

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



**“Participación de Panexina-1 en la regulación del funcionamiento
de Cav1.1”.**

Francisco Ignacio Jaque Fernández

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dra. Mariana Casas

2016

Universidad de Chile
Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Francisco Ignacio Jaque Fernández

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Noviembre de 2016.

Prof. Dra. Mariana Casas Atala

Directora de Tesis

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Julia Guerrero Peralta.

Prof. Dr. Hector Contreras Muñoz.

Dra. Carla Basualto Alarcón

Prof. Dr. Marcelo Cano Cappellacci

Presidente Comisión

ÍNDICE

Título	Página
1 Abreviaturas.....	1
2 Abstract y Resumen.....	2
2.1 Resumen.....	2
2.2 Abstract.....	4
3 Introducción.....	6
3.1 Canal de Ca ⁺² tipo L dependiente de Voltaje (Cav1.1).....	6
3.2 Panexina 1 (Panx1).....	9
3.3 Cav1.1 y relaciones con otras proteínas.....	11
3.4 Relación Cav1.1 y Panx1.....	13
4 Hipótesis, Objetivo General y Objetivos Específicos.....	15
4.1 Hipótesis.....	15
4.2 Objetivo General.....	15
4.3 Objetivos Específicos.....	15
5 Materiales y Métodos.....	16
5.1 Grupos Experimentales.....	16
5.2 Análisis estadístico.....	17
5.3 Electroporación de músculo en vivo.....	18
5.4 Preparación de fibras musculares (músculos FDB).....	18
5.5 Electrofisiología: Medición de corrientes de Ca ⁺² tipo L.....	19
5.6 Electrofisiología: Medición del Movimientos de Carga.....	21
5.7 Métodos análisis de datos: Corriente de Ca ²⁺ tipo L y Movimiento de Carga.....	23
6 Consideraciones Bioéticas.....	26
7 Resultados Objetivos Específicos.....	27
7.1 Resultados Corrientes de Ca ²⁺ tipo L.....	27
7.1.1 Gráfico 1: Corrientes de Ca ²⁺ tipo L fibra única.....	27
7.1.2 Tabla 1: Promedios Corrientes de Ca ²⁺ tipo L.....	28
7.1.3 Gráfico 2: Curva I-V Corrientes de Ca ²⁺ tipo L.....	29
7.2 Resultados del Movimiento de Carga.....	30
7.2.1 Gráfico 3: Movimiento de Carga.....	30
7.2.2 Gráfico 4: Curva Q-V Movimiento de Carga.....	31
7.2.3 Tabla 2: Promedios Movimiento de carga.....	32

7.2.4	Gráfico 5: Distribución de Boltzman de 2 estados para el Movimiento de carga....	33
7.2.5	Tabla 3: Distribución de Boltzman de 2 estados para el Movimiento de carga.....	34
8	Discusión de Resultados.....	35
9	Conclusión.....	39
10	Anexo 1.....	41
10.1	RNA interferencia.....	41
10.2	Experimento Potencial Controlado (Voltage-Clamp).....	42
10.3	Medición de Movimiento de Carga y Corriente de Ca^{+2} tipo L.....	43
10.4	Ajuste de Boltzmann.....	45
11	Anexo 2.....	49
11.1	Imágenes Instrumental Electroporación.....	49
11.2	Imágenes Instrumental fabricación microelectrodos.....	50
11.3	Imágenes Equipo Electrofisiología.....	52
12	Bibliografía.....	54

1- Abreviaturas

Acoplamiento excitación-contracción = ECC

Acoplamiento excitación-transcripción = ETC

Canal de Ca^{+2} dependiente de voltaje tipo L (DHPR) = Cav1.1

Canal de Panexina 1 = Panx1

Receptor de Rianodina tipo 1 = RyR1

Ion Calcio +2 = Ca^{+2}

Retículo Sarcoplasmático = SR

RNA interferente para Panexina 1 = ShPanx1

RNA que codifica para proteína fluorescente roja = mCherry

Proximity Ligation Assay = PLA

2- RESUMEN Y ABSTRACT

2.1- Resumen

En el músculo esquelético, la función más estudiada del receptor de dihidropiridina o canal de calcio tipo L (Cav1.1), además de su función como canal de Ca^{+2} tipo L, ha sido el acoplamiento excitación-contracción (ECC). En los últimos años, se ha descrito una nueva función para el Cav1.1, relacionando su actividad al acoplamiento excitación-transcripción (ETC). En el ETC, el Cav1.1 es clave y participa regulando la activación del canal de Panexina 1 (Panx1), el cual permite la salida de ATP desde el interior hacia el exterior de la célula. En fibras musculares, nuestro grupo ha descrito que este proceso de liberación de ATP por parte de Panx1 puede activarse mediante un estímulo eléctrico. Aún más importante, este es un proceso dependiente de la frecuencia de estimulación eléctrica y que, en conjunto a otros intermediarios, genera señales de Ca^{+2} intracelulares regulando la expresión génica asociada a la plasticidad muscular. El control que ejerce el Cav1.1 sobre la actividad del Panx1 luego de estímulos eléctricos a frecuencias permisivas, demuestra una influencia unidireccional desde Cav1.1 hacia Panx1. Por otro lado, estas proteínas se encuentran a menos de 40 nm de distancia y co-inmunoprecipitan. A pesar de estos hallazgos, la estrecha regulación funcional entre Cav1.1 y Panx1 permanece poco explorada. Se ha descrito que el Cav1.1 en su rol en el ECC, ejerce una regulación unidireccional o anterógrada, en la cual, frente a la depolarización de la membrana plasmática sufre un cambio conformacional que activa al Receptor de Rianodina tipo 1 (RyR1) permitiendo la salida de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplasmático y la contracción muscular. Sin embargo, en las últimas décadas se ha mostrado que existe también una regulación retrógrada desde RyR1 hacia Cav1.1, en la cual el RyR1 puede influenciar las características biofísicas del Cav1.1, como ocurre en modelos de inhibición o ausencia de RyR1, donde se encuentran alteraciones en la corriente de Ca^{+2} tipo L y en el “movimiento de carga” del Cav1.1. En relación a estos antecedentes, nuestra hipótesis es que existe una regulación retrógrada de Panx1 hacia Cav1.1. En este trabajo, evaluamos la influencia de Panx1 en la función de Cav1.1. Para esto, desarrollamos un modelo de knockdown para Panx1, con la técnica del RNA interferente, mediante la electroporación de un plasmidio shPanx1 en el músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB). Medimos la corriente de Ca^{+2} tipo L y el movimiento de carga en condiciones de “potencial

de membrana controlado, en célula completa” (*Whole cell Voltage-Clamp*) en fibras musculares aisladas del FDB. Observamos una disminución significativa en la amplitud de la corriente de Ca^{+2} tipo L durante los pulsos de potencial a 0 mV ($p=0,023$) y 10 mV ($p=0,018$) en las células que expresaban el plasmidio shPanx1 versus el control. Para el movimiento de carga, observamos una diferencia significativa en el parámetro $V_{0.5}$, una de las variables de la distribución de Boltzmann para 2 estados, que representa el potencial de membrana al cual se desplaza la mitad de la carga máxima, mostrando una disminución de este valor en las fibras shPanx1 vs el control ($p=0,047$). De esta manera, podemos concluir que Panx1 cumple un rol en la regulación de la función de Cav1.1 por lo que la interacción funcional entre estas dos proteínas es bidireccional al igual que en el caso de Cav1.1 y RyR1. Esta interacción debe tenerse en cuenta en el desarrollo de futuros tratamientos farmacológicos que tengan como blanco a Panx1 y para condiciones patológicas donde la función de Cav1.1 se encuentre afectada, como la distrofia muscular, así como en aquellos procesos donde la adaptación muscular juega un rol vital, como son el envejecimiento y la diabetes.

2.2- Abstract

In skeletal muscle, the most studied function of dihydropyridine receptor or L-type calcium channel (Cav1.1), in addition to its function as L-type Ca^{+2} channel, has been the excitation-contraction coupling (ECC). In recent years it has been described a new role for Cav1.1, linking their activity to the excitation-transcription coupling (ETC). In ETC, Cav1.1 is a key participant regulating the Pannexin 1 (Panx1) activation. This channel allows the outflow of ATP in a process dependent on the frequency of electrical stimulation and different intermediaries, generates intracellular Ca^{+2} signals regulating gene expression associated with muscle plasticity. However, the close functional regulation between Cav1.1 and Panx1 remains little explored. In addition to this, for Cav1.1 in ECC, initially a unidirectional or anterograde regulation was described, in which Cav1.1 after cellular membrane depolarization undergoes a conformational change that activates ryanodine receptor type 1 (RyR1) allowing the Ca^{+2} release and muscle contraction. However, in recent decades a retrograde regulation from RyR1 to Cav1.1 has been described, evidenced as a change in the electrophysiology properties of Cav1.1 during blocking or absence of RyR1, with alterations in the L-type Ca^{+2} current and "Charge Movement", representatives of Cav1.1 function. Our hypothesis is that there is a retrograde regulation from Panx1 to Cav1.1. We evaluated the influence of Panx1 in Cav1.1 function. For this, we decreased the expression of Panx1 by electroporation of a shPanx1 plasmid, encoding an interference RNA against Panx1 in *Flexor Digitorum Brevis* (FDB). Then we measured the L-type Ca^{+2} current and the Charge Movement by the "whole cell control voltage" experiment (Voltage-Clamp) in isolated FDB muscle fibers.

We observed a significant decrease in L-type Ca^{+2} current amplitude during the command pulses at 0 mV ($p = 0.02297$) and 10 mV ($p = 0.01778$) in shPanx1 vs control (mCherry). In Charge Movement we showed a significant difference in $V_{0.5}$, a variable in two-state Boltzmann distribution, which represents the voltage at which there is a half maximum charge (Q_{max}) displacement, with a decrease in shPanx1 $V_{0.5}$ vs control ($p = 0.047$). We can conclude that Panx1 has a role in the function of Cav1.1, so they have a bidirectional-relationship, the same that occurs between Cav1.1 and RyR1.

This knowledge allows us to understand that by generating a physiological or pharmacological effect on Panx1 function, there is a possible influence in the Cav1.1 activity. This should be considered in future drugs therapies that are targeting Panx1 and pathological conditions where the Cav1.1 function is affected, such as muscular dystrophy, as well as those processes where muscular adaptation plays a vital role, aging and diabetes.

3- INTRODUCCIÓN

3.1- Cav1.1, Canal de Ca⁺² dependiente de voltaje tipo L o Receptor de Dihidropiridinas (DHPR):

En el músculo esquelético, la función fisiológica más estudiada del Canal de Ca⁺² dependiente de voltaje tipo L (Cav1.1), ha sido el acoplamiento excitación-contracción (ECC). A pesar que existen muchos canales de Ca⁺² dependientes de voltaje, este canal tiene características únicas que lo diferencian de los otros canales de Ca⁺². La isoforma Cav1.1 está presente principalmente en el túbulo T del músculo esquelético, así como el Cav1.2 en el músculo cardíaco y Cav1.4 en neuronas (Catterall, 2011). El cambio conformacional que sufre con los cambios del potencial de membrana es el responsable de la iniciación del acoplamiento excitación-contracción, al generar, por acoplamiento físico directo, la apertura del Receptor de Rianodina tipo 1 (RyR1) en la cisterna terminal del retículo sarcoplasmático (Paolini, 2004). La apertura del RyR1 permite la salida de Ca⁺² desde el retículo sarcoplasmático (SR) hacia el espacio intracelular donde se encuentran los sarcómeros, iniciando la contracción muscular (Ríos & Brum, 1987; Hernández-Ochoa, 2012; Bannister, 2013) (Fig. 1). Una diferencia importante con las otras isoformas, es que el Cav1.1, presenta cinéticas de apertura del poro del canal que son mucho más lentas que en las otras isoformas (Catterall, 2000) presentando corrientes macroscópicas de Ca⁺² luego de depolarizaciones mucho más largas (al menos 80 ms) que la duración normal de un potencial de acción, por lo que estas corrientes de Ca⁺² sólo se observan en condiciones experimentales. En este mismo sentido, el ECC esquelético es diferente del cardíaco pues en el caso del músculo esquelético, la interacción entre el Cav1.1 y el RyR1 es física, siendo el cambio conformacional del Cav1.1 producto de los cambios en el potencial de membrana el que es transmitido directamente al RyR1 provocando su apertura, con la consecuente liberación de Ca⁺² desde el SR (Paolini, 2004). En el músculo cardíaco, no existe una interacción física entre el Cav1.2 y el RyR1, siendo la entrada de Ca⁺² a través del canal, producto de la despolarización, lo que genera la apertura del RyR1.

A nivel estructural, Cav1.1 es un complejo proteico compuesto por 4 subunidades: $\alpha 1S$, $\alpha 2$ - δ , $\beta 1a$ y $\gamma 1$ (Bannister, 2013). Todas presentan dominios intramembrana incluyendo los múltiples dominios de $\alpha 1S$ que es la responsable de la formación del poro de permeabilidad

y la sensibilidad al cambio de potencial de membrana (Bannister, 2013). La subunidad $\alpha 1S$ está organizada en 4 dominios homólogos (I-IV), con 6 segmentos transmembrana cada uno, S1 a S6. El segmento S4 tiene 4 a 5 residuos de aminoácidos cargados positivamente que le confieren la propiedad de sensor de potencial (Bannister, 2013). Estos aminoácidos se mueven frente a cambios en el campo eléctrico (producidos por cambios en el potencial de membrana) induciendo el cambio conformacional en Cav1.1 necesario para activar sus funciones. Este movimiento de residuos cargados (lisinas y argininas), generan una corriente no lineal y capacitiva que puede ser medida y recibe el nombre de “Movimiento de Carga” (Schneider, 1973). Si bien todas las proteínas transmembrana con residuos cargados pueden generar un movimiento de carga medible, como canales de Na^+ o K^+ dependientes de voltaje, debido a la mayor presencia del Cav1.1., es ampliamente aceptado que es el mayor contribuidor a la generación del movimiento de carga inducido por la depolarización de la membrana de la fibra muscular (Adams, 1990).

