

**REGISTRO DE CAMBIOS TRANSITORIOS DE LA CONCENTRACION
INTRACELULAR DE Ca^{2+} EN MUSCULO ESQUELETICO CON EL
INDICADOR METALOCROMICO ANTIPIRILAZO III**



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
SERVICIOS DOCUMENTALES
IZTAPALAPA**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

085830

presenta

El Biólogo: **AGUSTIN JERONIMO AVILA SAKAR**



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

CBS

1989

11-88 / 11-88
x

REGISTRO DE CAMBIOS TRANSITORIOS DE LA CONCENTRACION
INTRACELULAR DE Ca^{2+} EN MUSCULO ESQUELETICO CON
EL INDICADOR METALOCROMICO ANTIPIRILAZO III

Tesis que para obtener el grado de Maestro en
Biología Experimental presenta el Biólogo
Agustín Jerónimo Avila Sakar

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa cuenta con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio del subsidio 2115-007945 para el fortalecimiento del posgrado nacional.

A mi hijo Aram ...

A mi esposa Haydée.

A mi Padre y a mi Madre.

A mis compañeros de la Maestría
en Biología Experimental.

A mis compañeros del Laboratorio 26
del Departamento de Fisiología y
Biofísica del CINVESTAV-IPN.

085830

Contenido

| | pag. |
|--------------------------|------|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Objetivos | 8 |
| Material y Métodos | 9 |
| Resultados | 37 |
| Discusión | 74 |
| Apéndice I | 77 |
| Apéndice II | 83 |
| Bibliografía | 92 |
| Agradecimientos | 98 |

RESUMEN

Este trabajo presenta los resultados de determinaciones de cambios transitorios de concentración de Ca^{2+} en fibras musculares esqueléticas. Se implemento para dicho efecto una metodología espectrofotométrica que aprovecha óptimamente las propiedades fisicoquímicas del indicador metalocrómico antipirilazo III y su complejo con Ca^{2+} . Dichas determinaciones se hicieron simultáneamente con el registro de la actividad eléctrica de la membrana de las fibras, mediante el uso de una cámara experimental de tres compartimentos, en la cual el interior de un segmento de fibra cortada se aísla del exterior por medio de un par de sellos de vaselina. Las propiedades eléctricas pasivas de las fibras en esta preparación son comparables a las de fibras intactas. Los registros de cambios transitorios de la concentración de Ca^{2+} como respuesta a un potencial de acción muestran un curso temporal semejante al de la tensión isométrica durante una sacudida simple, sólo que ocurren en un lapso menor. El tiempo en que se alcanza la concentración máxima de Ca^{2+} libre es aproximadamente 5 ms y dicha concentración es del orden de 10^{-7} - 10^{-6} M. Cuando se estimula a una fibra mediante un pulso de voltaje controlado, se observa un aumento de la concentración de Ca^{2+} con un curso temporal aproximadamente exponencial, tendiendo a alcanzar un valor estacionario mientras permanece el pulso, y regresando suavemente al nivel basal siguiendo otro curso exponencial al corte del pulso. Se perfeccionó un modelo cinético basado en los flujos de Ca^{2+} hacia y del mioplasma durante la actividad muscular. La aplicación de dicho modelo a los registros obtenidos permitió hacer una estimación del curso temporal y magnitud de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico cuando se produce un potencial de acción y cuando se da un pulso de voltaje controlado.

INTRODUCCION

El problema del papel del calcio en la fisiología de la contracción y excitación muscular ha cautivado a numerosos científicos desde finales del siglo pasado. Algunos de los avances que se han tenido en su estudio han sido notables. Estos conciernen principalmente a dicho elemento en cuanto a activador de la contracción. Cuando una fibra muscular está en reposo, la concentración de Ca^{2+} en el mioplasma es prácticamente nula ($<100 \text{ nM}$; 36, 37). Con la llegada de un impulso nervioso a la placa mioneural se desencadena una serie de eventos que provocan la contracción de la fibra. En fibras musculares rápidas de vertebrados, la despolarización de la membrana produce un potencial de acción que se propaga longitudinalmente sobre la superficie de la fibra y radialmente hacia su interior por el sistema de túbulos transversos (fig. 1). En la región de las triadas, la señal eléctrica es transmitida por un mecanismo aún no conocido a las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico (RS), resultando en una liberación masiva del Ca^{2+} contenido en ese organelo hacia el mioplasma.

