

Doc- B
C 569c
C. 1

CARACTERIZACION DEL INTERCAMBIADOR SODIO-CALCIO EN
MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Fredy Roberto Cifuentes Navarro

Enero, 1997

Director de Tesis: Dra. Cecilia Hidalgo Tapia



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

FREDY ROBERTO CIFUENTES NAVARRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día 28 de Noviembre de 1996.

Director de Tesis:

Dra. Cecilia Hidalgo T.

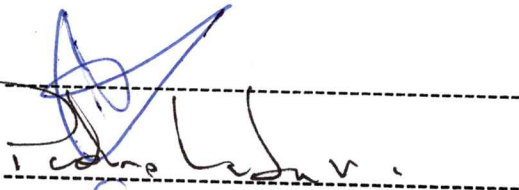


Comisión de Evaluación de la Tesis

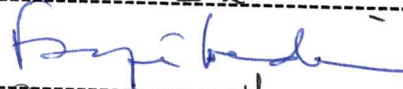
Dr. Luis Beaugé



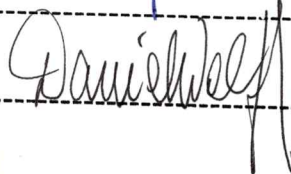
Dr. Pedro Labarca



Dr. Francisco Sepúlveda



Dr. Daniel Wolff



AGRADECIMIENTOS

Debo expresar mis sinceros agradecimientos a la Dra. Cecilia Hidalgo por su valioso y constante apoyo durante la realización de esta Tesis, así como por la constante discusión científica mantenida durante toda la estadía en su Laboratorio.

También expreso mis agradecimientos al Dr. Julio Vergara (UCLA School of Medicine) por su apoyo y cooperación para el desarrollo de una parte importante de esta Tesis. Junto con el Dr. Vergara, debo agradecer al Dr. Ariel Escobar (UCLA School of Medicine) por las largas discusiones que sirvieron para aclarar el uso de los colorantes indicadores de calcio.

Al Centro de Estudios Científicos de Santiago le agradezco su apoyo durante el desarrollo de esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio, quienes merecen una mención especial por compartir las largas jornadas de trabajo, especialmente durante la preparación de membranas.

A mi familia, por su comprensión y apoyo en la distancia, les doy gracias. Finalmente, a Su por su infatigable apoyo y compañía, por el cariño y alegrías que me ha brindado, sin el cual hubiese sido difícil concluir esta etapa.



INDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE MATERIAS	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY	xii
INTRODUCCION.....	1
1 Homeostasis de calcio en la célula muscular esquelética.	3
2 Antecedentes Bibliográficos.....	10
2.1 Intercambiador Na-Ca.	10
2.2 Intercambiador Na-Ca en músculo cardíaco.	15
2.3 El intercambiador Na-Ca de músculo esquelético.	20
3 Hipótesis	23
4 Objetivos.....	24
METODOS	26
1 Preparación de vesículas de túbulos-t.....	26



2 Ensayos de unión.	27
2.1 Unión de [³H]ouabaína.	27
2.2 Unión de [³H]nitrendipina.	28
3 Medición del intercambiador Na-Ca.	29
3.1 Flujos de entrada de calcio.	30
3.2 Flujos de salida de Ca.	31
4 Inmunodetección del intercambiador Na-Ca.	32
5 Registros Electrofisiológicos.	34
5.1 Registro de corrientes iónicas en fibras musculares aisladas.	34
5.2 Registro de la concentración de Ca²⁺ usando colorantes fluorescentes...	36
5.3 Propiedades de los colorantes indicadores de Ca²⁺.	37
6 Materiales.	37
RESULTADOS	38
1 Caracterización de las vesículas de túbulos transversales.	38
2 Flujos de calcio	41
2.1 Flujos de entrada de calcio.	41
2.2 Flujos de salida de calcio desde vesículas de túbulos transversales.	50
2.3 Efecto del calcio externo sobre la velocidad de salida de calcio.	54
2.4 Efecto del sodio en la velocidad de salida de calcio.	57
3 Inmunodetección del intercambiador Na-Ca.	59

4 Detección del intercambiador Na-Ca mediante registros electrofisiológicos.	63
4.1 Efecto de la remoción del sodio extracelular sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular.	65
4.2 Liberación intracelular de Ca^{2+} desde DM-nitrophen. Efecto sobre el intercambio Na-Ca.	69
4.3 Propiedades de los colorantes indicadores de Ca^{2+}.	70
DISCUSION	74
1 Consideraciones experimentales.	74
2 Origen de las vesículas de túbulos-t usadas en esta Tesis.	75
3 Flujos de calcio en vesículas de túbulos-t.	76
3.1 Flujos de entrada de calcio en ausencia de sodio intravesicular.	76
3.2 Flujos de salida de Ca^{2+}.	79
4 Inmunodetección del intercambiador Na-Ca.	85
5 Estudio del intercambiador Na-Ca mediante técnicas electrofisiológicas...	86
6 Implicaciones fisiológicas.	91
CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	95

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Comparación de los sistemas de transporte de calcio presentes en músculo esquelético.....	10
TABLA 2. Propiedades del intercambiador Na-Ca en membranas plasmáticas aisladas de músculo esquelético.	22
TABLA 3. Composición de los medios de salida de calcio.....	31
TABLA 4. Propiedades cinéticas de los flujos de calcio.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una fibra muscular esquelética de anfibios.....	2
Figura 2. Homeostasis iónica en una fibra muscular esquelética.....	4
Figura 3. Modos de operación del intercambiador Na-Ca.	14
Figura 4. Esquema propuesto de la topología del intercambiador Na-Ca de músculo cardíaco	18
Figura 5. Esquema de la preparación de fibra muscular aislada	35
Figura 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las distintas fracciones de membrana.....	39
Figura 7. Posibles vías de entrada de calcio a las vesículas de túbulos-t.....	42
Figura 8. Unión de calcio a vesículas de túbulos-t.....	44
Figura 9. Entrada de calcio a vesículas de túbulos-t a 25 °C.....	46
Figura 10. Entrada de calcio a vesículas de túbulos-t a 5 °C.....	47
Figura 11. Entrada de calcio a vesículas de túbulos-t mediada por intercambio Ca-Ca.....	49
Figura 12. Posibles vías de salida de calcio desde las vesículas de túbulos-t.....	51
Figura 13. Salida de calcio desde vesículas de túbulos-t en un medio sin sodio .	52
Figura 14. Salida de calcio desde vesículas de túbulos-t.	53
Figura 15. Salida de calcio desde vesículas de túbulos-t equilibradas y sin equilibrar con 2 mM CaCl ₂	55
Figura 16. Variación de las constantes de velocidad en función de la concentración de calcio.	56
Figura 17. Efecto de sodio extravesicular sobre las constantes de velocidad de salida de calcio.	58

Figura 18. Inmunodetección del intercambiador Na-Ca en túbulos-t de <i>Rana catesbiana</i>	61
Figura 19. Inmunodetección del intercambiador Na-Ca en túbulos-t de <i>Caudiverbera caudiverbera</i>	62
Figura 20. Esquema de la medición del intercambiador Na-Ca en fibras de músculo esquelético.....	64
Figura 21. Activación de una corriente iónica de salida al superfundir fibras con solución Ringer sin sodio.	68
Figura 22. Corriente iónica de entrada activada por fotólisis del complejo DM-nitrophen:Ca ²⁺	71
Figura 23. Respuesta de Fluo-3 y CaOrange-5N a un potencial de acción.....	73

RESUMEN

El ion calcio posee un papel fundamental en la fisiología del músculo esquelético. En este contexto, los antecedentes sobre la participación del intercambiador Na-Ca en la regulación del calcio citosólico, en fibras musculares esqueléticas de anfibios, son escasos. Para caracterizar la contribución del intercambiador Na-Ca a la homeostasis de calcio, se estudió el modo reverso de operación de este transportador en vesículas de túbulos-t aisladas del anfibio *Caudiverbera caudiverbera*. Además, se estudiaron ambos modos, directo y reverso, en fibras musculares únicas aisladas de *Rana catesbiana*.

El intercambiador Na-Ca se estudió *in vitro* en vesículas de túbulos-t, caracterizando los flujos de salida de Ca^{2+} dependientes de sodio extravesicular. Los flujos de salida de calcio, correspondientes al funcionamiento del intercambiador en el modo reverso, mostraron que sólo una fracción del calcio contenido en las vesículas se intercambió por sodio extravesicular, y que la velocidad de salida de Ca^{2+} fue modulada por las concentraciones de calcio y de sodio extravesiculares. Se observó una disminución de la velocidad de salida de Ca^{2+} al aumentar la concentración extravesicular de calcio. El 50% de este efecto se obtuvo a una concentración de calcio de $0,1 \mu\text{M}$ ($\text{pCa} = 7,06$). En ausencia de

calcio extravesicular, el sodio extravesicular aumentó la constante de velocidad de salida de Ca^{2+} en forma cooperativa (número de Hill de 2,7).

Los flujos de salida de calcio, medidos a $\text{pCa} > 9$ y a 5°C , se caracterizaron con una constante de velocidad de salida de $70 \pm 30 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 4$). Por otra parte, los flujos de entrada de calcio, mediados por intercambio Ca-Ca, se caracterizaron por una constante de velocidad de entrada de $4,3 \pm 0,7 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 4$, 5°C).

La preparación de vesículas de túbulos-t utilizada en estos estudios está altamente enriquecida en túbulos-t, a juzgar por la densidad de sitios de unión de dihidropiridinas de $79 \pm 21 \text{ pmol } [^3\text{H}]\text{-nitrendipina} / \text{mg proteína}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 5$), y está formada en más de un 80% por vesículas selladas con la configuración interior-afuera. Además, se encontró que las vesículas de túbulos-t son capaces de acumular calcio en su interior, indicando que poseen sitios de unión de calcio. La constante de afinidad de estos sitios de unión fue de $3,5 \pm 1,1 \text{ mM}$ ($N = 3$).

En forma complementaria, se estudió mediante inmunodetección cuáles isoformas del intercambiador Na-Ca estaban presentes en las preparaciones de túbulos-t. Los resultados sugirieron que en músculo esquelético de *Rana catesbiana* están presentes tanto la isoforma cardíaca (NCX1) como la isoforma de cerebro y músculo esquelético (NCX2). En músculo esquelético de *Caudiverbera caudiverbera* sólo se detectó la presencia de la isoforma NCX2.

En fibras musculares aisladas de *Rana catesbiana*, se estudiaron las corrientes iónicas producidas en respuesta a variaciones en el gradiente de sodio, o a aumentos repentinos en la concentración de calcio intracelular (producto de la fotólisis de DM-nitrophen:Ca²⁺ presente en el citoplasma). Al superfundir las fibras musculares con soluciones externas en las que se reemplazó el sodio por otro catión, se encontró que se producían corrientes iónicas de salida con valores de $0,36 \pm 0,17 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, N = 6) a un potencial de membrana de -90 mV. Además, se observaron pequeños aumentos de la concentración de calcio citosólico en respuesta a estas sustituciones iónicas. En experimentos paralelos con sodio externo normal, la fotólisis del complejo DM-nitrophen:Ca²⁺ activó una corriente de entrada de valores entre 0,3-1 $\mu\text{A}/\mu\text{F}$. Ambas respuestas serían consistentes con la operación del intercambiador Na-Ca, funcionando ya sea en el modo reverso (entrando calcio a la fibra muscular) o en el modo directo (sacando calcio de la fibra muscular).

Los valores de flujos de calcio mediados por el intercambiador medidos en vesículas fueron de magnitud comparables a los flujos obtenidos en experimentos realizados en fibras musculares aisladas.

Los resultados se discuten en el contexto del posible papel del intercambiador Na-Ca en la homeostasis de calcio en músculo esquelético de anfibio.

SUMMARY

Calcium ion plays a key role in skeletal muscle physiology. In skeletal muscle, the role of Na-Ca exchanger in calcium homeostasis is poorly understood. This work describes the properties of the reverse mode of action of the Na-Ca exchanger studied in t-tubules vesicles isolated from skeletal muscle of *Caudiverbera caudiverbera*. Both modes of action, forward and reverse, of the exchanger were studied in single skeletal muscle fibers isolated from *Rana catesbiana*.

In order to study the reverse mode of action of Na-Ca exchanger, extravesicular sodium dependent- Ca^{2+} efflux was measured in t-tubule vesicles. The experiments showed that a fraction of the vesicular calcium content was exchanged by extravesicular sodium. The results indicated that the rate constant of Ca^{2+} release depended on external calcium and sodium concentrations. In fact, extravesicular calcium decreased the rate of Ca^{2+} release with a $K_{0,5}$ of 0,1 μM ($\text{pCa} = 7.06$). Extravesicular sodium increased the rate constant of calcium release in a cooperative fashion (Hill number = 2.7).

The estimated rate constant of calcium release was $70 \pm 30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, N = 4), at $p\text{Ca} > 9$, 5 °C. The rate constant of calcium influx was estimated at $4.3 \pm 0.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, N = 4).

The t-tubule membrane vesicles contained a high density of dihydropyridine derivatives binding sites ($79 \pm 21 \text{ pmol } [^3\text{H}]\text{nitrendipine/mg}$ protein, $\bar{x} \pm \text{SD}$, n = 5) and they were at least 80 % sealed in an inside-out configuration. These vesicles accumulated calcium which indicates the presence of intravesicular calcium binding sites. The affinity of these calcium binding sites was $3.5 \pm 1.1 \text{ mM}$ (n = 3).

Immunodetection studies using polyclonal antibodies indicated the presence of both Na-Ca exchanger isoforms in t-tubule vesicles isolated from *Rana catesbiana*, the cardiac isoform (NCX1) and the brain and skeletal muscle isoform (NCX2). However, in t-tubule vesicles isolated from *Caudiverbera caudiverbera*, only NCX2 isoform was detected.

The effect of extracellular sodium removal or sudden increase in intracellular calcium concentration (produced by photolysis of DM-nitrophen) on ion currents were studied in single muscle fibers isolated from *Rana catesbiana*. Replacement of extracellular sodium by an univalent cation produced an outward current ($0.36 \pm 0.17 \text{ } \mu\text{A}/\mu\text{F}$ at -90 mV); at same time, a small increase in cytosolic free calcium concentration was observed. In normal Ringer solution, photolysis

of intracellular DM-nitrophen: Ca^{2+} complex activated an inward current of 0.3-1 $\mu\text{A}/\mu\text{F}$. Both results were attributed to the Na-Ca exchanger functioning either in the reverse mode (allowing calcium entry to the muscle fiber) or in the forward mode (removing calcium from the muscle fiber).

Calcium fluxes measured either in vesicles or in muscle fibers were equivalent in magnitude. The physiological role of Na-Ca exchanger in skeletal muscle is discussed.

INTRODUCCION

El ion calcio posee un papel fundamental como segundo mensajero intracelular. El aumento de la concentración intracelular de calcio desencadena procesos tan diversos como el acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético, cardíaco y liso (Bers, 1991), la liberación de neurotransmisores y los cambios en la eficiencia sináptica en neuronas (Ghosh y Greenberg, 1995), y el acoplamiento excitación-secreción en células secretoras (Baker y Knight, 1986). Sin embargo, los niveles intracelulares elevados de calcio son altamente tóxicos para las células, por lo cual siempre los aumentos del calcio citoplasmático son de naturaleza transitoria. Por lo tanto, para regular la función del calcio como segundo mensajero las células poseen mecanismos que mantienen con precisión la concentración de Ca^{2+} en reposo y que aseguran la naturaleza transitoria de los cambios producidos en respuesta a diferentes estímulos.

En el caso particular de las fibras musculares esqueléticas, la despolarización de los túbulos transversales (túbulos-t) induce a nivel de las tríadas la liberación de calcio desde las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático (RS). El Ca^{2+} liberado se une a la troponina C iniciando la

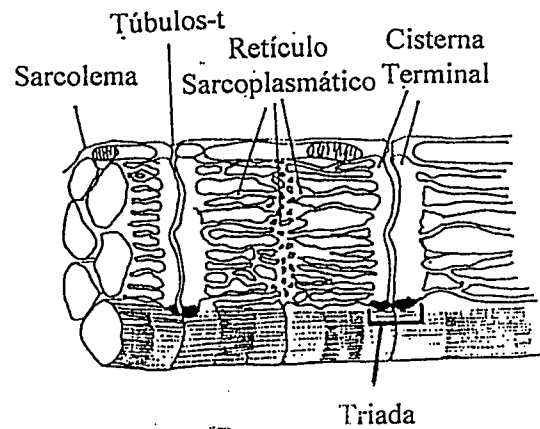


Figura 1. Esquema de una fibra muscular esquelética de anfibio. Se muestra la disposición relativa de los túbulos-t y del RS, los cuales rodean a las miofibrillas. Las cisternas terminales y los túbulos-t forman las triadas, que se ubican a nivel de la línea Z. (Tomado de Peachey, 1965).

contracción muscular. El mecanismo por el cual se acopla la despolarización de los túbulos-t y la liberación de calcio aún no se aclara completamente.

La Figura 1 representa un dibujo esquemático de la estructura del músculo esquelético de anfibios. Se muestra que el RS y los túbulos-t rodean las miofibrillas. El RS se ensancha formando las cisternas terminales, que se asocian con los túbulos-t formando las triadas. De estos estudios anatómicos, Peachey

(1965) determinó que más del 80% de los túbulos-t se asocia con el RS en músculo esquelético de anfibios.

La Figura 2 ilustra algunos de los canales y transportadores que participan en la homeostasis iónica de la fibra muscular esquelética. Entre otros, se muestran los canales de sodio y potasio responsables del potencial de acción, los canales de calcio tipo L, la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática y la Na^+ - K^+ -ATPasa. Estos canales y transportadores están presentes en proporciones variables en los túbulos-t y en la membrana de superficie. Para mayor claridad no se incluyeron en el esquema los tampones citoplasmáticos solubles de calcio, como la parvoalbúmina.

1 Homeostasis de calcio en la célula muscular esquelética.

La concentración de Ca^{2+} en las fibras musculares en reposo está en el rango submicromolar (Harkins. y cols., 1993). En respuesta al potencial de acción el calcio se eleva transitoriamente, alcanzando niveles micromolares durante 50 milisegundos aproximadamente (Vergara y Escobar, 1993).

Los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (mitocondrias y retículo sarcoplasmático) tienen una capacidad finita para almacenar calcio. Esto implica que la célula debe poseer mecanismos en su membrana plasmática que le permitan regular la concentración intracelular de Ca^{2+} aún en condiciones

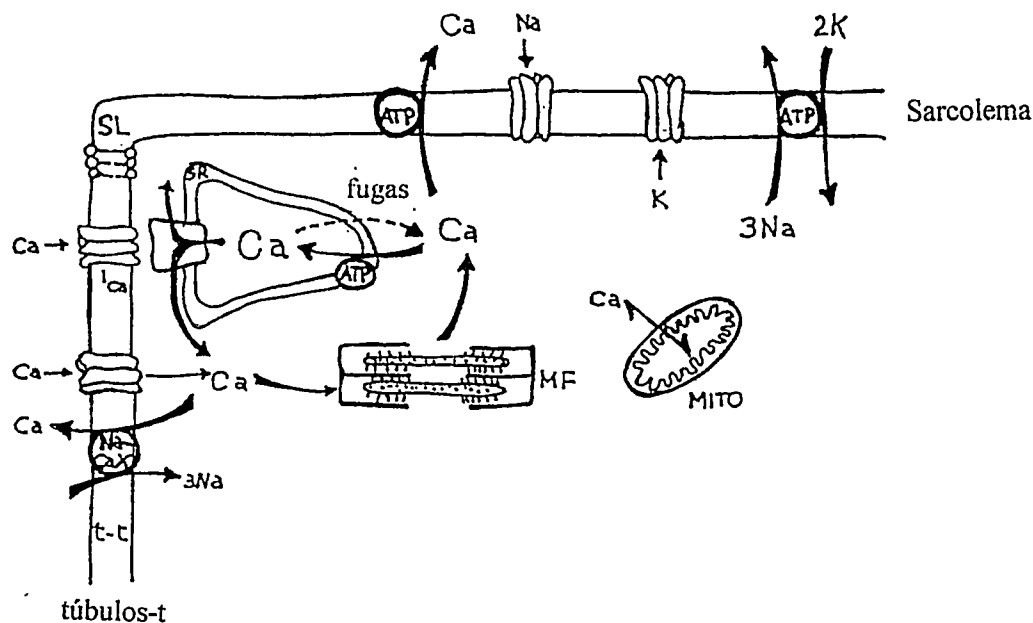


Figura 2. Homeostasis iónica en una fibra muscular esquelética. El Ca^{2+} puede entrar a la fibra por vías específicas: los canales de calcio y el intercambiador Na-Ca operando en el modo reverso, y también por vías pasivas no específicas (fugas). El calcio es liberado al citoplasma desde el retículo sarcoplasmático (RS) vía canales de liberación sensibles a ryanodina, y es removido del citoplasma, e indirectamente de los miofilamentos, por acción, primariamente, de la Ca^{2+} -ATPasa del RS, y por la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática y el intercambiador Na-Ca actuando en el modo directo (Fig. 3). (Modificada de Bers, 1991).

extremas, en las cuales los depósitos intracelulares están saturados con calcio o se han vaciado tras estimulación sostenida. Pequeños desbalances conducirían a una

progresiva ganancia o pérdida del calcio celular, lo cual podría sobrecargar o vaciar la célula con calcio, y por consiguiente afectar los depósitos intracelulares.

Vías de entrada de calcio a la célula. Los canales de calcio (tipo L) activados por voltaje representan una vía específica de entrada de calcio a las fibras musculares. Otra vía específica podría ser el intercambiador Na-Ca operando en el modo reverso (ver Figura 3), si es que en músculo esquelético este sistema operara como en músculo cardíaco, lo que no se ha demostrado hasta el momento y constituye uno de los objetivos de esta tesis. Considerando, además, que en reposo el gradiente electroquímico para Ca^{2+} favorece su entrada¹, cualquier tipo de fuga en la membrana plasmática representará una entrada de calcio no específica.

Los canales de Ca^{2+} de músculo esquelético son principalmente del tipo L y se encuentran localizados selectivamente en la membrana de los túbulos-t. Entre las características principales de estos canales se pueden citar: a) que son bloqueados (o activados) por un grupo de drogas, entre las cuales destaca los derivados de dihidropiridinas (DHP) y de verapamil (Curtis y Catterall, 1984; Flockerzi y cols., 1986), debido a lo cual estos canales se denominan receptores de DHP, b) que se activan en forma lenta en respuesta a los cambios en el

¹ $fem_{\text{Ca}} = 2(V_m - E_{\text{Ca}}) = 2(-90 - 128) = -436 \text{ mV}$ (En reposo)

potencial de membrana (Sánchez y Stefani, 1983), c) que presentan una inactivación dependiente de voltaje (Cota y Stefani, 1989) y d) que poseen una conductancia de 12 pS, en 100 mM Ba^{2+} simétrico (Ma y Coronado, 1988). Los túbulos-t poseen la mayor densidad de sitios de unión de dihidropiridinas que se conoce hasta el momento (Fosset y cols., 1983; Jaimovich y cols., 1986).

Debido a que los canales de calcio de músculo esquelético se activan lentamente en respuesta a los cambios de potencial, es poco probable que ellos produzcan una corriente de entrada de calcio durante un potencial de acción (Sánchez y Stefani, 1983). El rol fisiológico que se ha propuesto para estos canales de calcio es que actuarían como las moléculas detectoras de los cambios en el potencial de membrana, comunicando estos cambios a los canales de liberación de calcio del RS (Ríos y Brum, 1987).

La otra vía específica posible de entrada de calcio a la célula muscular esquelética es el intercambiador Na-Ca, ya que se ha demostrado la presencia de este transportador en vesículas de túbulos-t (Donoso e Hidalgo, 1989; Hidalgo y cols., 1991). En otras células excitables, dependiendo del potencial de membrana y de los gradientes químicos de sodio y calcio, este intercambiador permite la entrada o la salida de calcio, como se analiza en detalle más adelante.

