, P.E.Scherer, J.K.Kim, y M.P.Lisanti. 2005. Caveolin-3 knockout mice show increased adiposity and whole body insulin resistance, with ligand-induced insulin receptor instability in skeletal muscle. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 288:C1317-C1331.
  15. Caputo, C., P.Bolanos, y A.Gonzalez. 2004. Inactivation of Ca<sup>2+</sup> transients in amphibian and mammalian muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25:315-328.
  16. Chang, W.J., Y.S.Ying, K.G.Rothberg, N.M.Hooper, A.J.Turner, H.A.Gambliel, J.De Gunzburg, S.M.Mumby, A.G.Gilman, y R.G.Anderson. 1994. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* 126:127-138.
  17. Cohen, A.W., B.Razani, X.B.Wang, T.P.Combs, T.M.Williams, P.E.Scherer, y M.P.Lisanti. 2003. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance 100 defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 285:C222-C235.
  18. Corbett, A.M., A.H.Caswell, N.R.Brandt, y J.P.Brunschwig. 1985. Determinants of triad junction reformation: identification y isolation of an endogenous promotor for junction reformation in skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 86:267-276.

19. Couet, J., M.M.Belanger, E.Roussel, y M.C.Drolet. 2001. Cell biology of caveolae y caveolin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49:223-235.
20. Couet, J., S.Li, T.Okamoto, T.Ikezu, y M.P.Lisanti. 1997. Identification of peptide y protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 272:6525-6533.
21. Curt D. Furberg, MD. Natural Statins and Stroke Risk. *Circulation.* 99:185-188.
22. de la Torre, J.C. 2002. Molecular biology of Borna disease virus y persistence. *Front Biosci.* 7:d569-d579.
23. Dietzen, D.J., W.R.Hastings, y D.M.Lublin. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270:6838-6842.
24. Dohm, G.L., P.L.Dolan, W.R.Frisell, y R.W.Dudek. 1993. Role of transverse tubules in insulin stimulated muscle glucose transport. *J Cell Biochem.* 52:1-7.
25. Dohm, G.L. y R.W.Dudek. 1998. Role of transverse tubules (T-tubules) in muscle glucose transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441:27-34.
26. Drab, M., P.Verkaide, M.Elger, M.Kasper, M.Lohn, B.Lauterbach, J.Menne, C.Lindschau, F.Mende, F.C.Luft, A.Schedl, H.Haller, y T.V.Kurzchalia. 2001.

- Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293:2449-2452.
27. Felley-Bosco, E., F.C.Bender, F.Courjault-Gautier, C.Bron, y A.F.Quest. 2000. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:14334-14339.
28. Feron, O., L.Belhassen, L.Kobzik, T.W.Smith, R.A.Kelly, y T.Michel. 1996. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271:22810-22814.
29. Fill, M. y J.A.Copello. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 82:893-922.
30. Folco, E.J., G.X.Liu, y G.Koren. 2004. Caveolin-3 and SAP97 form a scaffolding protein complex that regulates the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287:H681-H690.
31. Franzini-Armstrong, C. STUDIES OF THE TRIAD : I. Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers. *J.Cell Biol.* 47, 488-499. 2006.



32. Franzini-Armstrong, C., L.J.Kenney, y E.Varriano-Marston. 1987. The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J. Cell Biol.* 105:49-56.
33. Fujimoto, T., S.Nakade, A.Miyawaki, K.Mikoshiba, y K.Ogawa. 1992. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol.* 119:1507-1513.
34. Galbiati, F., J.A.Engelman, D.Volonte, X.L.Zhang, C.Minetti, M.Li, H.Hou, Jr., B.Kneitz, W.Edelmann, y M.P.Lisanti. 2001. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276:21425-21433.
35. Galbiati, F., D.Volonte, A.M.Brown, D.E.Weinstein, A.Ben Ze'ev, R.G.Pestell, y M.P.Lisanti. 2000a. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains. *J. Biol. Chem.* 275:23368-23377.
36. Galbiati, F., D.Volonte, J.B.Chu, M.Li, S.W.Fine, M.Fu, J.Bermudez, M.Pedemonte, K.M.Weidenheim, R.G.Pestell, C.Minetti, y M.P.Lisanti. 2000b. Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:9689-9694.