En el mioplasma, el Ca^{2+} libre se une a una subunidad de la troponina (la subunidad TN-C), produciendo la interacción entre filamentos gruesos y delgados, con la consiguiente generación de tensión, un proceso que requiere de hidrólisis de ATP. El deslizamiento entre unos filamentos y otros resulta en la contracción muscular. La cadena de eventos que une la actividad eléctrica de la membrana externa y la respuesta mecánica ha sido convencionalmente denominada acople excitación-contracción. Simultáneamente con la liberación de Ca^{2+} , comienza su recaptación activa por el RS a través de una bomba de calcio específica de ese organelo, proceso responsable de la relajación (36, 37).

Por otro lado, también existen movimientos de Ca^{2+} del exterior al interior de la fibra a través de la membrana plasmática durante su actividad. Hace poco más de una década, se caracterizó por primera vez una actividad eléctrica dependiente de Ca^{2+} en fibras musculares esqueléticas de la rana (11). A la fecha, se han caracterizado dos tipos de canales iónicos de Ca^{2+} en músculo esquelético: uno de cinética lenta y otro de cinética rápida (4, 10, 23, 55). Estos canales se localizan principalmente en la membrana de los túbulos transversos (45). La corriente a través del canal lento puede detectarse a partir de pulsos despolarizantes a -40 mV , tiene un máximo entre los 100 y 200 ms, y decae espontáneamente con una constante de tiempo de entre 0.5 y 1.0 s (56), este último proceso debido principalmente a inactivación, pero también a depleción del Ca^{2+} tubular (2, 21, 61, 62). La corriente rápida se registra bajo condiciones más restringidas, debido a la labilidad de esos canales (23, 27). Se detecta a partir de aproximadamente -60 mV y tiene un curso rápido de activación (constante de activación igual a 5 ms, unas 30 veces más rápida que la corriente lenta). No decae significativamente durante pulsos despolarizantes largos, pero su amplitud decrece al paso del tiempo de exposición a la solución de registro.

Se ha especulado a cerca de la posible participación del Ca^{2+}

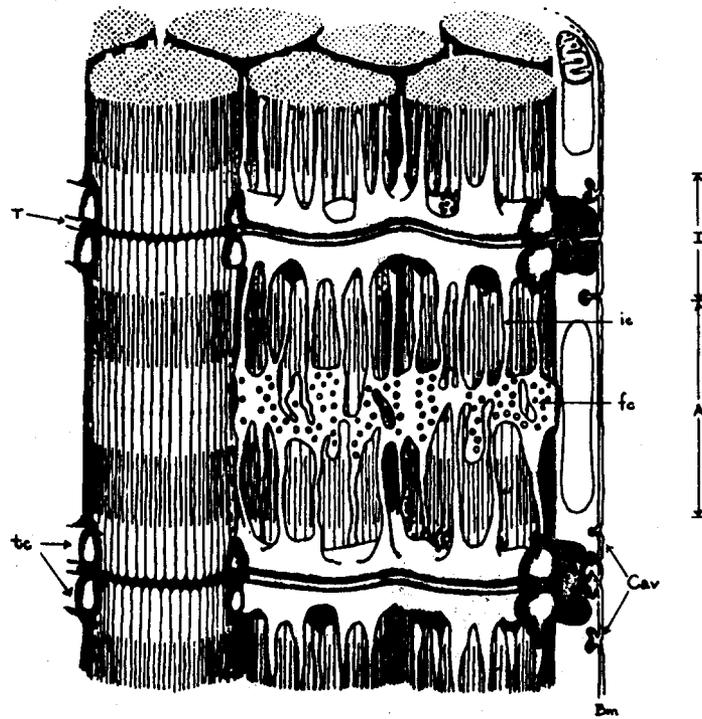


Figura 1

Ultraestructura de una fibra muscular.