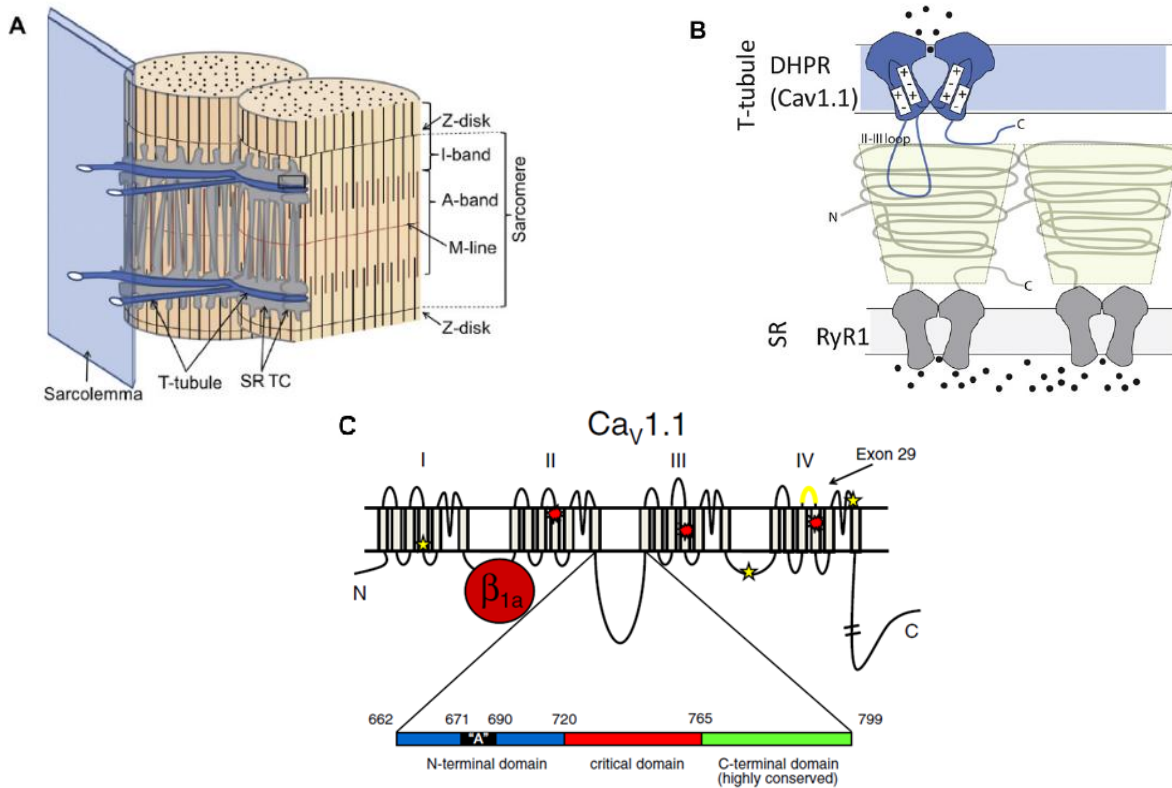


Fig. 1: Organización celular y molecular de los componentes del ECC en fibra de músculo esquelético. (Hernández-Ochoa, 2012; Bannister, 2013) (A) Ilustración de un segmento de fibra muscular esquelética en mamífero que muestra el sarcolemma, los túbulos transversos y su relación con la cisterna terminal del retículo sarcoplasmático. (B) Localización y función del Cav1.1 en el túbulo T de la membrana celular y su relación con el canal de Ca^{+2} , RyR1 en el retículo sarcoplasmático. (C) Esquema de las subunidades y dominios del Cav1.1 y su distribución en el túbulo T de la membrana celular.

Sin embargo, en los últimos años se ha descrito una nueva función para el Cav1.1 en este tejido, que relaciona su actividad como sensor de cambios en el potencial de membrana con cambios transcripcionales en las células musculares y le adjudica una nueva función como sensor de frecuencia, en el proceso conocido como acoplamiento excitación-transcripción (ETC). El ETC, al igual que el ECC, tiene como protagonista al Cav1.1, el cual participa activando una serie de vías de transducción de señales que resultan en cambios en la expresión génica y que son dependientes de la frecuencia de estimulación. En fibras musculares adultas estos cambios transcripcionales se han asociado con la plasticidad de las fibras musculares. En particular, una de las vías estudiadas, activada a bajas frecuencias de estimulación (menos de 50 Hz), depende de la activación de la salida de ATP y la producción de inositol trisfosfato (IP3) y se asocia con cambios de fenotipo de fibra rápida a lenta (Casas,

2010). Esta vía es dependiente de la frecuencia de estimulación eléctrica con una dependencia en forma de campana que alcanza un máximo entre 10 y 20 Hz (Casas, 2010). Se ha descrito de igual modo que el canal Panexina 1 (Panx1), participa en el ETC en miotubos (Buvinic, 2009) y en fibras musculares adultas (Jorquera, 2013).

3.2- Panexina 1 (Panx1)

Panx1 es una glicoproteína integral de membrana que pertenece a una familia de 3 genes en vertebrados (Panx1, Panx2 y Panx3). Ha sido propuesta como el homólogo de las proteínas formadoras de gap junction en invertebrados, inexas y además presenta una topología similar a la familia de las conexinas (Penuela, 2013). Las conexinas y panexinas presentan una estructura proteica similar consistente en 4 dominios transmembrana α -helice, 2 loops extracelulares y 1 loop intracelular con su segmento amino y carboxilo terminal expuestos al citoplasma. Para formar un canal funcional se requieren 6 subunidades. El canal presenta una conductancia elevada (550pS) que permite el paso de moléculas relativamente grandes como ATP y derivados del ácido araquidónico (Penuela, 2013) (Fig. 2).

Panx1 juega un rol en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluidos la propagación de las ondas de Ca^{+2} entre las células, la activación del inflammasoma y el reclutamiento de macrófagos para células apoptóticas (Penuela, 2013). De esta manera, si la apertura de Panx1 es esencial para asegurar estas funciones, la desregulación de su actividad podría llevar a una apertura descontrolada y causar muerte celular, por lo que la comprensión de los mecanismos de regulación de Panx1 es esencial. El espectro de expresión de Panx1 ha sido confirmado en distintos tejidos, presentando altos niveles en el músculo esquelético (Penuela, 2013; Bond, 2014). Panx2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y Panx3 se encuentra en bajos niveles de expresión en todos los tejidos incluyendo el músculo esquelético (Bond, 2014).

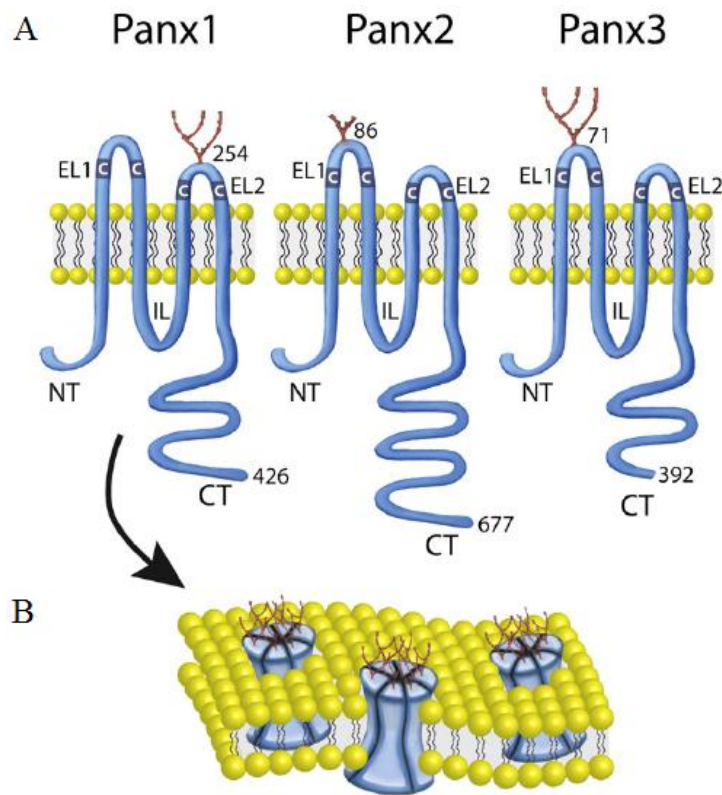


Fig. 2: Representación esquemática de los miembros de la familia de Panexinas y su localización en la membrana. (Penuela, 2013) (A) Panx1, Panx2 y Panx3 presentan distintos largos de cadena de aminoácidos (426, 677 y 392 respectivamente), son todas proteínas tetra-integrales de membrana con sitios de N-glicosilación en el aminoácido 254 (Panx1), 86 (Panx2) y 71 (Panx3). (B) Panexina oligomeriza en un hexámero para formar canales de una sola membrana en la superficie celular de diferentes células de mamíferos.

Recientemente, en fibras musculares adultas, se ha demostrado que la frecuencia de estimulación eléctrica juega un papel crucial en la activación de la liberación de ATP a través de Panx1 vía la activación del Cav1.1. La liberación de ATP al espacio extracelular participa en el ETC a bajas frecuencias de estimulación (20 Hz) y la regulación de expresión de genes relacionados con cambios de fenotipo de fibra rápida a lenta (Jorquera, 2013).

3.3- Cav1.1 y relaciones con otras proteínas

La relación entre el Cav1.1 y el RyR1 ampliamente descrita, que regula la liberación de Ca^{+2} (ECC) desde el SR luego de cada despolarización de la membrana, es llamada también acoplamiento “ortógrado”, debido a la dirección río abajo de esta interacción, entendiéndose que son los cambios conformacionales de Cav1.1 en la membrana celular los que controlan la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplasmático a través de la activación del RyR1 (Beam, 2004). Por otro lado, se habla de un acoplamiento retrógrado cuando una proteína regulada de manera ortógrada, modula a su vez la actividad de la proteína que lo activa, es decir, actúa río arriba. Este tipo de acoplamiento doble, ortógrado y retrógrado, ha sido descrito entre el RyR1 y el Cav1.1 (Nakai, 1996; Bannister, 2009; Bannister, 2016). En un estudio realizado por Bannister y cols. (2009) se midieron las corrientes de Ca^{+2} tipo L en miotubos luego de una inhibición del RyR1 con rianodina a altas concentraciones. Observaron una disminución de $V_{0.5}$, que es voltaje al cual se obtiene la mitad de la corriente máxima (según el ajuste de Boltzmann para 2 estados). Observaron también, que las curvas de movimientos de carga versus potencial de membrana (Curvas Q-V), asociados a Cav1.1, se desplazan hacia potenciales más hiperpolarizados en presencia de rianodina. Por otro lado, en modelos celulares carentes de RyR1 (miotubos de ratones dispédicos) los efectos descritos sobre la corriente y el movimiento de carga, durante la aplicación de rianodina, desaparecen. Se demostró así la importancia de esta regulación retrógrada desde RyR1 hacia el canal Cav1.1, por lo que hoy se habla de una comunicación bidireccional (Andronache, 2009; Bannister, 2016).

Cav1.1 presenta una interacción con otras proteínas que se encuentran en la membrana celular, en particular caveolina 3 (Cav3). Las caveolinas son proteínas andamio de membrana (que conectan otras proteínas y participan en diversas vías de señalización), asociadas a colesterol que regulan diversas vías de señalización. La familia está compuesta por las caveolinas 1 y 2 que están en todos los tejidos no musculares, y Cav3 que solo está presente en músculo esquelético. Las mutaciones de ésta última son responsables de variados desórdenes musculares, siendo el más estudiado el que produce la distrofia muscular de cinturas (LGMD) (Cohen, 2004). Diversos estudios han observado una participación de Cav3 en la fusión mioblástica, un rol en la organización y miogénesis celular en músculo y

finalmente una presencia y función en la correcta organización del túbulo T. De manera importante para nuestro estudio, se observó en miotubos de ratón (cultivo primario de células musculares) que la ausencia de Cav3 produce una disminución de la corriente máxima a la mitad, por lo que la conductancia del Cav1.1 disminuye a la mitad, sugiriendo que Cav3 está involucrado en la regulación de la función de Cav1.1 (Couchoux, 2007). En otro estudio realizado por Weiss y cols. (2008) al utilizar un plasmidio obtenido de un modelo murino de LGMD, que se caracteriza por una disminución en la expresión de Cav3, generaron un ratón knockdown de Cav3 endógena y utilizaron sus fibras musculares adultas, extraídas desde el FDB. En estas células midieron corriente de Ca^{+2} tipo L, movimiento de carga y transitorios de Ca^{+2} . Observaron que la corriente de Ca^{+2} tipo L disminuyó significativamente, mientras que ni el movimiento de carga ni los transitorios de Ca^{+2} evocados por despolarizaciones crecientes presentaron diferencias significativas. Estos resultados los llevaron a concluir que la presencia de Cav3 no juega un rol en el ECC, pero si en la función canal del Cav1.1.

Adicionalmente, en los últimos años se le ha atribuido a la proteína Junctofilina 1 (JP1) un rol en la función del Cav1.1. Esta es una proteína altamente conservada de una familia con 4 isoformas (JP1, JP2, JP3 y JP4). Están involucradas en el anclaje del retículo sarcoplasmático a la membrana celular (túbulo T en músculo esquelético) y son expresadas de manera diferenciada en las células excitables. JP1 y JP2 son expresadas en músculo esquelético, JP2 es expresada de manera exclusiva en las células cardíacas y en el músculo liso. JP3 y JP4 son expresadas en neuronas. En el músculo esquelético JP1 aparece involucrada en la formación y estabilización correcta de las triadas, cuyo knock-out genera mortalidad neonatal y desorganización de la estructura de la membrana con limitada contracción muscular. Se ha observado una mutación de JP2 en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. En modelos animales, una disminución de los niveles de expresión de JP2 induce miocardiopatías dilatadas e hipertróficas. De este modo se ha demostrado que JP1 y JP2 juegan un rol importante en la formación del complejo de unión de membranas sarcoplasmática y reticular, necesaria para el ECC. En este contexto, Golini y cols. (2011) realizaron un estudio para evaluar la función de Cav1.1 en modelos de miotubos de células C2C12, knock-down para JPs. Se determinó por co-inmunoprecipitación que ambas JPs se encuentran asociadas a Cav1.1, así como también RyR1 y Cav3, formando parte de un complejo proteico que regularía la función de Cav1.1. Además, por inmunofluorescencia contra JPs se observó una

pérdida del patrón punteado normalmente observado para estas proteínas, con señales para Cav1.1 y RyR1 más difusas y menos organizadas que en los controles. Según sus datos, habría en estos knockdown de JP una disminución en la expresión de Cav1.1, mientras que la de RyR1 se mantuvo constante. Para corroborar estos datos y estudiar la influencia de JPs en la función de Cav1.1 se midieron corrientes de Ca^{+2} tipo L, movimiento de carga y transitorios de Ca^{+2} evocados por despolarizaciones crecientes, observando una disminución de la corriente de Ca^{+2} tipo L y del movimiento de carga. En los transitorios de Ca^{+2} no se observaron diferencias significativas. En conjunto, estos resultados se condicen con una disminución de Cav1.1 en la membrana celular, lo que llevó a los autores a concluir que la presencia de JPs facilita el acoplamiento de Cav1.1 con RyR1 en la maquinaria del ECC (Golini, 2011).

3.4- Relación Cav1.1 y Panx1

En el estudio realizado por Jorquera y cols. (2013) se probó también que la disminución o inhibición del Cav1.1 en fibras adultas, bloquea la liberación de ATP a través de Panx1. Experimentos en miotubos disgénicos mdg (carentes de la subunidad $\alpha 1s$ y, por lo tanto, carentes de Cav1.1 en la membrana) no presentan liberación de ATP inducido por estímulo eléctrico, a pesar de que estas células son excitables y presentan potenciales de acción luego de cada pulso de estimulación externa. En este artículo muestran que la salida de ATP frente a un estímulo eléctrico tiene forma de campana alcanzando un máximo a 20 Hz y demuestran además que el Cav1.1 participa activando Panx1 luego de una estimulación a 20 Hz (y no a 90 Hz). Esta activación puede verse como “río abajo”, en la señalización propuesta (Fig. 3). Para explicar esta relación funcional entre Cav1.1 y Panx1, Casas y cols. (2010) estudiaron una posible interacción física entre ambas proteínas, observando que Cav1.1 y Panx1 co-inmunoprecipitan y se encuentran a una distancia menor a 40 nm, sugiriendo que una interacción directa o al menos una cercanía de ambas proteínas, podría participar de la estrecha regulación encontrada entre ambas.