37. Gallant, E.M., J.Hart, K.Eager, S.Curtis, y A.F.Dulhunty. 2004. Caffeine sensitivity of native RyR channels from normal and malignant hyperthermic pigs: effects of a DHPR II-III loop peptide. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 286:C821-C830.
38. Garcia-Cardena, G., P.Martasek, B.S.Masters, P.M.Skidd, J.Couet, S.Li, M.P.Lisanti, y W.C.Sessa. 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:25437-25440.
39. Gaster, M., P.Poulsen, A.Handberg, H.D.Schroder, y H.Beck-Nielsen. 2000. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 278:E910-E916.
40. Goodyear, L.J.K.B.B. 1998. Excercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu. Rev. Med.* 49:235-261.
41. Haarmann, C.S., A.F.Dulhunty, y D.R.Laver. 2005. Regulation of skeletal ryanodine receptors by dihydropyridine receptor II-III loop C-region peptides: relief of Mg<sup>2+</sup> inhibition. *Biochem. J.* 387:429-436.
42. Hagiwara, Y., T.Sasaoka, K.Araishi, M.Imamura, H.Yorifuji, I.Nonaka, E.Ozawa, y T.Kikuchi. 2000. Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9:3047-3054.

43. Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422-427.
44. Hayashi, T., J.F.Wojtaszewski, y L.J.Goodyear. 1997. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 273:E1039-E1051.
45. Hidalgo, C., J.Jorquera, V.Tapia, y P.Donoso. 1993. Triads and transverse tubules isolated from skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268:15111-15117.
46. Hidalgo, C., C.Parra, G.Riquelme, y E.Jaimovich. 1986. Transverse tubules from frog skeletal muscle. Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation. *Biochim. Biophys. Acta* 855:79-88.
47. Hirata, Y., M.Brotto, N.Weisleder, Y.Chu, P.Lin, X.Zhao, A.Thornton, S.Komazaki, H.Takeshima, J.Ma, y Z.Pan. 2006. Uncoupling store-operated  $Ca^{2+}$  entry and altered  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilin genes. *Biophys. J.* 90:4418-4427.
48. Holmberg, E. y B.Waldeck. 1980. The effect of insulin on skeletal muscle contractions and its relation to the effect produced by BETA-adrenoceptor stimulation. *Acta Physiol Scand.* 109:225-229.

49. Horgan, D.J. y R.Kuypers. 1987. Isolation of transverse tubules by fractionation of sarcoplasmic reticulum preparations in ion-free sucrose density gradients. *Arch. Biochem. Biophys.* 253:377-387.
50. Horgan, D.J. y R.Kuypers. 1988. Biochemical properties of purified transverse tubules isolated from skeletal muscle triads. *Arch. Biochem. Biophys.* 260:1-9.
51. Ikemoto, N., B.Nagy, G.M.Bhatnagar, y J.Gergely. 1974. Studies on a metal-binding protein of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249:2357-2365.
52. Ikemoto, N., M.Yano, R.El Hayek, B.Antoniou, y M.Morii. 1994. Chemical depolarization-induced SR calcium release in triads isolated from rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* 33:10961-10968.
53. Ilangumaran, S. y D.C.Hoessli. 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J* 335 ( Pt 2):433-440.
54. Kawabe, J.I., B.S.Grant, M.Yamamoto, C.Schwencke, S.Okumura, y Y.Ishikawa. 2001. Changes in caveolin subtype protein expression in aging rat organs. *Mol. Cell Endocrinol.* 176:91-95.
55. Kimura, A., S.Mora, S.Shigematsu, J.E.Pessin, y A.R.Saltiel. 2002. The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277:30153-30158.

56. Klip, A. y A.Marette. 1992. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. *J. Cell Biochem.* 48:51-60.
57. Launikonis, B.S. y D.G.Stephenson. 2001. Effects of membrane cholesterol manipulation on excitation-contraction coupling in skeletal muscle of the toad. *J. Physiol* 534:71-85.
58. Le Lay S, Kurzchalia TV. 2005. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30;1746(3):322-33
59. Li, C., W.Duan, F.Yang, y X.Zhang. 2006. Caveolin-3-anchored microdomains at the rabbit sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344:1135-1140.
60. Li, S., J.Couet, y M.P.Lisanti. 1996a. Src tyrosine kinases, G $\alpha$  subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271:29182-29190.
61. Li, S., T.Okamoto, M.Chun, M.Sargiacomo, J.E.Casanova, S.H.Hansen, I.Nishimoto, y M.P.Lisanti. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270:15693-15701.
62. Li, S., K.S.Song, S.S.Koh, A.Kikuchi, y M.P.Lisanti. 1996b. Baculovirus-based expression of mammalian caveolin in Sf21 insect cells. A model system for the

