



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

---



**PARTICIPACIÓN DE PANX-1 EN LA ENTRADA DE CALCIO ACOPLADA A  
EXCITACIÓN (ECCE) FRENTE A ESTÍMULOS DESPOLARIZANTES EN  
CÉLULAS MUSCULARES ADULTAS DE RATÓN**

**ANDREA VALENTINA VIDAL VERGES**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN FISIOLOGÍA**

Director de tesis: Prof. Dr. Enrique Jaimovich

2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Jaimovich por sus palabras de apoyo, por darme ánimo y confiar en mis capacidades aun cuando a mí me costó hacerlo.

A Javiera, Joceline y Mónica por el constante ánimo y compañerismo durante el transcurso de nuestros proyectos académicos.

A mis padres y hermana por estar siempre apoyándome y por escucharme en mis momentos complicados.

A Astrid por todas las herramientas que me brindó durante este último año, las cuales me permitieron avanzar tanto a nivel personal como académico.

A Venus y Thunder, que no pueden leer, pero les agradezco por distraerme tanto y hacerme reír con las cosas raras que hacen.

Al team chanchito corazón: Tami, Morin y Sofi. Por los días de playa, reuniones lloronas, juegos de mesa mal jugados y por un sinfín de cosas, gracias por estar.

A Blanca, por hacer mucho más ameno los últimos días de preparación de tesis, y por haber sido una increíble compañera de laboratorio y amiga.

En general, a todas las personas que de alguna u otra forma estuvieron durante este proceso y me apoyaron, me escucharon, me acompañaron y confiaron en mí. Muchas gracias.

**PARTICIPACIÓN DE PANX-1 EN LA ENTRADA DE CALCIO ACOPLADA A  
EXCITACIÓN (ECCE) FRENTE A ESTÍMULOS DESPOLARIZANTES EN  
CÉLULAS MUSCULARES ADULTAS DE RATÓN**

TESIS PARA GRADO DE MAGÍSTER EN FISIOLOGÍA (Mg)

Por

**Andrea Valentina Vidal Verges**

*Director de tesis:*

**Dr. Enrique Jaimovich**

**Programa de Fisiología y Biofísica. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad  
de Medicina, Universidad de Chile.**

## ÍNDICE

---

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
<b>Mecanismos de restauración de Ca<sup>2+</sup> intracelular: SOCE y ECCE</b> .....	8
<b>Canales de calcio sensibles a voltaje Cav1.1</b> .....	9
<b>Cinética del Ca<sup>2+</sup> frente a estímulos despolarizantes en fibras aisladas de músculo</b> .....	10
<b>Participación de Panx-1 en el mecanismo ETC</b> .....	13
<b>Proteínas participantes en ECCE</b> .....	14
<b>Quenching de Mn<sup>2+</sup> como técnica para evaluar el flujo de Cationes divalentes asociado a ECCE en fibras musculares</b> .....	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL .....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	17
1   <b>ANIMALES</b> .....	17
1. <b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b> .....	17
2   <b>PREPARACIÓN DE FIBRAS MUSCULARES</b> .....	18
3   <b>SOLUCIONES</b> .....	19
4   <b>QUENCHING DE Mn<sup>2+</sup></b> .....	19
5   <b>FARMACOLOGÍA</b> .....	20
7   <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	31
ANEXO .....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

## RESUMEN

---

Es bien sabido que, en las células excitables del músculo esquelético, estímulos eléctricos despolarizantes promueven la activación de diversos mecanismos celulares que son capaces de distinguir entre distintos rangos de frecuencia para su activación. Dentro de estos, se encuentra el *acoplamiento excitación-contracción* observado en tejido muscular, el cual se gatilla con estimulación tanto de alta como baja frecuencia, y que se sabe depende esencialmente de la interacción mecánica cruzada entre el canal de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sensible a voltaje de tipo L (Cav1.1) de los túbulos T, y el receptor de Rianodina (RyR) en la membrana del retículo sarcoplasmático. Por otra parte, también existe el *acoplamiento excitación-transcripción*, el cual solo se activa a bajas frecuencias y depende de un macro-complejo proteico que incluye a tanto a Cav1.1 como al canal de Panexina 1 (Panx1), el cual permite la salida de ATP hacia el medio extracelular. Estas proteínas interactúan entre sí y favorecen un aumento intracelular de los niveles de Inositol trifosfato (IP3) y  $\text{Ca}^{2+}$  asociados con la regulación en la transcripción génica en músculo. En músculo esquelético también existe otro mecanismo conocido como *entrada de calcio acoplada a excitación* (ECCE), que se activa al estimular eléctricamente a bajas frecuencias y promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del sarcolema, de forma independiente a la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares. Actualmente se desconoce el canal específico por el cual se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma, no obstante, se sabe que si bien requiere la presencia de Cav1.1 como RyR, el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  no está mediado por canales de tipo L como Cav1.1. Recientemente se ha sugerido que Panexina 1 también es capaz de formar canales de gran poro que son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , de esta forma, en este trabajo se evaluó la posible participación de Panx-1 en ECCE en la mediación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. Se evaluó la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  exclusivamente a través del sarcolema mediante la técnica de *quenching* de  $\text{Mn}^{2+}$ , la cual se basa en el apagamiento de la señal fluorescente de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  fura-2-AM, dada su afinidad con  $\text{Mn}^{2+}$ . Los resultados muestran un apagamiento significativo en la señal fluorescente al incubar las fibras en medio Ringer Krebs con  $\text{Mn}^{2+}$  y libre  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual se ve favorecido con estimulación de baja frecuencia. Dicho apagamiento es anulado al aplicar fármacos inhibidores de Panx-1, sugiriendo que la proteína puede estar

mediando tanto la salida de ATP como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma durante el fenómeno de ECCE.

## ABSTRACT

---

Depolarizing electrical stimuli promote activation of different cellular mechanisms that can in skeletal muscle. Within these is the *excitation-contraction coupling*, which is observed in both high and low frequency stimuli and depends on the participation and cross-mechanical interaction between Cav1.1 and RyR, on the other hand, there is the *excitation-transcription coupling* which is only activated at low frequencies and depends on a protein macro complex that includes Cav1.1 and Panx-1 in sarcolemma, which interact with each other, favoring the increase of intracellular IP3 and Ca<sup>2+</sup> levels, which is associated with gene transcription. There is other mechanism that is activated by electrical stimulation at low frequencies and promotes Ca<sup>2+</sup> entry through the sarcolemma, known as *excitation-coupled calcium entry* (ECCE), which does not depend on the emptying of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores, it is independent of L-type Ca<sup>2+</sup> currents and requires both the presence of Cav1.1 and RyR. The channel by which Ca<sup>2+</sup> enters the cytoplasm in this mechanism is still unknown, however, it is proposed that there must be at least a third protein capable of interacting with Cav1.1 and/or RyR, which permeates the cation. This work seeks to evaluate the participation of Panx-1 in ECCE, due to the high conductance and expression of the channel in adult skeletal muscle, in addition to the interaction described between this protein with Cav1.1, which is required in the excitation-transcription coupling. The entry of Ca<sup>2+</sup> was evaluated indirectly using Mn<sup>2+</sup> quenching, a fluorescence technique whose mechanism is based on the quenching of the signal of the fluorescent probe fura-2-AM by affinity of Mn<sup>2+</sup> to the probe when it enters the cell. Results suggest that Panx-1 participates in ECCE, mediating the exit of ATP together with the entry of Ca<sup>2+</sup> into the cytoplasm and that ECCE and excitation-transcription coupling are part of the same phenomenon.

## INTRODUCCIÓN

---

La expresión de genes y nivel o magnitud de ésta determina, ya sea a nivel celular, tisular, o en los distintos órganos, la morfología, funcionalidad de estos. Esta expresión ocurre de la mano de cambios metabólicos, hormonales y/o mecánicos además de los potenciales de acción evocados mediante estimulación eléctrica, sin embargo, respecto al rol de este último como regulador de la expresión génica en diversas células (como en las células del músculo esquelético), aún quedan muchas preguntas o dudas por resolver (Nacini, M. V. et al., 2008; Arias-Calderón et al., 2016; Zullo, et al., 2020).

La regulación y diferenciación celular dada por la expresión de genes puede estar acoplada a la participación de moléculas como  $\text{Ca}^{2+}$ , que a nivel intracelular actúa como segundo mensajero en este y otros procesos biológicos como la secreción y división celular (Ginty et al., 1997, Jaimovich et al., 2000). Los niveles de este ion varían dentro de la célula en respuesta a estímulos despolarizantes, tal como estímulo eléctrico de baja o alta frecuencia o bien, debido a altas concentraciones de  $\text{K}^+$ , que activan el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en los túbulos T sensible a voltaje, Cav1.1. En el músculo esquelético, este segundo mensajero cumple un rol fundamental en mecanismos celulares asociados a la contracción y a la plasticidad muscular (Tate et al., 1991, Berchtold, et al., 2000).

### **Mecanismos de restauración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular: SOCE y ECCE**

Para mantener la capacidad de responder a diversos procesos biológicos propios del músculo esquelético, es indispensable que éste mantenga cierto nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sin embargo, esto puede variar en respuesta a estímulos despolarizantes que promuevan la salida del catión desde reservorios intracelulares, los que pueden sufrir depleción del ion de manera dependiente de la intensidad y duración de los estímulos. Bajo estas condiciones, se considera relevante la concentración del catión a nivel extracelular, ya que permite reestablecer y mantener concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  adecuadas a nivel intracelular. (Bianchi et al., 1959). El mecanismo por excelencia que permite la entrada y restauración de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular, es la ruta



de *entrada de calcio dependiente de reservorios intracelulares*, SOCE (store-operated calcium entry), la cual ha sido ampliamente estudiada. SOCE depende esencialmente de la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares, como el retículo sarcoplasmático (SR) y, su mecanismo se basa en restaurar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en éste, a través de la interacción de proteínas como ORAI1 y STIM, con la finalidad de reestablecer y dar forma a los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos (Gach et al., 2008; Pan et al., 2021, Cherednichenko et al., 2004).

Por otra parte, existe un mecanismo propuesto que describe una vía alternativa de ingreso  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, conocido como *entrada de calcio acoplada a la excitación* (ECCE), el cual se genera durante la estimulación despolarizante prolongada o estimulación eléctrica repetida de baja frecuencia del músculo esquelético. A diferencia de SOCE, ECCE se describe como una vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dado ciertos estímulos fisiológicos, que no provocan agotamiento significativo de este catión en los reservorios intracelulares. Otras de las características de ECCE es que está ausente en fibras musculares que carecen de la subunidad  $\alpha 1\text{S}$  del canal Cav1.1 (disgénica) o el receptor de rianodina tipo 1, RyR1 (dispédica), por lo que se deduce que la presencia de ambas proteínas es necesaria para que se lleve a cabo dicho mecanismo (Cherednichenko et al, 2004; Gach et al., 2008; Bannister et al, 2009).