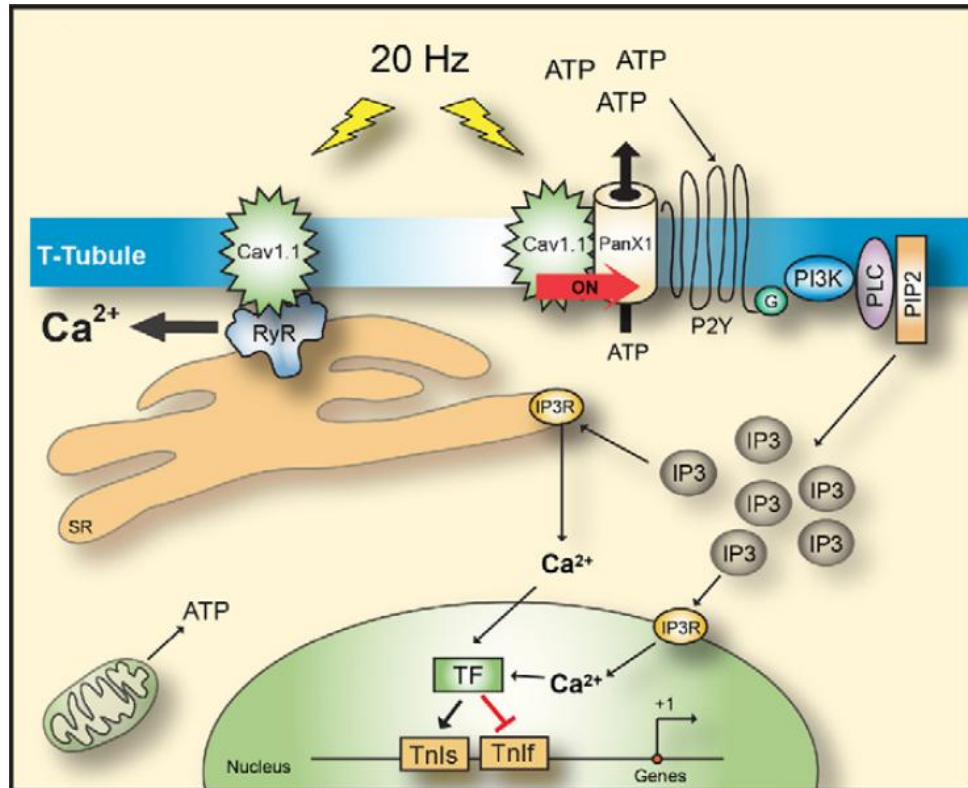


Fig. 3: Modelo de señalización para la regulación de expresión génica de fibras rápidas a lentas por estímulo eléctrico a 20 Hz. (Jorquera, 2013) Estimulación de fibras del flexor corto de los dedos (FDB) activa Cav1.1 con cada depolarización. Esta activación a su vez induce una liberación de Ca^{+2} rápida a través del RyR1 que causa la contracción de la fibra muscular. A 20 Hz existe una activación de otra función de Cav1.1 relacionada con la activación de Panx1 causando la liberación de ATP. Estos eventos gatillan una cascada de señales a través de los receptores P2Y, PI3K, PLC y la consecuente producción de IP3 que induce una señal de Ca^{+2} vía receptores de IP3 responsable de la activación de genes relacionados con la transición de fibras rápidas a lentas.

Se ha propuesto entonces que la activación de Cav1.1 y Panx1 juegan un papel fundamental como los pasos previos indispensables que permiten un cambio transcripcional a nivel de genes asociados a la plasticidad muscular (Jorquera, 2013).

Como se ha expuesto, existe evidencia de una posible interacción física directa entre Cav1.1 y Panx1, así como de una interacción funcional. Ambas participan en una vía de señalización con una regulación unidireccional desde Cav1.1 hacia Panx1 durante el ETC. Además, Cav1.1 tiene una regulación bidireccional con RyR1 que clásicamente fue descrita como unidireccional. Finalmente observamos que proteínas presentes en la membrana celular como Cav3 o las JPs son capaces de regular también la función de Cav1.1.

Con estos antecedentes nos planteamos la posibilidad de una regulación bidireccional entre Cav1.1 y Panx1.

4- Hipótesis, Objetivo general y objetivos específicos

4.1- Hipótesis

“La disminución de Panexina 1 en fibras musculares adultas desregula la función del Cav1.1”

4.2- Objetivo General

Evaluar los cambios en la función del Cav1.1 a raíz de una disminución de Panx1 en fibras musculares adultas.

4.3- Objetivos Específicos

- a. Determinar el efecto de la disminución en la expresión de Panx1 en fibras musculares adultas sobre la corriente de Ca^{+2} tipo L, a través de Cav1.1
- b. Determinar el efecto de la disminución en la expresión de Panx1 sobre los movimientos de carga en la membrana producidos por Cav1.1.

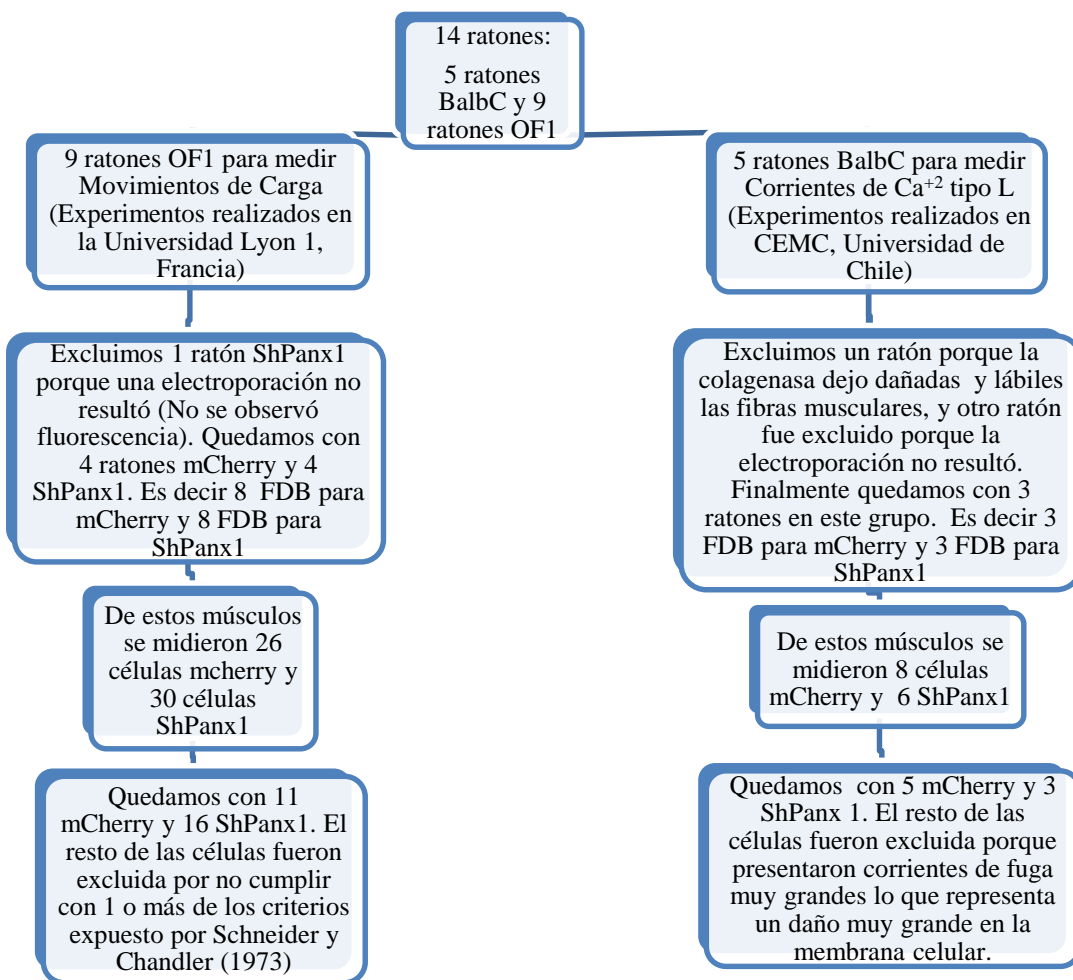
5- MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo a cargo del Dr. Enrique Jaimovich y de la Dra. Mariana Casas, que pertenece al Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC) en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los experimentos de movimiento de carga fueron realizados en el Laboratorio de Fisiología Integrativa Celular y Molecular dirigido por el Dr. Vincent Jacquemond, del Centro Nacional de la Investigación Científica (CNRS) en la Universidad de Lyon 1 (Lyon, Francia).

5.1- Grupos Experimentales

- 1) Para las mediciones de Corrientes de Ca^{2+} tipo L se utilizaron 5 ratones Balb-C machos de 6-7 semanas de edad, los cuales fueron electroporados con la proteína fluorescente roja mCherry en el FDB de la pata izquierda y el plasmidio codificante para el ShPax1 (knock-down de Pax1) en el FDB de la pata derecha. De este modo nuestros grupos experimentales para este experimento fueron divididos en los FDB de las patas izquierdas y derechas de los ratones.
- 2) Para la medición de Movimiento de Carga se utilizaron 9 ratones OF1 machos de 6-7 semanas de edad que fueron separados en 2 grupos, 4 ratones electroporados con mCherry y 5 ratones electroporados con ShPax1, ambos en los FDB de las patas traseras.

Fig. 4. Esquema de selección de datos para el análisis y posterior generación de resultados.



5.2- Análisis Estadísticos

Se usará el test de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos. Si los datos distribuyen normalmente, serán presentados como el promedio \pm error estándar (SEM) de un número de experimentos indicados como (n) o como resultados representativos de al menos 3 determinaciones independientes. Los datos serán sometidos a un análisis estadístico y las comparaciones entre los distintos grupos experimentales vs control se realizarán utilizando el test de *t-student* para muestras independientes.

5.3 Electroporación del músculo in vivo

Ratones BalbC y OF1 de 5-7 semanas fueron utilizados para este experimento.

Los ratones fueron anestesiados por gas isofluorano y sometidos al protocolo que se describe en DiFranco y cols. 2009. Los animales fueron inyectados con 10 μ L de Hialuronidasa 2 mg/mL en la planta de cada pata trasera para disgregar suavemente la matriz extracelular y permitir el correcto acceso de los plásmidos. Una hora después, los ratones fueron anestesiados nuevamente para luego inyectar en la planta de las patas traseras de los animales y de manera subdérmica, 20 μ g totales del plásmido disueltos en 10 μ L. Los plásmidos utilizados fueron los siguientes: mCherry en pata izquierda y shPanx1 en pata derecha en los ratones BalbC y los ratones OF1 fueron divididos en 2 grupos; mCherry en las patas traseras de un grupo y shPanx1 en las patas traseras del otro grupo. Posteriormente se dejó al animal en recuperación por 15 minutos. Finalmente se anestesió el ratón por última vez y se electroporó utilizando un electro-estimulador con 20 pulsos de corriente eléctrica a 110 V / cm, de 20 ms cada uno a 1 Hz de frecuencia. Una vez concluido el procedimiento se dejó al animal en observación por un período de 14 días en las mismas condiciones de dieta y ciclo luz /oscuridad de 12 horas. Tiempo después del cual se genera una disminución de Panexina 1, con datos funcionales y western blots observados en nuestro laboratorio para músculo esquelético (Anexo 1, Fig. 8 y 9).

5.4- Preparación de fibras musculares (músculos FDB)

Ratones BalbC de 7-9 semanas fueron usados para obtener los FDB para las mediciones de corrientes de Ca^{2+} tipo L. Ratones OF1 de 7-9 semanas fueron usados para obtener los FDB para las mediciones de Movimiento de carga. En ambos casos se extrajeron los músculos entre 14-21 días después de la electroporación para que el plasmidio genere la disminución de la expresión de ShPanx1 (DiFranco, 2009). Se identificó y diseccionó el músculo flexor corto de los dedos (FDB) de las patas traseras derecha e izquierda. En el caso de los ratones BalbC fue necesario separarlos y rotularlos cuidadosamente debido a que cada pata constituye un grupo diferente. A continuación, digerimos enzimáticamente la matriz extracelular de estos músculos con 400U/ml de colagenasa tipo 2 (Worthington Biochemicals Corp., Lakewood, NJ, USA) en medio de cultivo DMEM (baja glucosa) durante 90 min y los dejamos reposando durante la noche en DMEM suplementado con suero de caballo al 10%.

Al día siguiente, entre 10-12 hrs. después se realizó la disgregación mecánica en medio de cultivo DMEM suplementado con suero de caballo al 10% (Gibco). Las fibras se obtuvieron al pasar de forma sucesiva el músculo por pipetas Pasteur de diferentes diámetros para ser utilizadas inmediatamente en los experimentos de electrofisiología con una ventana temporal de 12 horas (DiFranco, 2009).

5.5- Voltage-clamp Célula Completa: medición de las Corrientes de Ca²⁺ tipo L

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de fisiología celular del músculo dirigido por el Dr. Enrique Jaimovich y la Dra. Mariana Casas, del Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Fueron hechos bajo la supervisión de la Dra. Mariana Casas y con la ayuda de la alumna de doctorado Jennifer Troc.

El equipo de electrofisiología estuvo compuesto por un microscopio confocal (Zeiss, Pascal 5), un amplificador Digidata 1322A (Axon Instrument, Austin, TX) en la configuración de la célula completa. Para la generación del pulso de comando y para la adquisición de datos se usó el software Clampex 9.2 llevado a un convertidor A/D, D/A (Axon Instruments, Austin, TX).

Las mediciones de las corrientes de Ca²⁺ fueron realizadas en fibras esqueléticas únicas aisladas desde el músculo FDB de ratón BalbC (Collet, 2004; Pouvreau, 2007). Se utilizó un ratón por día de medición debido a la necesidad de revisar y ajustar el equipo; También debido a la ventana temporal pequeña (12 hrs.) en que las fibras toleran el experimento (Pouvreau, 2007). Durante el ajuste del equipo hicimos los microelectrodos para cada medición con un estirador de pipetas. Se utilizaron capilares de boro silicato. El estirador aplica calor en un punto cerca de la mitad de los capilares mientras los extremos son jalados hasta el punto de ruptura. Fue necesario realizar una curva de calibración para obtener los valores de tensión, tiempo y calor adecuados para obtener las características deseadas de los electrodos. Se revisó que tuvieran una resistencia entre 2-5 MΩ que es un tamaño adecuado para la difusión de EGTA y para ingresar a la célula sin destruirla, como esta descrito en la literatura (Pouvreau, 2007; Hernández-Ochoa, 2012).

En esta técnica, la mayor parte de la fibra única fue aislada con silicona, de manera que el experimento de “Potencial controlado de célula completa” pudo ser realizado en una pequeña porción del extremo de la fibra.

Previo a esto el fondo de la placa fue recubierto con una delgada capa de silicona industrial (previamente probada que no genera daño ni muerte celular) de manera homogénea, luego de lo cual se depositaron las fibras musculares obtenidas por disgregación mecánica directamente en solución DMEM con suero de caballo al 10%. A continuación, se siliconaron entre 5-10 fibras por placa en un 80% de su extensión dejando una porción pequeña libre. Para esto se utilizó una microjeringa con una silicona industrial menos líquida que la usada en la base de la placa (también fue probada en las células) y se siliconaron las células en la placa a utilizar bajo microscopio. Se utilizaron entre 1-2 placas por cada músculo FDB, por lo que se midieron entre 3-4 placas por día de experimento (entre 1-2 placas por grupo experimental).

A continuación, preparamos el electrodo de tierra que debe contener la misma solución interna que los microelectrodos que ingresan a la célula.

Una vez siliconadas las fibras en una placa se debe cambiar la solución DMEM (10% FBS) por la solución externa utilizada para el experimento de medición de Corrientes de Ca^{2+} que esta descrita a continuación. El “Potencial controlado en célula completa” fue realizado con un microelectrodo lleno con solución interna que contiene (en mM): 140 Glutamato de potasio; 5 $\text{Na}_2\text{-ATP}$; 5 fosfocreatina de sodio; 5,5 MgCl_2 ; 5 D-glucosa; 20 EGTA, 5 HEPES, ajustando a pH 7.2 con KOH. La solución externa contiene (en mM) 140 tetraethylamoniometasulfonato (TEA); 2.5 CaCl_2 ; 2 MgCl_2 ; 0.002 tetrodotoxina (TTX); 1 4-aminopiridina (4-AP); 10 HEPES, ajustando a pH 7.2. El EGTA se utiliza en la solución interna como un quelador de Ca^{2+} para evitar que los niveles intracelulares de Ca^{2+} libre se eleven a puntos que generen contracción muscular. TEA y 4-AP son utilizados en la solución externa para el bloqueo de los canales de K^+ dependientes y no dependientes de voltaje. TTX es una toxina que bloquea de manera selectiva los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Pouvreau, 2007; Hernández-Ochoa, 2012).