- biochemical and morphological study of caveolae biogenesis. *J. Biol. Chem.* 271:28647-28654.
63. Li, W.P., P.Liu, B.K.Pilcher, y R.G.Anderson. 2001. Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J. Cell Sci.* 114:1397-1408.
64. Lillioja, S., A.A.Young, C.L.Culter, J.L.Ivy, W.G.Abbott, J.K.Zawadzki, H.Yki-Jarvinen, L.Christin, T.W.Secomb, y C.Bogardus. 1987. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J. Clin. Invest* 80:415-424.
65. Lisanti, M.P., Z.L.Tang, y M.Sargiacomo. 1993. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J. Cell Biol.* 123:595-604.
66. Lohn, M., M.Furstenau, V.Sagach, M.Elger, W.Schulze, F.C.Luft, H.Haller, y M.Gollasch. 2000. Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ. Res.* 87:1034-1039.
67. Lund, S., G.D.Holman, O.Schmitz, y O.Pedersen. 1995. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:5817-5821.

68. Maier, S., F.Aulbach, A.Simm, V.Lange, H.Langefeld, H.Behre, U.Kersting, U.Walter, y M.Kirstein. 1999. Stimulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc. Res.* 44:390-397.
69. Melzer, W., A.Herrmann-Frank, y H.C.Luttgau. 1995. The role of Ca<sup>2+</sup> ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta* 1241:59-116.
70. Milici, A.J., N.E.Watrous, H.Stukenbrok, y G.E.Palade. 1987. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol.* 105:2603-2612.
71. Minamisawa S, Oshikawa J, Takeshima H, Hoshijima M, Wang Y, Chien KR, Ishikawa Y, Matsuoka R. 2004. Juncctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem Biophys Res Commun.* 325:852-856.
72. Monier, S., D.J.Dietzen, W.R.Hastings, D.M.Lublin, y T.V.Kurzchalia. 1996. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* 388:143-149.
73. Muñoz, P., S.Mora, L.Sevilla, P.Kaliman, E.Tomas, A.Guma, X.Testar, M.Palacin, y A.Zorzano. 1996. Expression and insulin-regulated distribution of caveolin in skeletal muscle. Caveolin does not colocalize with GLUT4 in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 271:8133-8139.

74. Murata, M., J.Peranen, R.Schreiner, F.Wieland, T.V.Kurzchalia, y K.Simons. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92:10339-10343.
75. Okamoto, T., A.Schlegel, P.E.Scherer, y M.P.Lisanti. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. J. Biol. Chem. 273:5419-5422.
76. Palade, G.E. 1953. Fine structure of blood capillaries. J. Appl. Physics 24:1424.
77. Park, D.S., S.E.Woodman, W.Schubert, A.W.Cohen, P.G.Frank, M.Chandra, J.Shirani, B.Razani, B.Tang, L.A.Jelicks, S.M.Factor, L.M.Weiss, H.B.Tanowitz, y M.P.Lisanti. 2002. Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. Am. J. Pathol. 160:2207-2217.
78. Parton, R.G., M.Way, N.Zorzi, y E.Stang. 1997. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. J. Cell Biol. 136:137-154.
79. Pinniger, G.J., J.D.Bruton, H.Westerblad, y K.W.Ranatunga. 2005. Effects of a myosin-II inhibitor (N-benzyl-p-toluene sulphonamide, BTS) on contractile characteristics of intact fast-twitch mammalian muscle fibres. J. Muscle Res. Cell Motil. 26:135-141.



80. Ploug, T., D.B.van, H.Ai, S.W.Cushman, y E.Ralston. 1998. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J. Cell Biol.* 142:1429-1446.
81. Pouvreau, S., C.Berthier, S.Blaineau, J.Amsellem, R.Coronado, y C.Strube. 2004. Membrane cholesterol modulates dihydropyridine receptor function in mice fetal skeletal muscle cells. *J. Physiol* 555:365-381.
82. Ralston, E. y T.Ploug. 1999. Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res.* 246:510-515.
83. Razani, B., J.A.Engelman, X.B.Wang, W.Schubert, X.L.Zhang, C.B.Marks, F.Macaluso, R.G.Russell, M.Li, R.G.Pestell, D.Di Vizio, H.Hou, Jr., B.Kneitz, G.Lagaud, G.J.Christ, W.Edelmann, y M.P.Lisanti. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276:38121-38138.
84. Razani, B., A.Schlegel, y M.P.Lisanti. 2000. Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 12):2103-2109.
85. Renganathan, M., M.L.Messi, y O.Delbono. 1997. Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor uncoupling in aged skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 157:247-253.