Vías de salida de calcio hacia el medio extracelular. Se ha demostrado que la membrana plasmática de músculo esquelético posee una bomba de calcio que se

denomina PMCA (por plasma membrane Ca^{2+} -ATPase). Esta enzima posee mayor afinidad por calcio que la ATPasa del RS, aunque está presente en menor densidad que esta última. Debido a su mayor afinidad por calcio, esta ATPasa es la responsable mayoritaria de bombear calcio fuera de la célula en el estado de reposo, y por consiguiente, del mantenimiento de la concentración intracelular de calcio en reposo. La PMCA de músculo esquelético, que está presente tanto en la membrana de superficie como en los túbulos-t, es regulada por calmodulina (Hidalgo y cols., 1986a), proteína quinasa A (Hilfiker y cols., 1994) y proteína quinasa C. Estudios recientes han demostrado por inmunodetección que en músculo esquelético de mamíferos se encuentra la isoforma PMCA 1, con una masa molecular de 135 kDa, e indican que esta proteína co-purifica con el receptor de DHP y con el intercambiador Na-Ca (Sacchetto y cols., 1996).

El otro sistema de transporte que podría participar en la remoción del calcio hacia el exterior de la células es el intercambiador Na-Ca actuando en el modo directo (Donoso e Hidalgo, 1989; Hidalgo y cols., 1991). No se ha demostrado en forma concluyente que este transportador participe efectivamente removiendo calcio hacia el exterior del músculo, aunque su baja afinidad por el calcio citosólico determinada *in vitro* (ver Tabla 1) hace poco probable que participe en condiciones de reposo. Una discusión más detallada de las

propiedades de este intercambiador se presenta en la sección de Discusión Bibliográfica.

Liberación y captación de calcio por el RS. Además de los sistemas que permiten la entrada o la salida de calcio de la célula muscular esquelética, el RS tiene un papel central en la homeostasis del calcio intracelular. En respuesta al potencial de acción se produce la liberación de calcio desde las cisternas terminales del RS, a través de canales de calcio de alta conductancia. Aún está en discusión el mecanismo fisiológico que activa la apertura de estos canales, puesto que se ha demostrado que no responden directamente a los cambios de potencial que se producen en la membrana tubular. Los canales de liberación de calcio del RS son sensibles a un alcaloide derivado del arbusto *Ryana speciosa*, denominado ryanodina, que se une a los canales con alta afinidad (Inui y cols., 1987; Lai y cols., 1988). Actualmente, se acepta que estos canales corresponderían a las estructuras densas presentes en las tríadas, observadas primero mediante microscopía electrónica e inicialmente denominadas "pies" (Franzini-Armstrong, 1970).

La concentración de calcio al interior del RS está en el rango milimolar, lo que genera un gradiente químico que favorece la salida de Ca^{2+} desde su interior. Por esta razón, las fugas de calcio del RS representan una pérdida del contenido de calcio intrareticular. Sin embargo, la membrana del RS posee una muy baja

permeabilidad a calcio en reposo, lo que hace que las fugas de calcio al citoplasma sean pequeñas.

En músculo esquelético existe, además de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática ya mencionada, otra ATPasa que se encuentra en muy alta densidad en la membrana del RS y se denomina SERCA (por sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Esta enzima se activa al aumentar la concentración de calcio citosólico al rango micromolar y recaptura el calcio hacia el RS durante la relajación muscular. Hasta el momento, se han encontrado dos isoformas de esta enzima: SERCA 1, que se expresa exclusivamente en fibras de músculo esquelético de contracción rápida y SERCA 2a, que se expresa en fibras esqueléticas lentas y también en músculo cardíaco.

Un resumen de las propiedades cinéticas de los sistemas que participan en la homeostasis del Ca^{2+} en músculo esquelético se ilustra en la Tabla 1.

Considerando la afinidad relativa por Ca^{2+} de estos sistemas, la bomba de Ca^{2+} de los túbulos-t es el sistema principal que participa en la remoción de Ca^{2+} en reposo, en tanto que la bomba de Ca^{2+} del RS se activa sólo después de estimular el músculo. Como ya se indicó, no existen antecedentes sobre el papel del intercambiador Na-Ca en fibras musculares esqueléticas, tanto en reposo como durante el potencial de acción, pero es probable que, al igual que en

músculo cardíaco, participe al menos en la relajación de la fibra muscular actuando en el modo directo.

Tabla 1. Comparación de los sistemas de transporte de Ca^{2+} presentes en músculo esquelético.

	velocidad nmol/mg/min, 25°C	$K_{0.5}$ [μM] (para Ca^{2+})
Túbulos-t		
Ca^{2+} -ATPasa	7-10	0,3
intercambiador Na-Ca * (modo directo de salida de Ca^{2+} de la célula)	50-90	2,7
Canal de Ca^{2+} , tipo L ^s	12 pS (100 mM BaCl_2)	-
Retículo sarcoplasmático (RS)		
Ca^{2+} -ATPasa	2.000	1,6
Canal de Ca^{2+} , activado por ATP	60.000-200.000 110-120 pS (50 mM Ca^{2+})	4,0

* estos datos corresponden a músculo esquelético de anfibios, el resto a músculo esquelético de mamíferos. ^s Ma y Coronado, 1988.

2 Antecedentes Bibliográficos.

2.1 Intercambiador Na-Ca.

Reuter y Seitz (1968) basándose en el hallazgo que el flujo de salida de calcio desde células cardíacas se reducía al remover el sodio en el medio externo, propusieron que en músculo cardíaco existe un mecanismo que acopla los flujos de sodio y calcio. Baker y cols. (1967) encontraron resultados similares en axón gigante de calamar. Posteriormente, demostraron que el flujo de salida de sodio

dependía de la presencia de Ca^{2+} en el medio externo (Baker y cols., 1969). A partir de estos estudios, el intercambio Na-Ca se define operacionalmente como el flujo de calcio dependiente del sodio, *trans*, o como el flujo de sodio dependiente del calcio, *trans*.

Actualmente se acepta que el intercambiador Na-Ca se encuentra en la membrana plasmática de la mayoría de las células animales. En fibras musculares cardíacas, fibras musculares de picoroco y en axones gigantes de calamar, se ha demostrado que este sistema contratransporta un ion Ca^{2+} en intercambio por 3 iones Na^+ (Blaustein, DiPolo y Reeves, 1991). El procedimiento habitual que se emplea para determinar la existencia del intercambiador Na-Ca en células o en vesículas consiste en medir los flujos de entrada o salida de Na^+ o Ca^{2+} , y su dependencia recíproca de Ca^{2+} o Na^+ . Otra forma de constatar la presencia de un sistema de transporte de esta naturaleza es medir la concentración de Ca^{2+} citosólico y determinar si ésta varía en respuesta a los cambios en el gradiente electroquímico del sodio. Finalmente, también se pueden medir las corrientes iónicas producidas en respuesta a variaciones en la concentración de sodio o de calcio (Kimura y cols., 1987).

Una de las dificultades principales que se presenta para estudiar este sistema es que hasta el momento no se conocen inhibidores específicos. Uno de los inhibidores más utilizados es un derivado de amilorida, diclorobenzamil (Siegl

y cols., 1984). Sin embargo, se ha reportado que este compuesto también inhibe otros transportadores (Van Reuterghem y Frelin, 1993; Floreani y cols., 1987), lo que reduce su utilidad. Recientemente, se reportó que diclorobenzamil no inhibe el intercambiador al ser aplicado en la cara citoplasmática de células cardíacas.

La función celular que cumpliría este intercambiador sería la de transportar Ca^{2+} fuera de las células. En el corazón, luego de la estimulación, el intercambiador es el principal mecanismo responsable del flujo de salida de Ca^{2+} y compite por el Ca^{2+} citosólico con las Ca^{2+} -ATPasa del RS y el sarcolema (Bers, 1991) durante el proceso de relajación muscular.

La capacidad del intercambiador para regular la concentración de Ca^{2+} citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) está determinada por la dirección del transporte y por la magnitud de la tasa de intercambio. La dirección del transporte neto de Ca^{2+} depende de los gradientes químicos de Na^+ y de Ca^{2+} y del potencial de membrana; es decir de factores termodinámicos. La magnitud de la tasa de intercambio depende de factores tales como la afinidad del intercambiador por Na^+ y Ca^{2+} , la densidad de transportadores, y las tasas de recambio de las distintas etapas del proceso de transporte.

Los factores termodinámicos que determinan el intercambio pueden expresarse en términos del potencial electroquímico del intercambiador. Si consideramos que en todos los tejidos estudiados hasta el momento, se ha

demostrado que se intercambian 3 Na⁺ por cada Ca²⁺, la diferencia de potencial electroquímico del intercambio, $\Delta\mu_{\text{Na-Ca}}$, en la dirección de entrada de sodio y salida de calcio de la célula, está dada por la expresión:

$$(1) \quad \Delta\mu_{\text{Na-Ca}} = 3 \Delta\mu_{\text{Na}} + \Delta\mu_{\text{Ca}} \quad \text{donde:}$$

$$(2) \quad \Delta\mu_{\text{Na}} = R T \ln ([\text{Na}^+]_i / [\text{Na}^+]_e) + F \Delta V$$

$$(3) \quad \Delta\mu_{\text{Ca}} = R T \ln ([\text{Ca}^{2+}]_e / [\text{Ca}^{2+}]_i) - 2 F \Delta V$$

en el equilibrio tenemos que $\Delta\mu_{\text{Na-Ca}} = 0$, por lo que reemplazando (2) y (3) en (1) obtenemos que el potencial de equilibrio del intercambiador, $E_{\text{Na-Ca}}$, está dado por:

$$E_{\text{Na-Ca}} = \frac{-RT}{F} \ln \left\{ \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_e}{[\text{Ca}^{2+}]_i} \right) \left(\frac{[\text{Na}^+]_i}{[\text{Na}^+]_e} \right)^3 \right\}$$

donde R, T y F tienen sus significados habituales. Si el potencial de membrana, V_m , es igual a $E_{\text{Na-Ca}}$, entonces el transportador está en equilibrio termodinámico y este potencial corresponde al potencial de inversión (V_m). A potenciales de membrana más negativos que el potencial de inversión, existirá una corriente iónica de entrada de Na⁺ a la célula y el sistema de intercambio operará en la dirección de flujo de salida de Ca²⁺. A este modo de operación se denomina **modo directo**. A potenciales de membrana más positivos que V_m , existirá una corriente iónica de salida de Na⁺ y se producirá un flujo de entrada de Ca²⁺. A este modo de actuar del intercambiador se le denomina **modo reverso**. Además, es posible que el intercambiador, en condiciones no fisiológicas, funcione en el

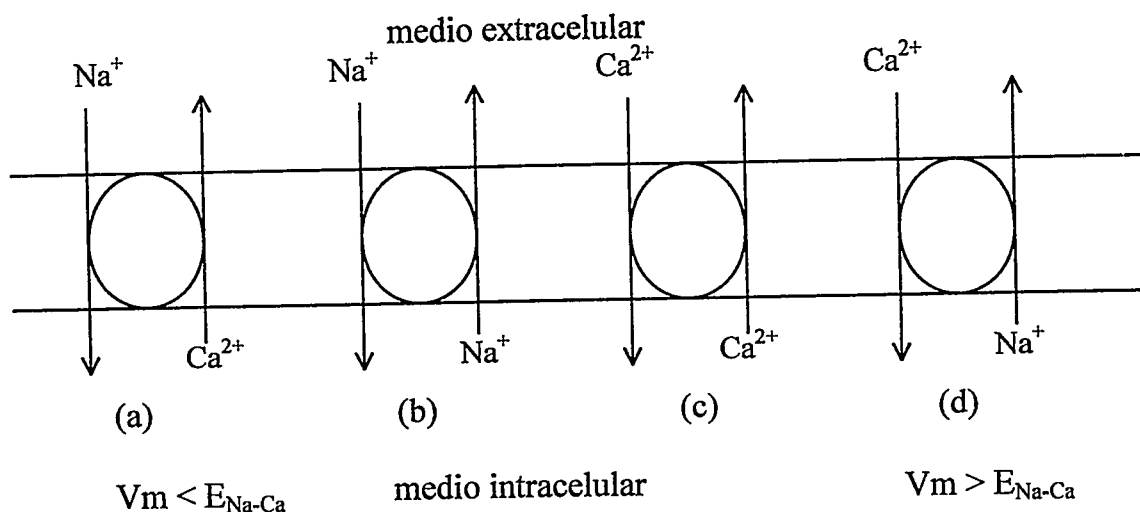


Figura 3. Modos de operación del intercambiador Na-Ca. Dependiendo del potencial electroquímico del sodio y del calcio, y del potencial de membrana, el intercambiador Na-Ca puede actuar: sacando Ca^{2+} de la fibra muscular o modo directo (a), o entrando calcio a la fibra muscular o modo reverso (d). También puede actuar en intercambio electroneuro Na^+-Na^+ (b) o $Ca^{2+}-Ca^{2+}$ (c). Los modos (a) y (d) son electrogénicos.

modo de intercambio electroneuro Na^+-Na^+ o $Ca^{2+}-Ca^{2+}$ (Fig. 3).

La tasa de recambio del intercambiador depende además de la modulación secundaria ejercida por distintos metabolitos, entre otros: ATP, H^+ , K^+ y Ca^{2+} (Hilgeman y cols., 1992; Schulze y cols., 1993).

En el caso particular del calcio, se ha descrito que el intercambiador de músculo cardíaco (Miura y Kimura, 1989), de fibras musculares de picoroco (Rasgado-Flores y cols., 1991) y de axón gigante de calamar (DiPolo, 1979), posee un sitio intracelular de unión de Ca^{2+} que debe tener calcio unido para que

el intercambiador Na-Ca pueda operar. La proteólisis parcial del intercambiador con α -quimiotripsina provoca la pérdida de la regulación por Ca^{2+} la activación permanente del intercambiador Na-Ca, siendo innecesaria la unión de calcio al sitio intracelular (Rasgado-Flores y cols., 1991; Espinosa-Tanguma y cols., 1993). En axón gigante de calamar, se ha demostrado que la afinidad por calcio de este sitio modulador, en ausencia de ATP, está en el rango micromolar ($K_d = 4-8 \mu\text{M}$) y aumenta a valores submicromolares ($K_d = 0,4-0,8 \mu\text{M}$) en presencia de ATP (DiPolo y Beaugé, 1991). Si la concentración citosólica de Ca^{2+} es $\leq 0,1 \mu\text{M}$, el intercambiador de axón gigante de calamar no funciona. El efecto de ATP en este tejido se debería a la activación de una proteína quinasa (DiPolo y Beaugé, 1991). En cardiocitos, el efecto de ATP se debería a la activación de una quinasa de fosfatidilinositol (PI), lo que produciría la síntesis de PIP₂ (fosfatidil inositol bisfosfato), el cual activaría el intercambiador (Hilgeman y Ball, 1996). No se ha descrito en cardiocitos que el ATP produzca un cambio en la afinidad por calcio del sitio regulador.

2.2 Intercambiador Na-Ca en músculo cardíaco.

Como ya se mencionó, Reuter y Seitz (1968) asociaron el flujo de salida de Ca^{2+} con la presencia de sodio en el medio externo y sugirieron que el músculo cardíaco poseía un intercambiador Na-Ca. Reeves y Sutko (1979) demostraron

actividad de intercambio Na-Ca en una preparación de vesículas aisladas de membrana plasmática de músculo cardíaco. Posteriormente, se demostró que el intercambiador es electrogénico (Reeves y Sutko, 1980; Philipson y Nishimoto, 1980).

El intercambiador Na-Ca de músculo cardíaco es un mecanismo importante para regular la concentración citosólica de calcio. Durante la excitación, el Ca^{2+} entra al cardiocito a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje e induce la liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático (Fabiato, 1983). Durante la relajación, la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica disminuye porque el Ca^{2+} es secuestrado dentro del retículo sarcoplasmático y es simultáneamente removido de la célula por el intercambiador (Bers, 1991).

Se ha postulado que el intercambiador también sería capaz de promover una entrada de calcio suficiente para provocar la liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático (LeBlanc y Hume, 1990; Lederer, Niggli y Hadley, 1990). LeBlanc y Hume (1990) postularon que el sodio que entra durante el potencial de acción a las células cardíacas, vía los canales de sodio, se acumularía en un espacio de difusión restringida localizado bajo el sarcolema. Este aumento local de la concentración de sodio promovería el funcionamiento del intercambiador Na-Ca en el modo reverso, produciendo entrada de calcio vía el intercambiador, lo que podría provocar la liberación de calcio inducida por calcio

desde el RS. Está en discusión si este mecanismo tiene importancia fisiológica (Sham y cols., 1992).

Estudios inmunohistoquímicos han mostrado que el intercambiador Na-Ca se ubica preferentemente en la membrana de los túbulos-t de los cardiocitos (Frank y cols., 1992). Otros autores han encontrado que el intercambiador Na-Ca de músculo cardíaco se distribuye de igual manera en la membrana de la superficie como en los túbulos-t (Kieval y cols., 1992).

El intercambiador Na-Ca fue parcialmente purificado a partir de una preparación de sarcolema de músculo cardíaco de perro (Philipson y cols., 1988). El análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, combinado con el uso de anticuerpos policlonales contra el intercambiador, reveló la presencia de 3 bandas proteicas, con masas moleculares de 160, 120 y 70 kDa. De estas, existe consenso que la banda de 120 kDa representa al intercambiador; se piensa que la banda de 70 kDa se originaría por proteólisis (Iwata y cols., 1995) aunque existe la posibilidad que corresponda a una isoforma activa más corta del intercambiador (Gabellini y cols., 1996), y no se conoce el origen de la banda de 160 kDa.

Se ha clonado y secuenciado el intercambiador cardíaco, encontrándose que codifica una proteína de 938 aminoácidos con un peso molecular de 110 kDa. A esta isoforma se la denominó NCX1 (Nicoll, Longoni y Philipson, 1990). El modelo estructural, generado a partir del perfil de hidrofobicidad, postula 11

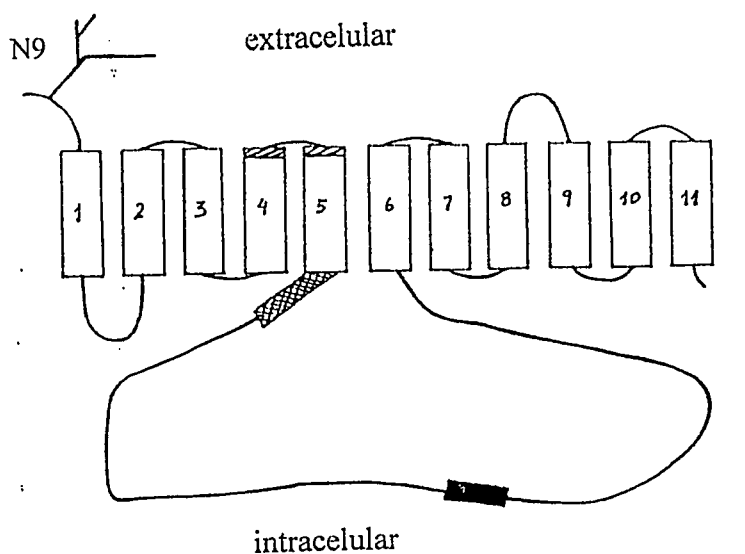


Figura 4. Esquema propuesto de la topología del intercambiador Na-Ca de músculo cardíaco. El diagrama se basa en el perfil de hidropatía y sugiere la presencia de 11 segmentos transmembrana, con una gran porción intracelular entre los segmentos transmembrana 5 y 6. Existe un probable sitio de glicosilación en la posición N9; en el segmento intracelular se encuentra una región con actividad inhibitoria del intercambiador (▨, 219-238) y los probables sitios de unión de Ca^{2+} (■, 371-508). Se muestra además, la región con homología a la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (▧, 180-202). Tomado de Nicoll y Philipson (1991).

segmentos de transmembrana y un gran dominio hidrofílico, probablemente intracelular (Figura 4).

Los estudios de hibridación determinaron que los transcritos del intercambiador son más abundantes en tejido cardíaco, aunque también están presentes en niveles variables en cerebro, pulmón, riñón, hígado, páncreas y

músculo esquelético (Kofuji y cols. 1992). Los estudios a nivel genómico han mostrado que un sólo gen codifica al intercambiador de tipo cardíaco, y que por procesamiento alternativo se puede producir las isoformas encontradas en los otros tejidos (Kofuji y cols. 1994). Se demostró que el gen que codifica la isoforma NCX1 se ubica en el cromosoma 17 de rata (Nicoll y cols., 1996b).

Recientemente se ha clonado a partir de una genoteca de cerebro de rata otra isoforma del intercambiador Na-Ca, denominada NCX2. Esta isoforma parece ser el producto de un gen diferente al que codifica a la isoforma NCX1, puesto que se localizaría en el cromosoma 7 de rata (Nicoll y cols., 1996b). La secuencia de este clon predice una proteína de 912 aminoácidos (aproximadamente 110 kDa). Las isoformas NCX1 y NCX2 son 61 y 65 % idénticas a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Los transcritos de NCX2 fueron detectados originalmente sólo en cerebro y músculo esquelético (Li y cols., 1994). En reportes preliminares, el laboratorio de Philipson ha mostrado que el ARNm de la isoforma NCX2 puede ser amplificado desde casi todos los tejidos, excepto hígado (Quednau y cols., 1996). Recientemente, estos autores han descrito el clonamiento de una tercera isoforma del intercambiador Na-Ca desde una genoteca de cerebro de rata (Nicoll y cols., 1996a,b). A nivel de secuencia de aminoácidos, esta tercera isoforma posee un 73% de identidad con NCX1 y un 75% de identidad con NCX2. Al igual que NCX2, mediante la

técnica de Northern los transcritos de NCX3 sólo han sido detectados en cerebro y músculo esquelético.

2.3 El intercambiador Na-Ca de músculo esquelético.

Los estudios realizados para caracterizar el intercambiador Na-Ca de músculo esquelético son escasos. Cosmos y Harris (1961), demostraron que al disminuir el sodio externo aumentaba la ganancia de Ca^{2+} en las fibras de músculo sartorio de anfibios. Este aumento se produce en 10 minutos aproximadamente. Estos autores propusieron una competencia de sodio y calcio por sitios de unión de naturaleza aniónica.

Posteriormente, Caputo y Bolaños (1978) demostraron que la salida de Ca^{2+} en fibras musculares de rana mostraba 3 componentes cinéticos principales: uno dependiente de la concentración de Na^+ extracelular, otro dependiente de la concentración de Ca^{2+} extracelular y un tercero que persiste en la ausencia de estos cationes. Basados en estos resultados, plantearon la presencia del intercambiador Na-Ca en músculo esquelético, y concluyeron que la disminución del flujo de salida de calcio, en ausencia de sodio externo, se debía a la "inhibición del intercambiador Na-Ca".

Recientemente, Hoya y Venosa (1995) trabajando con fibras musculares provenientes de músculo esquelético de una especie diferente de anfibio, no

podieron detectar la actividad del intercambiador Na-Ca en fibras en reposo. Sólo en presencia de cafeína, que estimula la salida de calcio desde el RS al citoplasma, pudieron determinar cambios en la cinética del flujo de salida de calcio atribuibles al intercambiador.

Gilbert y Meissner (1982) y Mickelson y cols. (1985) demostraron que los flujos de calcio en vesículas de sarcolema de músculo esquelético de conejo y de cerdo, respectivamente, eran estimulados por un gradiente de sodio, lo que es consistente con la presencia del intercambiador Na-Ca en estas preparaciones. Sin embargo, estos autores no realizaron estudios detallados sobre las propiedades de estos flujos acoplados, ni determinaron el contenido relativo de túbulos-t y membrana de superficie de las vesículas usadas.