(T) Túbulos transversos, (ic) cisternas intermedias, (tc) cisternas terminales, (Cav) caveolas, (Em) membrana basal, (fc) cuello perforado, (I) banda isotrópica, (A) banda anisotrópica. Modificada de Peachy, L. D. (48), según Lüttgau, H. C. & Stephenson, G. D. (36).

extracelular en el mecanismo de acople excitación-contracción (10, 11, 19). Existen evidencias de que el incremento de la concentración de Ca^{2+} en el mioplasma induce una mayor liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (24). La entrada inicial de Ca^{2+} extracelular al mioplasma podría funcionar como disparador de esa liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . De hecho, se ha demostrado que el Ca^{2+} extracelular es necesario para mantener la tensión durante las contracturas inducidas por K^+ (22, 25, 26, 35). Las sacudidas simples, sin embargo, han podido registrarse en soluciones prácticamente libres de Ca^{2+} (3). Además, el bloqueo de canales de Ca^{2+} inhibe las contracturas de K^+ pero no las sacudidas simples (25, 26, 29). Por otro lado, la ausencia de Ca^{2+} extracelular está asociada a una marcada reducción de la amplitud y duración de la sacudida simple bajo condiciones que mantienen inalterado el potencial de superficie normal de las fibras musculares (5). Asimismo, en ausencia de Ca^{2+} se ha observado un aumento significativo del umbral mecánico de fibras musculares esqueléticas (18). También ha sido demostrado que el Ca^{2+} extracelular modifica la liberación de Ca^{2+} del RS (14, 15, 53), probablemente a través de los sensores de voltaje del movimiento intramembranal de cargas (13, 51), sitios que además son sensibles a bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , como por ejemplo, nifedipina (49, 50).

Dicho movimiento intramembranal de cargas ha sido asociado al acople excitación-contracción desde su primera caracterización por Schneider y Chandler (60), basándose en la semejanza que guardan ambos fenómenos con respecto a sus propiedades cinéticas (42). Esto se observa, por ejemplo, si se compara la dependencia carga-voltaje con la de tensión-voltaje (28, 36), o bien la dependencia carga-voltaje con la de la liberación de calcio-voltaje (17, 40, 42, 49). Sin embargo, estas semejanzas están lejos de implicar una correlación completa, y difícilmente prueban algo a cerca del posible mecanismo excitación-contracción. Se ha propuesto la hipótesis de que los grupos cargados están unidos a moléculas grandes localizadas en los túbulos T en la región de las triadas. Dichas moléculas se extienden supuestamente hasta la membrana de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, donde son capaces de abrir y cerrar canales de Ca^{2+} . El movimiento de la molécula, como consecuencia de un cambio de voltaje produciría así directamente la liberación de Ca^{2+} (28, 36). Recientemente ha sido propuesto un mecanismo alternativo, el cual postula la intervención de un segundo mensajero, el inositol trisfosfato (63, 66). El acoplé, de acuerdo a esta hipótesis, sería una fenómeno de naturaleza fundamentalmente química.

Estas hipótesis a cerca del mecanismo de acople excitación-contracción han sido propuestas a lo largo de más de una década. Es importante señalar que no son excluyentes entre sí, lo cual refleja la complejidad del problema. Su estudio está basado principalmente en el registro simultáneo de la actividad eléctrica y algunas manifestaciones de la respuesta mecánica de la fibra muscular. Puesto que la liberación de Ca^{2+} del RS es propiamente la consecuencia del mecanismo de acople excitación-contracción, sea cual fuere este, es importante poder determinar con precisión su curso temporal simultáneamente con la actividad eléctrica de la fibra. Sin embargo, esto sólo se puede hacer indirectamente a partir del cambio de la concentración