Para cada experimento se usó un microelectrodo diferente cuya resistencia fue revisada cada vez al ingresar a la solución externa. A continuación, el microelectrodo ingresó a través de

la silicona, en la parte aislada de la fibra. Se realizó compensación análoga en el amplificador (se aumenta la corriente para la carga y se disminuye así la constante de tiempo) para disminuir el efecto de la resistencia en serie. Después de ingresar a la célula esperamos durante 20 minutos a que el EGTA difunda. Finalmente, la corriente de Ca^{2+} a través del Cav1.1 fue registrada con la célula controlada a un potencial basal de -80 mV. Partiendo de este potencial basal, se le aplicaron pulsos de comando de 500 milisegundos de duración desde -40 mV hasta +80 mV, con aumento escalado de amplitud de 10 mV, aplicados cada 30 segundos. Este protocolo se realizó 3 veces por fibra, con intervalos de 5 min. Cada pulso de comando fue precedido por un prepulso hiperpolarizante de -20 mV que para todos los voltajes es el mismo.

El componente lineal de fuga de la corriente fue eliminado con la substracción de un valor escalado de la medición de corriente generada por el prepulso, utilizando el protocolo P/1 (Leer descripción y ver figura 6 en Anexo 1). Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura ambiente de 20-22°C.

5.6- Voltage-Clamp Célula Completa: medición del Movimiento de Carga

Estos experimentos fueron aprendidos y realizados con la ayuda del Dr. Jacquemond en el laboratorio de fisiología integrativa, celular y molecular del músculo, CNRS, Universidad de Lyon 1. Realizado en el contexto de 2 pasantías de 1 mes, durante marzo y noviembre del año 2015.

El equipo de electrofisiología estuvo compuesto por un amplificador RK-400 (Bio-logic, Claix, France) usado en la configuración de célula completa. El pulso de comando y la adquisición de los datos fueron realizados usando el software WinWCP (donado por Dr. Dempster, Universidad de Strachclyde, Glasgow, Scotland) llevados a un convertidor A/D, D/A (National Instruments, Austin, TX).

Las mediciones del movimiento de carga fueron realizadas en fibras esqueléticas únicas aisladas desde el músculo FDB de ratón (Collet, 2004; Pouvreau, 2007). Fue necesario realizar una serie de experimentos previos en ratones sin electroporar para determinar las concentraciones de Ca^{2+} extracelular que nos permitieron realizar el experimento, buscando la menor concentración posible para evitar las corrientes de Ca^{2+} . Debido a que

concentraciones de 0,25 mM generaban corrientes evidentes, decidimos utilizar una concentración de 0,1 mM de Ca^{2+} , que tuvo la desventaja de ser muy dañino para la célula por lo que contábamos con una pequeña ventana temporal desde que la célula estaba en contacto con la solución externa (45-60 min), después de lo cual ya no era posible realizar el experimento.

La preparación de las fibras para la medición fue la misma que la expuesta en la sección anterior. Una vez siliconadas las células en una placa y debido al tiempo que toleran la solución externa, usamos una técnica creada y enseñada por el Dr. Jacquemond, que consistió en utilizar puntas de pipeta previamente recortadas, y generar microambientes en las células siliconadas. Se colocaban las puntas de manera que la circunferencia del extremo más grande de la punta recortada, envolviera a la célula siliconada dejándola de centro con un pequeño microambiente. De modo que al cambiar la solución DMEM con solución externa en una placa solo estuvo expuesta la célula en la que se estaba realizando el experimento sin esta cobertura. Mientras el resto permanecían cubiertas en el interior de las puntas recortadas con microambiente de DMEM (10% FBS). De esta manera fuimos liberando una célula cada hora para realizar el experimento. Esto permitió mantener las fibras en buen estado durante la duración del experimento.

Los experimentos en la modalidad “Potencial controlado en célula completa” fueron realizados con un microelectrodo con solución interna que contiene (en mM): 140 TEA-Meta; 5 Na₂-ATP; 5 fosfocreatina de sodio; 5,5 MgCl₂; 5 D-glucosa; 20 EGTA, 1 CaCl ajustando a pH 7,2.

La solución externa contiene (en mM): 140 tetraethylamoniometano sulfonato (TEA); 0,1 CaCl₂; 1 CdCl; 0,5 MnCl; 3 MgCl₂; 0,5 Ácido antraceno 9-carboxílico (9-AC) 0,002 tetrodotoxina (TTX); 1 4-aminopiridina (4-AP); ajustado a pH 7,2. El EGTA se utiliza en la solución interna como un quelador de Ca^{2+} tal como describimos antes. TEA y 4-AP son utilizados en la solución externa para el bloqueo de los canales de K^{+} . TTX fue usada para bloquear los canales de Na^{+} en músculo esquelético (Pouvreau S. 2007; Hernández-Ochoa 2012). Además, se utilizó 9-AC que nos permitió bloquear los canales de Cl^{-} , mientras que para bloquear las corrientes de Ca^{2+} se usó CdCl y para estabilizar la membrana MnCl.

Después de ingresar a la célula esperamos durante 15 minutos a que el EGTA difundiera al interior de la fibra. Finalmente, el movimiento de carga producido por los Cav1.1 en la membrana fue registrado con la célula controlada a un potencial basal de -100 mV. Partiendo de este potencial basal se le aplicaron pulsos de comando de 50 ms de duración desde -70 mV hasta +80 mV, con un aumento escalado de amplitud de 10 mV, aplicados cada 5 segundos. El pulso fue aplicado 3 veces a cada potencial. Cada pulso de comando es precedido por un prepulso de -20 mV que para todos los potenciales es el mismo.

El componente lineal de fuga de la corriente fue removido por la substracción de un valor escalado igual al descrito en la sección anterior. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura ambiente de 20-22°C.

Para normalizar los datos en ambos experimentos el prepulso hiperpolarizante de -20 mV nos permitió calcular la capacitancia de la célula a partir de la carga que puede almacenar como capacitor, y conociendo previamente el valor de capacitancia por 1cm² de membrana (descrito en la sección análisis de datos).

5.7- Métodos análisis de datos: Corriente de Ca²⁺ tipo L y Movimiento de Carga

Para el análisis de los datos usamos Origin Pro 7. Primero se cargaron los datos obtenidos (las corrientes medidas) desde el programa de adquisición de datos WinWCP en el programa de análisis de datos Origin Pro 7. Una vez cargados los datos, calculamos los promedios de las corrientes registradas a cada voltaje (3 repeticiones a cada voltaje), a continuación, llevamos a cero los valores de corriente durante el control del voltaje basal (Fig. 5A).

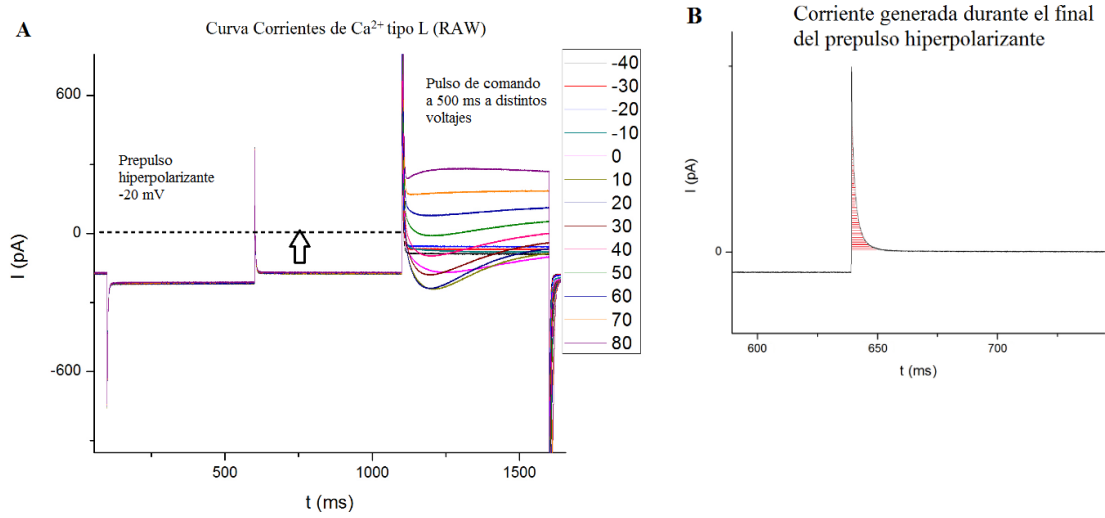


Fig. 5: Imágenes representativas de los análisis de los datos (exportada desde Origin 7 durante el análisis de datos). En A) observamos la representación de la sustracción de la corriente que debe aplicar el circuito para mantener el voltaje basal. En B) observamos la representación del cálculo de la carga desplazada durante el prepulsos hiperpolarizante (integral) para el posterior cálculo de la capacitancia de cada célula.

Luego realizamos la sustracción de corriente de fuga (Anexo 1, Fig. 6), que se observa como la diferencia de corriente que existe en la meseta durante el final del pulso de comando. Para esto utilizamos el valor máximo de corriente obtenido en el prepulsos (realizado en un potencial donde las corrientes capacitivas y no capacitivas tienen un comportamiento lineal). Esta corriente es generada por un pulso de -20 mV (que lleva el voltaje desde -80 mV a -100 mV en la medición de corriente de Ca²⁺ y desde -100 mV hasta -120 mV en movimiento de carga) y luego escalamos el valor en relación a los pulsos de comando del experimento. Es el valor escalado a cada voltaje el que se le sustrajo a la corriente total durante el tiempo de la aplicación del pulso. Después de esto, normalizamos las corrientes por la capacitancia que presenta el extremo libre de cada célula, para que puedan ser comparables entre las diferentes células. Este proceso también requiere de este prepulsos y del uso de la definición de capacitancia.

$$C = \frac{Q}{V}$$

Donde C es la capacitancia del condensador, medida en faradios (F), Q es la carga eléctrica almacenada, medida en coulomb (C) y V es la diferencia de potencial medida en Voltios (V).

Usando esta fórmula y considerando que el tamaño de la célula es directamente proporcional a la capacitancia (1cm^2 de membrana tiene $0,02\text{ pF}$), somos capaces de calcular la capacitancia, y por lo tanto indirectamente el tamaño de la membrana celular que genera corriente eléctrica (que no se encuentra aislado eléctricamente, fuera de la silicona).

Para obtener la Q debemos realizar la integral de la curva de corriente que se genera durante el prepulso (Fig. 5b). Luego el voltaje del prepulso es igual para todas las células (-20 mV).

En el caso de la corriente de Ca^{2+} una vez obtenemos la capacitancia debemos dividir la corriente máxima por la capacitancia, por lo que los datos que obtendremos para comparar las corrientes máximas serán medidos en pA/pF . Después realizamos una curva I-V para observar la dependencia de voltaje. Esta normalización por la capacitancia (por ende, por el área de la membrana) nos permite comparar las corrientes por área entre dos células, independizándonos de las variaciones en el tamaño de las células medidas.

En el caso del movimiento de carga, una vez obtenidas las curvas de corriente durante el pulso de comando (sin las corrientes de fuga), calculamos la integral del On y del Off (Ver Fig. 6 de Anexo 1) que representan las cargas desplazadas durante el inicio del pulso comando (On) y el final del pulso de comando (Off). Son estos valores los que dividimos por la capacitancia para obtener los datos en $\text{nC}/\mu\text{F}$.

Finalmente, realizamos una curva Q-V para observar la dependencia de la movilización de las cargas en función del potencial de la célula.

6- CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Los procedimientos y el manejo con los animales, agentes químicos y DNA recombinante se realizaron de acuerdo con el Libro de protocolos de Bioseguridad y bioética. Este proyecto se encuentra adjunto al Proyecto Fondecyt 1151293, titulado “Excitation-metabolism coupling in skeletal muscle; basic mechanism and their alteration in obesity and aging”, cuyo investigador responsable es el Dr. Enrique Jaimovich con la debida aprobación del Comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Fotografía adjunta al presente proyecto).

7- RESULTADOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7.1- Resultados Corrientes de Ca^{2+} tipo L

7.1.1- Gráfico 1: Corrientes de Ca^{2+} tipo L fibra única

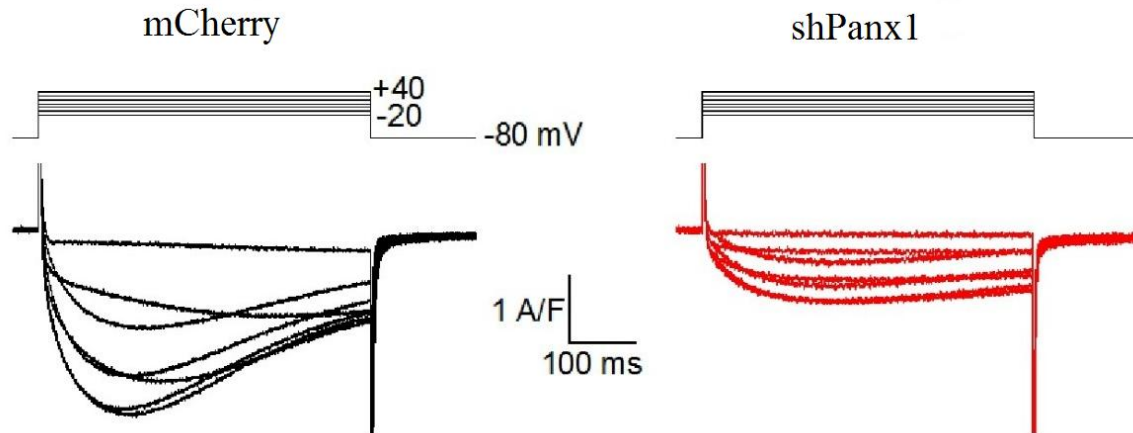


Gráfico 1: Corrientes de Ca^{2+} tipo L normalizadas frente a los pulsos de comando desde -20 mV hasta +40 mV en una fibra (representativa de cada grupo) electroporada con el plasmidio codificante para mCherry (izquierda) y shPanx1 (a la derecha). En la figura se muestran las corrientes de Ca^{2+} tipo L superpuestas en el tiempo (ms) generadas por los pulsos de comando para una célula del grupo mCherry (en negro) y las corrientes de Ca^{2+} tipo L para una célula del grupo shPanx1 (en rojo). En el centro de la figura se observa las unidades y escala para los gráficos (el eje Y en A/F y eje X en ms). En la fibra que expresa mCherry observamos que a medida que los pulsos de comando van a aumentando comienza a aparecer la corriente de Ca^{2+} tipo L que se vuelve máxima a los 10 mV, para luego comenzar a disminuir hasta que finalmente desaparece cerca de los 50 mV (potencial de reversión). Se puede observar que hay una disminución de esta corriente en la célula electroporada con shPanx1 vs mCherry (control).

En los experimentos de medición de la corriente de Ca^{2+} tipo L, observamos diferencias en el valor de la corriente máxima, al comparar 1 fibra representativa de cada grupo, mCherry vs shPanx1. En este ejemplo la corriente disminuye a menos de la mitad (gráfico 1).