### **Canales de calcio sensibles a voltaje Cav1.1**

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Cav) se activan en respuesta a cambios de potencial de membrana e inician cascadas de señalización celular en las que se involucra el  $\text{Ca}^{2+}$ .

El complejo Cav1.1 consta de la subunidad  $\alpha 1$  formadora de poros y las subunidades auxiliares  $\alpha 2\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que modulan el tráfico a la membrana, la cinética de la corriente y las propiedades de activación de los canales de Cav. La subunidad  $\alpha 1$ , conductora de iones de los canales de Cav eucarióticos, consta de una única cadena peptídica con cuatro repeticiones similares unidas por bucles intracelulares. Cada repetición contiene seis hélices transmembrana denominadas S1-S6, de las cuales S1-S4 de cada repetición forman el dominio de detección de voltaje (VSD) y S5-S6 de las cuatro repeticiones constituyen el poro conductor de iones. También contienen varias

subunidades auxiliares que forman un complejo con la subunidad  $\alpha 1$ . (Wu, J. et al. 2016)

Aunque las subunidades auxiliares no son esenciales para la permeación del canal, pueden regular el tráfico a la membrana y las propiedades del canal de la subunidad  $\alpha 1$ . Por ejemplo, la subunidad  $\alpha 2\delta$  puede facilitar la translocación de canal a la superficie celular, y la subunidad  $\beta$  modula las propiedades cinéticas del canal. En el músculo esquelético, la subunidad  $\beta$  en Cav1.1 juega un papel esencial en el acoplamiento excitación-contracción. La subunidad  $\gamma$  ayuda a la inactivación del canal. (Wu, J. et al., 2016; Wu, J. et al., 2017)

En músculo esquelético, se generan cambios conformacionales de Cav1.1 inducidos por el potencial de acción, que activan al receptor de rianodina tipo 1 (RyR1), que es un canal de liberación de calcio de alta conductancia ubicado en la membrana del retículo sarcoplasmático (SR), además, es responsable de la rápida liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares durante el acoplamiento excitación-contracción. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son luego bombeados de regreso al SR por la calcio-ATPasa SERCA, lo que lleva a la relajación muscular. (Wu, J. et al., 2017; Hering, S. et al., 2018).

### **Cinética del $\text{Ca}^{2+}$ frente a estímulos despolarizantes en fibras aisladas de músculo.**

Frente a estímulos despolarizantes se ha observado que se genera una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que presenta dos componentes de distinta cinética, hay una fase de aumento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  rápido, que surge inmediatamente luego de la estimulación, el cual se asocia a un proceso denominado *acoplamiento excitación-contracción* (ECC). En ECC se produce una interacción cruzada entre Cav1.1 en la membrana celular con el receptor de rianodina (RyR1) en el retículo sarcoplásmico producto de la despolarización de la membrana, esta interacción promueve una señal rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  por liberación de este catión desde el retículo endoplásmico (ER)/ retículo sarcoplásmico (SR), que favorece la interacción entre filamentos requeridos para la contracción muscular (Calderon et al., 2014). Por otra parte, el segundo componente de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  surge con una cinética más lenta post-estimulación; este segundo componente se encuentra asociado a otro mecanismo denominado *acoplamiento*

*excitación-transcripción* (ETC), donde la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular aumenta de manera dependiente de IP3 y ello se relaciona con activación de ERK, el factor de transcripción CREB además de la activación de la transcripción de genes tempranos y tardíos que participan en procesos de plasticidad muscular (Carrasco et al., 2003; Buvinic, S. et al., 2009; Arias-Calderón et al., 2016).

La vía de señalización involucrada en ETC incluye la activación de Cav1.1 por despolarización de la membrana celular, que promueve la acción de una vía acoplada a proteína G, activación de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C (PLC) para producir inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3) que produce liberación de  $Ca^{2+}$  al unirse a sus receptores (IP3R) en el SR y en la membrana nuclear, para inducir la transcripción diferencial de factores de transcripción y genes de expresión temprana (IEG) como c-fos y c-jun, genes relacionados con el ejercicio (IL-6) y otros relacionados con la plasticidad de las fibras musculares (TnIs y TnIf) (Carrasco et al., 2003; Casas et al., 2010).

Estudios previos han demostrado que las ondas lentas de  $Ca^{2+}$  en procesos de ETC, también se encuentran implicadas en la liberación de adenosín trifosfato (ATP), que participa como uno de los principales mediadores de este mecanismo (Casas et al., 2014; Jorquera et al., 2013). El ATP es liberado a través del canal de pannexina-1 (Panx-1) en la membrana celular y este ATP extracelular (eATP) actúa a través de los receptores purinérgicos P2Y, activando un mecanismo que se caracteriza por mediar la generación de la onda lenta de calcio dependiente de IP3. La liberación de ATP es modulada en cierto nivel por la frecuencia de estimulación eléctrica a la cual es sometida la fibra muscular, esta frecuencia a su vez determina en gran medida la programación transcripcional que brinda identidad a estas fibras, como la transición de un tipo de fibra muscular a otro y expresión de proteínas contráctiles y enzimas, dependiendo de los requerimientos de la célula (Murgia et al 2000; Serrano et al 2001, Jorquera 2013).

Tanto Cav1.1, como Panx-1 y P2Y forman parte de un macro complejo de proteínas en los túbulos T de células del músculo esquelético, se activa en respuesta a estímulos eléctricos despolarizantes de baja frecuencia promoviendo el proceso de ETC, donde

Cav1.1 y Panx-1 interactúan de manera funcional y recíproca en la membrana (Jorquera et al., 2013; Arias-Calderón et al., 2016, Jaque et al., 2021).

### **Panx-1: estructura, expresión celular y mecanismos de activación.**

A principios de los 2000 se describió por primera vez la molécula panexina (del latín *pan*, todo, a lo largo y *nexo*, conexión, enlace), de amplia distribución en el reino animal, con características compartidas a nivel estructural y funcional con proteínas de unión en hendidura o *gap junctions* de invertebrados denominadas inexas (con una homología de secuencia entre 25-33% de identidad) y con las proteínas de vertebrados conexinas (no comparten homología de secuencia) (Pachin et al., 2000; Bruzzone et al., 2003). Panexina, forma parte de una familia compuesta de tres proteínas glicosiladas integrales de membrana Panx-1, Panx-2 y Panx-3. El canal cuenta con una topología que consiste en cuatro dominios de transmembrana  $\alpha$ -helicoidal (TM), dos bucles extracelulares (EL) y un bucle intracelular (IL), con su amino (NT) y extremos carboxilo (CT) expuestos al citoplasma. (Penuela et al., 2013; Whyte et al., 2018).

Dentro de los miembros de la familia de panexina, Panx-1 es el miembro mejor caracterizado y se considera de expresión ubicua en diversos órganos y tipos celulares; mediante *northern blot* se han detectado distintos niveles mRNA expresados fuertemente en el corazón, músculo esquelético, testículos y ovarios, en niveles medios en cerebro, placenta, riñón, próstata e intestino delgado, y en bajos niveles en pulmón, hígado, páncreas, bazo, colon y sangre periférica (Bruzzone et al., 2003; Baranova et al., 2004). Está ampliamente aceptado que este canal, más que actuar como una unión en hendidura, funciona como un canal de membrana de gran poro y alta conductancia *in vivo*, regulado por modificaciones postraduccionales, localización subcelular y distribución tisular. (Celetti et al., 2010 Whytes et al., 2018). Mediante criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) se determinó que la estructura del canal se genera mediante el estado de oligomerización de Panx1 que requiere de 7 subunidades para componer un heptámero simétrico u homomérico, (Deng et al., 2020; Jin et al., 2020)

Panx-1 puede ser activado mediante diversos estímulos, tanto fisiológicos como patológicos, y de manera experimental. En cuanto a los estímulos fisiológicos que modulan la actividad de este canal están los ligandos (ATP, glutamato, agonistas  $\alpha$  - adrenérgicos y bradicinina) que se unen a sus receptores, produciendo la apertura de Panx-1 y estimulando así, la liberación de ATP. (Dahl, 2015; Dahl, 2018). Si bien se han generado diversas discusiones y controversias en torno a las distintas formas en las cuales se modula Panx-1, se ha descrito que tanto en la activación como inhibición del canal pueden ocurrir por elevadas concentraciones de  $K^+$  extracelular, altos niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, ATP, estimulación mecánica, voltaje, regulación redox, óxido nítrico (NO), NMDA, cambio de pH extracelular, interacción con receptores purinérgicos y las caspasas. (Whyte et al., 2018, Penuela et al., 2014). Además, existe evidencia sustancial sobre la modulación del canal por modificaciones postraduccionales como la glicosilación, que asocia al tráfico de la proteína hacia la membrana, la nitrosilación y la fosforilación que podrían estar mediando la activación de estos canales en distintos contextos celulares por acción de proteínas quinasa (Whyte et al., 2018).

### **Participación de Panx-1 en el mecanismo ETC**

En el mecanismo ETC, al igual que Cav1.1, se ha descrito que Panx-1 cumple un rol fundamental, mediando la liberación de ATP hacia el espacio extracelular, desencadenando una vía de señalización involucrada en la activación de la transcripción génica y plasticidad muscular de manera dependiente de estimulación eléctrica (Buvinic et al., 2009). La fibra muscular tiene la propiedad de responder de manera diferencial a distintas frecuencias de estimulación, induciendo la activación de ECC o ETC. Jorquera et al. (2013) demostraron que la liberación de ATP a través de Panx-1 ocurre de manera dependiente de la frecuencia de estimulación eléctrica, al estimular las fibras musculares adultas de ratón a bajas frecuencias (20 Hz) aumenta eATP, lo que no se aprecia al aplicar estímulos de altas frecuencias (90 Hz). A 20 Hz se producen dos máximos de liberación de ATP, el primero ocurre dentro de los primeros 0-15 segundos y el segundo alrededor de los 200 segundos post-estimulación, siendo este último de una mayor duración. Esta liberación inducida de ATP se asocia a su vez con un aumento en la expresión de TnIs y con la disminución

de Tnlf. La actividad de Panx-1, que interactúa con Cav1.1 en la membrana, es modulada de manera importante por la frecuencia de estimulación eléctrica, participando en el mecanismo de ETC, modulando la expresión de genes y la plasticidad en fibras de músculo esquelético (Buvinic et al., 2009, Casas et al., 2010, Jorquera et al., 2013).

### **Proteínas participantes en ECCE**

Cherednichenko y colaboradores, 2004, mostraron que, aunque Cav1.1 cumple una función de sensor de voltaje requerida para que se inicie ECCE en músculo esquelético, las corrientes  $Ca^{2+}$  tipo L no son responsables de la activación de este proceso. Esto fue probado mediante  $SKEIIIK$ DHPR (mutante músculo esquelético que contiene una mutación de Glu-a-Lys dentro de la región de los poros de la repetición III) expresados en fibras disgénicas, la cual no produce corriente de  $Ca^{2+}$ , pero si restaura las contracciones evocadas y los transitorios de  $Ca^{2+}$  intracelulares dependientes de despolarización, con propiedades similares a la condición silvestre. Es posible entonces, que ECCE requiera del acoplamiento conformacional Cav1.1-RyR1 para activar una vía de permeación de  $Ca^{2+}$  distinta o proporcionando un mecanismo único independiente de almacenamiento para abrir los canales Orai1 permeables al  $Ca^{2+}$  (Charednichenko et al., 2004; Yang et al., 2007; Dirksen et al., 2009).