intracelular de Ca^{2+} . De ahí la importancia de registrar adecuadamente los cambios de dicha concentración intracelular con suficiente precisión. Para este efecto se han empleado desde hace varios años indicadores ópticos de la concentración de Ca^{2+} . Estos son fundamentalmente de dos clases: aquellos que en presencia de Ca^{2+} emiten luz (luminiscentes), y aquellos que presentan cambios en su espectro de absorción luminosa como consecuencia de su interacción con Ca^{2+} . Históricamente los indicadores luminiscentes fueron los primeros en utilizarse para registrar el aumento de la concentración de Ca^{2+} durante la activación mecánica de fibras musculares (12, 54). El indicador empleado en esos casos fue la ecuorina, una proteína luminiscente presente en el género de medusas *Aequora*. Esta proteína emite una luz azul cuando está en presencia de aún pequeñísimas cantidades de Ca^{2+} . Sin embargo, tiene la desventaja de que la cinética de la reacción entre la proteína y el Ca^{2+} no permite registrar fielmente cambios muy rápidos de concentración de Ca^{2+} , además de que la relación entre luz emitida y concentración de Ca^{2+} no es lineal (64).

Los indicadores no luminiscentes llamados metalocrómicos han tenido más éxito. Son sustancias que sufren cambios de color cuando la concentración de Ca^{2+} cambia, lo cual es el resultado de la formación de complejos entre indicador y Ca^{2+} , con la consiguiente modificación de su espectro de absorción luminosa. Dichos cambios son suficientemente grandes como para ser usados para la determinación cuantitativa de la concentración de Ca^{2+} libre.

Tres son los indicadores metalocrómicos que principalmente han sido empleados en la determinación de la concentración intracelular de Ca^{2+} : MUREXIDA (purpurato de amonio), ARZENAZO III (ácido 2,2'-(1,8-dihidroxi-3,6-disulfo-naftalén-2,7-bisazo)-bisbencenarsónico), y ANTIPIRILAZO III (ácido 3,6-bis(4-antipirilazo)-4,5-dihidroxi-2,7-naftalén disulfónico) (7, 9, 33, 34, 38, 43, 44, 46, 47, 57, 58, 59, 64). Todos estos compuestos tienen una relativa selectividad por el Ca^{2+} , y mediante la elección de longitudes de onda apropiadas pueden disminuirse o eliminarse las interferencias causadas por otros metales. Tienen tiempos de respuesta rápidos (tiempos de relajación del complejo con el Ca^{2+} del orden de μs y ms). Sus coeficientes diferenciales de absorción con Ca^{2+} son relativamente grandes, lo cual permite determinaciones de concentración de Ca^{2+} en presencia de pequeñas cantidades del indicador. No obstante, hay diferencias importantes entre las propiedades de estos indicadores. La murexida, por ejemplo, es muy selectiva. No se observan cambios espectrales debidos al Mg^{2+} , el cual es abundante en el citosol y en las fracciones celulares. Este no es el caso con el arsenazo III, ya que la presencia de Mg^{2+} induce un cambio espectral considerable en el rango donde se puede determinar el Ca^{2+} . El antipirilazo III, por otro lado, presenta prácticamente selectividad total al Ca^{2+} a longitudes de onda entre 680 y 800 nm, aún cuando en otras regiones del espectro sí hay interferencia por Mg^{2+} (57, 58, 59, 64).

En cuanto a sus tiempos de relajación, el de la murexida es menor que 2 μs , mientras que el del arsenazo III es mayor que 2.8 ms. Esto

significa que el arsenazo III puede limitar en un momento dado el tiempo de resolución de reacciones rápidas de unión o transporte de Ca^{2+} . El del antipirilazo III ($\sim 180 \mu\text{s}$) es intermedio entre esos dos (más cercano al de la murexida) y es adecuado para cambios de concentración de Ca^{2+} que ocurren en un lapso de unas cuantas decenas de milisegundos (57, 58, 59, 64).