Posteriormente, Donoso e Hidalgo (1989) demostraron que las vesículas de túbulos-t de músculo esquelético de anfibio (selladas interior-afuera) eran capaces de acumular Ca^{2+} si se pre-equilibraban con sodio (presencia de sodio intravesicular), y encontraron que la cantidad de calcio acumulado era directamente proporcional a la $[\text{Na}^+]$ intravesicular. Además, observaron que la velocidad de captación de Ca^{2+} , que en vesículas interior-afuera corresponde a la salida de calcio de la célula, aumentaba con el aumento de la concentración de Ca^{2+} externo, informando un K_m aparente para calcio (citosólico) de $2,7 \mu\text{M}$. Estos estudios entregaron la primera evidencia en favor de la idea que el

intercambiador Na-Ca estaba presente en los túbulos-t y que realizaba intercambio en el modo directo.

En la Tabla 2 se muestran algunas de las propiedades informadas del intercambiador Na-Ca de músculo esquelético.

Tabla 2. Propiedades del intercambiador Na-Ca en membranas plasmáticas aisladas de músculo esquelético.

Preparación	temp °C	Entrada de Ca ²⁺ dependiente de sodio		Salida de Ca ²⁺ dependiente de sodio
		velocidad nmol/mg/min	K _{0.5} μM	velocidad nmol/mg/min
Sarcolema de conejo ^a	37°	6,25	28	3,11
Sarcolema de conejo ^b	37°	--	--	24
Sarcolema de cerdo ^c	37°	--	--	50
Túbulos-t de anfibio ^d	25°	54	2,7	50-90 *

* Medición en ausencia de Ca²⁺ extravésicular. ^a(Gilbert y Meissner, 1982); ^b(Michalak y cols., 1984); ^c(Mickelson y cols., 1985); ^d(Donoso e Hidalgo, 1989; Hidalgo y cols., 1991). Las preparaciones de sarcolema contienen túbulos-t y membrana de superficie en proporciones no conocidas.

Usando un método experimental diferente, consistente en medir las contracturas en fibras musculares esqueléticas aisladas de anfibios, se demostró que la superfusión de las fibras con soluciones sin sodio provoca un aumento en la amplitud de las contracturas inducidas ya sea por cafeína (Kawata y Fujishiro,

1990; García y cols, 1992), o por estimulación con soluciones con alto contenido de K^+ (García y cols, 1992). Estos autores postulan que al disminuir la concentración de sodio en las soluciones externas, el intercambiador Na-Ca funcionaría en el modo reverso, aumentando la concentración de Ca^{2+} citosólico. Este aumento de calcio produciría liberación de calcio inducida por calcio en el RS y potenciaría las contracturas.

Hasta el momento, sin embargo, no hay estudios que caractericen al intercambiador Na-Ca funcionando en el modo reverso. Los estudios a este respecto realizados en vesículas de túbulos-t de anfibios son preliminares (Donoso e Hidalgo, 1989). En fibras musculares aisladas no se ha determinado si efectivamente aumenta el Ca^{2+} citosólico al superfundir las fibras con soluciones con un bajo contenido de sodio. Tampoco se ha determinado si al disminuir el sodio externo se induce la activación de una corriente iónica debida al intercambiador Na-Ca, como se ha hecho en músculo cardiaco, o si estos cambios provocan la liberación de calcio inducida por calcio, como fue sugerido por García y cols. (1992).

3 ***Hipótesis***

La hipótesis que se plantea en esta tesis es que el intercambiador Na-Ca está presente en la membrana de los túbulos transversales de las fibras musculares

esqueléticas de anfibio, y que opera tanto en el modo reverso como en el modo directo.

El funcionamiento del intercambiador en el modo reverso, entrada de calcio a las células, debiera producir flujos de salida de calcio desde las vesículas de túbulos-t (selladas interior-afuera) acoplados a flujos de entrada de sodio, en tanto que en fibras musculares debiera generar un aumento en la concentración de calcio citosólico y una corriente iónica de salida (de sodio). Por otra parte, el funcionamiento del intercambiador en el modo directo, salida de calcio de las células, debiera producir flujos de entrada de calcio a las vesículas (selladas interior-afuera) acoplados a flujos de salida de sodio, y corrientes iónicas de entrada (de sodio) junto con una disminución del calcio citosólico en fibras musculares.

4 Objetivos.

Como objetivos principales se propusieron: 1) Estudiar el intercambiador en vesículas de túbulos-t aisladas de músculo esquelético de anfibios operando en el modo reverso y 2) Estudiar los cambios de concentración de calcio intracelular y las corrientes iónicas producidas en respuesta a variaciones en los gradientes electroquímicos de sodio y calcio en fibras musculares aisladas.

Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- i) Caracterizar la preparación de vesículas de túbulos-t, midiendo la densidad de receptores de dihidropiridinas como un índice de purificación, y estudiar la unión de ouabaína (total y latente) para determinar el porcentaje de vesículas selladas.
- ii) Estudiar los modos de operación del intercambiador en vesículas, midiendo los flujos de entrada y salida de calcio, y estudiar la posible regulación ejercida por calcio y sodio extravesiculares.
- iii) Investigar por inmunodetección la presencia de las isoformas del intercambiador Na-Ca en vesículas de túbulos-t.
- iv) Estudiar en fibras musculares aisladas los cambios en la concentración de calcio intracelular y las corrientes iónicas mediados por el intercambiador, en respuesta a un aumento del calcio intracelular y en respuesta a la remoción del sodio externo.

Se escogió estudiar el intercambiador Na-Ca en músculo esquelético de anfibios por las siguientes razones principales:

- i) La posibilidad de medir simultáneamente en fibras los cambios en la concentración de calcio intracelular y corrientes iónicas (objetivo iv). y ii) La posibilidad de comparar las propiedades del intercambiador con los estudios electrofisiológicos del músculo esquelético, realizados mayoritariamente en anfibios.

METODOS

1 Preparación de vesículas de túbulos-t.

Se aislaron las membranas de túbulos-t desde músculo esquelético del anfibio *Caudiverbera caudiverbera* o del anfibio *Rana catesbiana*, siguiendo el método descrito por Hidalgo y cols. (1986b). Todo el procedimiento descrito a continuación se realizó en una cámara fría. Se disecaron los músculos de las patas traseras de los animales, se limpiaron de tejido conectivo y vasos sanguíneos, se trituraron con tijera y luego se homogeneizaron en una licuadora (Waring Blendor, 30 y 20 seg. a baja velocidad) con 4 volúmenes de tampón A (mM: Tris-maleato 20, KCl 100; pH:7,2). El homogeneizado resultante se centrifugó a 8000 x g por 30 min. (rotor JA14, Beckman); el sedimento obtenido se volvió a homogeneizar en licuadora y centrifugar, repitiendo este procedimiento dos veces. Los sobrenadantes obtenidos en cada paso se filtraron por varias capas de gasa. Para solubilizar las proteínas contráctiles se adicionó KCl sólido (hasta alcanzar una concentración final de 0,6 M) y se centrifugó a 100.000 x g por 1 hora (rotor 30 o rotor TFT50.38). Los sedimentos acumulados se resuspendieron en 50 mL aproximadamente de buffer A y se homogeneizaron usando homogenizador vidrio/vidrio, luego se completó hasta un volumen de 250-

300 mL con tampón A y se volvió a centrifugar a 100.000 x g por 1 hora. El sedimento final se resuspendió en 15-18 mL de tampón B (mM: Tris-maleato 20, sacarosa 300; pH:7,2), se homogeneizó usando homogenizador vidrio/vidrio, y se depositó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa formado por las siguientes soluciones: (% p/v:mL) 50:4; 45:4; 37,5:5; 27,5:8; 25:5. Este gradiente se centrifugó toda la noche (12-14 horas, rotor SW25.1) a 22.000 r.p.m. Las bandas de proteínas se recuperaron por aspiración manual, se diluyeron con tampón B y se centrifugaron a 100.000 x g por 1 hora (Rotor 30 o TFT50.38). El sedimento correspondiente a cada banda se resuspendió y homogeneizó con tampón B, y se separó en pequeñas alícuotas (50 y 100 μ L). Las alícuotas se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron en un congelador, a -80 °C, hasta el momento de su uso. La concentración de proteínas de cada fracción se determinó por el método de Hartree (1972) usando albúmina sérica de bovino como estándar.

2 Ensayos de unión.

2.1 Unión de [³H]ouabaína.

La unión de [³H]ouabaína se midió utilizando el método descrito por Hidalgo y cols. (1986b). El medio de ensayo consistía de 0,3 mL de: (mM) NaCl 120, MgCl₂ 10, EGTA 1, ATP 15, Tris-HCl 40, pH:7,4 y [³H]ouabaína 100 nM. Se utilizaron 6-8 μ g de proteínas por ensayo. Después de incubar a 37 °C por 60

minutos, 270 μ L de cada muestra se filtraron rápidamente, mediante succión, a través de filtros Millipore. Los filtros se lavaron dos veces con 4 mL de la solución de ensayo (sin ATP) enfriada en hielo, se secaron y la radiactividad retenida en ellos se midió en un contador de centelleo líquido. La unión no específica se determinó en ausencia de ATP y en presencia de ouabaína no radiactiva 1 μ M. Para obtener la unión máxima, las vesículas se permeabilizaron con saponina (0,2 mg/mL) en el medio de ensayo. Los resultados se expresan como $\bar{x} \pm SD$ de n determinaciones independientes realizadas por triplicado.

2.2 Unión de [3 H]nitrendipina.

Los ensayos de unión de [3 H]nitrendipina se realizaron siguiendo el método descrito por Fosset y cols. (1983), en un ambiente con luz tenue debido a la fotosensibilidad de los derivados de dihidropiridinas. El medio de ensayo consistía de: (mM) Cloruro de Colina 140 ó NaCl 140; Tris-HCl 50, pH:7,4 y [3 H]nitrendipina 0,5 a 10 nM. Se utilizaron aproximadamente 10 μ g de proteínas por ensayo, en un volumen final de 300 μ L. Las muestras se incubaron por 60-80 minutos a 10 $^{\circ}$ C, y se detuvo la reacción filtrando rápidamente 270 μ L de cada ensayo a través de filtros de fibra de vidrio tipo B. Los filtros se lavaron dos veces con 4 mL con solución de lavado enfriada en hielo, se secaron y la radiactividad retenida en ellos se midió en un contador de centelleo líquido. La

unión no específica se obtuvo en presencia de nifedipina $1\mu\text{M}$. Los resultados se expresan como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de n determinaciones independientes realizadas por triplicado.

A los datos experimentales se ajustó una función del tipo: $B = B_m S / (S+K_d)$, donde B es el ligando unido, B_m es la unión máxima, K_d es la constante de disociación y S representa la concentración del ligando libre utilizado. Para realizar este ajuste se utilizó un programa de regresión no lineal.

3 Medición del intercambiador Na-Ca.

La cinética de intercambio de una sustancia entre dos fases separadas por una membrana, se describe por las siguientes ecuaciones (Lakshminarayanaiah, 1984):

i) el flujo de entrada de una sustancia hacia un compartimento interno está dado por:

$$C_i = C_o [1 - \exp(-k t)], \quad \text{donde:}$$

C_i y C_o son las concentraciones de la sustancia en los compartimentos internos y externos, respectivamente, y k es la constante de velocidad.

ii) el flujo de salida de una sustancia desde un compartimento interno está dado por:

$$C_i = C_i^o \exp(-k t), \quad \text{donde:}$$

C_i y C_i^o son las concentraciones en los compartimentos internos a tiempo t y a tiempo $= 0$, respectivamente, y k es la constante de velocidad del proceso.

3.1 Flujos de entrada de calcio.

Las vesículas de túbulos-t se incubaron con CaCl_2 2 mM (15-20 mCi ^{45}Ca /mmol Ca) a 5°C o 25°C por tiempos variables, en una solución de (mM): gluconato de potasio 10, Hepes-Tris 150, pH:7,4, valinomicina $1\mu\text{M}$. Para detener la reacción de entrada y medir el ^{45}Ca retenido en las vesículas, se tomaron alícuotas de $10\ \mu\text{L}$ y se agregaron sobre 1 mL de solución de detención (mM: MgCl_2 5, EGTA-Tris 10, LaCl_3 10, Hepes-Tris 140, pH:7,4.) e inmediatamente se filtraron, mediante succión, a través de filtros Millipore (HA, $0.45\mu\text{m}$). Los filtros estaban humedecidos en (mM): CaCl_2 0,1, MgCl_2 5, Hepes-Tris 20, pH:7,4. Los filtros se lavaron 3 veces con 3 mL de solución de detención enfriada en hielo, se secaron y se midió la radiactividad retenida utilizando un contador de centelleo líquido.

3.1.1 *Entrada de calcio vía intercambio Ca-Ca.*

Se utilizó una preparación de vesículas previamente equilibradas por 2 horas con CaCl_2 2 mM, en condiciones idénticas a las anteriores, luego se agregó una alícuota de ^{45}Ca y se midió la entrada de Ca siguiendo el protocolo ya descrito en la sección 3.1.

3.2 Flujos de salida de Ca.

Las vesículas se equilibraron con CaCl_2 2 mM por 2-3 horas en condiciones idénticas a las anteriormente descritas en la sección 3.1. Para iniciar la salida de Ca, una alícuota de estas vesículas se diluyó 100 veces en alguno de los medios de salida descritos en la Tabla 3. Rápidamente se filtró 1 mL de esta mezcla a través de filtros Millipore a distintos tiempos, y se siguió el método descrito para lavar y contar la radiactividad en ellos. Para medir el efecto del calcio extravesicular sobre la velocidad de salida de Ca, se utilizaron medios similares al medio (c) sodio-calcio, tamponados con distinta concentración de Ca^{2+} (pCa entre 5 y >9), preparados a partir de mezclas de EGTA- Ca^{2+} o HEDTA- Ca^{2+} , utilizando los valores de las constantes de disociación publicadas. Se tuvo especial cuidado de tamponar a pH:7,4 todas las soluciones.

Tabla 3. Composición de los medios de salida de Ca.

(en mM)	(a) sodio, cero calcio	(b) cero sodio. cero calcio	(c) sodio, calcio
NaCl	140	0	140
KCl	10	10	10
Hepes-Tris, pH:7,4	20	160	20
EGTA	10	10	0
valinomicina (μM)	1	1	1

Para medir el efecto de sodio sobre el intercambiador se midió la salida de Ca en medio similar al de la columna (a), pero con: Na^+ 120, 90, 60 ó 30 mM y EGTA 10 mM.

Los experimentos de flujos se realizaron en 2 o 3 determinaciones en N preparaciones independientes y los resultados se expresan como $\bar{x} \pm \text{SD}$.

4 Inmunodetección del intercambiador Na-Ca.

Los anticuerpos primarios denominados $\Pi 8-10$, que reconocen la isoforma cardíaca del intercambiador (NCX1), fueron preparados contra el intercambiador parcialmente purificado desde sarcolema de músculo cardíaco de perro (Philipson y cols., 1988). Los anticuerpos que reconocen la isoforma NCX2, presente en cerebro y en músculo esquelético de rata, fueron preparados contra un péptido formado por los residuos 333 a 635 de esta isoforma, residuos que se supone forman parte de la porción intracelular del intercambiador (Philipson, comunicación personal). Como controles positivos se utilizaron un fragmento peptídico de la isoforma NCX2, péptido que fue expresado en bacteria, y una preparación de sarcolema de músculo cardíaco. Ambos anticuerpos y los controles positivos respectivos fueron donados gentilmente por el Dr. Kenneth Philipson del Cardiovascular Research Laboratory (UCLA School of Medicine).

Las proteínas presentes en la preparación de vesículas de túbulo-t se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8,5%; las condiciones de corrida fueron: 70 mV y 90-100 mV en el gel de concentración y separación respectivamente. Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron en el tampón de transferencia (mM: Tris 3,1, glicina 24, metanol 10%) por 20 minutos, luego las proteínas se transfirieron al papel de nitrocelulosa usando un equipo estándar BioRad. Las condiciones de transferencia fueron 100 V por 1 hora (250-330 mA). Finalizada la transferencia, y para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos al papel de nitrocelulosa, el papel con las proteínas se incubó toda la noche o durante dos horas en un tampón que contenía albúmina sérica de bovino 1% y leche descremada 3%. Todo el procedimiento descrito a continuación se realizó a temperatura ambiente y con agitación suave: el papel con las proteínas se incubó por 2 horas con uno de los anticuerpos primarios (NCX1 o NCX2) diluido 1:300, se lavó tres veces por 10 minutos con la solución tampón, luego se agregó el segundo anticuerpo diluido 1:2000 y se incubó por 2 horas; se lavó nuevamente 3 veces, por 10 minutos cada vez, con solución tampón. La detección de los anticuerpos secundarios unidos se realizó mediante la técnica de quimio-luminiscencia aumentada usando reactivos comerciales (Amersham). Inmediatamente de producida la reacción de quimio-luminiscencia se expuso una placa de autoradiografía hasta obtener una buena señal.

5 Registros Electrofisiológicos.

5.1 Registro de corrientes iónicas en fibras musculares aisladas.

Para registrar las corrientes iónicas en fibras musculares aisladas del músculo semitendinoso de *Rana catesbiana*, se usó la técnica de Hille y Campbell de triple sello de vaselina (Hille & Campbell, 1976). Se utilizó una cámara de registro modificada, la que permite ser usada en conjunto con registros ópticos (Vergara, Delay, Heiny & Ribalet, 1983; Ashcroft, Heiny & Vergara, 1985). El esquema se ilustra en la Figura 5. Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio del Dr. Julio Vergara (UCLA School of Medicine).

La fibra muscular se estimula eléctricamente, bajo condiciones de control de corriente (current-clamp) o control de potencial (voltage-clamp), usando cuatro electrodos ubicados en los respectivos segmentos. La diferencia de potencial eléctrico en el segmento A se mide y se usa como señal de retroalimentación en los experimentos de control de potencial. Las corrientes de membrana se normalizaron por la capacitancia de las fibras y se expresan como $\mu\text{A}/\mu\text{F}$. Se utiliza esta normalización, en vez de expresar la densidad de corriente por centímetro cuadrado de membrana externa, para evitar posibles errores en la estimación del área de la membrana externa del segmento A. La capacitancia de la fibra (μF) se estimó de la integral de las corrientes transitorias producidas por pulsos hiperpolarizantes.

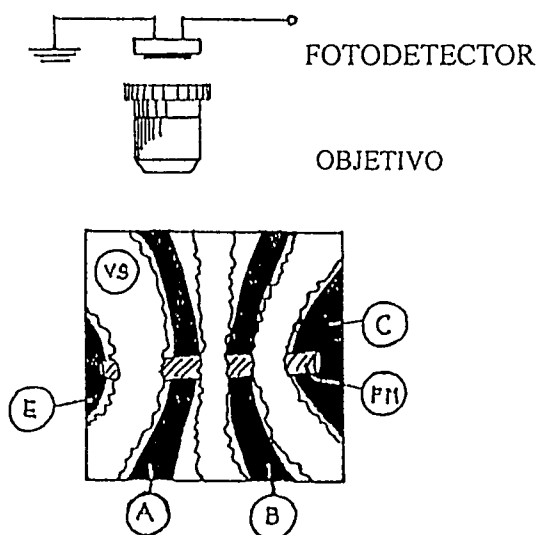


Figura 5. Esquema de la preparación de fibra muscular aislada. Un trozo de fibra muscular (FM) se monta en la cámara de registro, formando cuatro segmentos pequeños separados eléctricamente por tres sellos de Glisseal (VS). Los segmentos se designan: E, A, B, C. Los extremos cortados de la fibra, segmentos E y C, se permeabilizaron con saponina; luego de lavar la saponina se agrega soluciones que semejan un medio intracelular y que pueden difundir al interior de la fibra. El segmento B se baña externamente con una solución isotónica de potasio y se usa como referencia a tierra. La porción de fibra del segmento A se superfunde con soluciones externas de composición variable. La temperatura del registro fue de 15°C.

5.2 Registro de las variaciones del Ca^{2+} citosólico usando colorantes fluorescentes.

La cámara de registro, que permite iluminar una porción del segmento A de la fibra muscular por medio de una fibra óptica, se montó en un microscopio equipado con un dispositivo de epifluorescencia. Los colorantes indicadores de Ca^{2+} (Fluo-3 y CaOrange-5N) se agregaron en la solución interna que baña a los segmentos E y C (Figura 5). Se esperó 40-60 minutos para que los colorantes difundieran al interior de las fibras, de modo de obtener una fluorescencia basal constante.

La fluorescencia emitida por estos colorantes se colectó a través del objetivo del microscopio y se enfocó en un fotodiodo, para ser posteriormente amplificada. Las señales correspondientes a la fluorescencia, la corriente y el voltaje se adquirieron digitalmente en un computador en línea y se grabaron simultáneamente en una video grabadora, para ser digitalizadas y analizadas posteriormente.

La liberación de calcio al interior del segmento A de la fibra muscular, se realizó por fotólisis del complejo DM-nitrophen: Ca^{2+} mediante disparos (flashes) de luz ultravioleta (347 nm; 30 nseg) generados por un láser de rubí (Lumonics, UK). La luz UV se enfocó en el extremo de una fibra óptica con un lente condensador de cuarzo. El DM-nitrophen tiene una K_d aparente para Ca^{2+} de 5 nM, en tanto que los productos derivados de su fotólisis poseen una afinidad por

Ca^{2+} de 3 mM (Zucker, 1994). Esta disminución en la afinidad produce la rápida liberación de Ca^{2+} .

5.3 Propiedades de los colorantes indicadores de Ca^{2+} .

Para determinar la K_d de los colorantes Fluo-3 y CaOrange-5N se utilizaron soluciones estándar de pCa conocido (Molecular Probes). Se preparó una solución de 300 μM de cada colorante disuelta en las soluciones de pCa controlado y se midió la fluorescencia en una pequeña cubeta hecha de cubreobjetos, en el microscopio de epifluorescencia utilizado en los registros electrofisiológicos.

6 Materiales.

5-metil- $[\text{}^3\text{H}]$ nitrendipina, $[\text{}^3\text{H}]$ ouabaína y ^{45}Ca provinieron de DuPont-New England Nuclear Research Products (Boston, MA). Nifedipina, y la mayor parte de los reactivos se obtuvieron de Sigma. Los filtros de nitrocelulosa, HA de 0,45 μm , se obtuvieron de Millipore, y los filtros de fibra de vidrio, tipo B, de Watman o Sigma. Fluo-3 y CaOrange-5N provinieron de Molecular Probes (Eugene, OR), y DM-nitrophen, de Calbiochem (La Jolla, CA). En la inmunodetección se utilizaron reactivos Amersham (RPN 2108 e Hyperfilm-ECL). En la transferencia de las proteínas se utilizó el equipo BioRad Mini Trans-Blot (BioRad) y papel de nitrocelulosa (Immobilon-P) proveniente de Millipore.

RESULTADOS

1 Caracterización de las vesículas de túbulos transversales.

Los receptores de dihidropiridinas (DHP) se localizan preferentemente en la membrana de los túbulos-t del músculo esquelético, de modo que sirven de marcadores de membrana tubular. El método utilizado para aislar las vesículas de túbulos-t produce una fracción de membranas con alta densidad de sitios de unión de derivados de DHP (79 ± 21 pmol [^3H]nitrendipina / mg proteína, $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$). La alta densidad de sitios de unión de dihidropiridinas indica que esta fracción de membrana proviene preferentemente de los túbulos-t de la fibra muscular.

El rendimiento obtenido es de sólo 0,5 a 1,5 mg de proteínas de membranas por 100 gramos de músculo fresco. En esta fracción vesicular están presentes numerosas proteínas, como lo demuestra la electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (Fig. 6). Si bien no todas las proteínas están identificadas, se sabe que en la membrana de los túbulos-t están presentes: Mg^{2+} -ATPasa, canales de Na^+ , canales de K^+ , canales de Ca^{2+} (tipo L), Ca^{2+} -ATPasa (PMCA 1) y enzimas del ciclo del inositol 1,4,5-trisfosfato (Hidalgo y cols., 1986c).