Al considerar una vía alternativa de entrada de  $Ca^{2+}$ , una tercera proteína que podría interactuar tanto con Cav1.1 y como RyR, participando en la entrada de calcio producida en ECCE, proponemos que pudiera ser el canal Panx-1; esta proteína actúa como un canal de gran poro en la membrana, siendo permeable a diversas moléculas dependiendo de la conductancia y el tipo de estímulo que la regule. Se ha demostrado que Panx-1, en ciertas líneas celulares de cáncer de próstata es permeable a  $Ca^{2+}$  y facilita la comunicación intracelular entre células adyacentes, permite la difusión directa del catión y además facilita la propagación de ondas de  $Ca^{2+}$  intracelulares (Vanden et al., 2006). Por otra parte, en miocitos cardiacos de ratón se ha encontrado evidencia sustancial de que Panx-1 actúa como un canal de gran conductancia que permite la afluencia de calcio y despolarización de la membrana que podría desencadenar potenciales de acción (Zhang et al., 2007; Kienitz et al. 2010).

## **Quenching de Mn<sup>2+</sup> como técnica para evaluar el flujo de Cationes divalentes asociado a ECCE en fibras musculares.**

Con la finalidad de evaluar la entrada de cationes divalentes desde el medio extracelular, se han usado diversas técnicas como el *quenching* o apagamiento de manganeso, estimado como extinción de la luz emitida por sondas fluorescentes como fura-2 (Gach et al., 2008). Esta es una técnica que ha sido empleada en distintos tipos celulares para revelar aspectos específicos de la respuesta de entrada de cationes y su mecanismo se basa en que el Mn<sup>2+</sup> sea transportado a través de los mismos canales de la membrana plasmática que son permeables a otros cationes divalentes como Ca<sup>2+</sup>. La entrada de Mn<sup>2+</sup> en una célula se controla mediante la extinción de la fluorescencia de un fluoróforo (fura-2) con el que se ha cargado la célula y la ventaja de usarla radica principalmente en el hecho de que el *quenching* o apagamiento de Mn<sup>2+</sup> se realiza la excitación en el punto isosbético, a una longitud de onda en la cual la fluorescencia de Fura-2 es independiente de la concentración de Ca<sup>2+</sup> y se observa la emisión a 510 nm, además dentro de las propiedades que hacen que esta técnica sea conveniente en mediciones como la estimación indirecta de entrada de Ca<sup>2+</sup> están: (1) Mn<sup>2+</sup> al entrar a la célula, “*apaga*” la señal de fluorescencia de fura-2, por lo que su detección es fácil y rápida; (2) la entrada de Mn<sup>2+</sup> parece estar estimulada bajo las mismas condiciones que la de Ca<sup>2+</sup>, por lo cual se asumen rutas similares; y (3) dado que no existe un depósito de Mn<sup>2+</sup> intracelular en músculo esquelético, una extinción de la fluorescencia indica de forma inequívoca que el Mn<sup>2+</sup> que entra en el citoplasma se origina desde el exterior de la célula y no desde un depósito interno. (Gomes y Madeira, 1986; Clementi et al., 1992, Kwakye et al., 2013).

La identificación del mecanismo que subyace a la vía ECCE y potencia el flujo de Ca<sup>2+</sup> desde el medio extracelular al interior de la célula, resulta de gran importancia, ya que, si se demuestra que es mediado por el canal Panx1, proporcionará una herramienta esencial para el estudio del acoplamiento excitación-transcripción en músculo esquelético.

## **HIPÓTESIS**

---

La entrada de calcio acoplada excitación (ECCE) se produce por la activación de Panx-1 acoplada a Cav1.1 en respuesta a estimulación eléctrica en fibras musculares adultas del *flexor digitorum brevis* (FDB) en modelo murino.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Evaluar entrada de cationes divalentes a través del canal de Panx-1 al estimular eléctricamente fibras musculares adultas de FDB de modelo murino.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

- I. Identificar el quenching de  $Mn^{2+}$  por estimulación eléctrica de baja frecuencia (20Hz) en FDB.
- II. Evaluar ECCE mediante quenching de  $Mn^{2+}$  frente al uso de herramientas farmacológicas que modulan la actividad de Cav1.1.
- III. Evaluar ECCE mediante quenching de  $Mn^{2+}$  frente al uso de herramientas farmacológicas que modulan la actividad de Panx-1.



## DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

---

La presente investigación fue llevada a cabo en el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, a cargo sus directores, el Dr. Enrique Jaimovich y la Dra. Mariana Casas, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante los años 2021-2022.

### 1 | ANIMALES

El manejo de animales se lleva a cabo según los protocolos establecidos por la unidad de prevención de riesgos y bioética del comité animal de investigación de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Para evaluar la actividad del canal Panx-1, se utilizaron ratones C57BL/6 adultos (6-8 semanas de edad) obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Mantenidos bajo condiciones de temperatura- humedad controlada, ciclos de luz-oscuridad de 12 hora y comida y agua *ad libitum*.

#### 1. GRUPOS EXPERIMENTALES

Debido a la variabilidad entre fibras, se considera como grupos experimentales las fibras aisladas de FDB provenientes de ratones adultos, que se separan y mantienen ya sea en medio Krebs-Ringer (KR), Krebs-Ringer con  $Mn^{2+}$  (KR  $Mn^{2+}$ ), y junto con los distintos fármacos: KR  $Mn^{2+}$  con nifedipina (25 $\mu$ M), KR  $Mn^{2+}$  (-)S-Bay K 8644 (10 $\mu$ M) y KR  $Mn^{2+}$  Carbenoxolona (5 $\mu$ M) de manera independiente para la experimentación. Para cada grupo experimental se analizaron fibras de una población proveniente como mínimo de 3 ratones.

Las fibras musculares aisladas en las diferentes condiciones experimentales fueron tratadas, además, con 25 $\mu$ M N-bencil-p-toluenosulfonamida (BTS) para

inhibir la contracción muscular y disminuir posibles artefactos de movimiento asociados a ésta.

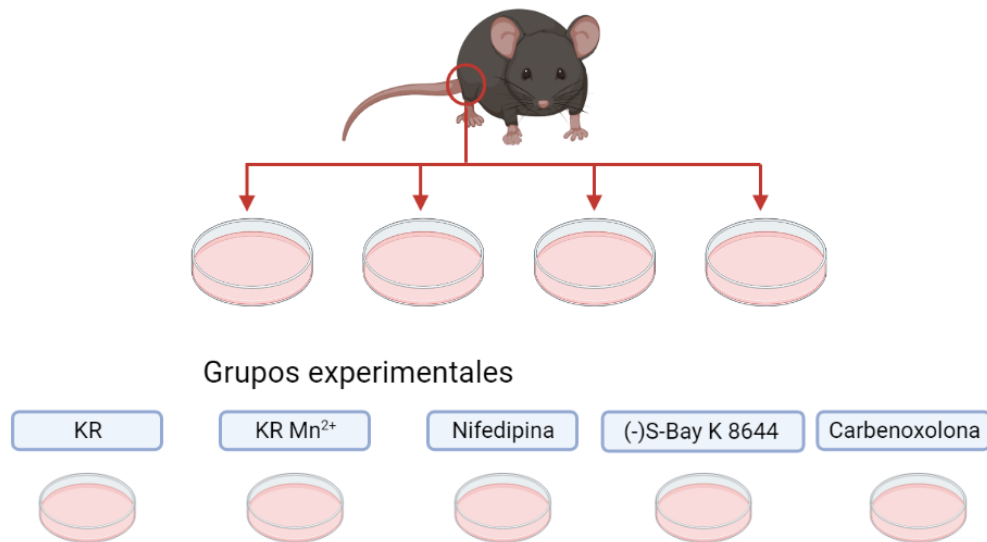


Figura 1. Representación ilustrada de las muestras obtenidas a partir del músculo flexor digitorum brevis (FDB) de ratón adulto de la cepa C57BL/6. Los grupos experimentales son las placas con fibras musculares aisladas frente a cada una de las condiciones: Fibras en medio Krebs-Ringer (KR), en medio Krebs-Ringer con manganeso (KR Mn<sup>2+</sup>) y fibras en KR Mn<sup>2+</sup> tratadas con: 25µM nifedipina (Nif), 10µM (-)S-Bay k 8644 (BayK) y 5µM Carbenoxolona (CBX).

## 2 | PREPARACIÓN DE FIBRAS MUSCULARES

Las fibras musculares aisladas fueron obtenidas a partir de digestión enzimática de FDB con colagenasa tipo 2 de Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA), preparación llevada a baño termostático durante 1 hora 30 minutos a 37°.

Luego, el músculo parcialmente digerido fue sometido a disociación mecánica, utilizando pipetas de vidrio con puntas de distinto tamaño pulidas con fuego. Las fibras obtenidas fueron sembradas en cubreobjetos cubiertos con matrigel en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) obtenida de Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) suplementado con suero de caballo al 10%, para luego ser llevadas a incubar, previo a la utilización de las fibras, durante 24h a 37° y CO<sub>2</sub> 5% (Buvinic et al., 2009; Casas et al., 2019; Arias-Calderón et al., 2016).

### 3 | SOLUCIONES

#### **Solución fisiológica Krebs-Ringer:**

140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5.5mM glucosa, 10mM HEPES, pH 7.4. Se agregan 200 ml de H<sub>2</sub>O a un vaso precipitado de vidrio de 500 ml, seguido por 4,23g NaCl, 1,19g KCl, 0,101g MgCl<sub>2</sub>, 0,07g CaCl<sub>2</sub>, 0,5g glucosa y 1,19g HEPES. Se agita utilizando una manta con agitación magnética y se ajusta el pH a 7.4. Se completa el volumen de 500 mL con H<sub>2</sub>O.

#### **Solución de quenching de Mn<sup>2+</sup>:**

140mM NaCl, 5mM KCl, 0.5mM MnCl<sub>2</sub>, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5mM glucosa, 10mM Hepes, pH 7.4.

Ambas soluciones fueron mantenidas a ~4°C en un frasco de vidrio previo a su uso.