La afinidad por el calcio es otro factor importante que diferencia a estos tres indicadores. La muy alta afinidad del arsenazo III por Ca^{2+} hace que el indicador se comporte como un auténtico buffer de dicho catión, secuestrando una proporción considerable del Ca^{2+} libre, siendo más adecuado su empleo cuando se quiere medir concentraciones del orden de nanomolar. La murexida, por el contrario, tiene una afinidad muy baja, lo cual limita la sensibilidad del colorante. La afinidad del antipirilazo III es intermedia entre la de esos otros dos colorantes, lo cual le hace apto para mediciones de Ca^{2+} a concentraciones donde la murexida o el arsenazo III, por una u otra razón, no son igualmente efectivos. El rango de concentraciones más adecuado para realizar mediciones con antipirilazo III es de 0 a $100 \mu\text{M}$, donde tiene buena sensibilidad sin perturbar demasiado al Ca^{2+} del sistema y forma predominantemente un solo tipo de complejo con este catión (32, 38, 57, 58, 59, 64).

Por otro lado, estos compuestos se unen en mayor o menor grado a fracciones celulares una vez que han penetrado al mioplasma (38). Sin embargo, ninguno parece tener efectos secundarios sobre la fisiología celular (59).

Actualmente, se están diseñando mejores indicadores para mediciones de la concentración de Ca^{2+} (64). La estrategia consiste en tomar una sustancia con alta selectividad y estequiometría 1:1 con Ca^{2+} , y unirle un cromóforo. Así se han sintetizado el BAPTA (ácido bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) y el "QUIN 2", un derivado metoxiquinolínico del BAPTA diseñado para ser usado como indicador fluorescente (65). El BAPTA, sin embargo, no es útil como indicador intracelular, ya que los cambios de absorbancia ocurren en la región ultravioleta del espectro. El "QUIN 2" sólo es adecuado para medir concentraciones de Ca^{2+} en reposo y no cambios rápidos de concentración, ya que debido a su alta afinidad fácilmente se satura en regiones de alta concentración de dicho catión. Esto demuestra que diseñar una molécula que reúna todos los requisitos de un indicador ideal es difícil, aunque se siguen haciendo esfuerzos para lograrlo.

Debido a las razones expuestas, el antipirilazo III es en la actualidad el mejor indicador para registros intracelulares de cambios rápidos de concentración de Ca^{2+} . Predomina un solo complejo con Ca^{2+} bajo condiciones normales de experimentación (un ión Ca^{2+} por cada dos moléculas de antipirilazo III) (38, 52). Mediante la elección de longitudes de onda adecuadas (entre 680 y 800 nm), permite determinar concentraciones de Ca^{2+} aún en presencia de Mg^{2+} u otros cationes divalentes, y así acentuar su selectividad por aquel ión (57, 58, 59). Por la cinética de la reacción de acomplejamiento con Ca^{2+} , el antipirilazo III es muy apropiado para registrar cambios rápidos de concentración de Ca^{2+} , por ejemplo, durante

la respuesta de una fibra muscular a un potencial de acción o a un pulso de voltaje controlado. Por otro lado, tiene la desventaja de unirse a fracciones celulares, lo cual representa una incertidumbre en la determinación del Ca^{2+} , esto es, mientras no se sepa con certeza si el colorante fijado también une Ca^{2+} y, de hacerlo, si lo hace con las mismas propiedades cinéticas y estequiométricas que el indicador libre. En Material y Métodos se describen más específicamente las propiedades fisicoquímicas de este indicador.

Para los fines de la investigación de la biofísica de la excitación-contracción muscular, es muy importante que, de los registros de cambios temporales de concentración de Ca^{2+} con indicadores ópticos durante la actividad muscular, podemos inferir información a cerca de los flujos de Ca^{2+} hacia y del mioplasma. El razonamiento fundamental es que en cada instante el Ca^{2+} libre en el mioplasma es el resultado de la contribución de factores que aumentan y disminuyen su concentración. Esos factores incluyen fenómenos de unión y disociación de Ca^{2+} a proteínas y otras moléculas, incluyendo el propio indicador, así como transporte de Ca^{2+} hacia y del mioplasma. En base a esto, se han desarrollado modelos cinéticos que permiten estimar la contribución de la liberación de Ca^{2+} del RS al cambio global de la concentración de Ca^{2+} libre, así como la participación relativa de los demás factores (8, 14, 39, 40, 41; ver Apéndice I).