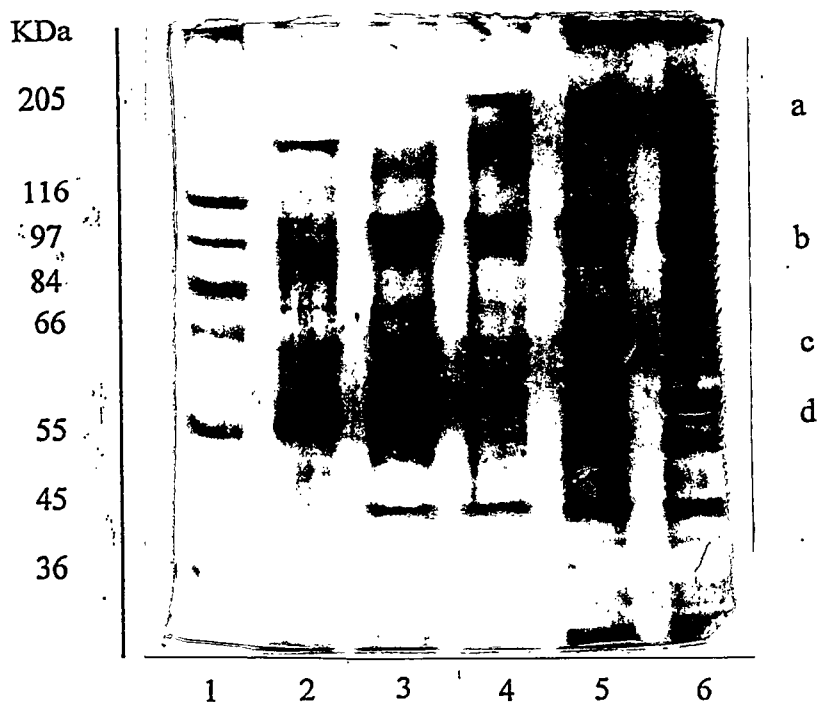


Figura 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las distintas fracciones de membrana. La fracción microsomal del músculo esquelético de *Caudiverbera caudiverbera*, obtenida a 100.000 g, se separó en una gradiente discontinua de sacarosa, y las distintas fracciones obtenidas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8,5%. La fotografía muestra en el carril: (1) marcadores de peso molecular, (2) túbulos-t de sapo, (3) retículo pesado de sapo (R3), (4) retículo pesado de sapo (R3) (contaminado con proteínas contráctiles), (5) tríadas de sapo y (6) tríadas de conejo. Cada carril contiene aproximadamente 20 μg de proteínas y el gel fue teñido con azul de Coomassie. Se indica las posiciones de la miosina (a), la Ca^{2+} -ATPasa de RS (b), la calsequestrina de rana (c) y de conejo (d). Nótese que las membranas de túbulos-t (carril 2) no poseen ni Ca^{2+} -ATPasa (SERCA 1) ni calsequestrina, marcadores específicos de RS.

Una de las características de esta preparación, que la hace útil en los estudios de transporte, es que está formada mayoritariamente por vesículas selladas en la configuración interior-afuera. El porcentaje de vesículas selladas se obtiene determinando la unión de [³H]ouabaína dependiente de ATP y calculando la relación entre la unión de ouabaína en una preparación intacta con respecto a la unión máxima obtenida en una preparación permeabilizada con detergentes (Hidalgo y cols., 1986b). La ouabaína y el ATP no son permeables y presentan sus respectivos sitios de unión en lados opuestos de la membrana. Al permeabilizar las vesículas con detergentes, como saponina, quedan expuestos los sitios de unión para ambos compuestos, por lo que se obtiene la unión máxima de [³H]ouabaína. En ausencia de detergente sólo las vesículas no selladas (las cuales tienen ambas caras de la membrana accesibles a ouabaína y ATP) unen [³H]ouabaína. Durante este trabajo se utilizaron preparaciones con 88 ± 30 pmol [³H]ouabaína / mg proteína ($\bar{x} \pm SD$, n=8), y con 80-85% de las vesículas selladas. Hidalgo y cols. (1986b) demostraron que el 100% de las vesículas se sellan con la configuración interior-afuera; es decir, exponiendo la cara citoplasmática al medio externo.

2 Flujos de calcio.

En esta sección de la Tesis se describen los estudios realizados para caracterizar el funcionamiento del intercambiador actuando en el modo reverso en vesículas de túbulos-t de músculo esquelético del anfibio *Caudiverbera caudiverbera*, para lo cual se midieron los flujos de salida de calcio dependientes de sodio extravesicular. Se caracterizó, en particular, el efecto de modificar las concentraciones de calcio y sodio extravesiculares sobre la velocidad de salida de calcio. Al iniciar los estudios preliminares del trabajo de Tesis sólo se había caracterizado en estas vesículas el intercambiador Na-Ca funcionando en el modo directo (Donoso e Hidalgo, 1989), reportándose la Km aparente para Ca^{2+} y el efecto de Na^+ intravesicular sobre la velocidad de entrada de Ca^{2+} .

2.1 Flujos de entrada de calcio.

Como una primera estrategia para medir flujos de salida de calcio de las vesículas, se determinó la capacidad de carga de las vesículas con calcio, y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio a distintas temperaturas. Al incubar las vesículas en un medio con calcio, sin ATP (para evitar el funcionamiento de la bomba de Ca^{2+}) y a $V_m = 0$ (de modo que los canales de Ca^{2+} estén inactivados), los flujos de entrada de Ca^{2+} a las vesículas se podrían deber a (Figura 7):

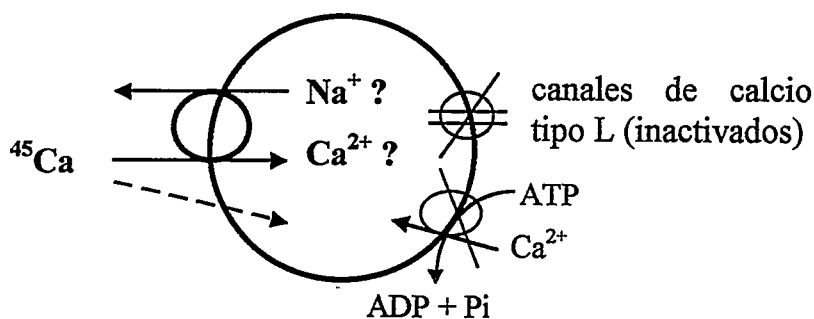


Figura 7. Posibles vías de entrada de Ca^{2+} a las vesículas de túbulos-t. El Ca^{2+} puede entrar por vías inespecíficas o fugas (flecha punteada), o vía el intercambiador Na-Ca, ya sea intercambiando Ca^{2+} por Ca^{2+} o Na^+ , si estos iones están presentes en el interior de las vesículas. No se considera la entrada por la Ca^{2+} -ATPasa porque no hay ATP en el medio, ni por los canales de calcio tipo L porque a $V_m = 0$ mV estos canales de Ca^{2+} están inactivados.

- i) intercambiador Na-Ca intercambiando Ca-Ca; este modo requiere que exista calcio dentro de las vesículas, lo que ha sido demostrado por Donoso e Hidalgo (1989),
- ii) intercambiador Na-Ca operando en el modo directo; este modo requiere la presencia de sodio al interior de las vesículas, parámetro que se puede controlar experimentalmente,

iii) fugas a través de vías inespecíficas de la membrana de las vesículas,

En primer lugar, se midió la acumulación de Ca^{2+} al equilibrio, incubando las vesículas de túbulo-t con distintas concentraciones de CaCl_2 externo por tres horas. Se escogió este tiempo ya que experimentos preliminares demostraron que a las tres horas se alcanzaba el equilibrio (Hidalgo y cols., 1991). En estas condiciones, el calcio puede entrar por intercambio Ca-Ca (i) (utilizando el calcio presente al interior de las vesículas) y por vías inespecíficas (iii) (al igual que los otros iones presentes en la solución de incubación). Estas determinaciones, y las que se describen más adelante, se realizaron en ausencia de sodio intravesicular (para impedir el funcionamiento de la vía ii) y fueron diseñadas para medir sólo el calcio intravesicular, ya que el calcio que se une externamente durante la incubación se elimina lavando las vesículas con EGTA 10 mM.

No se encontró una relación lineal entre el contenido de Ca^{2+} intravesicular y la concentración externa de CaCl_2 utilizada, ya que las vesículas acumularon calcio con una clara cinética de saturación hiperbólica sumada a un componente lineal (Fig. 8). Si se calcula la cantidad de calcio intravesicular que debería existir a cada concentración de calcio externa, suponiendo un volumen intravesicular de 1,5 μL por mg de proteína, y se le suma el componente de unión inespecífica a los filtros y las vesículas (línea de trazos, Fig. 8) se encuentra que estos valores son mucho menores que los valores experimentales.

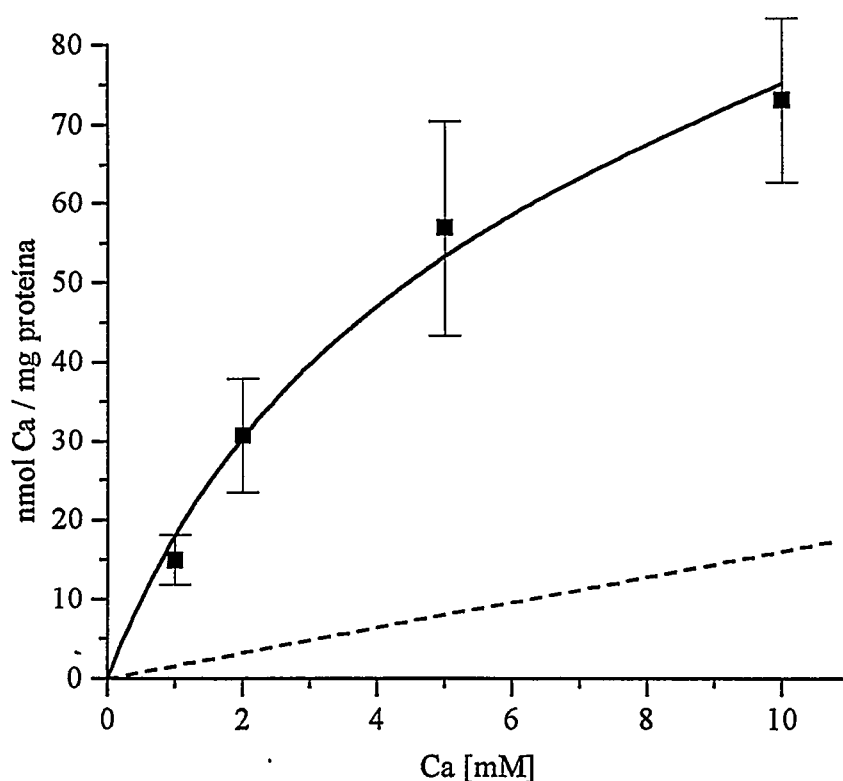


Figura 8. Unión de calcio a vesículas de túbulo-t. Las vesículas de túbulo-t se incubaron por 3 horas a 25 °C en un medio que contenía (mM): gluconato de potasio 10, valinomicina 2 μ M, HEPES-Tris 150, pH:7,4, con las concentraciones de CaCl_2 indicadas. Una alícuota de 10 μ L (7 μ g proteínas) se diluyó en 1 mL de solución de filtración que contenía (mM): MgCl_2 5, LaCl_3 5, EGTA 10, HEPES-Tris 130, pH:7,4; se filtró en filtros Millipore (HA 0,45 μ m) y se lavó 3 veces con 4 mL de solución de filtración enfriada en hielo. Se muestra el resultado de 3 determinaciones, cada una de ellas realizada por triplicado. A los datos experimentales se ajustó una función hiperbólica, que da cuenta del componente saturable (73 ± 10 nmol Ca/ mg proteína, $\bar{x} \pm \text{SD}$), más un componente lineal de 1,6 nmol Ca/ mM mg proteína (Hidalgo y cols., 1991), que se muestra en la línea de trazos.

Este resultado se puede interpretar postulando que las vesículas acumulan calcio debido a que poseen sitios intravesiculares de unión de Ca^{2+} . De los datos obtenidos, se calculó una densidad de sitios de unión de calcio de 73 ± 10 nmol/mg proteína, con una afinidad de $3,5 \pm 1,1$ mM ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 3$). El calcio unido a estos sitios de baja afinidad podría estar disponible para ser intercambiado por Ca^{2+} externo, vía intercambio Ca-Ca.

A continuación se midió el curso temporal de la entrada de Ca^{2+} a las vesículas de túbulos-t. Al incubar las vesículas con CaCl_2 2 mM, las vesículas acumularon al equilibrio 32 ± 10 nmol Ca/ mg proteína ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 16$). La constante aparente de velocidad de entrada de Ca^{2+} , estimada en dos preparaciones, fue de $0,8 \pm 0,3 * 10^{-3}$ seg^{-1} ($\bar{x} \pm \text{SD}$; a 25°C) (Fig. 9). Sin embargo, al estudiar la cinética de entrada de calcio a 5°C , se observó que la entrada de calcio se enlentecía más que lo esperado de un proceso pasivo, mostrando un $Q_{10} \approx 1,4$. Por otra parte, al ajustar a los puntos una curva de entrada mono-exponencial, el ajuste no era adecuado para los puntos más tempranos (Fig. 10). Estos resultados indican que la cinética de entrada de calcio es más compleja que un proceso mediado por simple difusión, y sugieren que una fracción del calcio acumulado por las vesículas entra por intercambio del calcio externo con el calcio residual contenido en las vesículas. Un análisis más detallado de la cinética de entrada se presenta en la sección de Discusión.

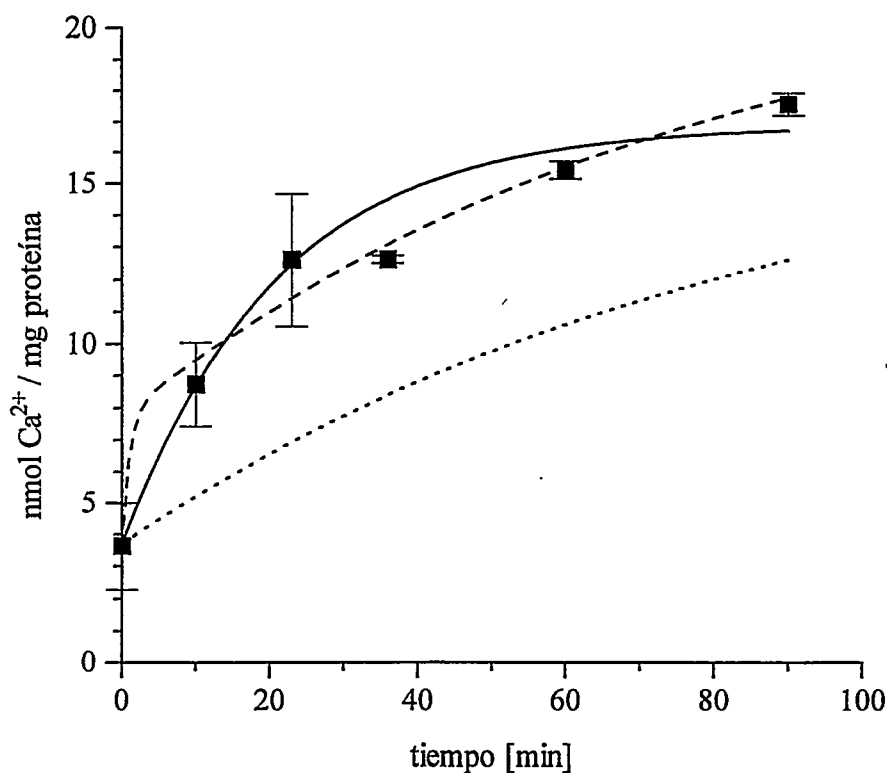


Figura 9. Entrada de calcio a vesículas de túbulo-t. Se midió la entrada de Ca^{2+} incubando las vesículas en un medio con CaCl_2 2 mM a 25 °C. A los datos experimentales, obtenidos en dos determinaciones realizadas en dos preparaciones de túbulo-t, se ajustó una función mono-exponencial (línea sólida), encontrándose los siguientes parámetros para la entrada: basal, $c = 3,7 \pm 1,0$ nmol Ca/mg proteína, carga máxima, $A = 13,4 \pm 1,4$ nmol Ca/mg proteína y una constante aparente de velocidad de entrada: $k = 0,8 \pm 0,3 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$. Las otras líneas corresponden a las curvas teóricas descritas en Discusión, donde la línea de puntos representa la entrada de calcio esperada por simple difusión pasiva, y la línea de trazos la entrada correspondiente a la suma del componente pasivo más un componente de entrada debido a intercambio Ca-Ca.

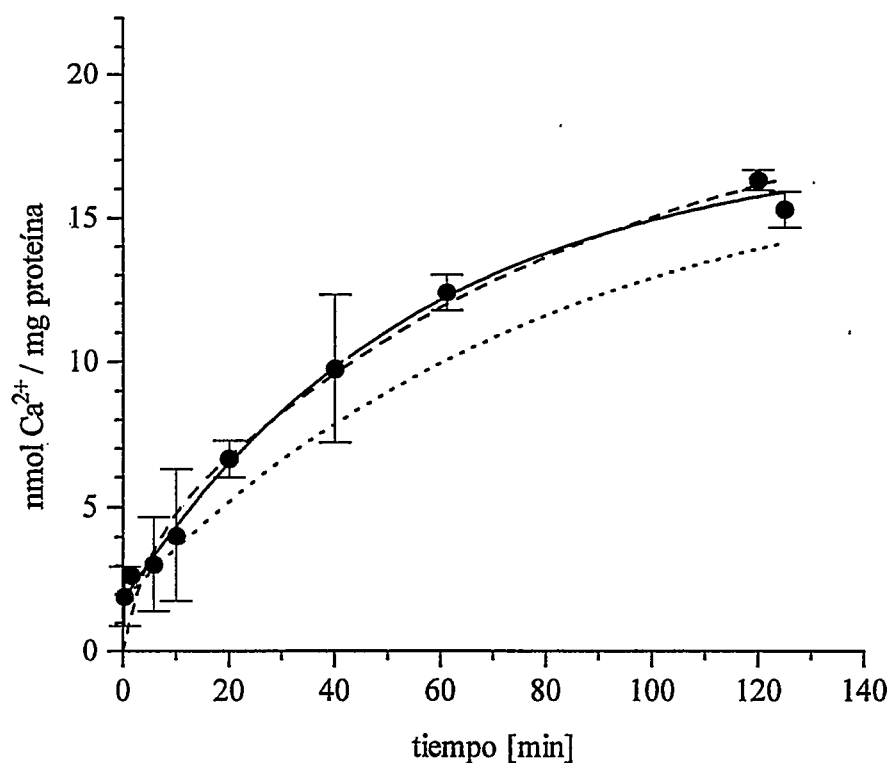


Figura 10. Entrada de calcio a vesículas de túbulo-t a 5 °C. Se midió la entrada de Ca^{2+} incubando las vesículas con CaCl_2 2 mM. Del ajuste de una función mono-exponencial a los datos experimentales se obtuvo la línea sólida (carga máxima, $A = 15,7 \pm 0,7$ nmol Ca/mg proteína y una constante aparente de velocidad de entrada, $k = 0,28 \pm 0,03 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$; $\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 2$). Las otras líneas corresponden a las curvas teóricas descritas en Discusión, donde la línea de puntos representa la entrada de calcio esperada por difusión pasiva, y la línea de trazos la entrada correspondiente a la suma del componente pasivo más un componente de entrada debido a intercambio Ca-Ca.

Considerando que a 25 °C el calcio se equilibra al interior de las vesículas en 90 minutos aproximadamente, se utilizó la siguiente estrategia para determinar preferentemente entrada de calcio mediada por el intercambiador Na-Ca (operando en el modo de intercambio Ca-Ca): las vesículas se equilibraron con CaCl_2 2 mM no radiactivo por 90 minutos y después se midió la entrada de calcio agregando una alícuota de ^{45}Ca . En estas condiciones, en que no hay gradiente de concentración de calcio (entre el medio de incubación y el calcio libre al interior de las vesículas), pero si existe una gradiente isotópica, el intercambio ^{45}Ca -Ca debiera predominar por sobre la entrada pasiva de Ca^{2+} .

Se observó que a 5°C el Ca^{2+} entraba rápidamente a las vesículas, equilibrándose en 15 minutos aproximadamente (Fig. 11). La constante de velocidad aparente de este proceso fue de $4,3 \pm 0,7 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, N =2). Es decir, en estas condiciones el calcio se acumula 15 veces más rápido que al cargar vesículas no pre-equilibradas con CaCl_2 2 mM (Fig. 10).

La cantidad de calcio acumulado en este proceso de intercambio Ca-Ca también fue variable entre las diferentes preparaciones de túbulos-t. En el caso mostrado en la Figura 11, el nivel de calcio en las vesículas alcanzó a 12 nmol Ca/mg proteína. El rango encontrado (12-26 nmol Ca/mg proteína) fue siempre menor que el observado al acumular calcio pasivamente cuando se comparan los valores de entrada de Ca^{2+} en una misma preparación (Figura 15).

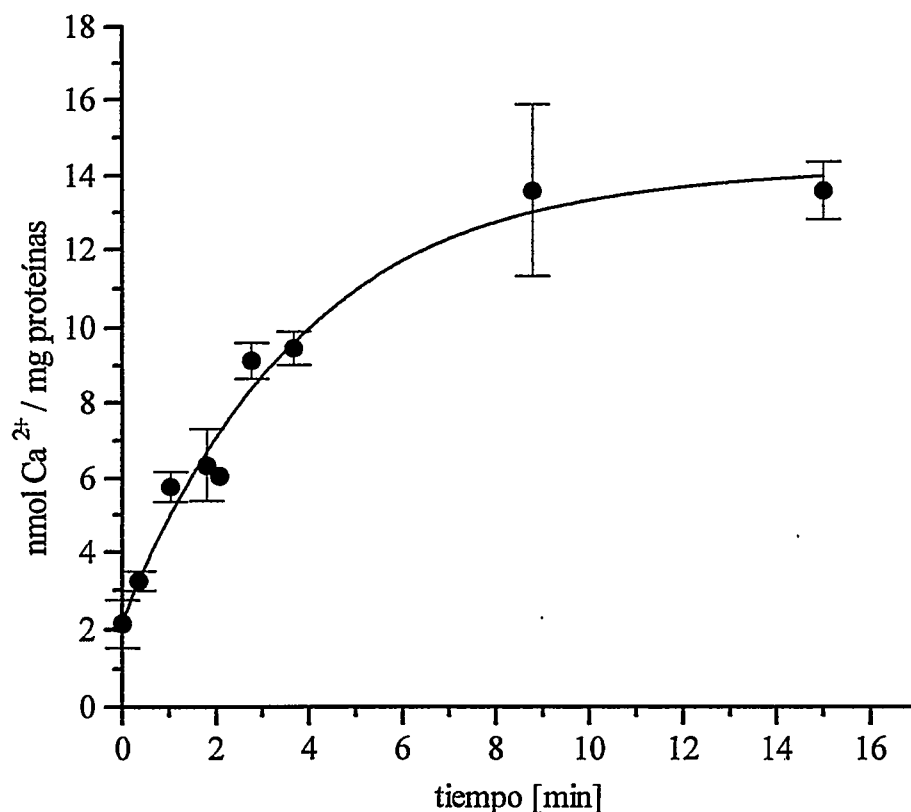


Figura 11. Entrada de calcio a vesículas de túbulo-t mediada por intercambio Ca-Ca. Se midió la entrada de Ca^{2+} , a 5°C , a vesículas previamente equilibradas con CaCl_2 2 mM. Se ajustó una función mono-exponencial a los datos experimentales, obteniéndose los siguientes parámetros: basal, $c = 2,2 \pm 0,5$ nmol Ca/ mg proteína, carga máxima, $A = 12,0 \pm 0,8$ nmol Ca/ mg proteína y una constante de velocidad de entrada, $k = 4,3 \pm 0,7 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 2$).