### 4 | QUENCHING DE Mn<sup>2+</sup>

Las fibras musculares aisladas, fueron cargadas con 5 µM de Fura-2 AM en una solución Krebs-Ringer y se incubaron durante 45min a temperatura ambiente. La sonda fue lavada 3 veces, dentro de las cuales en la última el lavado fue realizado con el medio sobre el cual se realizaron los experimentos en cada caso (KR, KR Mn<sup>2+</sup>, Nif, BayK o CBX). Posterior a los lavados se agregó 25 µM N-bencil-p-toluenosulfonamida (BTS) para inhibir la contracción muscular y posibles artefactos de movimiento causados por esta, y, se mantiene en reposo por 30 minutos. Para evaluar la fluorescencia, se utilizó un filtro de excitación de 357/7 nm y uno de emisión de 510/8 nm; los niveles de entrada de Ca<sup>2+</sup> serán estimados de manera indirecta, mediante apagamiento de la fluorescencia de la sonda, dada la entrada de Mn<sup>2+</sup> en el punto

isobéptico de Fura-2, lo que será representado como fluorescencia relativa ( $\Delta F/F_0$ ) en función del tiempo (s). Posterior al tiempo de incubación con BTS, las fibras son estimuladas eléctricamente a baja frecuencia (20 Hz) y se evaluará el cambio en la fluorescencia regiones de interés de cada una de las fibras individuales.

## 5 | FARMACOLOGÍA

Los agentes farmacológicos utilizados son Nifedipina (Sigma-Aldrich) 25 $\mu$ M como antagonistas del canal Cav1.1 que bloquea de manera funcional el canal (Jorquera et al., 2013), Carbenoxolona (CBX) 5 $\mu$ M, inhibidor de Panx-1 CBX cuyo mecanismo se basa en la modulación del primer bucle extracelular, que probablemente juega un papel central en la apertura del canal Panx-1 (Silverman et al., 2008; Jorquera et al., 2013; Arias-Calderón et al., 2016). Por otra parte, se usará (-)S-Bay K 8644 (BayK) que actúa como agonista de Cav1.1 e inhibe la liberación de ATP desde Panx-1 sin afectar las corrientes de Ca<sup>2+</sup> (Casas et al., 2014).

## 6 | ESTIMULACIÓN ELECTRICA

Las fibras aisladas se estimularon usando un dispositivo electro estimulador GRASS S48 (Axon instruments), aplicando un protocolo de estimulación que consta de 270 pulsos, con una duración de 0.3 ms por pulso, a baja frecuencia (20Hz) o alta frecuencia (90Hz) (Gach et. al, 2008; Jorquera et al., 2013), usando dos electrodos con una distancia entre sí de ~1 mm. Las imágenes obtenidas fueron procesadas usando el software Fiji (o ImageJ).

## 7 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El registro de la fluorescencia en el tiempo para cada una de las fibras fue dividido en 4 segmentos, siendo estos:  $PRE_{Est}$  (porción correspondiente a imágenes adquiridas previo al estímulo eléctrico),  $EST$  (representa el tiempo del estímulo en sí),  $RB$  (es el retorno desde el fin del estímulo hasta que la señal vuelve al nivel de la fluorescencia basal) y  $POST_{Est}$  (fluorescencia de una fibra luego de haber retornado al nivel basal).

En el caso del segmento  $POST_{Est}$  de los registros de fibras aisladas bajo las distintas condiciones de experimentación, se evaluó el promedio de las pendientes de la caída posterior a  $RB$  (entre  $RB$  y los siguientes 15-25 segundos) la cual se ajusta a una función lineal  $y=mx+b$ .

Para determinar la distribución de los promedios de las pendientes para cada uno de los grupos experimentales, sometidos ya sea a alta (90Hz) o baja (20Hz) frecuencia, fue aplicada la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para comparaciones entre dos condiciones, las pendientes fueron analizadas aplicando la prueba t-test para muestras independientes o no pareadas. Mientras que para establecer múltiples comparaciones entre grupo control y las distintas condiciones, los datos fueron evaluados mediante la prueba de ANOVA. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar (SEM).

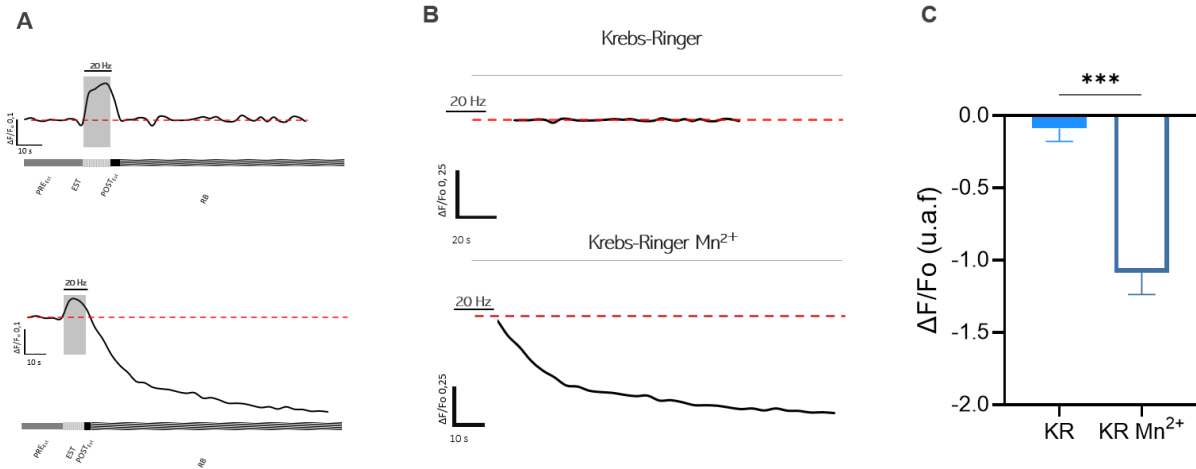
## RESULTADOS

---

La técnica de fluorescencia mencionada previamente, conocida como *quenching* o apagamiento de  $Mn^{2+}$ , fue aplicada en fibras musculares aisladas de FDB, las cuales se dividen inicialmente en dos grupos, aquellas incubadas en una solución Krebs-Ringer tradicional (KR), y el otro grupo, conformado por fibras incubadas en un medio Krebs-Ringer con  $Mn^{2+}$  (KR  $Mn^{2+}$ ), sin  $Ca^{2+}$  añadido ( $Ca^{2+}$  nominal cero). Las fibras aisladas fueron registradas en una sala a temperatura ambiente (25 °C), y fueron incubadas en medio KR con la sonda Fura-2-AM (5 $\mu$ M) para luego ser lavadas y sumergidas en el medio correspondiente, ya sea KR o KR  $Mn^{2+}$ , en este caso. Por último, se añade BTS (20 $\mu$ m) 30 minutos previo a los registros para atenuar posible artefacto de movimiento asociado al movimiento por contracción de las fibras al estimularlas eléctricamente.

Las fibras fueron observadas usando un objetivo de 40x y se realizaron los registros de la fluorescencia y cambios de la misma, mediante series de imágenes adquiridas desde un microscopio confocal (Carl Zeiss Axiovert 135 M, LSM Microsystems) mientras eran estimuladas con un electro estimador GRASS S48 (Axon instruments), siguiendo el protocolo de estimulación de 270 pulsos con una duración de 0.3 ms aplicados a una fibra usando dos electrodos con una distancia entre sí de ~1 mm, las imágenes obtenidas fueron procesadas usando el software Fiji (o ImageJ).

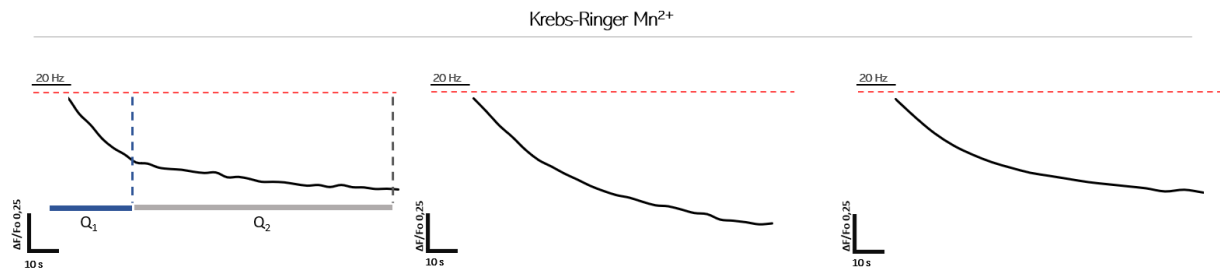
## Disminución de la fluorescencia en fibras musculares incubadas en un medio con $Mn^{2+}$ y el efecto de la frecuencia.



**Figura 2. Quenching de  $Mn^{2+}$  (A).** Registro de una fibra muscular aislada de FDB incubada en medio Krebs-Ringer tradicional (*arriba*) y Krebs-Ringer  $Mn^{2+}$  (*abajo*), cargadas con la sonda fluorescente Fura-2-AM ( $5\mu m$ ) estimulada eléctricamente a 20 Hz. Ambas fibras fueron además incubadas durante 30min con de  $20\mu M$  N-bencil-p-toluenosulfonamida (BTS) para inhibir la contracción de las fibras. La barra inferior, muestra distintos segmentos del registro: Gris: Pre-estímulo/(PRE<sub>EST</sub>), Punteado: Estímulo (EST), Negro: Post-estímulo (POST<sub>EST</sub>), líneas negras: Retorno al basal (RB). La línea roja punteada representa el promedio del registro basal (B) Registro de la señal posterior al estímulo. (C) Fluorescencia relativa de fibras incubadas en medio KR y en KR  $Mn^{2+}$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .  $n_{KR} = 15$ ,  $n_{KR Mn^{2+}} = 40$

Cada uno de los registros completos de cada una de las fibras, se divide en cuatro secciones: la primera, denominada pre-estímulo (PRE<sub>EST</sub>), la segunda, que representa el tiempo del estímulo en sí (EST) que en 1.a se señala con cuadro gris, la tercera, post-estímulo (POST<sub>EST</sub>), que va desde el final del estímulo hasta que la señal vuelve hasta su estado basal y la cuarta, es el retorno al basal que representa la señal desde que vuelve a la fluorescencia basal y desciende en el caso de 1.a. En la figura 1.a, se muestran el registro completo para una fibra en condición KR (*arriba*) y KR  $Mn^{2+}$  (*abajo*). En el caso de KR, se aprecia que, junto con el estímulo eléctrico aplicado a la fibra, hay aumento de la fluorescencia el cual desciende posterior al estímulo, para retornar a un estado basal, por otra parte, en el caso de KR  $Mn^{2+}$  se observa que posterior al estímulo eléctrico, hay una caída de la señal fluorescente por debajo del nivel basal. En conjunto con lo observado en 1.B, donde se aprecia únicamente la

señal  $POST_{Est}$  para ambos casos, KR muestra una señal que sigue una tendencia a mantener el nivel basal de fluorescencia posterior a la estimulación eléctrica, por otra parte, KR  $Mn^{2+}$  sin  $Ca^{2+}$ , tiene un comportamiento de caída de la fluorescencia relativa cercana al 60% por debajo del nivel basal. Finalmente, 1.C es una representación gráfica de la comparación entre la fluorescencia relativa ( $\Delta F/F_0$ , u.a.f) de KR frente a KR  $Mn^{2+}$ , y se aprecia que existe una diferencia significativa (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ) frente a la caída de la fluorescencia asociada a la estimulación eléctrica.