Este trabajo presenta los resultados de determinaciones del cambio temporal de la concentración de Ca^{2+} en fibras musculares aisladas con una metodología espectrofotométrica basada en la reacción de acomplejamiento entre Ca^{2+} y el indicador metalocrómico antipirilazo III. Las determinaciones se hicieron simultáneamente con registros de la actividad eléctrica de las fibras en una cámara experimental especialmente diseñada para ese objeto. Se presenta asimismo un análisis de las propiedades eléctricas pasivas de las fibras. Además, se desarrolla y aplica un modelo cinético de flujos de Ca^{2+} para obtener una estimación de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El trabajo experimental se realizó en el Departamento de Fisiología y Biofísica del CINVESTAV-IPN, México, D. F.

OBJETIVOS

Implementar una metodología espectrofotométrica basada en la reacción de acomplejamiento entre Ca^{2+} y el indicador metalocrómico antipirilazo III para determinar simultáneamente el curso temporal de la concentración intracelular de Ca^{2+} y los fenómenos eléctricos de la membrana en fibras musculares esqueléticas durante la actividad muscular así como perfeccionar y aplicar un modelo cinético de flujos de Ca^{2+} para obtener una estimación de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico durante dicha actividad.

MATERIAL Y METODOS

La metodología aquí desarrollada está destinada a ser usada en experimentos con fibras musculares esqueléticas aisladas, tanto de anfibio como de mamífero, pero puede ser adaptada para su uso en otras preparaciones. Todos los registros presentados corresponden a fibras de distintos músculos de *Rana pipiens*. El género *Rana* ha sido y es usado ampliamente en experimentos sobre excitación y contracción muscular.

Los animales empleados fueron originarios del estado de Michoacán y eran mantenidos en una jaula de aproximadamente 1.5 m x 0.5 m a la intemperie, en la cual hay un pequeño estanque con hierbas alrededor. El objeto de que la jaula esté a la intemperie es que las ranas puedan alimentarse de los insectos que se acerquen por ahí. No obstante, semanalmente se les daba chapulines u otros insectos para asegurar su alimentación.

Los animales eran sacrificados por decapitación, procurando evitar al máximo su sufrimiento. Luego se les destruía la médula para impedir movimientos reflejos durante la disección. Los músculos empleados en los experimentos fueron generalmente el semitendinoso y el peroneo, pero ocasionalmente se usaron otros, como el ileofibularis.

Una vez extraído un músculo, se coloca en Ringer Normal (Tabla I) a 4°C. La disección del músculo para aislar y extraer una fibra se hace en Solución Relajante o en K⁺-isotónico (Tabla I). La primera produce una contractura inicial por su alta concentración de K⁺ y luego una relajación. El gradiente electroquímico establecido por esta solución impide contracciones posteriores y, puesto que no tiene Ca²⁺, evita el dano producido a la fibra cuando dicho ión penetra en ella. La segunda es semejante a la primera, pero tiene Ca²⁺, y esto hace más fácil detectar si una fibra está dañada, pues la entrada de Ca²⁺ por el sitio dañado produce una contracción local. La disección se hace bajo el estereoscopio, con campo obscuro y con agua circulante para evitar el calentamiento de la preparación. Se separan fascículos, y de ellos se corta un segmento de fibra intacto de aproximadamente 1.5 mm de largo. La manipulación de la fibra se hace con pinzas muy finas. Los cortes se hacen con tijeras finas y con puntas de alfileres entomológicos perfectamente afilados.

El segmento de fibra así aislado es transportado a la cámara experimental mediante una pieza de lucita diseñada para ello. Esto debe hacerse de tal manera que la fibra siempre se mantenga bañada por la solución relajante. Cuando la disección se ha hecho en K⁺-isotónico, es necesario lavar la fibra primero en Solución Relajante para evitar llevar residuos de Ca²⁺ que la dañen al penetrar por los extremos donde se hicieron los cortes.