2.2 Flujos de salida de calcio desde vesículas de túbulos transversales.

El calcio acumulado al interior de las vesículas puede salir al medio externo por transporte mediado o por fugas inespecíficas de la membrana tubular, procesos que presentarán cursos temporales diferentes. Dependiendo de la composición del medio externo podemos diferenciar estos procesos (Fig. 12).

Si se diluyen vesículas cargadas con Ca^{2+} en un medio de salida que no contenga ni sodio ni calcio (Tabla 3,(a), Métodos), de forma que el intercambio Na-Ca y el intercambio Ca-Ca no se manifiesten, sólo el componente inespecífico estará presente. En estas condiciones se encontró que el calcio salía lentamente, de los datos obtenidos se extrapoló una constante de velocidad de salida de $0,2 \pm 0,1 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, N = 5; 15°C) (Fig. 13).

Para estudiar la cinética de salida de calcio en presencia de sodio, vía intercambio Na-Ca, las vesículas equilibradas con CaCl_2 2 mM (más ^{45}Ca) se diluyeron en un medio que contenía Na^+ 140 mM, EGTA 10 mM (en estas condiciones no podría ocurrir intercambio Ca-Ca, porque la concentración de calcio extravesicular está en el rango nanomolar). Se observó que sólo una fracción del Ca^{2+} acumulado al interior de las vesículas se intercambió por Na^+ externo, y que la velocidad de salida de calcio, de esta fracción intercambiable, fue muy rápida. La constante de velocidad estimada fue de $70 \pm 30 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, N = 4; 5°C). Un ejemplo representativo se muestra en la Figura 14. El

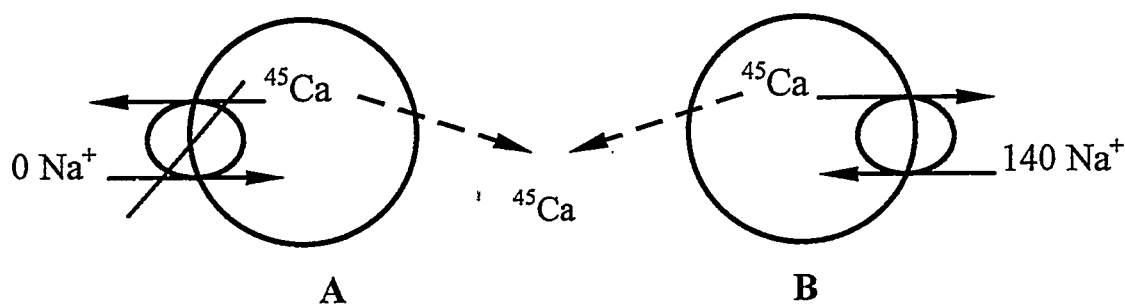


Figura 12. Posibles vías de salida de Ca desde las vesículas de túbulos-t. El Ca^{2+} puede salir desde las vesículas por salida simple, a través de vías inespecíficas de la membrana (fuga) o vía el intercambiador Na-Ca. **A.** Al diluir vesículas de túbulos-t en un medio sin sodio ni calcio, el intercambiador no puede actuar y sólo se manifestará el componente de fuga (flecha punteada). **B.** Si se diluyen las vesículas en un medio que contiene sodio (sin Ca^{2+} en el ejemplo) el Ca^{2+} puede salir por intercambio Na-Ca y por el componente de fuga.

porcentaje del Ca^{2+} acumulado al interior de las vesículas que se intercambia por sodio varió de 25 a 43 %. La fracción de Ca^{2+} no intercambiable por sodio extravésicular difundió desde el interior de las vesículas con una constante de velocidad aparente, similar a la del proceso pasivo descrito anteriormente.

Para privilegiar la salida de calcio dependiente de sodio, se cargaron las vesículas con Ca^{2+} mediante intercambio ^{45}Ca -Ca por 15 minutos (como se describió en la sección anterior) y luego se indujo la salida de calcio vía el intercambiador Na-Ca, diluyendo estas vesículas en un medio que contenía sodio

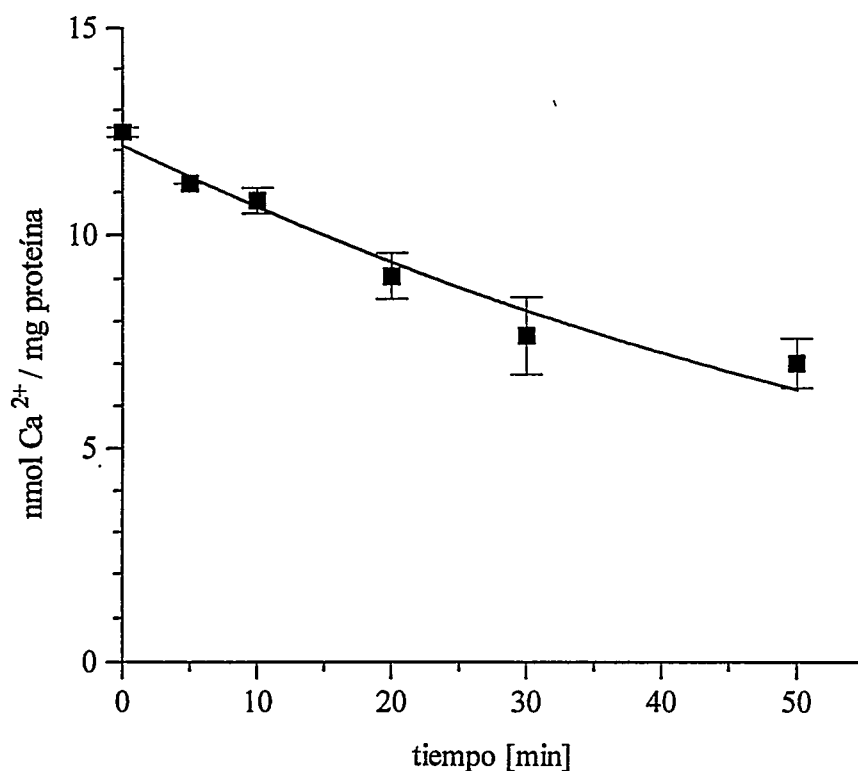


Figura 13. Salida de Ca desde vesículas de túbulo-t en un medio sin sodio. Se midió la salida de Ca^{2+} desde vesículas de túbulo-t equilibradas durante 2 horas con CaCl_2 2 mM. La solución de salida contenía: (mM) Hepes-Tris 140, EGTA 10 (15 °C). Los puntos experimentales corresponden al $\bar{x} \pm \text{SD}$ de una determinación realizada por triplicado. Los parámetros obtenidos del ajuste fueron: carga máxima a tiempo cero, $A_0 = 12,0 \pm 0,4$ nmol Ca/mg proteína y una constante de velocidad de salida, $k = 0,15 \pm 0,02 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$. A los valores experimentales se les restó la unión de calcio no específica, a los filtros y a las proteínas.

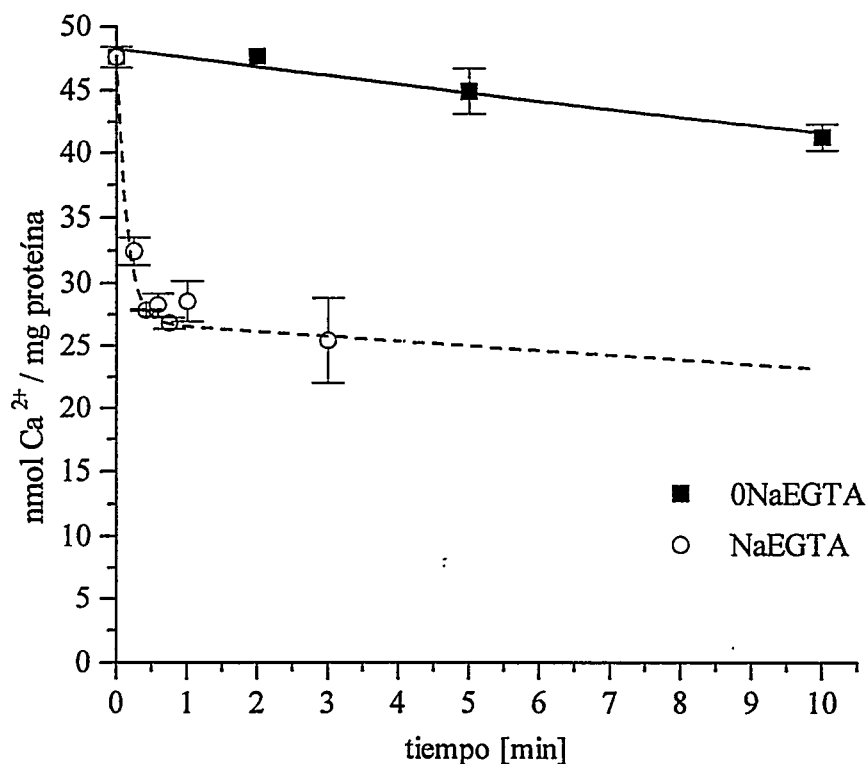


Figura 14. Salida de calcio desde vesículas de túbulos-t. Se midió la salida de Ca^{2+} , a 5°C , desde vesículas de túbulos-t equilibradas durante 2 horas con CaCl_2 2 mM. La salida de calcio se inició diluyendo en soluciones de las siguientes composiciones, en mM: (■) Na 0, EGTA 10, Hepes-Tris 140; (○) Na 140, EGTA 10. Los datos mostrados corresponden al promedio de 2 determinaciones, realizadas en la misma preparación de membranas. Se extrapoló una constante de velocidad de salida de $0,25 \cdot 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ a la salida en medio 0 Na/EGTA,. Del ajuste de una función bi-exponencial a la salida en medio Na/EGTA se obtuvieron los siguientes parámetros: fracción intercambiable por sodio = $20,7 \pm 0,9$ nmol Ca^{2+} /mg proteína, constante de velocidad de salida, $k = 0,11 \pm 0,01 \text{ seg}^{-1}$; fracción no intercambiable por sodio = $26,9 \pm 0,4$ nmol Ca^{2+} /mg proteína; para el componente lento de la salida se utilizó el mismo valor de la constante de velocidad extrapolada del ajuste en 0 Na/EGTA.

y EGTA. En ambas condiciones se encontraron valores similares para la constante de velocidad de salida y la cantidad de calcio intercambiado (Fig. 15). La cantidad de calcio acumulado en los experimentos en que se cargaron las vesículas por intercambio ^{45}Ca -Ca fue menor, por lo que porcentualmente se intercambió una fracción mayor del calcio (58 al 63%) que la obtenida al inducir la salida de Ca^{2+} desde vesículas sin pre-equilibrar (26-40%).

2.3 Efecto del calcio externo sobre la velocidad de salida de calcio.

Los primeros experimentos que realizamos al iniciar esta tesis indicaron que el calcio en el medio extravesicular enlentecía la salida de Ca^{2+} desde las vesículas (Hidalgo y cols., 1991). Esta acción moduladora del calcio era opuesta a lo informado hasta el momento en otros sistemas celulares. Por lo tanto, se caracterizó el efecto del calcio extravesicular (intracelular) sobre la velocidad de salida de calcio, estudiando la salida de Ca^{2+} en medios que poseían un amplio rango de concentración de calcio, desde pCa 5 a pCa > 9. Se observó que a medida que aumentaba el calcio libre extravesicular (disminuyendo el pCa), se produjo una disminución significativa de la constante de velocidad de salida de calcio desde las vesículas (Figura 16). La concentración de calcio con la cual se obtuvo el 50% del efecto fue de 10^{-7} M ($\text{pCa}_{0,5} = 7,06$).

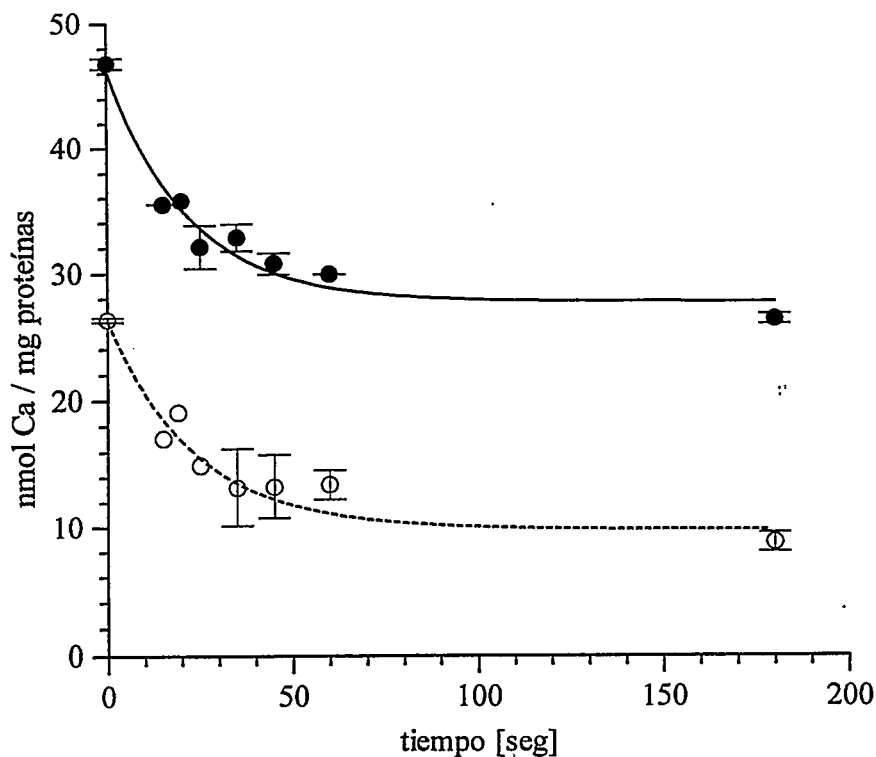


Figura 15. Salida de Calcio desde vesículas de túbulo-t equilibradas y sin equilibrar con CaCl_2 2 mM. Las vesículas se equilibraron con CaCl_2 2 mM (●) o con CaCl_2 2 mM (○) durante 3 horas a 25 °C, luego, a éstas últimas se les agregó una alícuota de ^{45}Ca y se incubó por 15 minutos adicionales. En ambas preparaciones, se midió la salida de Ca^{2+} , a 5°C, hacia un medio que contenía Na 140 mM, EGTA 10 mM. Se realizaron 2 determinaciones en cada una de ellas, se muestra el $x \pm \text{SD}$. Se ajustó una función de salida mono exponencial a los datos, obteniéndose los siguientes parámetros. Para (●): fracción intercambiada por sodio = $18,6 \pm 1,8$ nmol Ca/ mg proteína, constante de velocidad de salida, $k = 46 \pm 9 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, fracción no intercambiada por sodio, $c = 27,7 \pm 1,2$ nmol Ca/ mg proteína. Para (○): fracción intercambiada por sodio = $16,4 \pm 0,7$ nmol Ca/ mg proteína, constante de velocidad de salida, $k, 42 \pm 3 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$; fracción no intercambiada por sodio, $c = 9,8 \pm 0,7$ nmol Ca/ mg proteína.

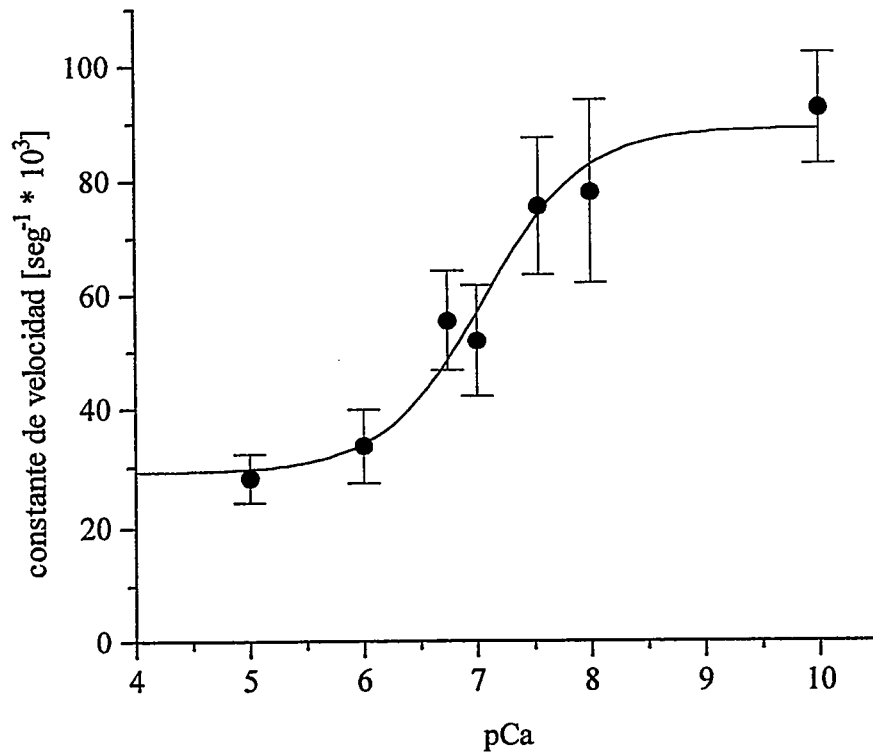


Figura 16. Variación de las constantes de velocidad en función de la concentración de calcio. Se muestra la dependencia de las constantes de velocidad de salida de Ca^{2+} , desde las vesículas de túbulos-t, en función de la concentración de calcio extravesicular (pCa). La salida de Ca^{2+} se midió en experimentos pareados, a 5 °C. Cada punto corresponde al promedio de al menos 3 determinaciones independientes. Se ajustó una función sigmoide a las constantes de velocidad de salida. El 50 % del efecto del calcio extravesicular se observó a un valor de pCa de 7,06.

Para comparar los valores absolutos de las constantes de velocidades de salida, a los distintos pCa, las mediciones que se ilustran en la Figura 16 se realizaron en una sola preparación de túbulos-t. Tanto el nivel de carga de calcio (tiempo cero) como el porcentaje de calcio liberado fue el mismo en todas las mediciones. Otras determinaciones experimentales, usando distintas preparaciones de túbulos-t, confirmaron este efecto del calcio extravesicular sobre la velocidad de salida de Ca^{2+} desde las vesículas.

2.4 Efecto del sodio en la velocidad de salida de calcio.

Para caracterizar el efecto del sodio extravesicular sobre la velocidad de salida de calcio desde las vesículas de túbulos-t, se midió la salida de calcio en medios sin calcio y con diferentes concentraciones de sodio (30, 60, 90 o 120 mM Na^+ , EGTA 10 mM). Se encontró que al aumentar la concentración de sodio extravesicular se producía un aumento de la velocidad de salida de calcio, llegando a saturación con concentraciones de sodio mayores que 100 mM. El análisis de los resultados indicó que existía cooperatividad entre la constante de salida y la concentración de sodio. Se ajustó una función de Hill a los datos experimentales y se encontró un n de Hill de 2,7 y una constante de Hill para sodio de 55 mM. El promedio de tres determinaciones realizadas en una misma preparación de vesículas se muestra en la Figura 17.

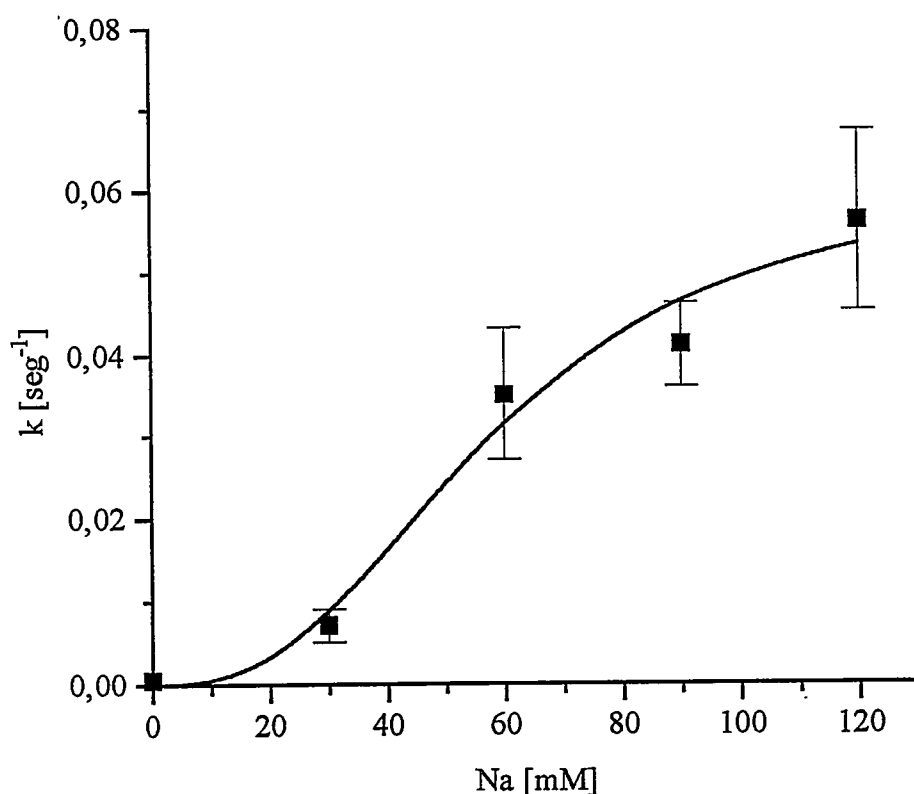


Figura 17. Efecto de sodio extravesicular sobre las constantes de velocidad de salida de calcio. Se midió la salida de Ca^{2+} diluyendo vesículas de túbulos-t cargadas con Ca^{2+} en medios de salida que contenían EGTA 10 mM y 30, 60, 90 o 120 mM Na; la osmolaridad de las soluciones se compensó con Hepes-Tris. El curso temporal de la salida de Ca^{2+} , en determinaciones realizadas por triplicado en cada una de las concentraciones de sodio, se ajustó a una función monoexponencial para obtener las constantes de velocidad de salida. Se muestra la relación entre las constantes de velocidad de salida de Ca^{2+} en función de la concentración de sodio extravesicular. Se ajustó una función de Hill a los datos, obteniéndose $n = 2,7$ y $K_H = 55$ mM.

3 Inmunodetección del intercambiador Na-Ca.

Con el propósito de investigar si el intercambiador Na-Ca presente en las vesículas t túbulos-t de anfibios corresponde a alguna de las isoformas conocidas hasta el momento y para las cuales se dispone de anticuerpos, se realizó estudios de inmunodetección. Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos tanto para la isoforma de músculo cardíaco (NCX1) (Philipson y cols., 1988) como para la isoforma presente en músculo esquelético y cerebro de rata (NCX2).

Túbulos-t de *Rana catesbiana*. Los primeros ensayos de inmunodetección se efectuaron en una preparación de túbulos-t de músculo esquelético de *Rana catesbiana*, la especie utilizada en los estudios electrofisiológicos descritos más adelante. Se encontró que los anticuerpos contra la isoforma cardíaca (NCX1) reaccionaron con dos bandas proteicas de las membranas de túbulos-t (Figura 18, carril 1): una banda mayoritaria de alrededor de 120 kDa y una minoritaria cercana a 160 kDa. El control, correspondiente a membranas de sarcolema aisladas de músculo cardíaco de mamífero, también presentó reacción con dos bandas de masas similares (Figura 18, carril 2) y que corresponden al intercambiador Na-Ca (Philipson y cols., 1988). Estos resultados indican que la preparación de túbulos-t del anfibio *Rana catesbiana* contiene la isoforma NCX1. Se observó, además, una significativa reacción del anticuerpo con otras bandas presentes en sarcolema cardíaco, como se ha descrito en todos

los estudios reportados usando este anticuerpo (Sacchetto y cols., 1996), el único hasta ahora disponible para identificar NCX1.