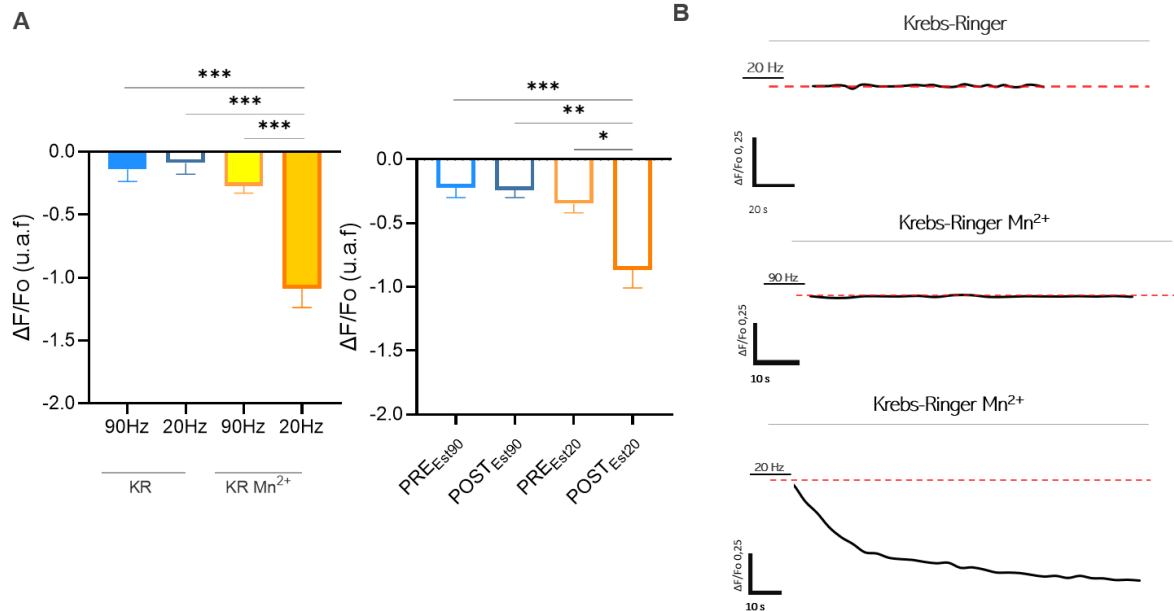
**Figura 2. Caída de la señal fluorescente.** Registros  $POST_{Est}$  de fibras de FDB incubadas en medio  $KRMn^{2+}$ . La línea punteada roja representa el nivel basal de la señal fluorescente, el final de la estimulación eléctrica está señalado como una línea negra en la parte superior del registro, acompañada como "20Hz", que es la frecuencia de estimulación aplicada a las fibras. lq: las líneas punteadas separan el registro en dos posibles segmentos de la caída de la señal.  $\tau$ : 50-115 s,  $t_{1/2}$ : 28-80 s

Se puede observar registros de la fluorescencia relativa en función del tiempo ( $\Delta F/F_0/t(s)$ ) (figura 2), se muestra el segmento  $POST_{Est}$ , donde la finalización del estímulo está representada como el final de la barra que marca la frecuencia en su parte superior, la cual viene acompañada de un decaimiento de la fluorescencia relativa. Durante el registro  $POST_{Est}$  de la fibra en KR  $Mn^{2+}$  se muestra una línea discontinuas y vertical que representa la distinción entre dos, aparentes, comportamientos de la caída de fluorescencia, la primera abarca una caída con una pendiente pronunciada que ocurre de manera inmediata luego del estímulo, cuya duración es de entre 15-30 segundos en la mayoría de las fibras observadas, seguidamente, se aprecia una segunda porción que representa una continuación de



la disminución de la fluorescencia, con una pendiente menor y una duración superior al minuto (los registros no tienen tiempo suficiente para determinar su duración). Esta caída no se observa a 90 Hz ni en al incubar las fibras en medio KR, como se muestra en la *figura 3*. Las curvas de decaimiento pueden ser ajustadas a una función exponencial con un  $\tau$  (tau) que va entre 50 -115 s y un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) que se mueve entre los rangos 38-80 s en las fibras KR  $Mn^{2+}$ . En el caso de las fibras incubadas en medio KR  $Mn^{2+}$  al apagamiento de la fluorescencia se produce entre un 40-80% por debajo del nivel basal; junto con esto, tiempos en los cuales se da el proceso, dan cuenta de un canal que presenta una apertura rápida que permite el paso del ion de manera dependiente de la estimulación eléctrica de baja frecuencia, la cual precede a una entrada de manera más lenta y prolongada, por lo que se sugiere que el canal, como se ha observado en otros estudios, se mantiene abierto por más de un minuto.

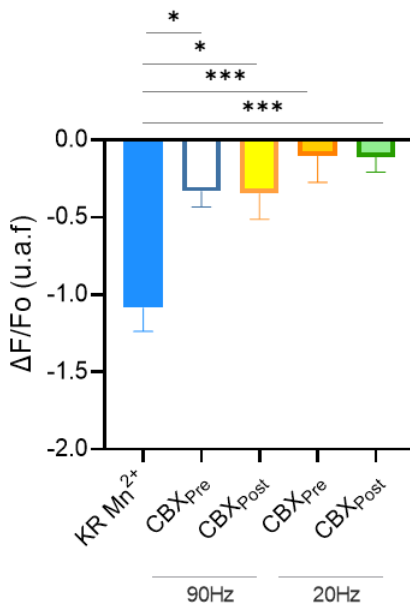
## Dependencia de la frecuencia de estimulación: Quenching de $Mn^{2+}$ ocurre a 20Hz.



**Figura 3. Dependencia de la frecuencia (A) der.** Fluorescencia relativa de fibras incubadas en medio KR y en KR  $Mn^{2+}$  y estimuladas a 90 y 20 Hz (\*\* $p < 0.0001$ ) KR: . *izq.* Fluorescencia relativa de fibras incubadas en medio KR  $Mn^{2+}$  previo al estímulo ( $PRE_{Est}$ ) y posterior a este (RB) (\*  $p 0.043$ , \*\*  $p 0.003$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). **(B)** Registro de la señal posterior al estímulo.  $n_{KR} = 15$ ,  $n_{KR Mn^{2+}} = 40$

Dentro de las fibras incubadas en medio KR  $Mn^{2+}$ , además, se hace distinción entre la frecuencia a la cual son estimuladas. Se representan a través de un gráfico de barras la porción de los registros de las fibras  $PRE_{Est}$  estimuladas tanto a 90 Hz como a 20 Hz y  $POST_{Est}$  bajo las mismas condiciones de estimulación, siendo estas comparadas a su vez, con fibras control (KR  $POST_{Est}$  20Hz). En 3.a se observa que entre los registros  $PRE_{Est}$  no hay diferencias significativas entre sí frente a las dos frecuencias de estimulación aplicada, al igual que entre estas con  $POST_{Est}$  a 90 Hz, sin embargo, se observa que las tres condiciones descritas guardan diferencia significativa con  $POST_{Est}$  (\*\* $p < 0.0001$ ) de las fibras en medio KR  $Mn^{2+}$  estimuladas a 20 Hz, lo que sugiere que los cambios fluorescencia, en este caso la disminución de la misma, ocurre de manera dependiente de la frecuencia de estimulación eléctrica.

En 3b, por otra parte, se ven los registros  $POST_{Est}$  para una fibra incubada en medio KR (arriba), una en KR  $Mn^{2+}$  estimulada a 90Hz (medio) y esta misma, pero estimulada 20Hz (abajo); los dos primeros registros presentan un comportamiento similar, manteniendo un nivel de la señal similar al basal (línea punteada), a diferencia de la fibra estimulada a bajas frecuencias (20Hz), en la cual se ve una clara disminución de la señal por apagamiento. A partir de los datos obtenidos, se sugiere que existe un apagamiento o disminución de la fluorescencia que se asocia a la entrada  $Mn^{2+}$  a la fibra muscular y su unión por afinidad a la sonda Fura-2-AM, lo cual actúa mediando el apagamiento de esta de manera dependiente a la frecuencia eléctrica de estimulación.

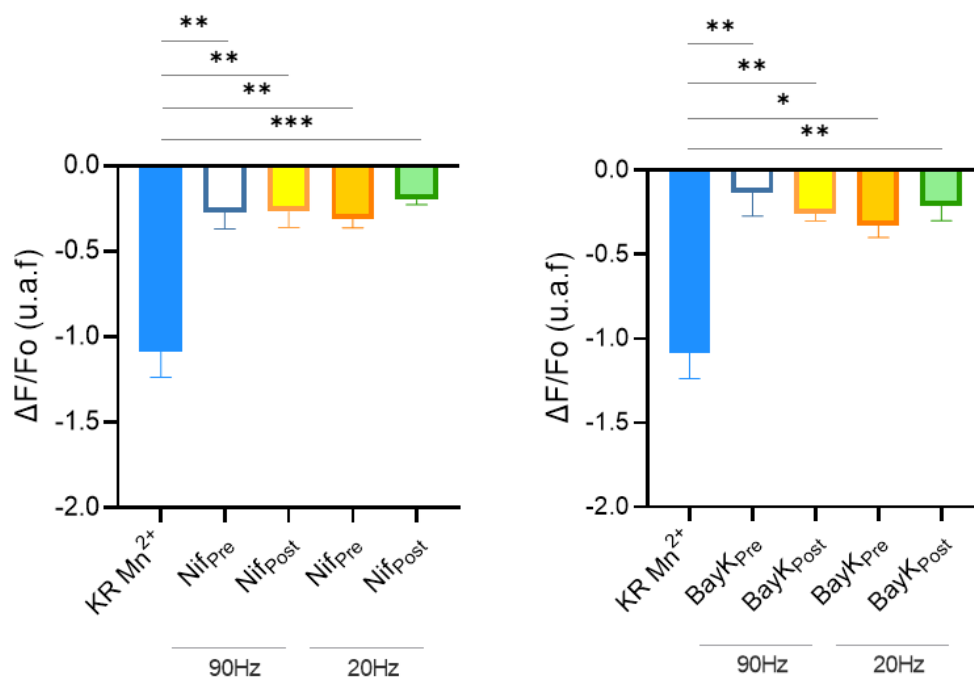


**Figura 4. Efectos del fármaco modulador de Panx-1, Carbenoxolona.** Fluorescencia relativa de fibras incubadas en medio KR  $Mn^{2+}$  y KR  $Mn^{2+}$  + CBX (CBX) estimuladas a 90 y 20 Hz (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).  $n_{KR Mn^{2+}}=40$ ,  $n_{CBX}= 16$ .