La cámara experimental está construida en lucita y dividida en tres compartimentos aislados por sellos de vaselina (fig. 2). La parte central del segmento de la fibra se coloca en el compartimento central (C), donde la

TABLA I

COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS

| | RINGER NORMAL (mM) | RELAJANTE (mM) | K ⁺ -ISOTONICO (mM) | INTRA- CELULAR (mM) | 10 mM Ca ²⁺ (mM) |
|--|--------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| NaCl | 115.0 | | | | |
| KCl | 2.5 | | | | |
| CaCl ₂ | 1.8 | | | 0.0082 | |
| HEPES-Na | 5.0 | | | | |
| Glutamato de K ⁺ | | 120.0 | | | |
| MgCl ₂ | | 2.0 | | 5.5 | |
| EGTA-Na ₂ | | 0.1 | | | |
| Tris-maleato de K ⁺ | | 5.0 | | | |
| Glutamato de Cs ⁺ | | | | 108.0 | |
| EGTA-Cs ₂ | | | | 1.0 | |
| ATP-Na ₂ | | | | 5.0 | |
| Glucosa | | | | 5.0 | |
| Tris-maleato de Cs ⁺ | | | | 5.0 | |
| AP-III | | | | 3.0 | |
| TEA-CH ₃ SO ₃ | | | | | 105.0 |
| Ca-(CH ₃ SO ₃) ₂ | | | | | 10.0 |
| Tris-CH ₃ SO ₃ | | | | | 5.0 |
| 3,4-DAP | | | | | 1.0 |
| K ₂ SO ₄ | | | 95.0 | | |
| CaSO ₄ | | | 10.0 | | |
| HEPES-K | | | 5.0 | | |

AP-III=Antipirilazo III; 3,4-DAP=3,4-diaminopiridina

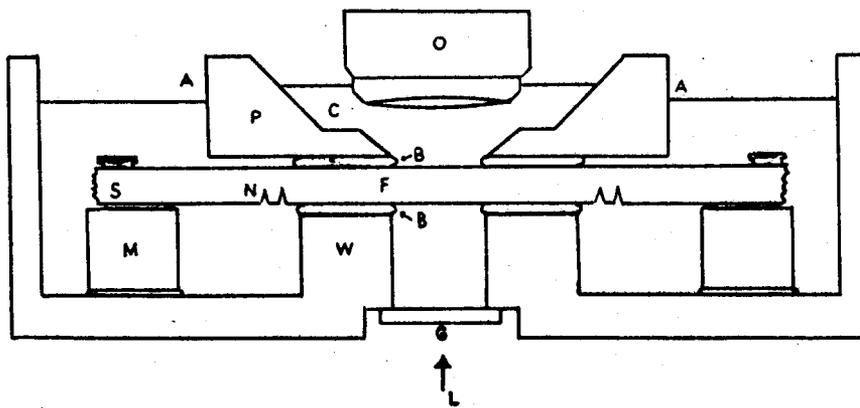


Figura 2

Preparación de la fibra cortada en la cámara experimental con doble sello de vaselina

(F) fibra, (N) cortes laterales, (M) pedestales móviles, (B) sellos de vaselina, (G) cubreobjetos, (L) haz luminoso, (P) placas de separación de los compartimentos, (A) compartimentos laterales, (C) compartimento central, (O) objetivo de inmersión, (W) paredes que separan a los compartimentos con ranura para colocar la fibra, (S) cinta adhesiva para sujetar a la fibra. Figura tomada de Kovacs, L., et al., (34).