86. Rietveld, A. y K.Simons. 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:467-479.
87. Roseblatt, M., C.Hidalgo, C.Vergara, y N.Ikemoto. 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol. Chem.* 256:8140-8148.
88. Sargiacomo, M., P.E.Scherer, Z.Tang, E.Kubler, K.S.Song, M.C.Sanders, y M.P.Lisanti. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:9407-9411.
89. Sargiacomo, M., M.Sudol, Z.Tang, y M.P.Lisanti. 1993. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 122:789-807.
90. Scherer, P.E., R.Y.Lewis, D.Volonte, J.A.Engelman, F.Galbiati, J.Couet, D.S.Kohtz, D.E.van, P.Peters, y M.P.Lisanti. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:29337-29346.
91. Schnitzer, J.E., P.Oh, B.S.Jacobson, y A.M.Dvorak. 1995. Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:1759-1763.

92. Schroeder, F., A.M.Gallegos, B.P.Atshaves, S.M.Storey, A.L.McIntosh, A.D.Petrescu, H.Huang, O.Starodub, H.Chao, H.Yang, A.Frolov, y A.B.Kier. 2001. Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp. Biol. Med. (Maywood. )* 226:873-890.
93. Scriven, D.R., A.Klimek, K.L.Lee, y E.D.Moore. 2002. The molecular architecture of calcium microdomains in rat cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976:488-499.
94. Shaul, P.W. y R.G.Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol* 275:L843-L851.
95. Shevchenko, A., P.Keller, P.Scheiffele, M.Mann, y K.Simons. 1997. Identification of components of trans-Golgi network-derived transport vesicles and detergent-insoluble complexes by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 18:2591-2600.
96. Simionescu, N. 1983. Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev.* 63:1536-1579.
97. Smart, E.J., G.A.Graf, M.A.McNiven, W.C.Sessa, J.A.Engelman, P.E.Scherer, T.Okamoto, y M.P.Lisanti. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 19:7289-7304.

98. Smart, E.J., Y.S.Ying, C.Mineo, y R.G.Anderson. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:10104-10108.
99. Smith, K.E., C.Gu, K.A.Fagan, B.Hu, y D.M.Cooper. 2002. Residence of adenylyl cyclase type 8 in caveolae is necessary but not sufficient for regulation by capacitative Ca(2+) entry. *J Biol. Chem.* 277:6025-6031.
100. Smith, P.K., R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, y D.C.Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
101. Song, K.S., S.Li, T.Okamoto, L.A.Quilliam, M.Sargiacomo, y M.P.Lisanti. 1996a. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 271:9690-9697.
102. Song, K.S., P.E.Scherer, Z.Tang, T.Okamoto, S.Li, M.Chafel, C.Chu, D.S.Kohtz, y M.P.Lisanti. 1996b. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271:15160-15165.

103. Stan, R.V., W.G.Roberts, D.Predescu, K.Ihida, L.Saucan, L.Ghitescu, y G.E.Palade. 1997. Immunoisolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Mol. Biol. Cell* 8:595-605.
104. Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Kangawa K. 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell*. 6:11-22.
105. Tang, Z., T.Okamoto, P.Boontrakulpoontawee, T.Katada, A.J.Otsuka, y M.P.Lisanti. 1997. Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *J. Biol. Chem.* 272:2437-2445.
106. Tiwari A, Bansal V, Chugh A, Mookhtiar K. Statins and myotoxicity: a therapeutic limitation. *Expert Opin Drug Saf.* 2006 5:651-666.
107. Venema, V.J., H.Ju, R.Zou, y R.C.Venema. 1997. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 272:28187-28190.
108. Wagenknecht, T., C.E.Hsieh, B.K.Rath, S.Fleischer, y M.Marko. 2002. Electron tomography of frozen-hydrated isolated triad junctions. *Biophys. J.* 83:2491-2501.

109. Wang, W., P.A.Hansen, B.A.Marshall, J.O.Holloszy, y M.Mueckler. 1996. Insulin unmasks a COOH-terminal Glut4 epitope and increases glucose transport across T-tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 135:415-430.
110. Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. 2004. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev.* 2004 25:177-204.
111. Way, M. y R.G.Parton. 1996. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 378:108-112.
112. Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall blader epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1:445-458.
113. Yamamoto, M., Y.Toya, C.Schwencke, M.P.Lisanti, M.G.Myers, Jr., y Y.Ishikawa. 1998. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273:26962-26968.
114. Yeh, J.I., K.J.Verhey, y M.J.Birnbaum. 1995. Kinetic analysis of glucose transporter trafficking in fibroblasts and adipocytes. *Biochemistry* 34:15523-15531.
115. Yuan, S.H., W.Arnold, y A.O.Jorgensen. 1991. Biogenesis of transverse tubules and triads: immunolocalization of the 1,4-dihydropyridine receptor, TS28, and

the ryanodine receptor in rabbit skeletal muscle developing in situ. *J Cell Biol.*  
112:289-301.