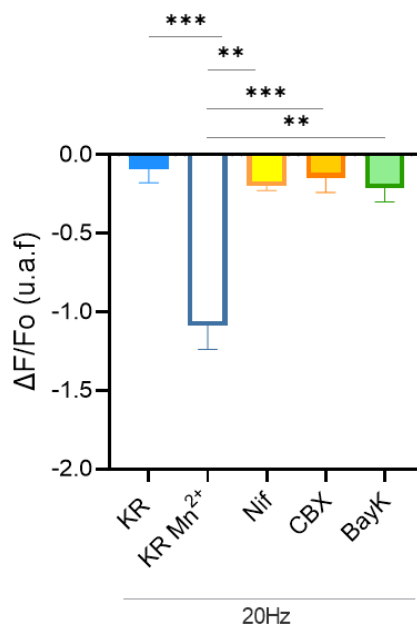
### Efecto de Carbenoxolona, inhibidor de Panx-1 en el quenching de $Mn^{2+}$

El inhibidor de Panx-1, carbenoxolona (CBX), se ha investigado que actúa sobre el primer *loop* extracelular, modulando la apertura del canal. En esta investigación se ha utilizado a manera de inhibir el canal para evaluar el apagamiento, para ello las fibras

fueron incubada previamente con la sonda que luego fue lavada y mantenida en un medio KR Mn<sup>2+</sup> con BTS y el inhibidor de Panx-1, CBX (5 μM), 30min previo a los registros. Al evaluar la fluorescencia relativa de las fibras bajo esta condición, tanto PRE<sub>Est</sub> como POST<sub>Est</sub> a 20 y 90Hz, se obtiene que no hay diferencias significativas entre sí, sin embargo, si se observa diferencia con las fibras en KR Mn<sup>2+</sup> (\*\*\*) p <0.0001). Frente a CBX es claro que la entrada de Mn<sup>2+</sup> y, por lo tanto, el quenching o apagamiento de la sonda, se ve afectado de manera negativa, por lo que se presume que el canal de Panx-1 estaría participando en la entrada de este catión. Dado que carbenoxolona restablece el nivel de la señal fluorescente a niveles similares a la condición sin Mn<sup>2+</sup> (KR), eliminando el efecto de la caída de fluorescencia dada por la entrada de Mn<sup>2+</sup>, se propone que estos resultados muestran evidencia de la participación de Panx-1 en este proceso.



**Figura 5. Efectos las Dihidropiridinas, Nifedipina y Bayk en el quenching de Mn<sup>2+</sup>.** Fluorescencia relativa de fibras incubadas en medio: *izquierda.* KR Mn<sup>2+</sup> y KR Mn<sup>2+</sup> + Nifedipina (Nif) estimuladas a 90 y 20 Hz Hz (\*\* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001). *derecha.* KR Mn<sup>2+</sup> y KR Mn<sup>2+</sup> + (-) S-Bay K 8644 (BayK) estimuladas a 90 y 20 Hz Hz (\* p < 0.05, \*\* p < 0.005). n<sub>KR Mn<sup>2+</sup></sub>=40 n<sub>BayK</sub>= 16, n<sub>Nif</sub>= 12



**Figura 6.** Quenching de los distintos grupos de estudio. Fluorescencia relativa del registro POST<sub>Est</sub> para cada uno de los grupos. KR Mn<sup>2+</sup> - KR (\*\*\*, p < 0.001); KR Mn<sup>2+</sup> - Nif (\*\* p < 0.005); KR Mn<sup>2+</sup> - CBX (\*\*\*, p < 0.001); KR Mn<sup>2+</sup> - BayK (\*\* p < 0.005).

### Efecto de fármacos moduladores de la actividad de Cav1.1 sobre el quenching de Mn<sup>2+</sup>

En ECCE se ha descrito que es necesaria tanto la presencia de RyR1 en el retículo sarcoplásmico, como de Cav1.1 en la membrana plasmática. Este último además está involucrado en procesos celulares en los cuales es capaz de discriminar entre las frecuencias de estimulación participando de manera diferencial uno u otro de estos procesos. Como Jorquera et al, 2013 describen, a bajas frecuencias Cav1.1, activa una vía involucrada en la transcripción génica y plasticidad muscular, la cual se da como resultado en conjunto de un macro complejo proteico el cual constituye junto con Panx-1 y otros elementos moleculares. La interacción funcional de Cav1.1 con Panx-1 según Jaque et al. 2021 ocurre a manera de regular la actividad de estas proteínas bidireccionalmente y es requerida en mecanismos como ETC. Tomando en cuenta estos antecedentes, en el presente estudio incluyó el uso de fármacos moduladores de la actividad de Cav1.1 con la finalidad de evaluar el efecto sobre la disminución o apagamiento de la fluorescencia descrito anteriormente en el cual parece participar de manera activa Panx-1.

Se llevó a cabo un proceso similar a los descritos anteriormente, pero en esta ocasión,

junto con BTS (20  $\mu\text{m}$ ), también se incubaron las fibras 30 min previo al registro con Nifedipina (25  $\mu\text{M}$ ), fármaco el cual actúa como antagonista del canal Cav1.1, bloqueándolo de manera funcional. En la *figura 5*, se ve un comportamiento similar a lo observado en el caso de CBX, la fluorescencia de las fibras incubadas previamente con el fármaco, no muestran diferencias significativas entre sí ya sea  $\text{PRE}_{\text{Est}}$  o  $\text{POST}_{\text{Est}}$  a 20 o 90Hz respecto a la población control para este caso (KR  $\text{Mn}^{2+}$ ). La *figura 5 (derecha)* por otra parte, muestra los resultados del uso de (-) S-Bay K 8644, una dihidropiridina que actúa como agonista de Cav1.1. Las fibras cargadas con Fura-2-AM fueron incubadas previo a los registros durante 20min con Bay K (10 $\mu\text{M}$ ). De manera similar a observado frente a las condiciones anteriores, la respuesta de la fluorescencia de las fibras frente a este fármaco, no presenta diferencias significativas respecto  $\text{PRE}_{\text{Est}}$  y  $\text{POST}_{\text{Est}}$  a 90Hz y 20Hz del control solo con  $\text{Mn}^{2+}$ . En conjunto es posible afirmar que el canal Cav1.1 y su interacción con Panx-1 es necesario para que ocurra ECCE.

## DISCUSIÓN

---

En el presente trabajo se evaluó el *quenching* o apagamiento de la señal fluorescente de Fura-2-AM al incubar fibras aisladas de músculo esquelético de ratón adulto en un medio con  $Mn^{2+}$ , sin  $Ca^{2+}$  añadido, de manera dependiente de la frecuencia eléctrica de estimulación. Interesantemente, la entrada de  $Mn^{2+}$  a través de la membrana plasmática, y el apagamiento de la señal disminuye de manera significativa en presencia de  $5\mu M$  de *Carbenoxolona*, inhibidor farmacológico del canal de alta conductancia, Panx-1. En correspondencia con los resultados obtenidos, se sugiere que dada la aplicación de estímulos eléctricos despolarizantes de baja frecuencia (20 Hz), se produce activación del canal Panx-1 en la membrana plasmática y, la consecuente salida de ATP a través de este canal, descrita en el mecanismo de acoplamiento excitación-transcripción, además, concuerda con las condiciones de estimulación a las cuales se ha observado ECCE diversos artículos referentes a esta vía.

La entrada de  $Ca^{2+}$  acoplada a excitación, ECCE, es un mecanismo propuesto por Cherednichenko et al. 2004, como una posible vía para la entrada de  $Ca^{2+}$  hacia el medio intracelular en fibras musculares, el cual a diferencia de SOCE, no depende del vaciamiento o depleción de este ion de los reservorios intracelulares y ocurre de manera independiente a la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L, característica de los canales sensibles a voltaje Cav1.1 en la membrana plasmática. Se ha observado que la entrada de  $Ca^{2+}$  en ECCE es parcialmente abolida en fibras tanto dispédicas como disgénicas, por lo que se sugiere que es un mecanismo que ocurre de manera

dependiente a la expresión e interacción funcional de un complejo que incluye tanto a Cav1.1 como a RyR1 en el retículo sarcoplásmico; aunque se sugiere que el paso del catión sería mediado por al menos una tercera proteína en la membrana capaz de interactuar con tanto con Cav1.1 y RyR, con capacidad de permear calcio hacia el interior de la célula, hasta la fecha se desconoce la identidad de esta.

El uso de las fibras musculares adultas como modelo experimental en este proyecto, se basa en características de estas células como aquello descrito por Jorquera et al. 2013, quienes determinaron mediante ensayos de ligadura de proximidad (PLA) que tanto como Cav1.1 como nuestro principal canal de interés, Panx-1, co-localizan en los túbulos T de estas células adultas y que la interacción entre ambas proteínas es intensidad de este marcado es más intenso a bajas frecuencias y además ocurre interacción entre estas al mismo nivel de intensidad de estímulo, lo que no ocurre a altas frecuencias (90Hz).

En esta investigación se ha observado que aplicando estímulos eléctricos despolarizante que siguen un protocolo de 270 pulsos de una duración de 0.3 ms y a una frecuencia de 20 Hz, las fibras musculares responden contrayéndose, efecto que se observó al estimular repetidas veces una fibra (datos no mostrados), por lo que se presume que, al mantener la propiedad contráctil de la fibra frente a los estímulos, los reservorios intracelulares de  $Ca^{2+}$  mantienen niveles de concentración adecuados para que la fibra responda y, el catión sea capaz de gatillar la interacción entre filamentos de actina y miosina para producir la contracción. Por otra parte, tanto en Cherednichenko et al. 2004 y Gach et al. 2008 se recurrió al implemento de herramientas farmacológicas para evaluar el posible rol de la vía SOCE en la entrada



de  $\text{Ca}^{2+}$  acoplada a excitación; se usó tanto tapsigargina como cafeína, para vaciar los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y seguidamente confirmar el vaciamiento del retículo sarcoplásmico, bajo estas condiciones de depleción severa se ha observado que en fibras incubadas con  $\text{Mn}^{2+}$  en el medio extracelular y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  añadido, se produce entrada del mismo, la cual se aprecia como un apagamiento en la señal fluorescente de Fura-2-AM.

Como la principal aproximación experimental que ha permitido caracterizar el fenómeno de ECCE, así como algunas de las propiedades mencionadas, está el *quenching* o apagamiento de  $\text{Mn}^{2+}$ , en la cual se recurre al uso de la sonda fluorescente *Fura-2-acetoximetil ester* (Fura-2-AM) que, es una molécula altamente lipofílica y pasa a través de la membrana, hacia el citoplasma donde es desesterificada por esterasas citosólicas, resultando como Fura-2, en su conformación fluorescente. El *quenching de  $\text{Mn}^{2+}$*  es una técnica de fluorescencia que se basa en las propiedades físicas del catión y del grado de afinidad a la sonda fluorescente Fura-2-AM, la cual es mayor que para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fura-2- $\text{Mn}^{2+}$   $3.4 \pm 0.18 \text{ nM}$ , Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$   $222.4 \pm 6.7 \text{ nM}$ ) según Hatae et al. 1996. El  $\text{Mn}^{2+}$  entra a la célula y se une por afinidad a la sonda fluorescente Fura-2, apagando o extinguiendo la señal emitida en una amplia gama de longitudes de onda de excitación. La señal es extinguida por  $\text{Mn}^{2+}$  en condiciones de excitación donde las propiedades fluorescentes de Fura-2 resultan independientes de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y esto, puede ser observado a una longitud de onda de emisión de 510nm. Aplicando esta técnica de fluorescencia acoplada a estimulación eléctrica despolarizante, se adquirieron registros de imágenes de las fibras aisladas a partir del microscopio confocal Carl Zeiss Axiovert 135 M, LSM Microsystems y del

microscopio Olympus XI 81 Spinning Disk, a partir de los cuales se analizaron datos de fluorescencia a lo largo de cada uno de los registros, de manera dependiente del tiempo y de la frecuencia de estimulación. En este estudio, la disminución de la fluorescencia fue observada de manera evidente en fibras incubadas en un medio Krebs-Ringer con  $Mn^{2+}$ , sin  $Ca^{2+}$  añadido, de manera significativa respecto a aquellas fibras incubadas en presencia de  $Ca^{2+}$  sin  $Mn^{2+}$ , con una caída de la señal fluorescente de al menos 40% desde la señal basal.