7.1.2- Tabla 1: Promedio Corrientes de Ca²⁺ tipo L

Pulso de comando (mV)	Promedio corrientes Ca ²⁺ tipo L mCherry (A/F) ± SE (n=5)	Promedio corrientes Ca ²⁺ tipo L shPanx1 (A/F) ± SE (n=3)
-40	0,03 ± 0,02	0,09 ± 0,07
-30	0,02 ± 0,03	0,14 ± 0,12
-20	-0,10 ± 0,07	0,09 ± 0,10
-10	-0,82 ± 0,29	-0,14 ± 0,15
0	-2,58 ± 0,46	-0,59 ± 0,25*
10	-3,58 ± 0,51	-0,85 ± 0,50*
20	-3,39 ± 0,56	-0,68 ± 0,84
30	-2,63 ± 0,57	-0,41 ± 0,96
40	-1,57 ± 0,52	-0,04 ± 0,93
50	-0,31 ± 0,48	0,49 ± 0,85
60	0,61 ± 0,40	1,05 ± 0,83
70	1,56 ± 0,29	1,41 ± 0,67
80	2,59 ± 0,32	1,96 ± 0,71

Tabla 1: Promedio corrientes de Ca²⁺ tipo L mCherry vs shPanx1. En la tabla se describen las corrientes promedio ± error estándar (SE) de ambos grupos (mCherry = 5 y shPanx1 = 3) frente a los pulsos de comando a los diferentes potenciales de membrana. * Representa una diferencia estadísticamente significativa (p < 0,05).

En la Tabla 1 se muestra que existe una diferencia significativa en la corriente máxima entre ambos grupos a valores de potencial de membrana de 0 mV y 10 mV obtenida después del análisis estadístico usando el test t-student para muestras independientes. A 0 mV la corriente disminuye desde -2,58 A/F en mCherry (control) a -0,59 A/F en fibras knockdown para

Panx1 (shPanx1), mientras que a 10 mV disminuye de -3,58 A/F en mCherry a -0,85 A/F en shPanx1.

7.1.3- Gráfico 2: Curva I-V Corrientes de Ca²⁺ tipo L

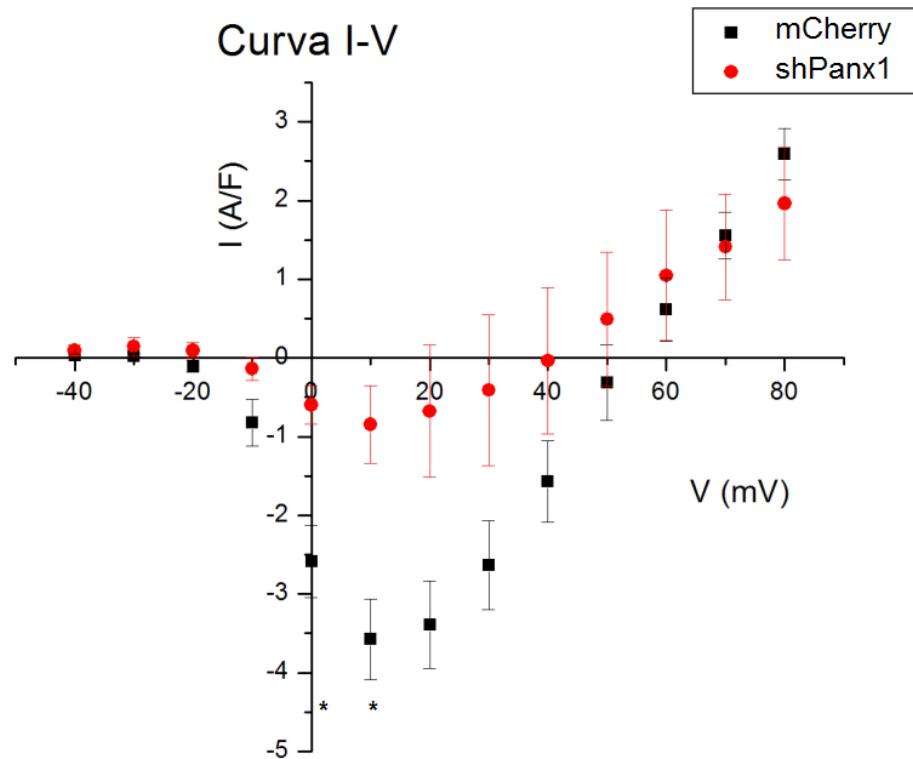


Gráfico 2: Curva I-V de los promedios de los peak de corrientes de Ca²⁺ tipo L normalizadas y graficadas a los potenciales respectivos desde -40 mV hasta +80 mV. Podemos observar que la corriente máxima en ambos grupos ocurre a los 10 mV y que el potencial de reversión ocurre alrededor de los 50 mV en ambos grupos. En el gráfico observamos los promedios \pm SE normalizados de las corrientes de Ca²⁺ tipo L generados por el protocolo de estimulación escalonado entre -40 y +80 mV. En negro se observa la curva para las células que expresan mCherry (control) y en rojo shPanx1. Se observa una disminución estadísticamente significativa de la corriente de Ca²⁺ tipo L en las fibras shPanx1 en relación al control a 0 mV con un $p = 0,02297$ y a 10 mV con un $p = 0,01778$ (t-student, 5 mCherry vs 3 ShPanx1).

En el gráfico 2 observamos la curva I-V utilizada para observar la variación de la corriente en función del potencial. Se muestra en la figura que existe una disminución estadísticamente significativa de la corriente máxima en los potenciales a los cuales se obtiene la máxima corriente (0 mV y 10 mV). Si bien se observa un desplazamiento a la izquierda en el grupo

de shPax1 en el potencial de reversión (punto en el que cruza el eje x), este no es significativo.

7.2- Resultados del Movimiento de Carga

7.2.1- Gráfico 3: Movimiento de Carga

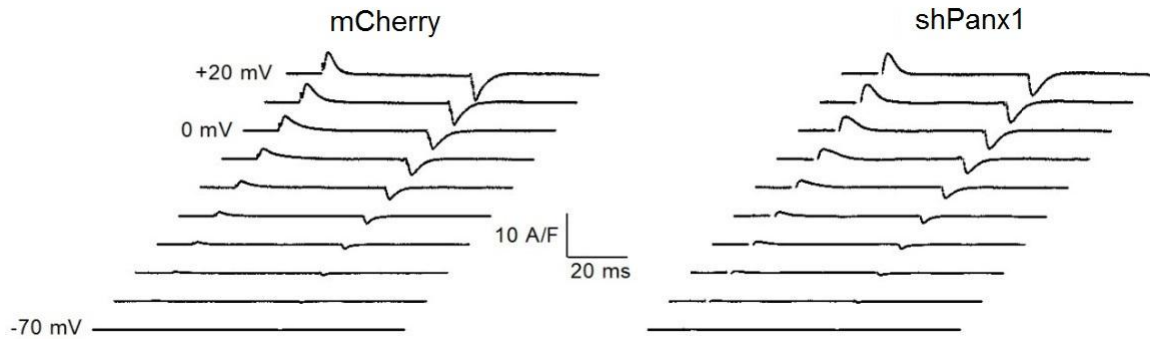


Gráfico 3: Movimiento de carga normalizado frente a los pulsos de comando ordenados de manera creciente desde -70 mV hasta +20 mV en una célula (representativa de cada grupo) para fibras que expresan mCherry y shPax1. En la figura se muestra el movimiento de carga (On y Off) en respuesta al protocolo de estimulación previamente descrito con un pulso de 50 ms escalado desde -70 hasta +20 mV para una célula representativa de ambos grupos. mCherry a la izquierda y shPax1 a la derecha. En el grupo que expresa mCherry (control) podemos observar que tanto On como Off comienzan a aumentar en la misma medida y proporcionalmente a medida que aumenta el pulso de comando hasta que se alcanza un máximo entre los 0 y 20 mV. No se observan diferencias entre ambas fibras (mCherry vs shPax1).

Para el objetivo específico 2, en el gráfico 3 se observa primero un ejemplo del movimiento de carga para una fibra representativa de cada grupo en el tiempo y a los diferentes valores de potencial de membrana. No se observaron diferencias significativas entre estas dos fibras, mCherry y shPax1.

7.2.2- Gráfico 4: Curva Q-V Movimiento de Carga

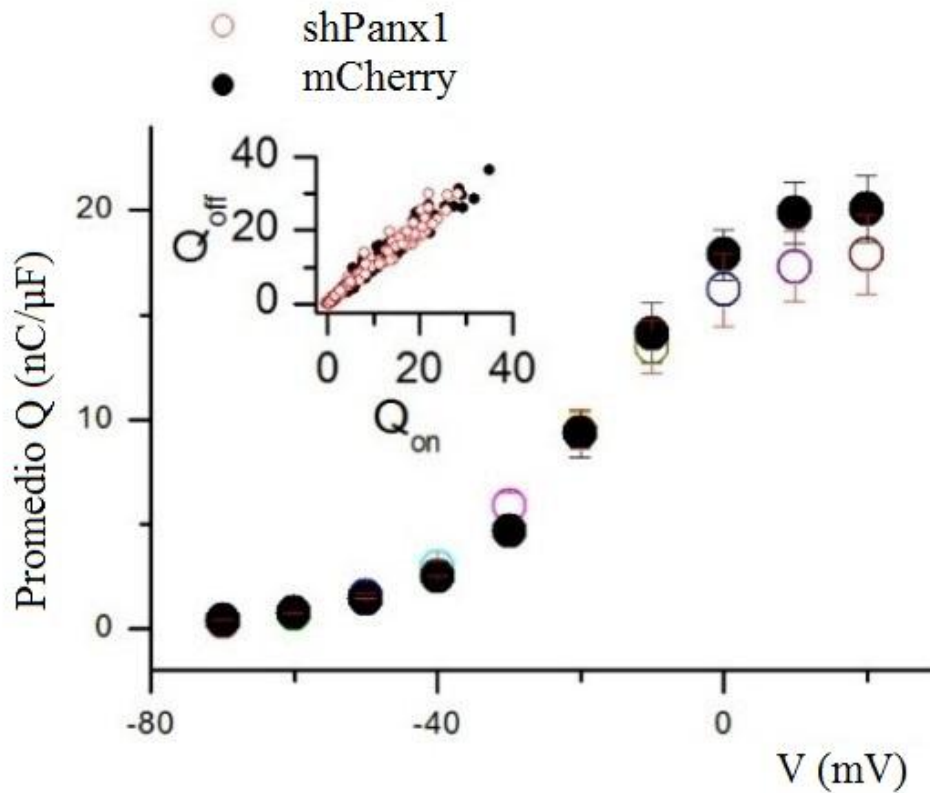


Gráfico 4: Curva Q-V de los promedios de los peak de Movimiento de carga normalizados y graficados a los voltajes respectivos desde -70 mV hasta +20 mV. En la figura en la esquina superior izquierda en pequeño se observa un gráfico de Q_{on} vs Q_{off} que representan el movimiento de carga medido durante las fases hiperpolarizantes y despolarizantes del pulso de comando. Se observa una buena correlación entre ambas siendo indicador de Movimiento de Carga correctamente filtrado. Además, observamos el promedio (\pm SE) de los movimientos de carga medidos (en grande) para cada célula (11 mCherry y 16 shPanx1). En estos resultados no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

En el gráfico 4 se muestra la curva Q-V que muestra las variaciones de los desplazamientos de las cargas con el potencial de membrana. A cada uno de los potenciales medidos no existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la cantidad de carga desplazada para ambos grupos.

7.2.3- Tabla 2: Tabla de promedios de Movimiento de Carga (Qon y Qoff)

Pulso de comando (Voltaje en mV)	Promedio Qon mCherry \pm SE (nC/uF)	Promedio Qoff mCherry \pm SE (nC/uF)	Promedio Qon shPanx1 \pm SE (nC/uF)	Promedio Qoff shPanx1 \pm SE (nC/uF)
-70	0,06 \pm 0,32	-0,01 \pm 0,28	0,24 \pm 0,06	-0,08 \pm 0,10
-60	0,06 \pm 0,34	-0,34 \pm 0,30	0,53 \pm 0,12	-0,50 \pm 0,11
-50	0,40 \pm 0,63	-1,37 \pm 0,34	1,27 \pm 0,23	-1,38 \pm 0,29
-40	1,68 \pm 0,93	-3,28 \pm 0,33	2,70 \pm 0,30	-3,07 \pm 0,35
-30	4,91 \pm 1,51	-7,64 \pm 0,86	5,33 \pm 0,50	-6,35 \pm 0,51
-20	9,53 \pm 1,80	-14,45 \pm 1,20	9,03 \pm 0,83	-11,57 \pm 0,81
-10	14,04 \pm 2,16	-18,32 \pm 1,65	12,59 \pm 1,37	-16,05 \pm 1,30
0	16,77 \pm 2,71	-24,24 \pm 1,63	15,00 \pm 1,73	-19,90 \pm 1,72
10	21,25 \pm 2,91	-28,92 \pm 3,01	17,37 \pm 1,98	-23,59 \pm 2,03
20	27,85 \pm 4,42	-32,95 \pm 3,81	21,46 \pm 2,45	-26,27 \pm 2,39

Tabla 2: Tabla de promedios de Movimiento de carga (Qon y Qoff) en mCherry y shPanx1 a cada voltaje.

En la tabla se muestran los valores promedio para Qon y Qoff para los grupos shPanx1 (n = 16) y mCherry (n = 11) No se observaron diferencias significativas entre los grupos a ninguno de los voltajes de los pulsos de comando.

En la tabla 2 se muestran los promedios del movimiento de carga para el principio del pulso de comando (Qon) y para el final del pulso de comando (Qoff). No existen diferencias al analizarlos por separado a cada uno de los potenciales aplicados durante los pulsos de comando.

7.2.4- Gráfico 5: Distribución de Boltzman de 2 estados para el Movimiento de carga

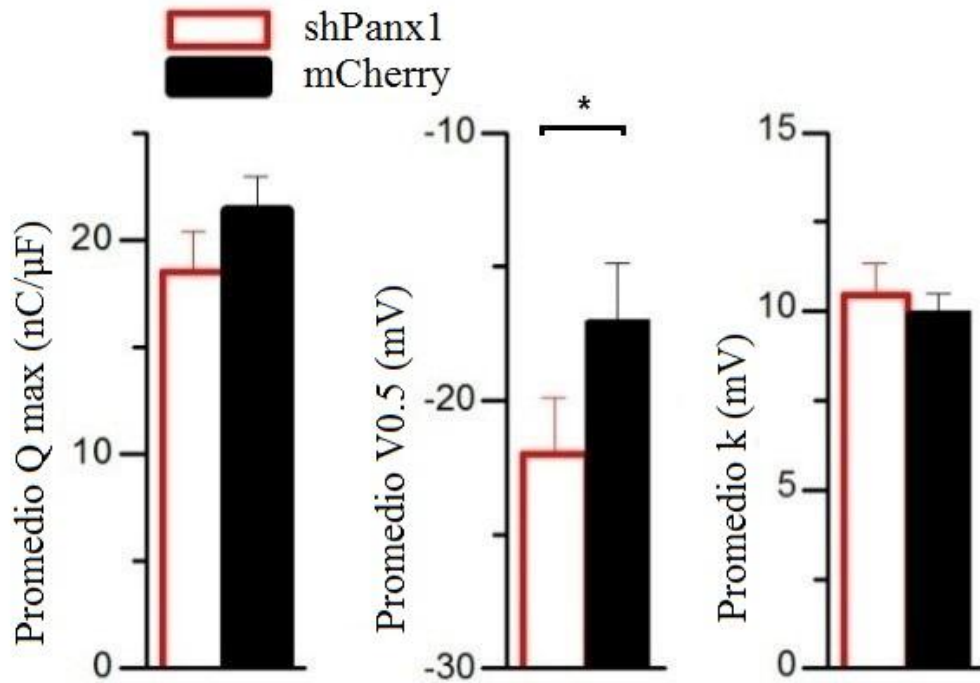


Gráfico 5: Gráfico de barra de los resultados de la Distribución de Boltzmann para 2 estados aplicado a los datos de Movimiento de carga. Se muestran los valores promedio \pm SE de los resultados del análisis según Boltzmann para un sistema con 2 estados posibles, abierto ($P_o = 1$) y cerrado ($P_o = 0$) que representan los estados abierto y cerrado del canal Cav1.1. Se utilizó la siguiente ecuación $Q(V) = Q_{max}/(1+\exp((V0.5-V)/k))$ que se ajusta a los datos de Movimiento de carga anteriormente mostrados (para más información ver Anexo 1). Donde Q_{max} es el flujo de carga máxima, $V0.5$ el voltaje al que se moviliza la mitad de la carga máxima y k representa la pendiente en el gráfico $Q-V$ anteriormente mostrado (Hernández-Ochoa, 2012). No se observan diferencias en Q_{max} y k que se obtienen de este análisis (Q_{max} ; $p=0,74$, $V0.5$; $p=0,04$ y k ; $p=0,78$). Si se observan diferencias significativas (*) en $V0.5$ (shPanx1=16 y mCherry=11). El grupo de shPanx1 presentó un menor voltaje para obtener la mitad de la carga máxima desplazada.