Contrastando con la clara reacción obtenida con los anticuerpos anti-NCX1, los anticuerpos contra la isoforma de músculo esquelético NCX2 mostraron una débil reacción con las membranas de túbulos-t de *Rana catesbiana*. Sólo se detectó una tenue una banda de aproximadamente 60 kDa (Figura 18, carril 3). El control positivo, contra un péptido de masa de 35 kDa (que corresponde a un fragmento presumiblemente intracelular de NCX2) expresado en bacteria, presentó además de la banda de 35 kDa que corresponde al péptido, numerosas otras bandas (Figura 18, carril 4) como ha sido descrito en la literatura al usar este sistema de expresión. No se observó reacción con la fracción correspondiente a RS.

Estos resultados son la primera demostración directa, usando anticuerpos, que sugieren que ambas isoformas del intercambiador Na-Ca, NCX1 y NCX2, estarían presentes en los túbulos-t de músculo esquelético del anfibio *Rana catesbiana*.

Túbulos-t de *Caudiverbera caudiverbera*. Se repitió el mismo procedimiento de inmunodetección con preparaciones de túbulos-t y RS aisladas de músculo esquelético de *Caudiverbera caudiverbera*. Se encontró que los anticuerpos contra NCX2 reconocieron una banda mayoritaria de alrededor de 60

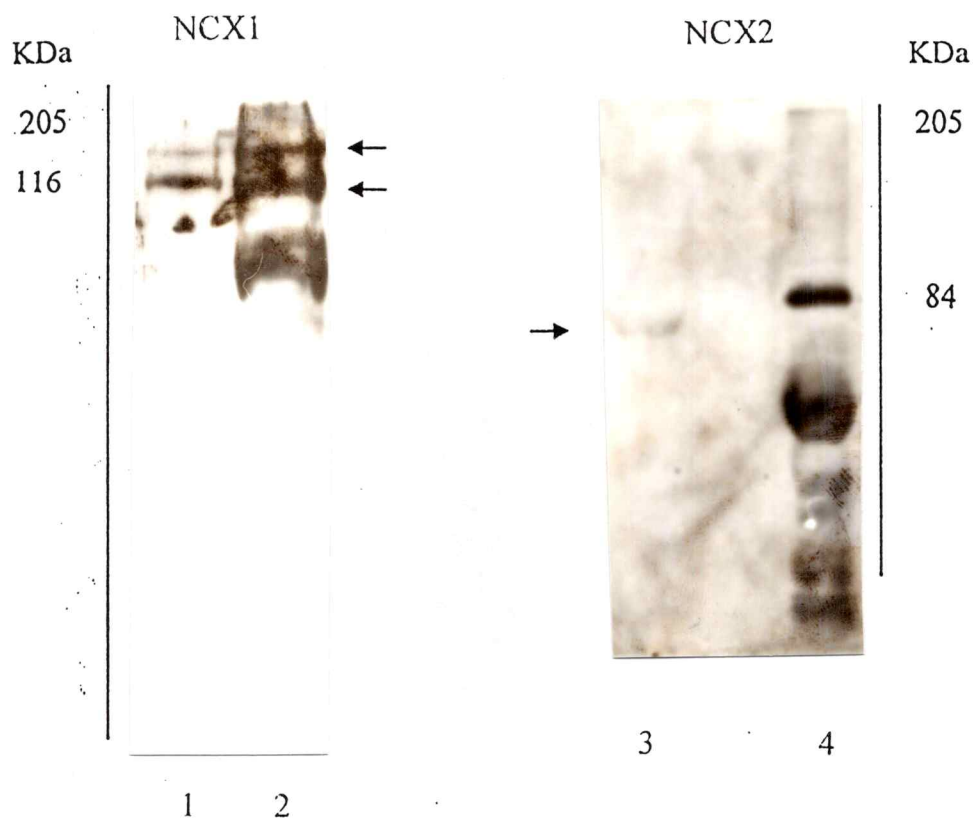


Figura 18. Inmunodetección del intercambiador Na-Ca en túbulos-t de *Rana catesbiana*. La fotografía muestra que los anticuerpos contra la isoforma cardíaca (NCX1) reconocen bandas de proteína con masas de alrededor de 120 y de 160 kDa (carril 1, puntas de flecha) en la fracción de túbulos-t de músculo esquelético, y reaccionan con proteínas de similar masa en una preparación de sarcolema de músculo cardíaco de perro (carril 2). Los anticuerpos contra la isoforma de músculo esquelético (NCX2) reconocen bandas de alrededor de 60 kDa en la fracción de túbulos-t de músculo esquelético (carril 3). Se usó como control positivo para NCX2 un péptido proveniente del putativo segmento intracelular de esta isoforma expresado en bacteria, (carril 4).

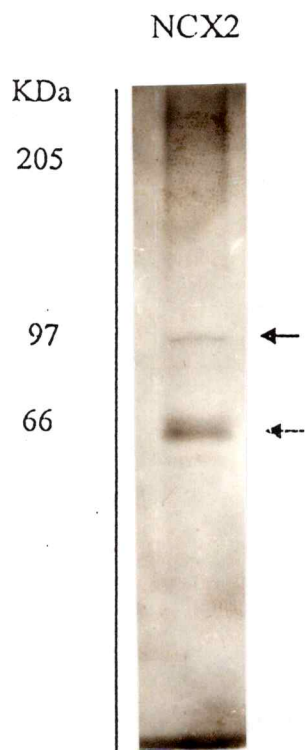


Figura 19. Inmunodetección del intercambiador Na-Ca en túbulos-t de *Caudiverbera caudiverbera*. La fotografía muestra que en túbulos-t de músculo esquelético de este anfibio, los anticuerpos contra la isoforma esquelética (NCX2) reconocen proteínas de alrededor de 60-65 kDa y una débil banda de alrededor de 100 kDa.

kDa y una banda tenue de alrededor de 100 kDa presentes en la fracción de túbulos-t (Fig. 19). No se observó reacción de estos anticuerpos con las fracciones de RS pesado ni con una preparación de tríadas de músculo esquelético aisladas del mismo anfibio, lo que podría deberse a que esta última fracción sólo posee un 10% de túbulos-t.

En contraste con lo observado en la preparación de túbulos-t de *Rana catesbiana*, no se observó reacción de los anticuerpos contra NCX1 con proteínas de 100 kDa. Sólo se detectó, en algunas preparaciones, una débil reacción con una serie de bandas de masas inferiores a 60 kDa (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que en músculo esquelético del anfibio *Caudivebera caudiverbera* se encontraría mayoritariamente la isoforma NCX2 del intercambiador Na-Ca. Alternativamente, podrían explicarse estos resultados suponiendo que la isoforma NCX1 de este anfibio sería más inestable que NCX2.

4 Detección del intercambiador Na-Ca mediante registros electrofisiológicos.

Se estudió la contribución del intercambiador Na-Ca en la regulación de la concentración intracelular de calcio en fibras musculares aisladas, registrando las corrientes iónicas y los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular producidos en respuesta a variaciones en los gradientes de sodio o de calcio. El esquema de la estrategia empleada se muestra en la Figura 20.

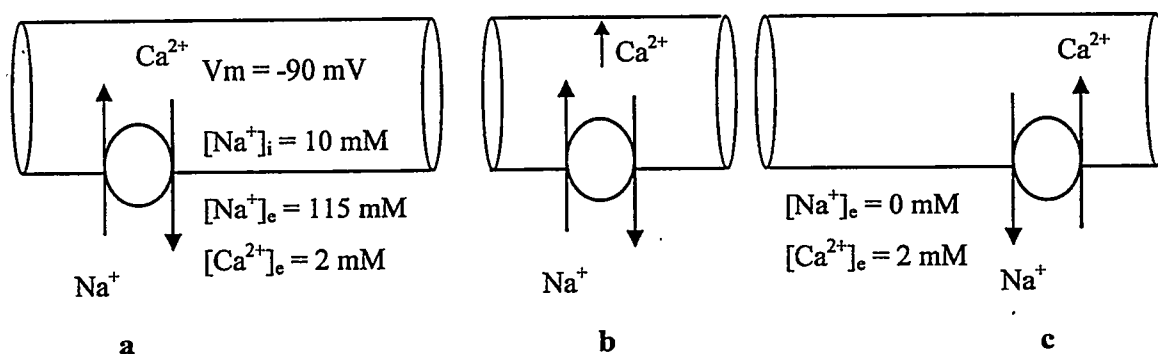


Figura 20. Esquema de la medición del intercambiador Na-Ca en fibras de músculo esquelético. Con las concentraciones de sodio y calcio indicadas en a, el potencial de inversión del intercambiador Na-Ca, V_{rev} , es de -64 mV aproximadamente. En condiciones de reposo (a), debido a que $V_m < V_{rev}$ el intercambiador funciona en el modo directo sacando Ca^{2+} desde la fibra muscular, al aumentar el Ca^{2+} intracelular mediante liberación desde el complejo DM-nitrophen: Ca^{2+} (b), se favorece el funcionamiento del intercambiador en el modo directo, lo que induce la salida de Ca^{2+} y la entrada de Na^+ al interior de las fibras. Finalmente, al superfundir la fibra con una solución sin Na^+ (c), se tiene que $V_m > V_{rev}$ de modo que se produce la entrada de Ca^{2+} y la salida de Na^+ desde las fibras, esto genera una corriente iónica de salida.

La manera usual de variar el gradiente de sodio es disminuir la concentración de sodio en la solución externa, hasta lograr que el potencial de inversión del intercambiador sea menor que el potencial de membrana (Figura 20, c). En el caso del Ca^{2+} , la situación es más complicada dada la enorme diferencia

entre las concentraciones extra e intracelular. Este inconveniente ha sido solucionado con el uso de compuestos enjaulados como se describe más adelante.

4.1 Efecto de la remoción del sodio extracelular sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Si se superfunden fibras musculares mantenidas a un potencial de -90 mV con soluciones externas en las cuales se ha reemplazado el sodio por otro catión, se genera un gradiente de salida de sodio ($E_{\text{Na-Ca}} \approx -600 \text{ mV}$). Por lo tanto, se cumple la condición $V_m > V_{\text{rev}}$ y el intercambiador Na-Ca funciona en el modo reverso. Al operar el intercambiador en esta forma se debiera producir una corriente de salida llevada por sodio acoplada a la entrada de calcio al interior de la fibra, lo que provocaría un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} .

Para probar si el intercambiador responde de este modo, se aislaron fibras musculares únicas, que se mantuvieron bajo condiciones de potencial de membrana controlado a -90 mV durante todo el curso del experimento. Se investigó en estas condiciones, si al reemplazar el sodio por otro catión monovalente en la solución Ringer externa se activaba una corriente iónica, y si se producían cambios en la concentración de calcio intracelular.

En esta serie de experimentos, para no provocar respuestas falsas, se tuvo la precaución de utilizar soluciones externas que fueran equivalentes en cuanto a

la osmolaridad, al pH y al pCa. Las condiciones experimentales utilizadas se escogieron para no activar otras conductancias iónicas; además de mantener el potencial a -90 mV (a este potencial sólo una ínfima fracción de los canales de sodio y de calcio tipo L se encuentran activados), se trabajó con soluciones que contenían TTX (10^{-6} M) para bloquear los canales de sodio, y gluconato de cesio en el medio interno para bloquear los canales de potasio.

Debido a que se esperaba que los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} estuvieran en el rango de 10^{-7} M a 10^{-6} M, se escogió a Fluo-3 como indicador de calcio, porque posee una constante de afinidad para Ca^{2+} de $0,3 \mu\text{M}$ aproximadamente (ver más adelante). Para evitar la aparición de ruidos eléctricos en los registros se utilizó una superfusión lenta de la fibra muscular. Por lo tanto, no se consideró como una limitación la respuesta cinética relativamente lenta de Fluo-3 (Escobar y cols., 1995). El tiempo de recambio de la solución de perfusión estaba en el rango de minutos.

Entre los cationes usados para reemplazar al Na^+ se utilizó Li^+ , porque el intercambiador Na-Ca no lo transporta. Los otros cationes utilizados fueron tetrametilamonio (TMA^+) o N-metilglucamina (NMG^+).

Se encontró que, independiente del catión utilizado, en soluciones con cero sodio externo se producían pequeñas corrientes iónicas de salida, mantenidas en el tiempo como se muestra en la Figura 21. La magnitud de estas corrientes,

registradas a un potencial de mantenimiento de -90 mV, fue de 3 a 12 nA (0,18 a 0,65 $\mu\text{A}/\mu\text{F}$; $\bar{x} = 0,36 \pm 0,17 \mu\text{A}/\mu\text{F}$, $N = 6$). Estas corrientes fueron reversibles, ya que al superfundir nuevamente la fibra con soluciones con sodio volvieron al nivel basal control. Estas corrientes llegaron a su nivel máximo con un retardo de al menos 1 minuto, como se observa en la Figura 21, pero es probable que este retardo se deba a la velocidad de recambio de las soluciones en la cámara de registro.

Por otra parte, en algunos de estos experimentos se observó que en respuesta a la superfusión de soluciones sin sodio se producía un ligero aumento del volumen de la fibra muscular. El aumento del volumen celular ocurre a pesar de que las soluciones fueron cuidadosamente calibradas (osmolaridad, pCa, pH). Hasta el momento no se tiene una clara explicación de por qué ocurren estos cambios de volumen.

Esta variación en el volumen de las fibras musculares dificultó realizar una cuantificación precisa de los cambios en la concentración de calcio, puesto que los cambios de volumen celular falsean las mediciones de fluorescencia realizadas con colorantes como Fluo-3, que utilizan una sola longitud de onda. Para corregir parcialmente las mediciones de fluorescencia se usó otro colorante en conjunto con Fluo-3. Se utilizó rhodamina-B, porque su espectro de emisión de fluorescencia es distante del de Fluo-3 y porque su fluorescencia es independiente

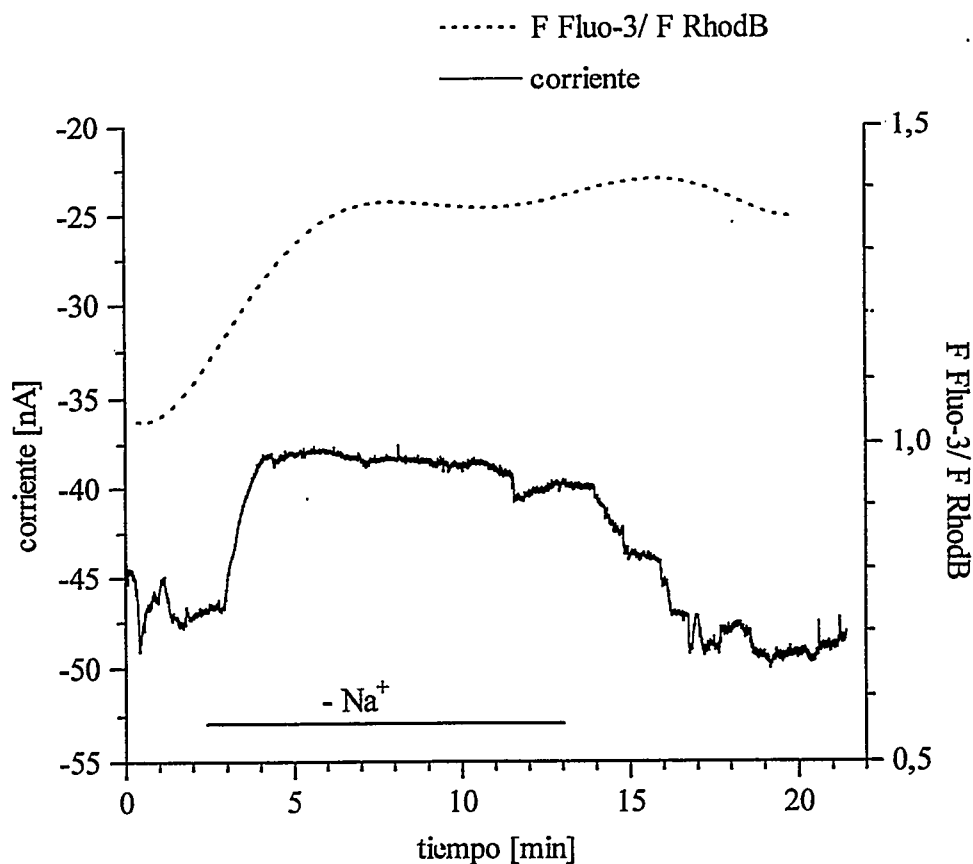


Figura 21. Activación de una corriente iónica de salida al superfundir fibras con solución Ringer sin sodio. Se muestra el efecto que se produce al superfundir una fibra muscular aislada de músculo semitendinoso de *Rana catesbiana* con solución a la que se reemplazó el sodio por tetrametilamonio. Se registró la corriente iónica a un potencial de mantenimiento de -90 mV, y a 15 °C. La línea bajo el registro de corriente indica la superfusión con solución sin sodio.

de la concentración de calcio de tal modo que las variaciones en la fluorescencia de este segundo colorante reflejarían sólo los cambios de volumen. Luego de realizar estas correcciones, se encontró que los cambios en la concentración de calcio estaban en el rango submicromolar (0,03-0,1 μM), muy por debajo del aumento de calcio que ocurre en respuesta a un potencial de acción o en respuesta a la despolarización de la fibra muscular que se produce al variar el potencial de mantenimiento.

4.2 Liberación intracelular de Ca^{2+} desde DM-nitrophen. Efecto sobre el intercambio Na-Ca.

Como una aproximación complementaria, se varió el gradiente electroquímico del calcio, produciendo un súbito aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} por fotólisis del complejo DM-nitrophen: Ca^{2+} , y se determinó si estos cambios en los niveles de calcio citosólico activaban corrientes iónicas. Se equilibró el DM-nitrophen al interior de las fibras por difusión desde los extremos cortados.

Considerando los gradientes electroquímicos del sodio y del calcio, se esperaba que al aumentar la concentración de calcio intracelular, manteniendo las fibras al potencial de reposo de -90 mV, se activara el intercambiador Na-Ca, y que éste funcionara en el modo directo, sacando calcio de la fibra muscular. Al

funcionar el intercambiador en este modo se debería observar una corriente iónica de entrada debida al sodio.

En 3 experimentos independientes se detectó que la liberación de calcio desde DM-nitrophen activó una corriente iónica de entrada de alrededor de 20 nA (23 ± 10 nA, $n = 3$). Esta corriente de entrada se activó inmediatamente con el aumento en el calcio y se mantuvo estable durante el tiempo de registro (50 milisegundos) (Figura 22). En este ejemplo, se usó Rhod2 como indicador de los cambios en la concentración de calcio. Se observó esencialmente la misma respuesta al utilizar Fluo-3 o CaOrange-5N para detectar calcio citosólico.

Debido a que las fibras musculares resisten sólo unos pocos disparos del láser con el cual se fotoliza el DM-nitrophen, en estos experimentos no fue posible realizar las sustituciones iónicas apropiadas, tales como eliminar el sodio externo, para corroborar si la corriente iónica detectada correspondía efectivamente a una corriente de entrada de sodio.

Sin embargo, estos resultados apoyan los obtenidos al eliminar el sodio externo, ya que la magnitud de las corrientes iónicas obtenidas fue comparable.

4.3 Propiedades de los colorantes indicadores de Ca^{2+} .

Para medir los cambios en la concentración intracelular de calcio, es necesario tener en cuenta la afinidad del colorante por Ca^{2+} , puesto que ésta

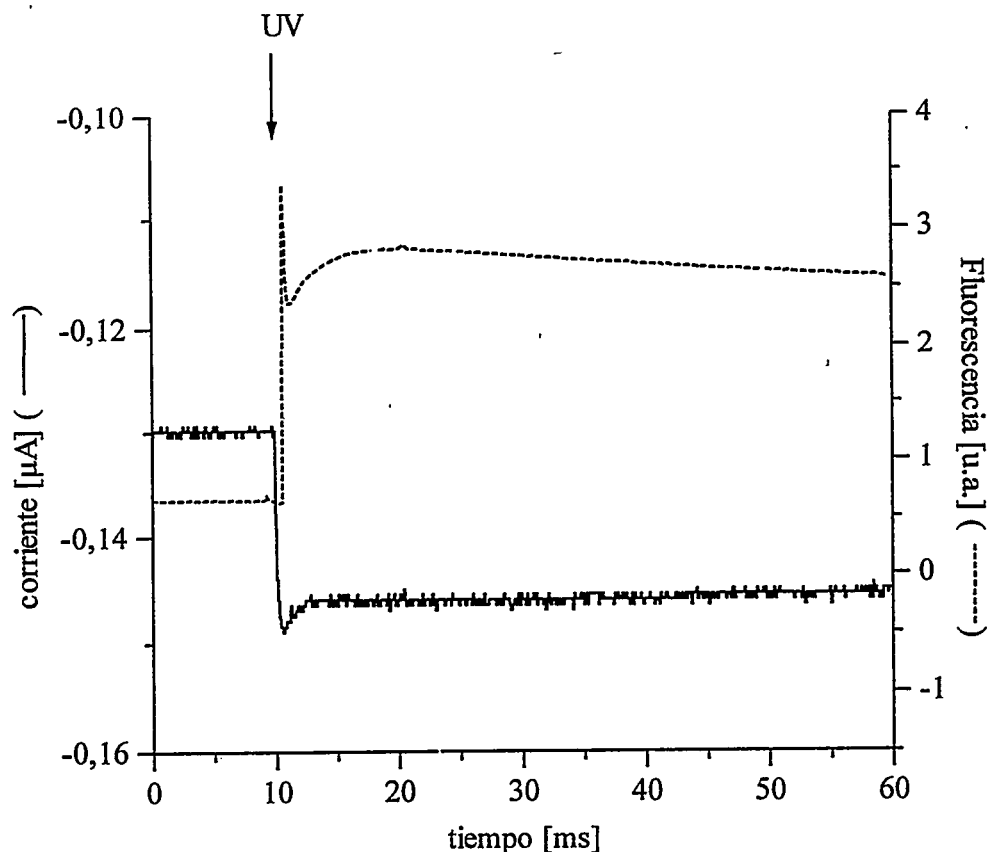


Figura 22. Corriente iónica de entrada activada por fotólisis del complejo DM-nitrophen:Ca²⁺. Se muestra que la liberación de Ca²⁺ por fotólisis del complejo DM-nitrophen:Ca²⁺ activa una corriente de entrada a las fibras musculares esqueléticas de *Rana catesbiana* y una elevación del calcio citosólico. Estos registros se realizaron a 15 °C. El medio intracelular contenía aspartato de cesio 80 mM, DM-nitrophen (pCa = 7) 6 mM y Rhod2 300 μM. La flecha indica el disparo del láser. Para evitar la saturación del fotodiodo, se bloquea electrónicamente su respuesta por 2 mseg, de modo que la señal fluorescente muestra un retardo artificial. (u.a. = unidades arbitrarias).

determina el rango dinámico de concentraciones de calcio en las cuales el colorante puede ser de utilidad, su respuesta cinética y el aumento relativo de fluorescencia que experimenta el colorante al unir calcio.

Por estas razones, se determinó la afinidad para Ca^{2+} de los colorantes Fluo-3 y CaOrange-5N. Se obtuvo un K_d de $0,3 \mu\text{M}$ para Fluo-3 y de $70 \mu\text{M}$ para CaOrange-5N, aunque este último podría poseer también un componente de menor afinidad, con un K_d cercano a $150-180 \mu\text{M}$. Además, es necesario mencionar que se observaron ligeras variaciones en la afinidad de los colorantes entre los distintos lotes comerciales usados. En las mismas determinaciones se midió el aumento de fluorescencia de estos colorantes al unir Ca^{2+} , que se expresa habitualmente como la relación $\Delta F/F$ o bien como $F_{\text{máx.}}/F_{\text{min.}}$. En el caso de Fluo-3 se encontró que la razón $F_{\text{máx.}}/F_{\text{min.}} = 20-30$, en tanto que para CaOrange-5N esta razón fue de sólo 3-4. Estos valores indican que Fluo-3 tiene mejor relación señal ruido que CaOrange-5N. Sin embargo, CaOrange-5N tiene una mejor respuesta cinética a los cambios de calcio (Escobar y cols., 1995), y es capaz de seguir con mayor precisión los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ que ocurren en respuesta a un potencial de acción (Cifuentes y cols., 1995, Fig. 23).