En los registros en los cuales las fibras son incubadas y mantenidas en un medio Ringer-Krebs con  $Mn^{2+}$ , al graficar la fluorescencia respecto del tiempo, mientras se estimula la fibra a baja frecuencia, se observa una caída de la señal fluorescente posterior al estímulo eléctrico, la cual ocurre de forma exponencial. Esta caída exponencial o disminución de la señal para efectos prácticos, puede ser analizada en base a dos segmentos que pueden ser ajustados a una recta. Se observa un primer segmento con una pendiente pronunciada que ocurre rápidamente posterior a la estimulación eléctrica y su duración es de aproximadamente 30 segundos; el segundo segmento se produce con una pendiente menos pronunciada y, tiene una duración que sobrepasa los 60 segundos. La caída de la señal, que resulta de al menos un 40% menos fluorescencia respecto a la señal basal registrada previo a la estimulación, independientemente de que presente dos segmentos bien definidos a lo largo de la caída, hace considerar la posibilidad de que el canal que permea  $Mn^{2+}$  bajo estas condiciones, se encuentra abierto durante algunos minutos permitiendo el paso del catión. La duración de apertura de la canal sugerida según lo observado es compatible con lo propuesto por Jorquera et al. 2013, donde posterior a una estimulación eléctrica

de baja frecuencia se produce la apertura del canal de Panx-1, que está acompañada por la generación de dos *peaks* de salida de ATP, que ocurren aun después de un par de minutos (el segundo *peak* ocurre entre los 3-5 min post-estimulación).

Cherednichenko et al. 2004 evalúa en un rango de distintas frecuencias de estimulación eléctrica la entrada de Ca<sup>2+</sup> acoplada a excitación; siendo esta mayor a 20 Hz, lo que en artículos previos del nuestro laboratorio y en el presente estudio, se considera como baja frecuencia. En concordancia con la literatura referente a ECCE y tomando en cuenta la frecuencia de estimulación (Cherednichenko et al., 2004; Hurnes et al. 2005; Gach et al., 2008), en esta investigación se observa que el quenching, como medida indirecta de la entrada de calcio a través de la membrana, apaga la señal fluorescente a bajas frecuencias (20 Hz) y no así a altas (90 Hz). Sugestivamente, esta dependencia de la frecuencia ha sido observada y descrita por Jorquera et al. 2013 y Jaque et al. 2021, los cuales destacan la propiedad de Panx-1, de estimularse de manera selectiva a bajas frecuencias (20 Hz), permitiendo la salida de ATP desde la célula hacia el medio extracelular al interactuar de manera recíproca con Cav1.1, participando en mecanismos asociados a la transcripción génica y plasticidad muscular. Estos antecedentes, en conjunto con los resultados obtenidos, permiten postular que a través de un canal Panx-1 de alta conductancia, ocurre el paso de Mn<sup>2+</sup> a través de la membrana de manera dependiente de la frecuencia en el fenómeno descrito como ECCE.

El bloqueador de la familia de hemicanales tipo panexina, Carbenoxolona (CBX), inhibe la actividad de Panx-1 a través de la modulación del primer *loop* extracelular, el

cual parece tener un rol fundamental en la maquinaria de apertura del canal (Michalski K. & Kawate, t., 2016). Usando este inhibidor a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , se ha observado que en aquellas fibras incubadas en medio Krebs-Ringer con  $\text{Mn}^{2+}$ , la caída de la señal por *quenching* de  $\text{Mn}^{2+}$  observada al estimular fibras incubada en medio sin el fármaco, es anulada casi en su totalidad. Posterior a la estimulación a 20 Hz, se aprecia que el nivel de la señal fluorescente no difiere significativamente del nivel de fluorescencia observado en la señal basal ( $\text{PRE}_{\text{Est}}$ ) como se observa en la figura 4, en comparación con aquellas fibras incubadas en medio Krebs-Ringer tradicional (datos no mostrados). Los resultados obtenidos, muestran una clara participación de Panx-1 en la entrada de  $\text{Mn}^{2+}$  y con ello en ECCE, ya que al evaluarlo como *quenching* o apagamiento de la señal; se observa diferencia significativa respecto a aquellas fibras sin CBX, y, no muestran diferencias significativas con la condición en la cual las fibras han sido incubadas únicamente en un medio Krebs-Ringer tradicional (KR), sin  $\text{Mn}^{2+}$ , como puede apreciarse en la *figura 6*.

Se ha descrito previamente que Panx-1 forma parte de un macro complejo proteico en el cual interactúa con Cav1.1 en el sarcolema de las fibras de músculo esquelético, según Jaque et al. 2021, este tipo de interacción ocurre de manera recíproca y afecta tanto el mecanismo de ETC en el ambas actúan, estimulado a bajas frecuencias, como en la contracción muscular (ECC). Tomando en consideración la importancia que tiene la interacción de estas proteínas y la cercanía que hay entre ellas en el músculo esquelético, estudiamos el cómo estaría afectado el *quenching* de  $\text{Mn}^{2+}$  al modular Cav1.1 mediante aproximaciones farmacológicas con dihidropiridinas. Para fines del presente estudio se utilizaron las dihidropiridinas nifedipina (25  $\mu\text{M}$ ) y (-) S-Bay K 8644 (BayK) (10 $\mu\text{M}$ ). En el caso de nifedipina, se sabe que actúa como un bloqueador del

Canal Cav1.1, en los experimentos de fluorescencia, se observó que además inhibió el quenching, lo que es posible evidenciar al analizar los registros posteriores a la estimulación, en los cuales no se observó diferencia significativa respecto de los niveles de fluorescencia basal, y al igual que CBX, tampoco con la condición KR. Por otra parte, es interesante evaluar el efecto de BayK, sobre las fibras; esta dihidropiridina actúa de acuerdo con la dosis, teniendo la capacidad de actuar como agonista o antagonista de manera dependiente de la concentración (Teiggle, D., 2003). Para efectos de este estudio se usó una concentración en la cual el fármaco se considera agonista (25  $\mu$ M) del canal Cav1.1, a diferencia de la mayoría de las dihidropiridinas, sin embargo, de manera paradójica, este agonista del canal de  $Ca^{2+}$  inhibe la salida de ATP desde Panx-1, frenando los cambios transcripcionales estimulados a 20 Hz, (Casas et al. 2014). En un medio en el cual las fibras son incubadas con KR  $Mn^{2+}$  y se añade BayK, se obtienen resultados similares en cuanto a los niveles de fluorescencia relativa  $POST_{Est}$  adquiridos al incubar con nifedipina, confirmando un efecto de ambas dihidropiridinas similar al descrito para la inhibición de la salida de ATP. Cabe destacar un comportamiento de BayK, previo al estímulo eléctrico que llama interesantemente la atención, ya que inicialmente hay un decaimiento basal de la fluorescencia sin estimulación eléctrica (datos no mostrados), lo que amerita mayores estudios con esta droga, con la finalidad de explicar dicha respuesta. En conjunto, es posible rescatar que ambas dihidropiridinas que modulan el canal de  $Ca^{2+}$  sensible a voltaje Cav1.1, anulan el quenching de  $Mn^{2+}$ . Este efecto es destacable, tomando en cuenta que en ECCE es necesaria la presencia de este canal y, con estos resultados se refuerza la idea de que la tercera proteína involucrada en el mecanismo de ECCE es Panx-1, ya que en que la interacción recíproca entre

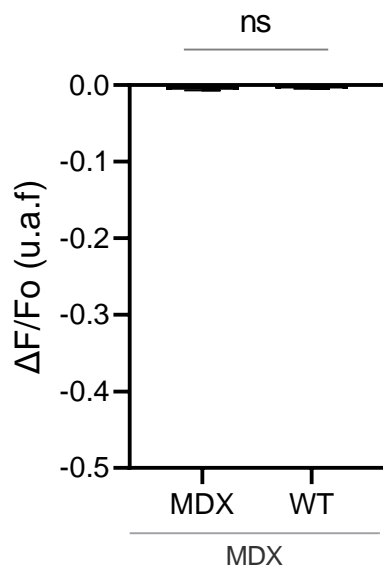
ambos canales, al afectar Cav1.1, se vería afectada también la entrada de  $Mn^{2+}$  a través de Panx-1. Aun teniendo estos antecedentes, el mecanismo por el cual interactúan y activan entre sí estas proteínas aún es algo que se desconoce.

La “comunicación” entre Panx-1 y Cav1.1 y, el control recíproco entre estas proteínas, según Valledares et al. 2013, es importante en algunas afecciones relacionadas con el músculo esquelético, lo cual se puede observar en el modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne (DMD, *Duchenne muscula dystrophy*), *mdx*, en el cual, existe desregulación de la liberación de ATP en condición de reposo, y además (Mareedu et al., 2021) se ha descrito un aumento importante del  $Ca^{2+}$  intracelular. En un experimento preliminar, evaluamos quenching de  $Mn^{2+}$ , en fibras musculares de ratones *mdx*, y se observa una caída basal de la señal, previo al estímulo eléctrico en medio KR  $Mn^{2+}$  (n= 5, datos no mostrados). Por otra parte, se evaluó la posibilidad de que el quenching se pudiera ver afectado por nifedipina, para ello se agregó Nif (25 $\mu$ m) a las fibras en medio KR  $Mn^{2+}$ , y se pudo observar como el quenching disminuía de manera significativa (\*\*\*)  $p < 0.001$ , *figura S.2*). Estos datos sirven a manera preliminar como un experimento para evaluar una posible vía que contribuye en la entrada de  $Ca^{2+}$  exacerbada presente en fibras distróficas de ratones modelo de DMD. En todo caso, la diferencia en el quenching basal no es significativa al comparar con fibras de ratones wild type (WT) (n=40) como se puede ver en la figura S.1. Esto puede estar relacionado con la diferencia entre los tamaños muestrales de ambos grupos, por lo que debería aumentar el número de datos de *mdx*, para tener una comparación más exacta entre las poblaciones.