En el gráfico 5, se observan 3 gráficos de barra que representan las variables analizadas durante el ajuste de la curva $Q-V$ a una ecuación de Boltzmann para 2 estados, Q_{max} , $V0.5$ y k . Podemos observar que existe una diferencia significativa en el $V0.5$ entre ambos grupos, donde el grupo shPanx1 presenta una disminución en relación al control.

7.2.5- Tabla 3: Distribución de Boltzman de 2 estados para el Movimiento de carga

Grupo de estudio	Promedio Q máximo (nC/uF) ± SE	Promedio V05 (mV) ± SE	Promedio k (mV) ± SE
mCherry	21,4 ± 1,5	-22,0 ± 2,1*	9,9 ± 0,5
shPax1	19,5 ± 1,9	-17,0 ± 2,2*	10,5 ± 0,8
Significancia (t-student)	p = 0,74	p = 0,04*	p = 0,78

Tabla 3: Gráfico de barra de los resultados de la Distribución de Boltzmann para 2 estados aplicado a los datos de Movimiento de carga. En la tabla se muestran los valores promedio para cada una de las variables obtenidas con la distribución de Boltzmann para 2 estados y la significancia de la diferencia entre ambos grupos (shPax1=16 y mCherry=11). *Representa significancia estadística con $p < 0,05$.

Finalmente, en la tabla se observan los valores promedio para cada una de las variables del ajuste de Boltzman para 2 estados. Podemos observar que existe una disminución estadísticamente significativa desde -22,0 mV a -17,0 mV en V0.5 al comparar el grupo control (mCherry) con el grupo shPax1, respectivamente.

8- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos nos dan cuenta de la interacción que presenta Cav1.1 y Panx1. Esta interacción funcional, había sido descrita anteriormente por Jorquera y col. 2013, donde se mostraba que tanto agonistas como antagonistas de Cav1.1 bloquean la normal salida de ATP a través de Panx1 luego de estímulo eléctrico de las fibras, indicando que drogas que se unen a Cav1.1 y que alteran de alguna manera su función pueden tener un efecto sobre la actividad de Panx1 (Jorquera, 2013). En esta tesis mostramos una regulación en la dirección inversa, mostrando como una disminución de Panx1 (usando electroporación de un plasmidio que codifica para un RNA interferente contra Panx1) altera las corrientes de Ca^{+2} tipo L, generando una disminución significativa a 0 mV y 10 mV en el grupo ShPanx1 vs control, potenciales a los cuales se obtiene la máxima corriente (Gráfico 2 y tabla 1). Además, mostramos una diferencia significativa del parámetro V0.5 del ajuste de Boltzmann de la curva Q-V, que representa el potencial de membrana al cual se moviliza la mitad de la carga máxima (gráfico 5 y tabla 3). El grupo shPanx1 presenta menores valores de V0.5, lo que representa una sensibilización del Cav1.1 frente a los potenciales en condiciones de disminución de Panx1 en la membrana. Además, obtuvimos iguales valores de Qmax lo que nos permite inferir que la cantidad de Cav1.1 en la membrana en ambos grupos no cambia, lo que se condice con otros datos obtenidos en nuestro laboratorio, realizados con Western Blot, pero que no se muestran en esta tesis (Anexo 1, Figura 9).

Estos resultados son concordantes con una alteración en la función del Cav1.1, el cual parece presentar una cinética de apertura diferente, en ausencia de Panx1.

Podemos hacer un símil en relación al ECC, donde RyR1 es activado como respuesta a un cambio conformacional en Cav1.1, inducido por la despolarización del túbulo T como parte de una comunicación anterógrada. Además, Cav1.1 y RyR1, presentan también una comunicación retrógrada, donde la presencia del RyR1 y su correcto funcionamiento regula además la función del Cav1.1 evidenciado en un cambio en la corriente de Calcio tipo L que pasan a través del canal y en un cambio en los movimientos de carga (Bannister, 2009).

Del mismo modo en que se ha descrito que Cav1.1 puede activar Panx1 después de un estímulo de 20 Hz y activar así, vías de señalización río abajo durante el ETC, por lo que parece existir también una regulación retrograda de la función de Cav1.1 por Panx1.

Haciendo un paralelo entre el ECC y el ETC, podemos decir que en el primer caso el Cav1.1 y el RyR1 presentan una interacción física directa y una regulación bidireccional en el músculo esquelético, mientras que, en el ETC, Cav1.1 y Panx1 presentan una regulación también bidireccional, con la posibilidad de que sea una relación física directa. Esta última teoría será motivo de estudio en los próximos años.

Considerando lo anterior y los datos expuestos en esta tesis sería interesante evaluar en futuros estudios, el efecto de la disminución de Panx1 en la función del Cav1.1 desde otro punto de vista funcional utilizando las mediciones de los transitorios de Ca^{+2} , como se ha realizado por otros grupos en torno a otras proteínas que interactúan con Cav1.1. Este es el caso de Cav3, donde Couchoux y col. (2007) mostraron las repercusiones de la disminución de Cav3 en la función de Cav1.1 en la corriente de Ca^{+2} tipo L medida en miotubos, al igual que lo observado por nosotros en nuestro estudio en fibras musculares adultas (Couchoux, 2007). Luego de estos resultados Weiss y cols. (2008) realizaron un estudio para medir la corriente de Ca^{+2} tipo L, el movimiento de carga y los transitorios de Ca^{+2} en fibras musculares adultas electroporadas con un plasmidio que genera un modelo de knockdown para Cav3 endógeno, como se describe en la introducción de esta tesis. Además de los experimentos que realizaron en este trabajo, estos investigadores midieron los transitorios de Ca^{+2} para evaluar la participación de Cav3 en la función de Cav1.1, asociado a la contracción muscular (ECC). En sus resultados observaron al igual que Couchoux y col. (2007) que existe una disminución de la corriente de Ca^{+2} tipo L, sin embargo, no observaron diferencias en el movimiento de carga, ni en los transitorios de Ca^{+2} . Por lo que concluyeron que existe una alteración en la función de Cav1.1 en lo referente a la corriente de Ca^{+2} tipo L y que ésta podría jugar un rol en la alteración asociada a la patología neuromuscular, distrofia muscular de cinturas (LGMD) (Weiss, 2008).

De este modo, que exista una alteración en la corriente de Ca^{+2} , parece no ser predictor de que se observen alteraciones en el experimento de movimiento de carga, ni en la medición de los transitorios de Ca^{+2} . Por lo cual sería de mucho interés medir los transitorios de Ca^{+2} en nuestro modelo y verificar si en nuestro caso existe o no una alteración a este nivel.

Observado desde un punto de vista fisiológico en músculo esquelético, nuestros resultados sugieren que es posible entonces que cualquier proceso normal o patológico que presente una

regulación directa de la función o presencia de Panx1 en la membrana sarcoplasmática, genere una influencia en la función de Cav1.1. Del mismo modo, es necesario tener presente que actuales o futuros fármacos como carbenoxolona (inhibidor de Panx1) que regulen la función de Panx1 podrían regular del mismo modo y en alguna medida la función de Cav1.1, generando quizás una alteración a nivel de las vías de plasticidad muscular, expresión de genes y contracción muscular en músculo esquelético adulto, teorías que deberán ser evaluadas en futuros estudios.

Por otro lado, Panx1 presenta una presencia y participación de diversos procesos como la activación del inflammasoma, la propagación de las ondas de Ca^{+2} entre las células, y el reclutamiento de macrófagos para células apoptóticas, pero que no han sido descritos en profundidad en cuanto a su participación y los intermediarios. Estos procesos podrían tener eventualmente alguna influencia o regulación en la función de Cav1.1, en cuanto afectan la función de Panx1.

Por otro lado, es importante mencionar que en esta tesis logramos realizar la medición de movimiento de carga en fibras musculares adultas, un experimento que requiere una alta preparación, soluciones especiales, con muchos factores que controlar y un equipo de electrofisiología que calibrar hasta que funcione a la perfección. Esto, realizado en fibras musculares adultas complejiza aún más el experimento debido a que las soluciones que se deben utilizar presentan una toxicidad para las células. Existen pocos laboratorios en el mundo que realizan este experimento y fuimos capaces de lograrlo gracias a la guía y supervisión del experto en señales de Ca^{+2} en músculo esquelético y en electrofisiología en músculo esquelético adulto, Profesor Vincent Jacquemond. A pesar de esto este experimento presenta limitaciones, de las cuales hablaremos a continuación.

Teóricamente, el movimiento de carga es una representación del cambio de un estado cerrado ($P_o = 0$) del canal a un estado abierto ($P_o = 1$), y ocurre de manera paralela a la aparición de las corrientes, por lo cual es considerado un resultado que habla de la cinética de apertura del canal durante la activación y la generación de una corriente inducida por cambios de potencial (Bezanilla, 2000).

Considerando lo anteriormente expuesto y que las corrientes máximas a 0 mV y 10 mV presentaron una disminución significativa en el grupo shPanx1 en relación a mCherry en el

experimento de medición de corrientes de Ca^{+2} tipo L, nosotros esperábamos que hubiese cambios más evidentes en las curvas Q-V de los promedios del movimiento de carga. En nuestros datos, sin embargo, no observamos diferencias significativas en estos valores.

En nuestros datos de movimiento de carga observamos diferencias entre shPax1 y mCherry después del ajuste con la distribución de Boltzmann para 2 estados en el valor $V_{0.5}$, que representa el valor de potencial en el cual se obtiene la mitad de la carga máxima (Q_{max}).

Es importante destacar, que este experimento presenta dificultades para poner en evidencia procesos más lentos (Rios, 1992), debido a que si realizamos pulsos de comando más largos (>50 ms) que tengan la misma duración que los utilizados para obtener las corrientes de Ca^{+2} tipo L (500 ms) representarían de mejor manera la cinética de apertura del canal durante este proceso en particular. Pero esto no se puede lograr debido a que las corrientes de salida contaminan la señal, impidiéndonos medir solamente el movimiento de carga del Cav1.1 y nos impiden evidenciar las diferencias que existen en la función del Cav1.1, que ya observamos en los otros experimentos (Rios, 1992). La distribución de Boltzmann para 2 estados nos permite ajustar las señales obtenidas y disminuir el ruido y el impacto de las corrientes de salida. Para poder ajustar por Boltzmann es necesario que las señales alcancen un valor de saturación, lo que es difícil de obtener debido a que a estos valores de potencial las corrientes contaminantes se vuelven muy grandes, contaminando la señal (Ver anexo 1, Movimiento de Carga).

En otros estudios similares como el realizado por Bannister y cols. (2009) en el estudio de la influencia de RyR1 en la función de Cav1.1, se observaron resultados similares a los nuestros con un aumento de las corrientes máximas durante la medición de las corrientes de Ca^{+2} tipo L, junto a lo cual observaron un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de movimiento de carga en el grupo con inhibición del RyR1 y posterior al análisis de Boltzmann obtuvieron una diferencia significativa en $V_{0.5}$. De modo contrario, Weiss y cols. (2008) encontraron diferencias en las corrientes de Ca^{+2} tipo L, pero no en el movimiento de carga.

Estos antecedentes nos muestran que dependiendo de la proteína que interactúa con Cav1.1, podemos observar alteraciones en diferentes parámetros biofísicos del canal, no siendo siempre los mismos que cambian. Por lo mismo, es importante realizar un estudio completo en el modelo knockdown para Pax1, que contemple las corrientes de Ca^{2+} , el movimiento

de carga y la liberación de calcio intracelular, luego de estimulación a distintos potenciales de membrana.

Finalmente es importante considerar que existen otras relaciones entre Panx1 y un canal de Ca^{+2} dependiente de voltaje, como lo es Cav1.2, canal de la misma familia del Cav1.1, pero presente en otros tejidos. Esta relación ha sido descrita recientemente en músculo liso en los vasos del pulmón (Dahl, 2016).

Usando Clevidipina, que es un fármaco análogo a las dihidropiridinas que disminuye la presión arterial a través de la inhibición de Cav1.2, los autores observaron que existían diferentes niveles de afinidad al fármaco, y que estas diferencias estaban asociadas a la presencia de Panx1.

Cuando co-expresaron Panx1 con Cav1.2 observaron mayores niveles de afinidad y un mayor efecto en la disminución de la presión arterial, por lo que concluyeron que Panx1 ejerce una función reguladora de Cav1.2 y participa en la respuesta de este canal a la administración de Clevidipina (Dahl, 2016).

Este estudio respalda los resultados obtenidos en esta tesis y nos abre una gran gama de posibilidades sobre las posibles regulaciones que podría ejercer Panx1 en Cav1.2 y la posibilidad de que el fenómeno estudiado se replique con alguno de los otros canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje como Cav1.3 que se encuentra en el sistema nervioso, o el mismo Cav1.2 en el corazón.

9- Conclusiones

Podemos concluir entonces que la disminución en la expresión de Panx1 en fibras musculares adultas genera una disminución de la corriente máxima de Ca^{2+} tipo L, a través de Cav1.1 medida en condiciones de voltaje controlado de célula completa.

Además, la disminución en la expresión de Panx1 en fibras musculares adultas genera una disminución de VO5 (variable del ajuste de Boltzmann), voltaje al cual se desplaza la mitad de la carga máxima en el movimiento de carga producido por Cav1.1 y que representa una sensibilización del canal frente al potencial.

Podemos concluir entonces que la disminución de Panexina 1 en fibras musculares adultas desregula la función de Cav1.1. Por lo tanto, Panx1 genera una regulación en la función de Cav1.1, alterando sus propiedades de dependencia de potencial durante el movimiento de carga y la corriente máxima de Ca^{+2} tipo L en condiciones experimentales.

Estos hallazgos sumados a los obtenidos por Jorquera y cols. 2013, con PLA nos permiten concluir además que ambas proteínas presentan una comunicación y regulación bidireccional, datos que hacen cada vez más viable que la interacción entre ambas proteínas sea directa.

En las proyecciones de este estudio sería muy interesante medir los transitorios de calcio como otra manera de conocer la función del canal, así como realizar experimentos funcionales en vivo utilizando este modelo para medir fuerza y o resistencia.

Finalmente realizar experimentos con inhibidores de Panexina 1 como Carbenoxolona se vuelve necesario para dilucidar si es la presencia de la proteína o el estado funcional lo que regula la función de Cav1.1.

10- ANEXO 1

10.1- RNA Interferencia

El término RNA de interferencia (RNAi) hace referencia al silenciamiento post-transcripcional de expresión de genes que ocurre en respuesta a la introducción de una doble hebra de RNA (dsRNA) en la célula, de secuencia idéntica al mRNA blanco. La degradación de la expresión de genes objetivo ocurre por la activación de la vía enzimática del complejo endógeno de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Asimismo, RISC también juega un papel importante en la inhibición de mRNA endógenos en un mecanismo relacionado con los micro-ARN (miARN) (Moore, 2010).

Esta técnica ha sido ampliamente usada para disminuir los niveles de una proteína determinada, tanto en células en cultivo como en modelos in vivo.