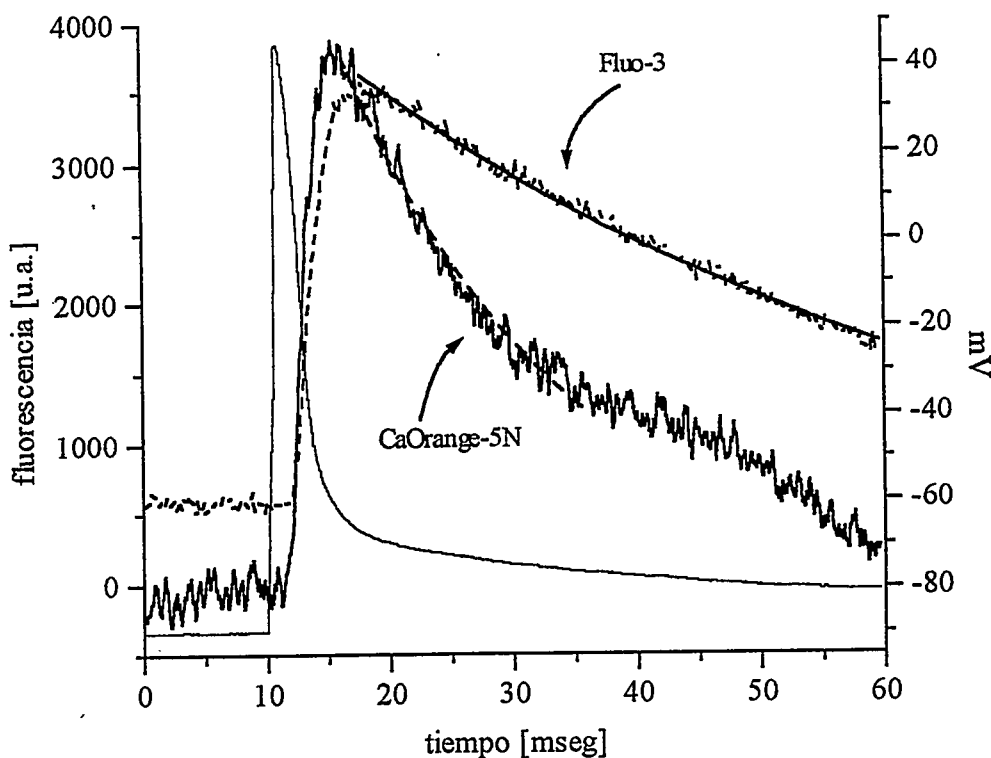


Figura 23. Respuesta de Fluo-3 y CaOrange-5N a un potencial de acción. Se midió el cambio en la concentración de Ca^{2+} citosólico producido en respuesta a un potencial de acción usando $300 \mu\text{M}$ de Fluo-3 o CaOrange-5N. La fibra muscular de *Rana catesbiana* se equilibró a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ con una solución interna de aspartato de potasio que contenía EGTA $500 \mu\text{M}$, DM-nitrophen 6 mM , $\text{pCa} = 7$. Se obtuvo un valor de constante de decaimiento de 56 mseg para Fluo-3 y de 18 mseg para CaOrange-5N. Nótese el retardo de aproximadamente $1.5\text{-}2 \text{ mseg}$. de la señal de fluorescencia obtenida con ambos colorantes con respecto al inicio del potencial de acción.

DISCUSION

1 Consideraciones experimentales.

La mayor ventaja para realizar los estudios del intercambiador Na-Ca en la preparación de túbulos-t de anfibios, obtenida con el método descrito por Hidalgo y cols. (1986b), es que esta fracción está formada por 80 a 85% de vesículas selladas con la configuración interior-afuera. La integridad de las vesículas, que se infiere de los estudios de latencia de los sitios de unión de [³H]ouabaína, se confirmó indirectamente al encontrar que las vesículas prácticamente no presentan fugas de calcio desde su interior, como se discute más adelante.

El principal inconveniente de esta preparación es su bajo rendimiento (0,5 - 1,5 mg proteína/100 gr. de músculo fresco). Además, finalizada la etapa preparativa, es necesario realizar una caracterización básica de la fracción de túbulos-t que incluye la determinación de la densidad de sitios de unión de derivados de dihidropiridinas y de ouabaína. En el caso de los experimentos de flujos de Ca²⁺, se determina la cantidad de Ca²⁺ acumulado, el curso temporal de la salida pasiva y la fracción de Ca²⁺ intercambiable por sodio. El bajo rendimiento y esta caracterización preliminar limita el número de los estudios de transporte que se pueden realizar en una misma preparación de membranas.

En un intento de evitar esta limitación, y trabajar con membranas que se obtienen con mucho mayor rendimiento, se realizaron experimentos preliminares con el propósito de caracterizar el intercambiador Na-Ca en una fracción de tríadas. No se obtuvieron resultados apropiados, debido a que el componente mayoritario de retículo sarcoplasmático contamina las mediciones. Esto ocurrió a pesar de usar rojo de rutenio, bloqueador no específico de los canales de liberación de calcio del RS. Además, debido al bajo porcentaje de túbulos-t (10%) en esta preparación (Hidalgo y cols., 1993) se debe trabajar con una mayor cantidad de proteínas, lo que aumenta significativamente el nivel basal de todas las mediciones de Ca^{2+} disminuyendo la relación señal ruido de las mediciones.

2 Origen de las vesículas de túbulos-t usadas en esta Tesis.

Los estudios morfológicos de músculo esquelético de anfibios han demostrado que más del 80% de la membrana tubular son túbulos-t de unión, ya que se encuentran asociados al RS formando uniones tríadicas (Peachey, 1965). Los túbulos-t no asociados al RS se denominan túbulos-t libres. Los receptores de DHPs están presentes sólo en la membrana tubular, y parecen encontrarse exclusivamente en los túbulos-t de unión (Salvatori y cols., 1990). Por lo tanto, la densidad de receptores de DHP es una medida del origen y la pureza de las fracciones tubulares aisladas.

La densidad de sitios de unión de DHP de las preparaciones de túbulos-t usadas en esta tesis fue > 70 pmol [^3H]nitrendipina /mg proteína. Esto indica que la fracción de membrana utilizada tiene un alto grado de pureza y proviene de los túbulos-t de unión. La mayoría de las preparaciones de túbulos-t, tanto de anfibios como de mamíferos, descritas en la literatura tienen menor densidad de receptores (Hidalgo, 1986), lo que señala que contienen menos túbulos-t de unión que la preparación usada en esta Tesis.

3 Flujos de calcio en vesículas de túbulos-t.

3.1 Flujos de entrada de calcio en ausencia de sodio intravesicular.

Es posible estudiar flujos de calcio en las fracciones aisladas de túbulos-t porque la mayoría de las vesículas están selladas. En las condiciones experimentales usadas (vesículas sin sodio), las vías de entrada de calcio más probables son por intercambio Ca-Ca, ya que las vesículas contienen calcio en su interior (Donoso e Hidalgo, 1989), y por fugas inespecíficas. Debido a la inactivación de los canales de calcio tipo L, la probabilidad que se produzcan flujos de entrada de calcio por estos canales es mínima. La ausencia de ATP en el medio de incubación asegura que la bomba de Ca^{2+} no contribuya a los flujos de entrada.

Los experimentos de carga de calcio mostraron que la concentración intravesicular de Ca^{2+} al equilibrio fue en todos los casos significativamente mayor que la concentración de calcio externa. Si el volumen intravesicular fuera de $1,5 \mu\text{L}/\text{mg}$ proteína (Hidalgo y cols., 1991), al equilibrar las vesículas con CaCl_2 2 mM el contenido de Ca^{2+} libre en el equilibrio sería sólo de 3 nmol Ca/mg proteína. El rango encontrado fue de 32 ± 10 nmol Ca/mg proteína ($N = 16$). Estos resultados indican que las vesículas de túbulos-t poseen sitios de unión de calcio, a los cuales se uniría más del 80% del calcio intravesicular. De hecho, se encontró un componente saturable de unión con una afinidad de 3,5 mM y una capacidad máxima de unión de 73 nmoles por mg de proteína.

Debido a la variabilidad en la cantidad de calcio acumulado por las distintas preparaciones de vesículas incubadas en CaCl_2 2 mM, los resultados presentados corresponden a experimentos realizados dos o tres veces en N preparaciones ($N \geq 2$). Sin embargo, a pesar de la variabilidad en los valores absolutos de calcio acumulado, se observaron valores similares de las constantes cinéticas de los flujos de entrada (y también de salida) en todas las preparaciones estudiadas.

Si la entrada de calcio a las vesículas fuera mediada en parte por intercambio $\text{Ca}-\text{Ca}$ y en parte por entrada no específica (fuga), debieran existir dos componentes en los flujos de entrada de calcio. Estos componentes debieran

tener distintas dependencias de temperatura, ya que un proceso mediado por un transportador presenta una dependencia de la temperatura (Q_{10}) mucho mayor que un proceso pasivo. El hecho que la constante de velocidad aparente disminuyera de $0,8 \pm 0,3 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ a $0,28 \pm 0,01 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ al bajar la temperatura de 25°C a 5°C , indica que una fracción del calcio entra por transporte mediado.

Para intentar separar ambos componentes, se supuso que la constante de velocidad de salida por fuga, $0,2 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, es igual a la constante de velocidad de entrada mediada por fuga. Se utilizó, además, el valor de constante de entrada mediada por intercambio Ca-Ca, $4,3 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, obtenido a 5°C . Con estos valores se construyó una función que representa la suma de los dos componentes:

$$f(x) = A (1 - \exp(-k_1 t)) + B (1 - \exp(-k_2 t))$$

donde k_1 y k_2 representan los valores de las constantes de entrada del componente mediado y del componente pasivo, respectivamente.

Para realizar este análisis se escogieron los datos obtenidos a 5°C , ya que a esta temperatura existen suficientes puntos experimentales tempranos. De este ajuste se obtuvieron valores de $A = 3 \text{ nmol/mg}$ y $B = 17 \text{ nmol/mg}$, con un $R^2 = 0,98$ (Fig. 10, línea de puntos), en tanto que el ajuste con una función monoexponencial (Fig. 10, línea de trazos) dio un valor de R^2 de 0,97. El ajuste con la función que define dos componentes de entrada indicaría que sólo una fracción minoritaria, 15%, del calcio acumulado por las vesículas entraría vía intercambio

Ca-Ca. Este pequeño componente sólo contribuiría a la entrada total en tiempos menores de 10 minutos, lo que podría explicar por que sólo los puntos tempranos se desvían del ajuste con una función mono-exponencial.

Es posible realizar un análisis similar para la cinética de entrada obtenida a 25 °C. Suponiendo un componente de entrada mediado por intercambio Ca-Ca de sólo 15% de la entrada total, éste contribuiría muy poco a la entrada de calcio medida a tiempos superiores a 10 minutos. De hecho, es posible ajustar a los puntos experimentales sobre 10 minutos una función mono-exponencial con la misma k de la entrada pasiva.

3.2 Flujos de salida de Ca^{2+} .

Los estudios de salida de calcio hacia una solución externa que no contenía sodio ni calcio mostraron que el calcio salía lentamente de las vesículas, indicando que las vesículas se encuentran selladas y que poseen una baja permeabilidad a calcio. Este componente se atribuyó a fugas inespecíficas.

Para estudiar la salida de Ca^{2+} mediada por el intercambiador Na-Ca, se midió la salida de Ca^{2+} hacia un medio extravesicular sin Ca^{2+} y que contenía Na^+ 140 mM. En estas condiciones deberían manifestarse el componente de fuga y el componente de intercambio Na-Ca. Se observó que sólo una fracción del Ca^{2+} acumulado era intercambiada por sodio, con una constante de velocidad de salida

en el rango de $70 \pm 30 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (N = 4). Por otra parte, al pre-equilibrar las vesículas con CaCl_2 2 mM y luego cargarlas con ^{45}Ca mediante intercambio ^{45}Ca -Ca, para posteriormente inducir la salida de Ca^{2+} hacia un medio de salida de composición idéntica al anterior, se encontró que la fracción de calcio que era intercambiada por sodio fue significativamente mayor que el control, los valores de las constantes de salida fueron similares. Los valores absolutos del calcio intercambiado fueron similares, por lo que la diferencia en la fracción de calcio intercambiado se explica porque las vesículas acumulan un menor contenido de calcio mediante intercambio ^{45}Ca -Ca que en la condición control.

El hecho que sólo un porcentaje del calcio intravesicular sea intercambiado por sodio se puede explicar suponiendo ya sea la existencia de dos poblaciones de vesículas, una población que posea el intercambiador y otra que no lo posea; o bien, que existan dos clases de sitios de unión de Ca^{2+} al interior de las vesículas, uno desde el cual el calcio se pueda intercambiar rápidamente por sodio (o por calcio) y otro sitio, con mayor afinidad, desde el cual el calcio se intercambie lentamente. No es posible discernir entre ambos mecanismos con los resultados experimentales obtenidos, ya que ambos modelos explican el hecho que aumente la fracción de Ca^{2+} intercambiable por sodio al preincubar las vesículas con CaCl_2 .

Un resumen de las propiedades cinéticas de los flujos de calcio se presenta en la siguiente Tabla:

Tabla 4. Propiedades cinéticas de los flujos de calcio en vesículas de túbulos-t.

Flujos de entrada	Constante de velocidad $k * 10^3 \text{ seg}^{-1}$
Ca-Ca	4,3 ± 0,7
Ca-Ca (residual, 25 °C)	0,8 ± 0,3
Ca-Ca (residual, 5 °C)	0,28 ± 0,03
Flujos de salida	
inespecífico (0 Na-0 Ca)	0,2 ± 0,1
Na-Ca	70 ± 30

A partir de los datos obtenidos se pueden calcular los flujos unidireccionales de salida de calcio. Suponiendo que las vesículas de túbulos-t son esferas de un radio de 50 nm y que 1 mg de vesículas ocupa un volumen de 1,5 µL (Hidalgo y cols., 1991), el volumen de una vesícula es de $5,2 * 10^{-16} \text{ cm}^3$, su superficie es de $3,1 * 10^{-10} \text{ cm}^2$ y 1 mg de vesículas contendría $3 * 10^{12}$ vesículas. Las velocidades iniciales de salida de calcio se calculan de la relación $A * k$, donde A es la cantidad total de calcio intercambiado por sodio y k la constante de velocidad del proceso de intercambio. Con valores de A de 18 nmol $\text{Ca}^{2+} / \text{mg}$ proteína y de k de $70 * 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ (a 5 °C), se obtienen velocidades de

salida en el rango de $1,2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ seg}^{-1}$. Transformados a flujos de salida de calcio, se obtienen valores de flujos de $1,3 * 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$.

Efecto del calcio extravesicular. Al comparar las velocidades de salida de Ca^{2+} en medios con sodio 140 mM y distintas concentraciones de calcio extravesicular, se encontró que el calcio externo enlentecía la salida de calcio (Hidalgo y cols., 1991). Este efecto del calcio citoplasmático sobre el intercambiador Na-Ca es completamente diferente a lo informado hasta la fecha. Como se mencionó en la Introducción, se ha descrito en otras preparaciones la existencia de un sitio intracelular que une calcio y que activa el intercambio Na-Ca (Hilgeman y cols., 1992; DiPolo y Beaugé, 1991; Rasgado-Flores y cols., 1991).

Considerando esta diferencia, se caracterizó el efecto del Ca^{2+} externo sobre la velocidad de salida de Ca^{2+} en medios con Na^+ 140 mM y diferente pCa controlado. La concentración de calcio a la cual se obtuvo el 50% del efecto fue de $\approx 10^{-7} \text{ M}$ (pCa = 7,06), valor que está en el rango de las concentraciones de calcio citoplasmático reportadas en fibras musculares esqueléticas en reposo. La afinidad de este sitio sugiere que podría tratarse de un sitio regulador más que de un sitio de transporte. Este valor es menor que el K_m para calcio intracelular del intercambiador cardíaco (Reeves y Sutko, 1983) y también es menor que el K_d del sitio regulador intracelular presente en axón, medido en ausencia de ATP (DiPolo y Beaugé, 1991). La existencia de este sitio regulador en el

intercambiador Na-Ca de fibras musculares de anfibio, indicaría que al aumentar el calcio intracelular se enlentecería la entrada de calcio a través del intercambiador Na-Ca.

Recientemente se ha descrito el clonamiento de un intercambiador Na-Ca presente en *Drosophila* el que muestra un fenotipo distinto de regulación por Ca^{2+} (Hryshko y cols., 1995). A diferencia de lo descrito con la isoforma NCX1 y en similitud a lo encontrado en esta Tesis, el intercambiador de *Drosophila* es inhibido por concentraciones de Ca^{2+} citosólico submicromolares (Buchko y cols., 1996). Los estudios de la secuencia del cADN revelaron que este intercambiador es 48% idéntico con la isoforma NCX1 a nivel de aminoácidos, y que posee sitios de unión de Ca^{2+} de secuencia similar a la encontrada en la isoforma NCX1 (Buchko y cols., 1996). Estos resultados plantean la interrogante de por qué un sitio regulador con estructura similar efectúa acciones completamente diferente en intercambiadores que presentan un alto porcentaje de homología. Si los dos fenotipos regulatorios están relacionados al mismo sitio de unión de Ca^{2+} , debieran existir etapas intermedias, entre la unión de Ca^{2+} y la regulación del funcionamiento del intercambiador Na-Ca, que sean distintas entre los diferentes fenotipos de intercambiador.

En este contexto sería muy interesante realizar la comparación de la secuencia y posible topología del intercambiador Na-Ca de músculo esquelético

de anfibio y compararla con la isoforma de músculo esquelético de mamíferos y de *Drosophila*, y determinar si este sitio regulador es conservado en la isoforma presente en anfibios. Probablemente este sitio de unión de Ca^{2+} sea conservado entre las diferentes especies y los distintos fenotipos sean consecuencia de la presencia de otro sitio regulador diferente.

Efecto del sodio extravesicular. Los estudios del efecto de sodio sobre la velocidad de salida de Ca^{2+} , mostraron que la salida de calcio de las vesículas era regulada por sodio en forma cooperativa. A los datos experimentales se les pudo ajustar una función de Hill, encontrándose un número de Hill de 2,7 y una constante K_H de 55 mM para sodio. Estos datos concuerdan con lo informado en la literatura para el intercambiador cardíaco, y son consistentes con una estequiometría de intercambio de 3 Na^+ por 1 Ca^{2+} .

Finalmente, se debe mencionar que esta propiedad de intercambio Na-Ca presente en las vesículas de túbulos-t de músculo esquelético de anfibio *Caudiverbera caudiverbera* se pierde en el transcurso de unos días. La razón de esta pérdida se desconoce.

4 Inmunodetección del intercambiador Na-Ca.

Los estudios de inmunodetección del intercambiador Na-Ca, utilizando el anticuerpo policlonal $\Pi 8-10$ contra la isoforma cardíaca (NCX1), se han realizado en membranas aisladas de músculo cardíaco o en líneas celulares transfectadas con el cADN de la isoforma NCX1 del intercambiador Na-Ca. Estos estudios han reportado proteínas de 160, 120 y 70 kDa que corresponderían al intercambiador; este anticuerpo reacciona además con otras bandas proteicas de la preparación de sarcolema cardíaco (Philipson y cols., 1988; Vemuri y cols., 1990; Iwata y cols., 1995; Sacchetto y cols., 1996). Hasta el momento, $\Pi 8-10$ es el único anticuerpo disponible para realizar la inmunodetección de la isoforma NCX1 mediante la técnica de inmunoblot (K. Philipson, comunicación personal).

Los estudios de hibridación de ARN realizados en músculo esquelético de mamíferos indican que ambas isoformas del intercambiador Na-Ca se expresan a nivel de ARN mensajero (Kofuji y cols., 1992; Li y cols., 1994). No existen a la fecha estudios de este tipo que indiquen cuál de las isoformas del intercambiador Na-Ca está presente en músculo esquelético de anfibios.

En esta Tesis, los estudios de inmunodetección usando el anticuerpo $\Pi 8-10$ y otro anticuerpo policlonal contra un péptido perteneciente a la isoforma NCX2, sugieren que en las vesículas aisladas de túbulos-t de *Rana catesbiana* están presentes ambas isoformas del intercambiador Na-Ca. Por otra parte, en la

preparación de túbulos-t del anfibio *Caudiverbera caudiverbera* los resultados obtenidos sólo mostraron la presencia de la isoforma NCX2 del intercambiador. En relación a la presencia de la isoforma NCX1 en este anfibio, los resultados no son concluyentes, puesto que sólo en algunas preparaciones de túbulos se obtuvo inmunoreacción, pero con bandas proteicas de masa molecular inferiores a las del intercambiador.

En conclusión, estos resultados son la primera indicación de que una o las dos isoformas del intercambiador Na-Ca están presentes en los túbulos-t de músculo esquelético de anfibios.

5 Estudio del intercambiador Na-Ca mediante técnicas electrofisiológicas.

Se estudió la actividad del intercambiador en fibras musculares únicas aisladas de *Rana catesbiana* produciendo cambios en el gradiente electroquímico de sodio o de calcio y determinando el efecto de estos cambios en las corrientes iónicas y en la concentración de calcio citosólico.

Experimentos sin sodio externo. Considerando las concentraciones de sodio y de calcio intracelulares y de la solución de superfusión, y el potencial de mantenimiento de las fibras (-90 mV), al eliminar el sodio de la solución externa se puede calcular que el potencial de inversión del intercambiador es del orden de

-600 mV. En estas condiciones el intercambiador funciona en el modo reverso, lo que debería producir una corriente iónica de salida de sodio acoplada a la entrada de Ca^{2+} a la fibra muscular.

Se encontró que al reemplazar el sodio por otro catión monovalente en la solución de perfusión, se producía una corriente iónica de salida, con una magnitud neta de $0,36 \pm 0,17 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ a 15°C . Estas corrientes fueron reversibles, puesto que al superfundir nuevamente la fibra con soluciones con sodio se eliminó la corriente neta, lo que indica que ella está asociada estrechamente al cambio de gradiente electroquímico para sodio. Más aún, suponiendo que la capacitancia de la membrana es de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$, esta corriente neta corresponde a un flujo neto de salida de $3,7 * 10^{-12}$ equivalentes $\text{cm}^{-2} \text{seg}^{-1}$. Si en cada ciclo del intercambiador actuando en el modo reverso se transportan 3 equivalentes de sodio hacia afuera y dos equivalentes de calcio hacia adentro, este flujo neto corresponde a un flujo de entrada de calcio de $3,7 \text{ pmoles cm}^{-2} \text{seg}^{-1}$. Este valor es de magnitud comparable a los flujos de salida de calcio, $1,3 \text{ pmoles cm}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 5°C , obtenidos en vesículas de túbulos-t. Tanto la reversibilidad de la corriente neta, como la coincidencia en las magnitudes de los flujos de salida de calcio, son consistentes con la idea de que la corriente medida al eliminar el sodio externo es debida al intercambiador Na-Ca funcionando en el modo reverso.