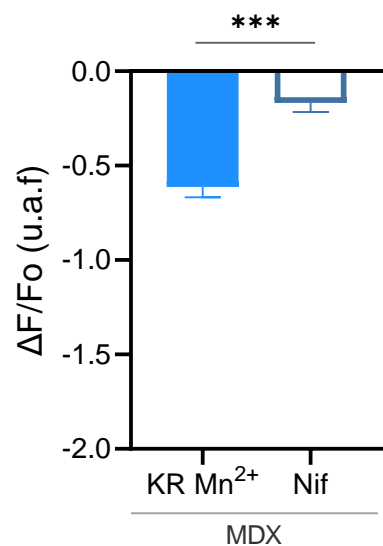
En resumen, hemos proporcionado evidencia de curso temporal, dependencia de frecuencia y farmacología que permite proponer que el fenómeno conocido como

ECCE en músculo esquelético ocurre a través del canal de Panx-1. Este estudio permitirá ahora el estudio mucho más detallado de las propiedades de este canal en músculo esquelético con una técnica sencilla y de fácil acceso, con posibilidad de encontrar las alteraciones de este sistema en diversas patologías musculares.

## ANEXO



**S.1 Figura suplementaria 1.** Quenching basal en ratones mdx, modelo de Distrofia muscular. Fluorescencia relativa del promedio de registros PRE<sub>Est</sub> para fibras de ratones mdx y WT incubados en medio KR Mn<sup>2+</sup>.  $n_{mdx}=5$   $n_{WT}=40$



**S. 2 Figura suplementaria 2.** Efecto de nifedipina sobre el quenching en ratones mdx. Fluorescencia relativa del promedio de registros POST<sub>Est</sub> para fibras de ratones mdx incubados en medio KR Mn<sup>2+</sup> y KR Mn<sup>2+</sup> + nifedipina (Nif). \*\*\* ( $p < 0.001$ )

$n_{mdx\ KR\ Mn^{2+}}=5$   $n_{mdx\ KR\ Mn^{2+} + nif}=40$



## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Arias-Calderón, M., Almarza, G., Díaz-Vegas, A., Contreras-Ferrat, A., Valladares, D., Casas, M., Toledo, H., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2016). Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 6, 15. Doi: 10.1186/s13395-016-0087-5
2. Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M. Kelmanson, I., et al. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83, 706–716. Doi: 10.1016/j.ygeno.2003.09.025
3. Berchtold, M. W., Brinkmeier, H., & Müntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological reviews*, 80(3), 1215–1265. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1215>
4. Bianchi, C. P., and A. M. Shanes. 1959. Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contracture. *J. Gen. Physiol.* 42:803–815.
5. Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13644–13649. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100>
6. Buvinic, S., Almarza, G., Bustamante, M., Casas, M., López, J., Riquelme, M., Sáez, J. C., Huidobro-Toro, J. P., & Jaimovich, E. (2009). ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 284(50), 34490–34505. Doi: 10.1074/jbc.M109.057315.

7. Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2014). The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophysical reviews*, 6(1), 133–160. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0135-x>
8. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E. ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exerc Sport Sci Rev*. 2014 Jul;42(3):110-6. doi: 10.1249/JES.000000000000017. PMID: 24949845.
9. Carrasco, Maria Angélica, Nora Riveros, Juan Ríos, Marioly Müller, Francisco Torres, Jorge Pineda, Soledad Lantadilla, and Enrique Jaimovich. 2003. “Depolarization-Induced Slow Calcium Transients Activate Early Genes in Skeletal Muscle Cells.” *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284 (6): C1438–47. doi:10.1152/ajpcell.00117.2002.}
10. Celetti, S. J., Cowan, K. N., Penuela, S., Shao, Q., Churko J., Laird, D. W.; Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. *J Cell Sci* 15 April 2010; 123 (8): 1363–1372. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.056093>.
11. Cherednichenko, G., Hurne, A. M., Fessenden, J. D., Lee, E. H., Gach, P. D., Beam, K. G., & Pessah, I. N. (2004). Conformational activation of Ca<sup>2+</sup> entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15793–15798. Doi: 10.1073/pnas.0403485101
12. Dahl G. (2015). ATP release through pannexon channels. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1672), 20140191. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191>
13. Dahl G. (2018). The Pannexin1 membrane channel: distinct conformations and functions. *FEBS letters*, 592(19), 3201–3209. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13115>

14. Deng, Z., He, Z., Maksaev, G., Bitter, R. M., Rau, M., Fitzpatrick, J., & Yuan, P. (2020). Cryo-EM structures of the ATP release channel pannexin 1. *Nature structural & molecular biology*, 27(4), 373–381. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0401-0>
15. Dirksen R. T. (2009). Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 587(Pt 13), 3139–3147. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172148>
16. DiFranco, M., Quinonez, M., Capote, J., & Vergara, J. (2009). DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (32), 1520. Doi: 10.3791/1520
17. Gach, M. P., Cherednichenko, G., Haarmann, C., Lopez, J. R., Beam, K. G., Pessah, I. N., Franzini-Armstrong, C. & Allen, P. D. (2008).  $\alpha 2\delta 1$  Dihydropyridine Receptor Subunit Is a Critical Element for Excitation-Coupled Calcium Entry but Not for Formation of Tetrads in Skeletal Myotubes. *Biophysical Journal*, 94(8), 3023-3034. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.118893>
18. Ginty D. D. (1997). Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial?. *Neuron*, 18(2), 183–186. Doi: 10.1016/s0896-6273(00)80258-5
19. Gomes da Costa, A., & Madeira, V. M. (1986). Magnesium and manganese ions modulate Ca<sup>2+</sup> uptake and its energetic coupling in sarcoplasmic reticulum. *Archives of biochemistry and biophysics*, 249(1), 199–206. Doi: 10.1016/0003-9861(86)90575-8
20. Hatae, J., Fujishiro, N., & Kawata, H. (1996). Spectroscopic Properties of Fluorescence Dye Fura-2 with Various Divalent Cations. *The Japanese Journal of Physiology*, 46(5), 423–429. doi:10.2170/jjphysiol.46.423

21. Hering, S., Zangerl-Plessl, E. M., Beyl, S., Hohaus, A., Andranovits, S., & Timin, E. N. (2018). Calcium channel gating. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 470(9), 1291–1309. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2163-7>
22. Jaimovich, E., Reyes, R., Liberona, J. L., & Powell, J. A. (2000). IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 278(5), C998–C1010. Doi: 10.1152/ajpcell.2000.278.5.C998
23. Jaque-Fernández, F., Jorquera, G., Troc-Gajardo, J., Pietri-Rouxel, F., Gentil, C., Buvinic, S., Allard, B., Jaimovich, E., Jacquemond, V., & Casas, M. (2021). Pannexin-1 and CaV1.1 show reciprocal interaction during excitation-contraction and excitation-transcription coupling in skeletal muscle. *The Journal of general physiology*, 153(12), e202012635. <https://doi.org/10.1085/jgp.202012635>
24. Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., & Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of cell science*, 126(Pt 5), 1189–1198. Doi: 10.1242/jcs.116855
25. Jin, Q., Zhang, B., Zheng, X. et al. Cryo-EM structures of human pannexin 1 channel. *Cell Res* 30, 449–451 (2020). doi: 10.1038/s41422-020-0310-0
26. Kwakye, G. F., Li, D., Kabobel, O. A., & Bowman, A. B. (2011). Cellular fura-2 manganese extraction assay (CFMEA). *Current protocols in toxicology*, Chapter 12, Unit12.18. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1218s48>
27. Michalski, K., & Kawate, T. (2016). Carbenoxolone inhibits Pannexin1 channels through interactions in the first extracellular loop. *The Journal of general physiology*, 147(2), 165–174. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511505>

28. Murgia, M., Serrano, A. L., Calabria, E., Pallafacchina, G., Lomo, T., & Schiaffino, S. (2000). Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nature cell biology*, 2(3), 142–147. Doi: 10.1038/35004013
29. Narici, M. V., Maffulli, N., and Maganaris, C. N. (2008). Ageing of human muscles and tendons. *Disabil. Rehabil.* 30, 1548–1554. Doi: 10.1080/09638280701831058
30. Pan, Z., Choi, S., & Luo, Y. (2018). Mn<sup>2+</sup> Quenching Assay for Store-Operated Calcium Entry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1843, 55–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8704-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8704-7_4)
31. Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., & Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology: CB*, 10(13), R473–R474. Doi: 10.1016/s0960-9822(00)00576-5
32. Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(1), 15–22. Doi: 10.1016/j.bbamem.2012.01.017
33. Penuela, S., Simek, J., & Thompson, R. J. (2014). Regulation of pannexin channels by post-translational modifications. *FEBS letters*, 588(8), 1411–1415. Doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.028
34. Serrano, A., Murgia, M., Pallafacchina, G., Calabria, E., Coniglio, P., Lømo, T., & Schiaffino, S. (2001). Calcineurin Controls Nerve Activity-Dependent Specification of Slow Skeletal Muscle Fibers but not Muscle Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13108-13113. Doi: 10.1073/pnas.231148598
35. Silverman, W., Locovei, S., & Dahl, G. (2008). Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *American journal of physiology. Cell physiology*, 295(3), C761–C767. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00227.2008>

36. Tate, C. A., Hyek, M. F., & Taffet, G. E. (1991). The Role of Calcium in the Energetics of Contracting Skeletal Muscle. *Sports Medicine*, 12(3), 208–217. doi:10.2165/00007256-199112030-00005
37. Triggle, D. J. (2003). The transition from agonist to antagonist activity: symmetry and other considerations. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 459-475. <https://doi.org/10.1016/b978-012744481-9/50032-5>
38. Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y. V., Baranova, A. V., Ivanov, D. V., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2006). Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *The Journal of cell biology*, 174(4), 535–546. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601115>
39. Whyte-Fagundes, P., & Zoidl, G. (2018). Mechanisms of pannexin1 channel gating and regulation. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1860(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.07.009>
40. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., & Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, 537(7619), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature19321>
41. Wu, J., Yan, N., & Yan, Z. (2017). Structure-Function Relationship of the Voltage-Gated Calcium Channel Cav1.1 Complex. *Advances in experimental medicine and biology*, 981, 23–39. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_2)
42. Zhang, Y. A., Tuft, R. A., Lifshitz, L. M., Fogarty, K. E., Singer, J. J., & Zou, H. (2007). Caffeine-activated large-conductance plasma membrane cation channels in cardiac myocytes: characteristics and significance. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(4), H2448–H2461. Doi: 1152/ajpheart.00032.2007
43. Zullo, A., Mancini, F., Schleip, R., Wearing, S., Yahia, L., & Klingler, W. (2017). Interplay between fascia, skeletal muscle, nerves, adipose tissue, inflammation,

and mechanical stress in musculo-fascial regeneration. JOURNAL OF GERONTOLOGY AND GERIATRICS, 65(4), 271-283.

44. Zullo, A., Fleckenstein, J., Schleip, R., Hoppe, K., Wearing, S., & Klingler, W. (2020). Structural and Functional Changes in the Coupling of Fascial Tissue, Skeletal Muscle, and Nerves During Aging. *Frontiers in physiology*, 11, 592. Doi: 10.3389/fphys.2020.00592