Existen distintos métodos para obtener RNAi. El más simple consiste en la transfección de oligonucleótidos de RNA cortos (siRNA) en las células. Si bien a nivel de la disminución del mRNA blanco esta técnica funciona muy bien, existe el problema de la variabilidad de las transfecciones, pero sobretodo, la dilución que sufren durante la proliferación celular y el tiempo de permanencia de los siRNA en la célula, que suelen no sobrepasar los 7 días.

Una manera de resolver este problema ha sido la introducción de los shRNA, cuya producción es mediada por un vector de DNA (un plasmidio). En este sistema, shRNAs pueden ser transfectados como plasmidios que codifican para shRNA transcritos por una RNA polimerasa III. Los shRNAs consisten en dos secuencias complementarias de 19 a 22 pares de bases de RNA unidos por una secuencia de 4-11 nucleótidos que forman una horquilla que une las dos hebras complementarias de RNA. Luego de la transcripción, el shRNA es exportado al citosol donde es reconocido por una enzima endógena, Dicer, que procesa el shRNA y lo convierte en siRNA capaces de silenciar el mRNA para el cual su secuencia es complementaria (Moore. 2010). Esta técnica mediada por plasmidios, es muy útil en células musculares adultas, que son capaces de mantener la expresión de un plasmidio por más de un mes (Di Franco, 2009), asegurando así la disminución de la expresión de proteínas (o un knockdown) de manera sostenida en el tiempo incluso para proteínas de membrana que suelen tener una vida media relativamente alta.

10.2- Experimento de Potencial Controlado (Voltage-Clamp)

Esta es una técnica que se utiliza desde los años 60 en los axones de calamares gigantes en el estudio de los potenciales de acción, procesos y proteínas asociadas a cambios en los potenciales de membrana de las células (Rios, 1992). En esta técnica se ingresa a la célula y se mide el potencial de membrana de la célula en estudio. Una vez dentro se compara la medición con el valor deseado (pulso de comando) y si existe una diferencia se inyecta corriente en la dirección adecuada para llevar el potencial de membrana al valor del pulso de comando. En el caso que una corriente sea generada en la membrana durante condiciones de “potencial controlado”, el circuito debe enviar una corriente igual y en dirección opuesta a la corriente de membrana para mantener el potencial de membrana constante. La corriente que pasa por el amplificador es la corriente que ocurre en la membrana activada a un tiempo determinado (Hernández-Ochoa, 2012). Para usar adecuadamente esta técnica, el potencial debe ser espacialmente uniforme en el área de membrana donde la corriente es registrada. Por esta razón, existen diferentes variaciones de esta técnica, principalmente en el número de electrodos usados y el tamaño máximo de células que pueden ser registradas. Una de las primeras técnicas usadas en fibras musculares fue “técnica con 3 microelectrodos”, donde 2 electrodos se usan para medir y uno para mandar el pulso comando. Una de las últimas versiones de “potenciales controlados en célula completa” utiliza un solo electrodo, el cual mide y manda la señal al mismo tiempo permitiendo el ingreso a fibras musculares más pequeñas y la posibilidad de que exista una contracción muscular sin que se dañe la fibra. Esta técnica requiere que las fibras musculares sean cortas para ser capaz de mantener el potencial uniforme espacialmente (Hernández-Ochoa, 2012).

De este modo, una manera de lograr buenas mediciones con ésta técnica en fibras musculares adultas, que son células de gran tamaño (40 nm x 300 nm) es aislar eléctricamente una porción de la fibra con un aislante como la silicona. Este tipo de solución fue la que desarrolló Jacquemond (Jacquemond, 1997) donde se silicona una gran parte de la célula aislándola eléctricamente, de modo que en la pequeña porción libre se pueda controlar el potencial con un solo electrodo. Esta última técnica es la que utilizamos en esta tesis.

10.3- Mediciones de Movimiento de Carga y Corrientes de Ca^{+2} tipo L

El movimiento de carga representa el cambio de estado de proteínas canal con aminoácidos cargados eléctricamente, y por lo tanto sensibles a potencial, ubicadas en la membrana celular, que sufren un cambio conformacional desde un estado cerrado ($P_o = 0$) hacia un estado abierto ($P_o = 1$). El movimiento de los aminoácidos como respuesta a los cambios en el potencial genera una corriente eléctrica que puede ser medida. Desde este punto de vista entonces puede ser generado por todos los canales dependientes de voltaje que se encuentran en la membrana plasmática de una célula (Bezanilla, 2000).

En el caso del músculo esquelético adulto desde 1990 en el estudio de Adams y cols. se reconoce que, si bien existen otros canales dependientes de voltaje en la célula muscular, el mayor contribuidor al movimiento de carga es Cav1.1.

El movimiento de los Cav1.1 en el túbulo T es registrado como una corriente capacitiva no lineal intramembrana. El movimiento de carga es estimado en mediciones con procedimientos adecuados para eliminar las corrientes iónicas y para medir y substrair las corrientes capacitivas lineales que fluyen a través de la superficie del túbulo T (Ríos & Pizarro, 1991). Después de que las corrientes son eliminadas, los registros pueden incluir algunos residuos de corrientes iónicas, así como las corrientes capacitivas lineal y no lineal. La corriente capacitiva lineal es separada del total de la corriente usando una propiedad exclusiva de la corriente no lineal que es su saturación, propiedad esperada de una carga o dipolos confinados a la membrana. En contraste, la carga de la membrana no satura, lo que se observa al aplicar pulsos de igual amplitud, pero con polaridad opuesta (P_+ y P_-) a un voltaje donde las propiedades de membrana son lineales mayormente (-120 mV), por lo que se espera que un pulso a ese voltaje genere una respuesta de corrientes capacitivas lineales. Por lo tanto, si un pulso positivo es aplicado en un rango donde la membrana se comporta no-linealmente, y un pulso negativo es aplicado en un rango donde se comporta linealmente la adición de estas corrientes eliminará todas las corrientes lineales y dejará solamente la corriente asimétrica (corriente capacitiva no lineal, así como también remanentes de corrientes no lineales iónicas). Este método es conocido como el procedimiento $\pm P$, pero presenta el problema de que, al usar pulsos positivos grandes, el correspondiente pulso negativo alcanza valores que dañan las células. El método P/n (Armstrong & Bezanilla, 1994)

resuelve este problema usando prepulsos más pequeños, múltiples de la amplitud del pulso de estímulo. En nuestro experimento utilizamos una adaptación de este método que llamaremos P/1, donde se calculó la corriente de un solo prepulso hiperpolarizante desde -100 a -120 mV y se escaló al valor del pulso de estímulo usando una regla de 3 simple, asumiendo el comportamiento lineal de la corriente. Posteriormente se sumaron ambas corrientes realizando la eliminación de los componentes lineales capacitivos (ver Fig. 4; materiales y métodos, “Análisis movimiento de carga”).

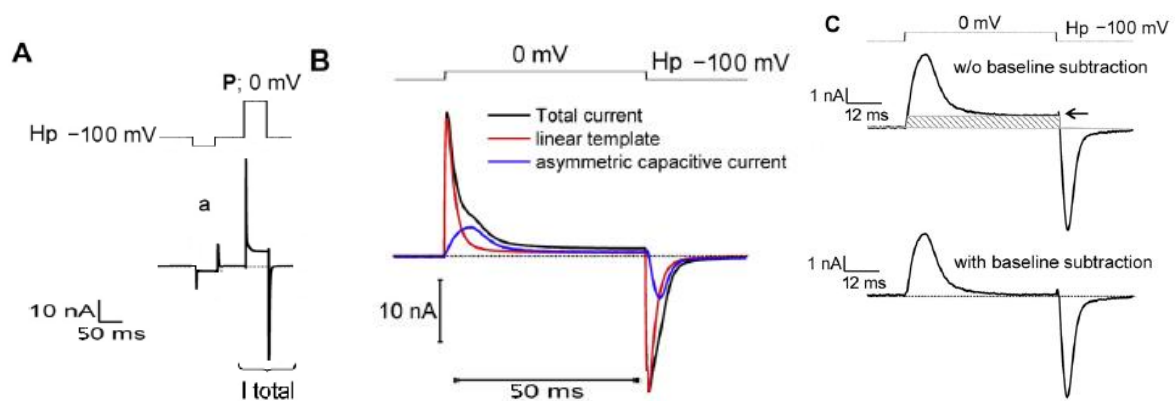


Fig. 6: Substracción de los componentes lineales de la corriente en la membrana usando un protocolo P/1 (a) y la substracción de la línea basal (Imagen modificada tomada desde Hernández-Ochoa, 2012). (A) Protocolo de Voltaje (arriba) y las correspondientes respuestas de corrientes (abajo). La corriente de membrana durante un pulso de voltaje es parcialmente corregida por substracción análoga de componentes lineales usando el circuito de cancelación de la capacitancia en el amplificador. (B) Corrientes registradas en respuesta a 50 ms de un pulso de depolarización a 0 mV desde un potencial de reposo de -100 mV. Corriente total (curva negra), representación positiva de la corriente lineal obtenida con el protocolo P/1 escalado (curva roja) y la corriente capacitiva asimétrica aislada (curva azul) que resulta de la substracción de la corriente lineal al total de la corriente. (C) En la parte superior de la figura se observa en una versión expandida en el axis de la corriente asimétrica aislada (curva azul) del panel B, mostrando una elevación de la línea basal (área achurada bajo la curva) que representa componentes iónicos residuales. Y abajo se observa la misma curva después de la substracción de la línea basal representando la corriente no lineal capacitiva (“Movimiento de Carga”).

Para evaluar la dependencia de voltaje de la activación del Movimiento de Carga, una serie de pasos de depolarizaciones de amplitud creciente debe ser aplicada desde el potencial de reposo (Potencial de membrana que es mantenido por el amplificador) (ver Resultados movimiento de carga). El total de la carga desplazada durante un pulso (Q) es obtenido calculando la integral de cada corriente capacitiva no lineal desde el comienzo del pulso (t_0) hasta el tiempo donde se alcance el nivel estacionario (t_e) (el área bajo la curva entre esos

dos tiempos). En ausencia de contaminación con corrientes iónicas, la cantidad de carga que se mueve durante el comienzo del pulso (Q_{on}) debe ser igual a la carga que se mueve después del final del pulso (Off).

$$Q = \int_{t_o}^{t_e} IQ(t)dt$$

Se debe observar saturación en ambos extremos del pulso que corresponden a las 2 posiciones de conformación de canal con proteínas cargadas (Anexo 1). El Movimiento de Carga debe tener la dirección del campo aplicado, cualquier corriente generada en otra dirección debe ser necesariamente iónica (Schneider & Chandler, 1973). Además, la cantidad de carga que se desplaza aumenta a medida que aumenta la amplitud de los pulsos. Esta dependencia de voltaje para la activación del Movimiento de Carga se puede describir usando una distribución de Boltzman de 2 estados:

$$Q(V) = \frac{Q_{max}}{1 + e^{\left(\frac{V_{0.5} - V}{k}\right)}}$$

Donde Q_{max} es el Movimiento de Carga máximo, $V_{0.5}$ es el potencial al cual se desplaza la mitad de la carga máxima (Q_{max}) y K es la pendiente de la relación $Q-V$.

10.4- Ajuste de Boltzman

La distribución de Boltzman surge como una solución para el problema que describe el cambio físico de estado de un sistema desde un estado E_1 , a un estado E_2 y así hasta n estados posibles. Comienza con la pregunta física en el contexto de la mecánica estadística de generar una ecuación que sea capaz de describir los cambios de estado de un sistema en el tiempo de forma aleatoria, es decir es una descripción física de la segunda ley de la termodinámica, más conocida como Entropía (Physical Biology of the cell, 2009).

La ecuación para la distribución general de Boltzman:

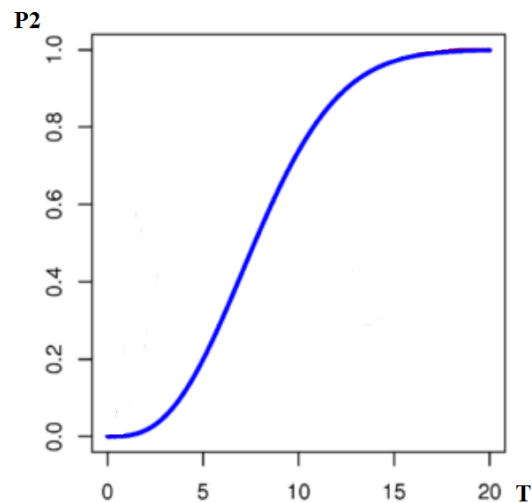
$$P(E) = \frac{1}{z} \exp\left(-\frac{E}{kT}\right) \text{ con } z = \sum_E \exp\left(-\frac{E}{kT}\right)$$

Donde a una temperatura T , la probabilidad de un estado con energía E está dada por esta distribución.

En el caso de los canales iónicos se ha descrito y utilizado la ecuación de la distribución de Boltzman para dos estados, que se ajusta al comportamiento de poblaciones de canales que presentan 2 estados; un estado abierto ($P_o = 1$) y otro cerrado ($P_o = 0$). Y donde se describen procesos que presentan un comportamiento exponencial que alcanzan un valor de saturación (Hernández-Ochoa, 2012).

Las ecuaciones específicas para la distribución de Boltzman para un sistema con 2 estados:

$$P1 = \frac{1}{1 + e\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)} \quad ; \quad P2 = \frac{1}{1 + e\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)}$$



En nuestro análisis de Movimiento de carga utilizamos P2, donde 1 representa el estado de máxima apertura del canal cuando se genera el movimiento de carga máximo (Q_{max}), 0 es la condición inicial cuando el canal está cerrado y la energía E, es representada por los cambios en el potencial de membrana como respuesta a los pulsos de comando aplicados (Physical Biology of the cell, 2009).

De este modo $P2 = \frac{1}{1 + e\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)}$ se transforma en $Q(V) = \frac{Q_{max}}{1 + e\left(\frac{V_{0.5} - V}{k}\right)}$

10.5- Relación entre el movimiento de carga y los estados abiertos y cerrados en un canal iónico.

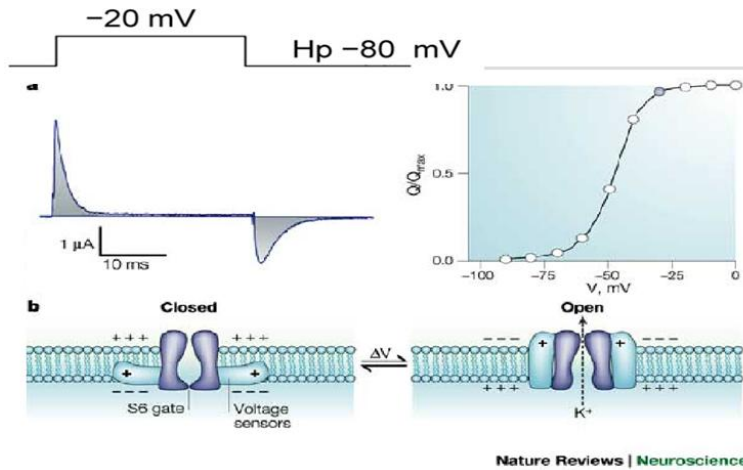


Fig. 7: Movimiento de carga en canales de Potasio en Neuronas (Swartz. 2004. Review).

En la figura se observa en a) la corriente generada en el tiempo (ms) asociada al pulso de comando de -20 mV, desde un potencial de reposo de -80 mV que aparece en la parte superior la figura. Además, se muestra la relación de los pulsos de comando con el movimiento de carga en el gráfico Q-V al lado derecho.

En b) se muestra la relación con el estado cerrado ($P_o = 0$) del canal y el estado abierto ($P_o = 1$). Donde en el estado abierto la corriente es máxima y el movimiento de carga también.