En relación a la variación en la concentración intracelular de calcio, se esperaba que el funcionamiento del intercambiador en el modo reverso produjera un aumento en la concentración intracelular de calcio. Se puede hacer un cálculo aproximado de la variación en la concentración de calcio (sin tomar en cuenta la difusión en el citoplasma hacia los extremos cortados) si se supone que el segmento de la fibra muscular en que se registra la corriente corresponde a un cilindro con un volumen de $1,57 * 10^{-6} \text{ cm}^3$ (100 μm de diámetro y 200 μm de largo), a través de cuya superficie fluye una corriente neta de salida de 6 nA. Esta corriente corresponde a un flujo iónico de $6,2 * 10^{-14}$ equivalentes/seg., a través de la superficie de la fibra que se registra. Por lo tanto, durante un registro de 1 minuto en solución externa sin sodio debieran entrar $2,3 * 10^{-6} \text{ mol Ca}^{2+}/\text{cm}^3$ y la concentración de calcio debiera aumentar a 2,3 mM. Considerando que el espacio intracelular de una fibra muscular está ocupado mayoritariamente por las miofibrillas, el aumento en la concentración de calcio intracelular debiera ser mayor aún. Sin embargo, los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico fueron apenas detectables con el método empleado, siendo menores de 0,1 μM .

El hecho que no se haya detectado un aumento en la concentración de calcio citoplasmático de la magnitud esperada podría explicarse suponiendo que el calcio que entra es bombeado hacia el RS por acción de la Ca^{2+} -ATPasa. En una fibra muscular que funciona normalmente, el RS posee una gran capacidad de

almacenamiento de calcio, y por lo tanto es capaz de mantener el calcio citoplasmático en los niveles de reposo ($0,1 \mu\text{M}$). De modo que si esta explicación es correcta, para obtener un aumento significativo del calcio libre citosólico sería indispensable tener previamente inhibida la Ca^{2+} -ATPasa del RS.

Para comprobar esta hipótesis, se intentó bloquear la Ca^{2+} -ATPasa del RS con tapsigargina, droga que preferentemente inhibe esta enzima y que ha sido utilizada en fibras musculares de anfibio (Caputo y Bolaños, 1995). Sin embargo, estos experimentos no fueron exitosos, porque a pesar de usar dosis bajas, la tapsigargina resultó dañina a las fibras musculares, que sufrieron contracturas probablemente causadas por el aumento en el Ca^{2+} citosólico por efecto de la droga. A concentraciones menores de tapsigargina no se observaron efectos, pero siempre se puede suponer que estas dosis estaban por debajo del rango farmacológico apropiado. Sin embargo, queda la posibilidad que las corrientes netas medidas al eliminar el sodio externo no se deban al intercambiador.

Aumento de calcio citosólico. Como una aproximación complementaria para estudiar la actividad del intercambiador Na-Ca en fibras aisladas de músculo esquelético de anfibios, se varió el gradiente electroquímico del calcio, produciendo un aumento en la concentración citosólica de calcio, por fotólisis del complejo DM-nitrophen: Ca^{2+} , y midiendo si este aumento en el calcio activaba una corriente iónica.

El método de liberar calcio desde DM-nitrophen ha sido aplicada exitosamente en el estudio del intercambiador Na-Ca de músculo cardíaco (Niggli & Lederer, 1991; Niggli & Lederer, 1993; Niggli & Lipp, 1994), pero no existen estudios semejantes en músculo esquelético. Niggli y Lederer (1991, 1993) encontraron que la liberación de Ca^{2+} desde el complejo DM-nitrophen: Ca^{2+} , activa una corriente de entrada transitoria en células cardíacas. La magnitud de esta corriente es dependiente de la temperatura y del potencial de membrana, variando entre valores de $0,7 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ a $V_m = 0 \text{ mV}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, a valores de $10 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ a $V_m = -80 \text{ mV}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Se postula que esta corriente se debe a la entrada de Na^+ por el intercambiador Na-Ca funcionando en el modo directo.

Otra estrategia para producir aumentos en la concentración de calcio citosólica en cardiocitos fue adoptada por Hatem y cols. (1994), quienes dando pulsos rápidos de cafeína para liberar calcio desde el RS, activaron una corriente iónica de entrada de $3,7 \pm 0,5 \text{ pA/pF}$ ($V_m: -80 \text{ mV}$, $22-24 \text{ }^\circ\text{C}$). Por analogía con los experimentos de Niggli y Lederer, estos autores atribuyeron esta corriente al intercambiador Na-Ca.

Se encontró que en fibras musculares esqueléticas, la liberación de Ca^{2+} desde el complejo DM-nitrophen: Ca^{2+} produjo la activación de una corriente de entrada de alrededor de 20 nA ($0,3-1 \mu\text{A}/\mu\text{F}$, a $15 \text{ }^\circ\text{C}$). Estas corrientes se activaron en forma instantánea con el disparo UV de láser y permanecieron

estables durante el tiempo que duró el registro (50 msec.). Esto demuestra que en músculo esquelético de anfibio existen mecanismos que responden instantáneamente a los aumentos citosólicos de calcio generando una corriente iónica de entrada. Por analogía a lo observado en músculo cardíaco, proponemos que esta corriente representa la entrada de sodio por el intercambiador. Como en las soluciones internas que difunden desde los extremos cortados de las fibras se utilizó aspartato como anión; la posibilidad que se active una corriente aniónica (de salida) en respuesta al aumento del calcio citosólico es baja.

6 Implicaciones fisiológicas.

Se propone que en una fibra de músculo esquelético en reposo, el intercambiador Na-Ca funcionaría en el modo directo a muy baja velocidad, debido a la $K_{0,5}$ descrita de $2,7 \mu\text{M}$ (Donoso e Hidalgo, 1989). Sin embargo, tras episodios de estimulación sostenida en que el calcio citosólico alcanza niveles micromolares, el intercambiador, en analogía con lo que ocurre en músculo cardíaco, sería un mecanismo eficiente de remoción de calcio hacia el medio extracelular. Durante el potencial de acción, cuando se cumple la condición que V_m es mayor que $E_{\text{Na-Ca}}$, entraría Ca^{2+} vía el intercambiador. Sin embargo, dada la gran capacidad de almacenamiento del RS, el calcio que entra sería bombeado hacia el interior del mismo.

A la luz de los resultados encontrados, los experimentos de García y cols. (1992) y de Kawata y Fujishiro (1990) descritos en la Introducción se pueden explicar postulando que al superfundir las fibras musculares con soluciones sin sodio, el intercambiador Na-Ca funciona en el modo reverso, permitiendo la entrada de calcio a las fibras; este calcio es bombeado al interior del RS y debido al mayor contenido de Ca^{2+} en el RS se produce un aumento significativo de la magnitud de las contracturas inducidas por cafeína o por despolarización por potasio.

En conclusión, considerando los resultados mostrados tanto en fibras como en vesículas, se propone que el intercambiador Na-Ca podría tener dos funciones diferentes en el mantenimiento de la homeostasis del calcio en músculo esquelético de anfibio. Actuando en el modo directo, movería calcio fuera de la fibra tras un aumento significativo de su concentración intracelular. Actuando en el modo reverso, podría operar como un mecanismo fisiológico de relleno del RS.

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de esta Tesis se enumeran a continuación:

- 1) los estudios de flujos de salida de Ca^{2+} revelan la presencia del intercambiador Na-Ca en las vesículas de túbulos-t aisladas de músculo esquelético de *Caudiverbera caudiverbera*, puesto que alrededor del 40 % del calcio acumulado al interior de las vesículas es intercambiado por sodio extravesicular,
- 2) la constante de velocidad de salida de calcio (hacia un medio de Na 140, EGTA 10) se estimó en $70 \pm 30 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, en tanto que la constante de velocidad de entrada de calcio se estimó en $4,3 \pm 0,7 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$.
- 3) las vesículas de túbulos-t acumulan calcio, porque poseerían sitios de unión de calcio internos, los que presentan una afinidad para calcio de $3,5 \pm 1,1 \text{ mM}$,
- 4) la velocidad de salida de calcio es modulada negativamente por el calcio extravesicular, encontrándose una $K_{0,5}$ de $0,1 \mu\text{M}$ para este efecto modulador,
- 5) el sodio extravesicular activa en forma cooperativa la salida de Ca^{2+} desde las vesículas, con un número de Hill de 2,7 y una constante para sodio de 55 mM,
- 6) los estudios de inmunodetección sugieren que en músculo esquelético de las dos especies de anfibios estudiados, *Rana catesbiana* y *Caudiverbera*

caudiverbera, se encontraría presente la isoforma NCX2, mientras que la isoforma cardíaca sólo se detectó en túbulos-t de *Rana catesbiana*,

7) las mediciones de corrientes iónicas realizadas en fibras musculares aisladas revelan que las manipulaciones de los gradientes electroquímicos del calcio o del sodio, activan corrientes iónicas, que se deberían al funcionamiento del intercambiador Na-Ca,

8) en estos mismos ensayos, los estudios en fibras musculares aisladas utilizando colorantes sensibles a Ca^{2+} mostraron pequeñas variaciones en la concentración de calcio citoplasmático, lo cual indica probablemente que el calcio que entra a la fibra muscular, vía el intercambiador Na-Ca, es bombeado al interior del retículo sarcoplasmático por acción de la Ca^{2+} -ATPasa,

REFERENCIAS

1. Ashcroft, F.M.; Heiny, J. y Vergara, J. Inward rectification in the transverse tubular system of frog skeletal muscle studied with potentiometric dyes. *J. Physiol. (London)* 359:269-291. 1985.
2. Baker, P.F., Blaustein, M., Hodgkin, A.L. y Steinhardt, R.A. The effect of sodium concentration on calcium movements in giant axons of *Loligo forbesi*. *J. Physiol. (London)* 192: 43-44P, 1967.
3. Baker, P.F., Blaustein, M., Hodgkin, A.L. y Steinhardt, R.A. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol. (Lond)* 200: 431-458, 1969.
4. Baker, P.F. y Knight, D.E. Exocytosis: Control by calcium and other factors. *British Med. Bull.* 42:399-404, 1986.
5. Bers, D.M. Na/Ca exchange and the sarcolemmal Ca-pump. In: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. pp. 71-92, 1991.
6. Blaustein, M.P., DiPolo, R. y Reeves, J. Sodium-calcium exchange. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v.639. 1991
7. Buchko, J., Hnatowich, M. y Hryshko, L.V. The same regulatory Ca^{2+} binding site is employed by NCX1 and Calx for opposite Ca_i^{2+} regulation phenotypes. *Biophys. J.* 70: A203, 1996.
8. Caputo, C. and Bolaños, P. Effect of external sodium and calcium on calcium efflux in frog striated muscle. *J. Membr. Biol.* 41:1-14, 1978.

9. Caputo,C. and Bolaños,P. Effect of thapsigargin on isometric tension and Fluo-3 calcium transients of amphibian skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 68:A313, 1995.
10. Cifuentes,F., Escobar,A.L. y Vergara,J.L. CalciumOrange-5N: A low affinity indicator able to track the fast release of calcium in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 68:A419, 1995.
11. Cosmos,E.E. y Harris,E.J. *In vitro* studies of the gain and exchange of calcium in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 44: 1121-1130, 1961.
12. Cota,G. y Stefani,E. Voltage-dependent inactivation of slow calcium channels in intact twitch muscle fibers of the frog. *J. Gen. Physiol.* 94:937-951, 1989.
13. Curtis,B.M. y Catterall,W.A. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23: 2113-2118, 1984.
14. DiPolo,R. Calcium influx in internally dialyzed squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 73:91-113, 1979.
15. DiPolo,R. y Beaugé,L. Regulation of Na-Ca exchange: an overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 639:100-111, 1991.
16. Donoso,P. e Hidalgo,C. Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 978: 8-16, 1989.
17. Escobar,A.L., Cifuentes,F. y Vergara,J.L. Detection of Ca^{2+} -transients elicited by flash photolysis of DM-nitrophen with a fast calcium indicator. *FEBS Lett.* 364:335-338, 1995.
18. Espinosa-Tanguma,R., DeSantiago,J. y Rasgado-Flores,H. α -Chymotrypsin deregulation of the sodium-calcium exchanger in barnacle muscle cells. *Am. J. Physiol.* 265: C1118-C1127, 1993.
19. Fabiato,A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245: C1-C14, 1983.

20. Flockerzi, V., Oeken, H.-J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalié, A. y Trautwein, W. Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323: 66-68, 1986.
21. Floreani, M., Tessari, M., Debetto, P., Luciani, S. y Carpenedo, F. Effects of N-chlorobenzyl analogues of amiloride on myocardial contractility, Na-Ca exchange carrier and other cardiac enzymatic activities. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 336: 661-669, 1987.
22. Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E. y Lazdunski, M. [³H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258: 6086-6091, 1983.
23. Frank, J.S., Mottino, G., Reid, D., Molday, R.S. y Philipson, K.D. Distribution of the Na⁺-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labelling study. *J. Cell. Biol.* 117: 337-345, 1992.
24. Franzini-Armstrong, C. Studies of the triads. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* 47: 488-499, 1970.
25. Gabellini, N., Zatti, A., Rispoli, G., Navangione, A. y Carafoli, E. Expression of an active Na⁺/Ca²⁺ isoform lacking the six C-terminal transmembrane segments. *Eur. J. Biochem.* 239:897-904, 1996.
26. Garcia, M.C., Diaz, A.F., Godinez, R. and Sanchez, J.A. Effect of sodium deprivation on contraction and charge movement in frog skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13: 354-365, 1992.
27. Ghosh, A. y Greenberg, M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247, 1995.
28. Gilbert, J.R., y Meissner, G. Sodium-calcium exchange in skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *J. Membrane Biol.* 69: 77-84, 1982.

29. Harkins, A.B., Kurabayashi, N. y Baylor, S.M. Resting myoplasmic free $[Ca^{2+}]_i$ measured with fura red and Fluo-3 in intact single twitch fibers from frog skeletal muscle. *Biophys. J.* 64: A241, 1993.
30. Hartree, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422-427, 1972.
31. Hatem, S.N., Sham, J.S.K. y Morad, M. Enhanced Na^+ - Ca^{2+} exchange activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ. Res.* 74:253-261, 1994.
32. Hidalgo, C. Isolation of muscle membranes containing functional ionic channels. In: *Ionic channels in cells and model systems* (Latorre, R. ed.), pp 101-125. Plenum Publishing Corp., 1986.
33. Hidalgo, C., Gonzalez, M.E. y García, A.M. Calcium transport in transverse tubules isolated from rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 854:279-286, 1986a.
34. Hidalgo, C., Parra, C., Riquelme, G. y Jaimovich, E. Transverse tubules from frog skeletal muscle. Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation. *Biochim. Biophys. Acta* 855: 79-88, 1986b.
35. Hidalgo, C., Carrasco, M.A., Magendzo, K. y Jaimovich, E. Phosphorylation of phosphatidylinositol by transverse tubules vesicles and its possible role in excitation-contraction coupling. *FEBS Lett.* 202: 69-73, 1986c.
36. Hidalgo, C.; Cifuentes, F. y Donoso, P. Sodium-calcium exchange in transverse tubule vesicles isolated from amphibian skeletal muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 639: 483-497, 1991.
37. Hidalgo, C., Jorquera, J., Tapia, V. y Donoso, P. Triads and transverse tubules isolated from skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268: 15111-15117, 1993.

38. Hilfiker,H., Guerini,D. y Carafoli,E. Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane Ca^{2+} ATPase. J. Biol. Chem. 269: 26178-26183, 1994.
39. Hilgemann,D.W., Collins,A. y Matsuoka,S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. J. Gen. Physiol. 100: 933-961, 1992.
40. Hilgeman,D.W. y Ball,R. Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP2. Science 273:956-959, 1996.
41. Hille,B. y Campbell,D.T. An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibres. J. Gen. Physiol. 67:265-293, 1976.
42. Hoya,A. y Venosa,R.A. Characteristic of Na^+ - Ca^{2+} exchange in frog skeletal muscle. J. Physiol. (Lond.) 486: 615-627, 1995.
43. Hryshko,L.V., Nicoll,D.A., Matsuoka,S., Weiss,J.N., Schwarz,E., Benzer,S. y Philipson,K.D. Anomalous regulation of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger from *Drosophila*. Biophys. J. 68:A410. 1995.
44. Inui,M., Saito,A. y Fleischer,S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. J. Biol. Chem. 262: 1740-1747, 1987.
45. Iwata,T., Galli,C., Dainese,P., Guerini,D. y Carafoli,E. The 70 kD component of the heart sarcolemmal Na^+ / Ca^{2+} -exchanger preparation is the C-terminal portion of the protein. Cell Calcium 17:263-269, 1995.
46. Jaimovich,E., Donoso,P., Liberona,J.L. e Hidalgo,C. Ion pathways in transverse tubules. Quantification of receptors in membranes isolated from frog and rabbit skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 855: 89-98, 1986.
47. Kawata,H. and Fujishiro,N. Effects of sodium depletion on the caffeine-induced contraction of frog's skeletal muscle. Japanese Journal of Physiology. 40:243-251, 1990.

48. Kieval,R.S., Bloch,R.J., Lindenmayer,G.E., Ambesi,A. y Lederer,W.J. Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *Am. J. Physiol.* 263: C545-C550, 1992.
49. Kimura,J., Miyamae,S. y Noma, A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells in guinea pigs. *J. Physiol.* 384: 199-222, 1987.
50. Kofuji,P., Hadley,R.W., Kieval,R.S., Lederer,W.J. y Schulze,D.H. Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger. *Am. J. Physiol.* 263:C1241-C1249, 1992.
51. Kofuji,P., Lederer,W.J. y Schulze,D.H. Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter. *J. Biol. Chem.* 269: 5145-5149, 1994.
52. Lai,F.A., Erickson,H.F., Rousseau,E., Li,Q.-Y. y Meissner,G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331: 315-319, 1988.
53. Lakshminarayanaiah,N. Equations of membrane biophysics. pp 59-63, Academic Press,Inc. Orlando, FL, 1984.
54. LeBlanc,N. and Hume,J.R. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 248:372-375, 1990.
55. Lederer,W.J.; Niggli,E. and Hadley,R.W. Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science* 248, 283, 1990.
56. Li,Z., Matsuoka,S., Hryshko,L.V., Nicoll,D.A., Bersohn,M.M., Burke,E.P., Lifton,R.P. and Philipson,K.D. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *J. Biol. Chem.* 269(26): 17434-17439, 1994.
57. Ma,J y Coronado,R. Heterogeneity of conductances states in calcium channels of skeletal muscle. *Biophys. J.* 53: 387-395, 1988.

58. Michalak, M., Famulski, K. y Carafoli, E. The Ca^{2+} -pumping ATPase in skeletal muscle sarcolemma. Calmodulin dependence, regulation by cAMP-dependent phosphorylation, and purification. *J. Biol. Chem.* 259:15540-15547, 1984.
59. Mickelson, J.R., Beaudry, T.M. and Louis, C.F. Regulation of skeletal muscle sarcolemmal ATP-dependent calcium transport by calmodulin and cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 127-136, 1985.
60. Miura, Y. y Kimura, J. Sodium-calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *J. Gen. Physiol.* 93: 1129-1145, 1989.
61. Nicoll, D.A., Longoni, S. and Philipson, K.D. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} antiporter. *Science* 250:562-565, 1990.
62. Nicoll, D.A. y Philipson, K.D. Molecular studies of the cardiac sarcolemmal sodium-calcium exchanger. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 639:181-188, 1991.
63. Nicoll, D.A., Quednau, B., Qiu, Z., Xia, Y.-R., Lusic, A.J. y Philipson, K.D. Cloning of a third mammalian Na^{+} - Ca^{2+} exchanger: NCX3. *Biophys. J.* 70: A202, 1996a.
64. Nicoll, D.A., Quednau, B., Qiu, Z., Xia, Y.-R., Lusic, A.J. y Philipson, K.D. Cloning of a third mammalian Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCX3. *J. Biol. Chem.* 271: 24914-24921, 1996b.
65. Niggli, E. y Lederer, W.J. Molecular operations of the Na-Ca exchanger revealed by conformation currents. *Nature (Lond.)*. 349:621-624, 1991.
66. Niggli, E. y Lederer, W.J. Activation of the Na-Ca exchange current by photolysis of "caged calcium". *Biophys. J.* 65:882-891, 1993.

67. Niggli,E. y Lipp,P. Voltage dependence of Na-Ca exchanger conformational currents. *Biophys. J.* 67: 1516-1524, 1994.
68. Peachey,L.D. The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of frog's sartorius. *J. Cell Biol.* 25:209-231, 1965.
69. Philipson,K.D., y Nishimoto,A.Y. Na^+ - Ca^{2+} exchange is affected by membrane potential in cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* 255: 6880-6882, 1980.
70. Philipson,K.D., Longoni,S. y Ward,R. Purification of the cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchange protein. *Biochim. Biophys. Acta* 945: 298-306, 1988.
71. Quednau,B., Nicoll,D.A. y Philipson,K.D. Tissue-specific expression of the Na/Ca exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3. *Biophys. J.* 70: A202, 1996.
72. Rasgado-Flores,H., DeSantiago,J. y Espinosa-Tanguma,R. Stoichiometry and regulation of the Na-Ca exchanger in barnacle muscle cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 639:22-33, 1991.
73. Reeves,J.P. y Sutko,J.L. Sodium-calcium exchange in cardiac membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 590-594, 1979.
74. Reeves,J.P. y Sutko,J.L. Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles. *Science* 208: 1461-1464, 1980.
75. Reeves,J.P. y Sutko,J.L. Competitive interactions of sodium and calcium with the sodium-calcium exchange system of cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* 3178-3182, 1983.
76. Reuter,H. y Seitz,N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol.* 195: 45-70, 1968.
77. Ríos,E. y Brum,G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325: 717-720, 1987.

78. Sacchetto,R., Margreth,A., Pelosi,M. y Carafoli,E. Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 237:483-488, 1996.
79. Salvatori,S., Damiani,E., Barbani,J., Furlan,S., Salviati,G. y Margreth,A. Co-localization of the dihydropyridine receptor and the cyclic AMP-binding subunit of an intrinsic protein kinase to the junctional membrane of the transverse tubules of skeletal muscle. *Biochem. J.* 267:679-687, 1990.
80. Sánchez,J.A. y Stefani,E. Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol. (London)* 337:1-17, 1983.
81. Shieh, B.H., Xia,Y., Sparkes,R.S., Klisak,I., Lusic,A.J., Nicoll,D.A. y Philipson,K.D. Mapping of the gene for the cardiac sarcolemmal Na-Ca exchanger to human chromosome 2p21-p23. *Genomics* 12:616-617, 1992.
82. Schulze,D., Kofuji,P., Hadley,R., Kirby,M.S., Kieval,R.S., Doering,A., Niggli,E. y Lederer,W.J. Sodium/calcium exchanger in heart muscle: molecular biology, cellular function, and its special role in excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.* 27:1726-1734, 1993.
83. Sham,J.S.K., Cleemann,L. y Morad,M. Gating of the cardiac Ca^{2+} release channel: The role of Na^+ current and Na^+-Ca^{2+} exchange. *Science* 255:850-853, 1992.
84. Siegl,P.K.S., Cragoe,Jr.,E.J., Trumble,M.J. and Kaczorowski,G.J. Inhibition of Na^+/Ca^{2+} exchange in membrane vesicles and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3238-3242. 1984.

85. Van Reuterghem, C. y Frelin, C. 3,4 dichlorobenzamil-sensitive, monovalent cation channel induced by palytoxin in cultured aortic myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 109: 859-865, 1993.
86. Vemuri, R., Haberland, M.E., Fong, D. y Philipson, K.D. Identification of the sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger using monoclonal antibodies. *J. Membr. Biol.* 118:279-283, 1990.
87. Vergara, J.; Delay, M.; Heiny, J. y Ribalet, B. Optical studies of t-system potential and calcium release in skeletal muscle fibers. In: *The Physiology of Excitable Cells*, Alan R. Liss, Inc., NY, pp. 343-355. 1983.
88. Vergara, J. y Escobar, A. Detection of Ca^{2+} transients in skeletal muscle fibers using the low affinity dye Calcium-green-5N. *Biophys. J.* 64: A37, 1993.
89. Zucker, R. Photorelease techniques for raising or lowering intracellular Ca^{2+} . In: *Methods in Cell Biology* (Nuccitelli, R. ed.) Vol 40, pp 31-63. Academic Press, San Diego, CA. 1994.