10.6- Datos funcionales del modelo de Knockdown

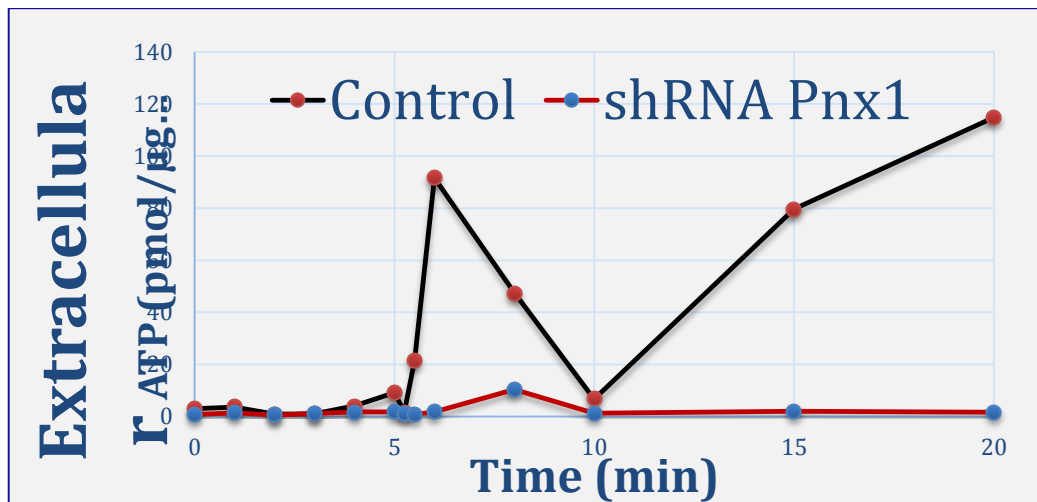


Fig. 8: Salida de ATP en respuesta a un estímulo eléctrico de baja frecuencia (20 Hz). (Datos obtenidos en el laboratorio)

Se observa en la figura la salida de ATP hacia el espacio extracelular en respuesta a un estímulo eléctrico en células de mCherry (control en negro) y shPanx1 (rojo) obtenido en nuestro laboratorio. Se observan 2 peak de salida de ATP en respuesta al estímulo en el caso del control, mientras en shPanx1 no se observa la salida de ATP.

10.7- Western blot para el modelo de Knockdown obtenido en nuestro laboratorio

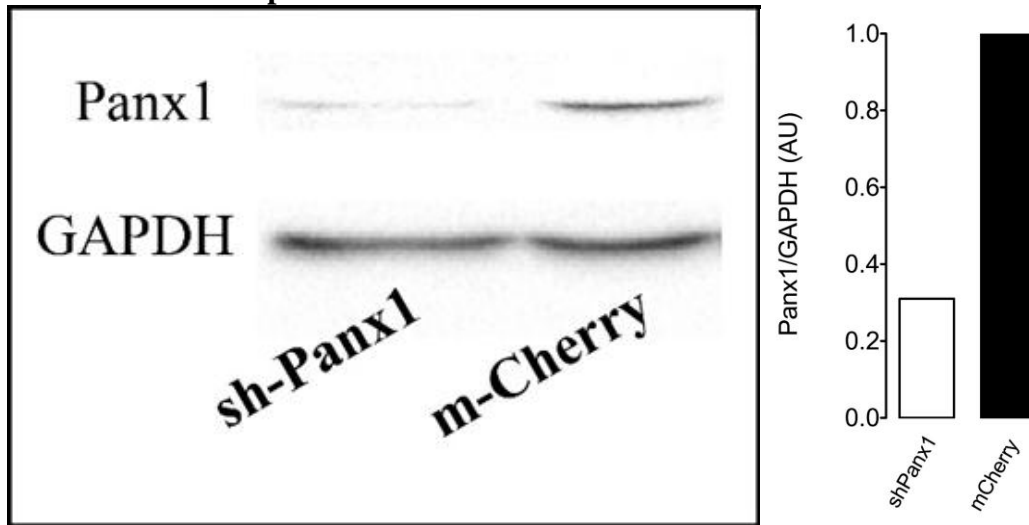


Fig. 9: Western Blot contra Panx1 para mCherry y shPanx1 (Datos obtenidos en el laboratorio). Se observa una disminución de la expresión de Panx1 de un 70% en shPanx1 en relación al control (mCherry).

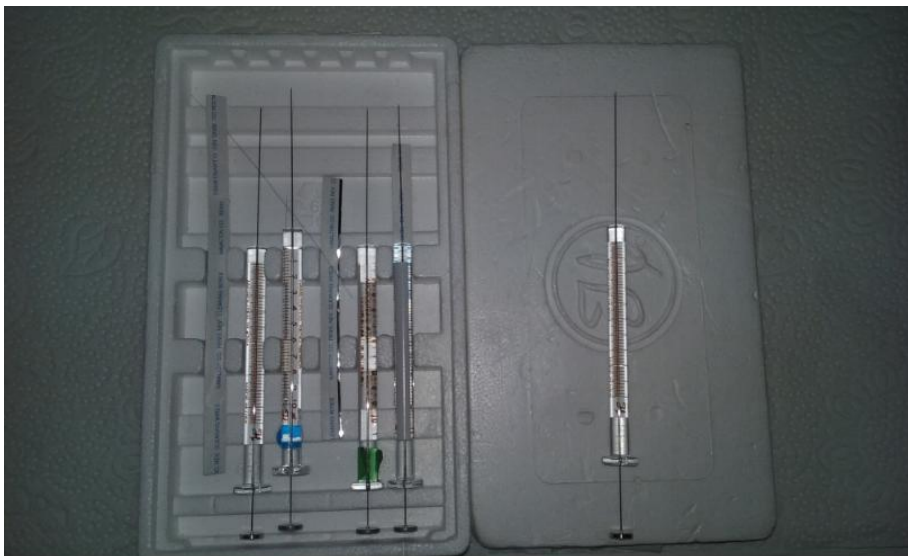
11- ANEXO 2

11.1- Imágenes Instrumental de Electroporación

Fotografía 1: Electroestimulador Grass (S48 Stimulator). Utilizado para aplicar los pulsos eléctricos durante la técnica de *Electroporación en Vivo*.



Fotografía 2: Microjeringas (Hamilton). Utilizadas para inyectar el plasmidio durante la técnica de *Electroporación en vivo*.



11.2- Imágenes Instrumental Fabricación Microelectrodos

Fotografía 3: Estirador de capilares. Instrumento utilizado para la fabricación de los microelectrodos usando capilares de borosilicato.



Fotografía 4: Microscopia utilizado para la comprobación de la forma correcta (largo y tamaño) de las puntas de los microelectrodos.



Fotografía 5: Microelectrodos utilizados en los experimentos de “Potencial controlado en célula completa”.

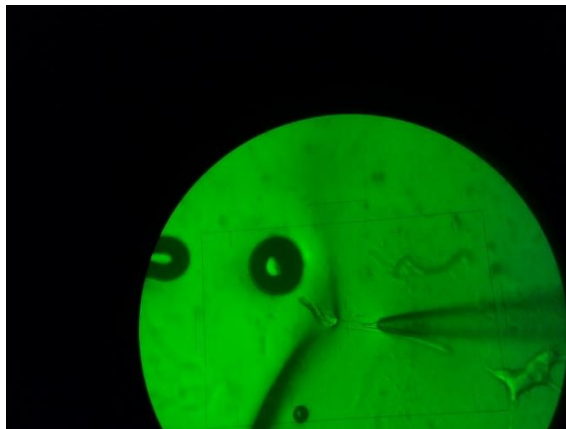


11.3- Imágenes Equipo Electrofisiología

Fotografía 6: Microscopio confocal (usado en los experimentos de medición de corriente en Chile). Se observa durante la realización de un experimento de Potencial controlado de célula completa. Con el micromanipulador encendido y el microelectrodo en solución.



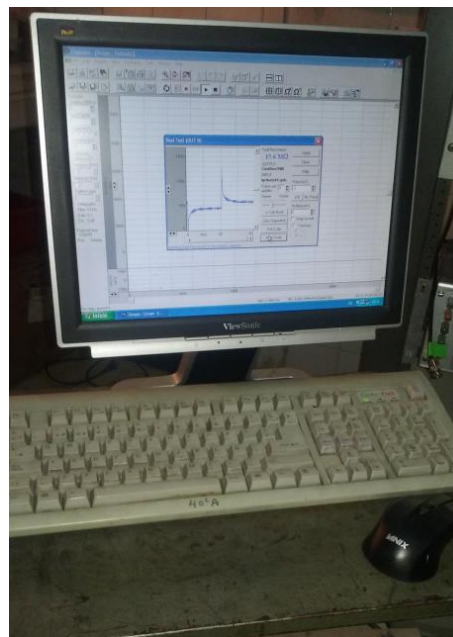
Fotografía 7: Microelectrodo ingresando a la célula muscular. Imagen tomada desde el microscopio. Se observa también a silicona que divide la célula dejando una parte libre.



Fotografía 7: Osciloscopio asociado al amplificador de la señal y el transformador análogo digital. Necesarios para el experimento de “Potencial controlado en célula completa”.



Fotografía 8: Computador asociado al circuito del amplificador de la señal. Se observa la señal RC para el ingreso del microelectrodo a la célula en el establecimiento del “Potencial controlado en célula completa”



12- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams, B. A.; Tanabe, T., Mikami, A.; Numa, S. and Beam, K. G. “Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs”. *Nature*. 356: 569-572, 1990.
- 2) Andronache, Z.; Hamilton, S. L.; Dirksen, R. T. and Melzer, W. “A retrograde signal from RyR1 alters DHP receptor inactivation and limits window Ca^{+2} release in muscle fibers of Y522S RyR1 knock-in mice”. *PNAS*. 106: 4531-4536, 2009.
- 3) Bannister, R. and Beam, K.G. “Ryanodine modification of RyR1 retrogradely affects L-type Ca^{+2} channel gating in skeletal muscle”. *J Muscle Res Cell Motil*. 30: 217–223, 2009.
- 4) Bannister, R. A.; Beam K. G. “Cav1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca^{+2} channel”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828: 1587–1597, 2013.
- 5) Bannister, R. A.; Sheridan, D. C. and Beam, K. C. “Distinct Components of Retrograde CaV1.1-RyR1 Coupling Revealed by a Lethal Mutation in RyR1”. *Biophysical Journal*. 110: 912-921, 2016.
- 6) Beam, K. G. and Horowicz, P. “Excitation–contraction coupling in skeletal muscle”. *Myology*. 3: 257–280, 2004.
- 7) Bezanilla, F. “The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels”. *Physiological Reviews*. 80: 555-592, 2000.
- 8) Bond, S.R. and Naus C.C. “The pannexins: past and present”. *Frontiers in Physiology*. 58: 1-24, 2014.
- 9) Buvinic, S.; Almarza, G.; Bustamante, M.; Casas, M.; López, J.; Riquelme, M.; Sáez, J. C.; Huidobro-Toro, J. P. and Jaimovich, E. “ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle”. *J. Biol. Chem*. 284: 34490-34505, 2009.
- 10) Casas, M.; Figueroa, R.; Jorquera, G.; Escobar, M.; Molgó, J. and Jaimovich, E. “IP(3)-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers”. *J. Gen. Physiol*. 136, 455-467, 2010.
- 11) Catterall, W. A. “Structure and regulation of Voltage-Gated Ca^{+2} Channels”. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 16:521–55, 2000.

- 12) Catterall, W. A. "Voltage-Gated Calcium Channels". Cold Spring Harb Perspect Biol. 3: a003947, 2011.
- 13) Cohen, A. W.; Hnasko, R.; Schubert, W. and Lisanti M. P. "Role of caveolae and caveolins in health and disease". *Physiol Rev* 84:1341–1379, 2004.
- 14) Collet, C.; Pouvreau, S.; Csernoch, L.; Allard, B. and Jacquemond, V. "Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under Silicone Voltage-Clamp conditions". *Cell Biochem. Biophys.* 40: 225-236, 2004.
- 15) Couchoux, H.; Allard, B.; Legrand, C.; Jacquemond, V. and Berthier, C. "Loss of caveolin-3 induced by the dystrophy-associated P104L mutation impairs L-type calcium channel function in mouse skeletal muscle cells". *J Physiol.* 580:745–754, 2007.
- 16) Dahl, G. P.; Conner, G. E.; Qiu, F.; Wang, J.; Spindler, E.; Campagna, J. A. and Larsson, H. P. "High affinity complexes of pannexin channels and L-type calcium channel splice-variants in human lung: Possible role in clevidipine-induced dyspnea relief in acute heart failure". *EBioMedicine.* 10: 291-297, 2016.
- 17) DiFranco, M.; Quinonez, M.; Capote, J. and Vergara, J. "DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation". *J Vis Exp* 32, 2009.
- 18) Golini, L.; Chouabe C.; Berthier, C.; Cusimano, V.; Fornaro, M.; Bonvallet, R.; Formoso, L.; Giacomello, E.; Jacquemond, V. and Sorrentino, V. "Junctophilin 1 and 2 Proteins Interact with the L-type Ca^{+2} Channel Dihydropyridine Receptors (DHPRs) in Skeletal Muscle". *The Journal of Biological Chemistry.* 286: 43717-43725, 2011.
- 19) Hernández-Ochoa, E. O. and Schneider, M. F. "Voltage clamp methods for the study of membrane currents and SR Ca^{+2} release in adult skeletal muscle fibres". *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 108: 98-118, 2012.
- 20) Jacquemond, V. "Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers". *Biophys. J.* 73: 920-928, 1997.
- 21) Jaimovich, E.; Reyes, R.; Liberona, J. L. and Powell, J. A. "IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca^{+2} signals in cultured skeletal muscle". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: C998-C1010, 2000.

- 22) Jorquera, G.; Altamirano, F.; Contreras-Ferrat, A.; Almarza, G.; Buvinic, S.; Jacquemond, V.; Jaimovich, E. and Casas, M. "Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity". *Journal of cell Science*. 126: 1189-1198, 2013.
- 23) Nakai, J.; Dirksen, R. T.; Nguyen, H. T.; Pessah, I. N.; Beam K. G. and Allen P. D. "Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor". *Nature*. 380: 72–75, 1996.
- 24) Moore, C. B.; Guthrie, E. H.; Huang, M. T. and Taxman, D. J. "Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown". *Methods Mol Biol*. 629: 141–158, 2010.
- 25) Paolini C.; Fessenden J. D.; Pessah I. N.; and Franzini-Armstrong C. "Evidence for conformational coupling between two calcium channels". *PNAS*. 34: 12748-12752, 2004.
- 26) Penuela S.; Gehi R.; Laird D.W. "The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta*". 1828: 15-22, 2013.
- 27) Pouvreau, S.; Collet, C.; Allard, B. and Jacquemond, V. "Whole-cell voltage clamp on skeletal muscle fibers with the silicone-clamp technique". *Methods Mol Biol*. 403: 185-194, 2007.
- 28) Powell, J.A.; Carrasco, M.A.; Adams, D.S.; Drouet, B.; Rios, J.; Muller, M.; Estrada, M. and Jaimovich, E. "IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca²⁺ signaling pathway in skeletal muscle". *J. Cell Sci*. 114: 3673–3683, 2001.
- 29) Ríos, E.; Pizarro, G.; Stefani, E. "Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling". *Annu Rev Physiol*. 54: 109-33, 1992.
- 30) Rios, E.; Brum, G. "Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle". *Nature*. 325: 717-720, 1987.
- 31) Schneider, M.F. and Chandler, W.K. "Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling". *Nature*. 242: 244-246, 1973.

- 32) Weiss, N.; Couchoux, H.; Legrand, C.; Berthier, C.; Allard, B. and Jacquemond, V.
“Expression of the muscular dystrophy-associated caveolin-3P104L mutant in adult mouse skeletal muscle specifically alters the Ca⁺² channel function of the dihydropyridine receptor”. *Eur J Physiol.* 457:361–375, 2008.