superficie externa de la membrana queda expuesta a la solución extracelular. Los extremos de la fibra quedan en los compartimentos laterales (A) sujetos a un par de pedestales móviles (M), de manera que se pueda regular el estiramiento de la fibra. Mediante cortes pequeños (N), se pone en contacto el mioplasma con la solución de los compartimentos laterales, que por tal razón se denomina solución intracelular. Las soluciones extra- e intracelulares están aisladas mediante los sellos de vaselina. Esta preparación tiene, pues, la enorme ventaja de que se puede modificar la composición del mioplasma mediante el empleo de distintas soluciones intracelulares. Para los registros ópticos, la importancia de esto radica, además, en que la manera de hacer penetrar al colorante sensible a Ca^{2+} es por difusión a partir de los compartimentos laterales. El fondo del compartimento central es un cubre-objetos (G) a través del cual pasa un rayo de luz (L). Este incide en la fibra y es recolectado por un objetivo de inmersión (O). Las mediciones ópticas consisten básicamente en un seguimiento de los cambios de intensidad luminosa del haz que atraviesa la fibra a determinadas longitudes de onda, y el diseño de la cámara experimental es idóneo para este propósito.

El colorante sensible a Ca^{2+} empleado es el antipirilazo III (fig. 3). Sus propiedades fisicoquímicas lo hacen un indicador excelente para registrar cambios rápidos de la concentración intracelular de Ca^{2+} (34, 38, 52, 57, 58, 59, 64). Este colorante presenta un espectro de absorbancia con un máximo a 550 nm. En presencia de Ca^{2+} , se observa una disminución de la absorbancia a esa longitud de onda, pero un aumento de ella entre 620 y 800 nm. (fig. 4): La interacción del antipirilazo III con otros cationes divalentes no resulta en cambios de absorbancia a longitudes de onda mayores que 680 nm (fig. 5), lo cual le confiere una selectividad ventajosa para registrar cambios de concentración de Ca^{2+} aún en presencia de otros iones fisiológicos que se presentan en concentraciones importantes, como por ejemplo, Mg^{2+} . Por otro lado a longitudes de onda mayores que 800 nm no absorben ni el antipirilazo III ni sus complejos. Estas longitudes de onda pueden usarse entonces para tener un control de la absorbancia no dependientes de Ca^{2+} , y que comúnmente se les llama cambios intrínsecos de absorbancia. Otra ventaja es que el colorante no tiene una gran capacidad amortiguadora y por lo tanto no modifica significativamente la concentración de Ca^{2+} libre que hay que medir. Además, el tiempo de relajación del complejo Ca^{2+} -antipirilazo III (~ 180 us) permite realizar determinaciones de la concentración de Ca^{2+} con intervalos de sólo fracciones de milisegundo entre ellas.

La transformación de las medidas de absorbancia a valores de concentración de Ca^{2+} no es un problema fácil. Esto se debe a que un requisito indispensable para poder efectuarlas correctamente es conocer la estequiometría de la reacción de acomplejamiento entre antipirilazo III y Ca^{2+} . Varios autores (7, 32, 34, 38, 52) han llevado a cabo calibraciones in vitro o en fibras musculares con el fin de determinar simultáneamente la estequiometría de la reacción y los valores de la constante de disociación del complejo (K_p) y su coeficiente diferencial de extinción molar ($\Delta\epsilon_p$). Se ha visto que la estequiometría de la reacción depende

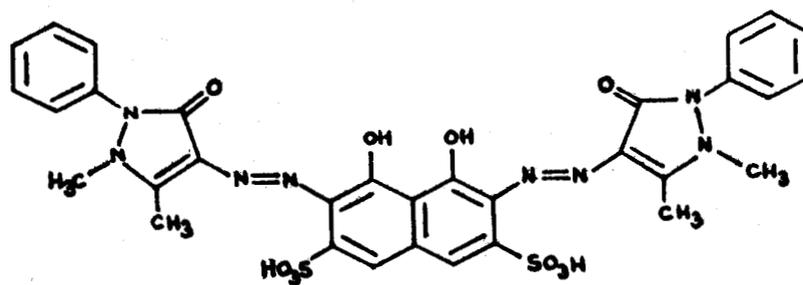


Figura 3

Antipirilazo III

ácido 3,6-bis(4-antipirilazo)-4,5-dihidroxi-2,7-naftalén disulfônico

COMPARACION DE ESPECTROS DE AP111 Y Ca-AP111.

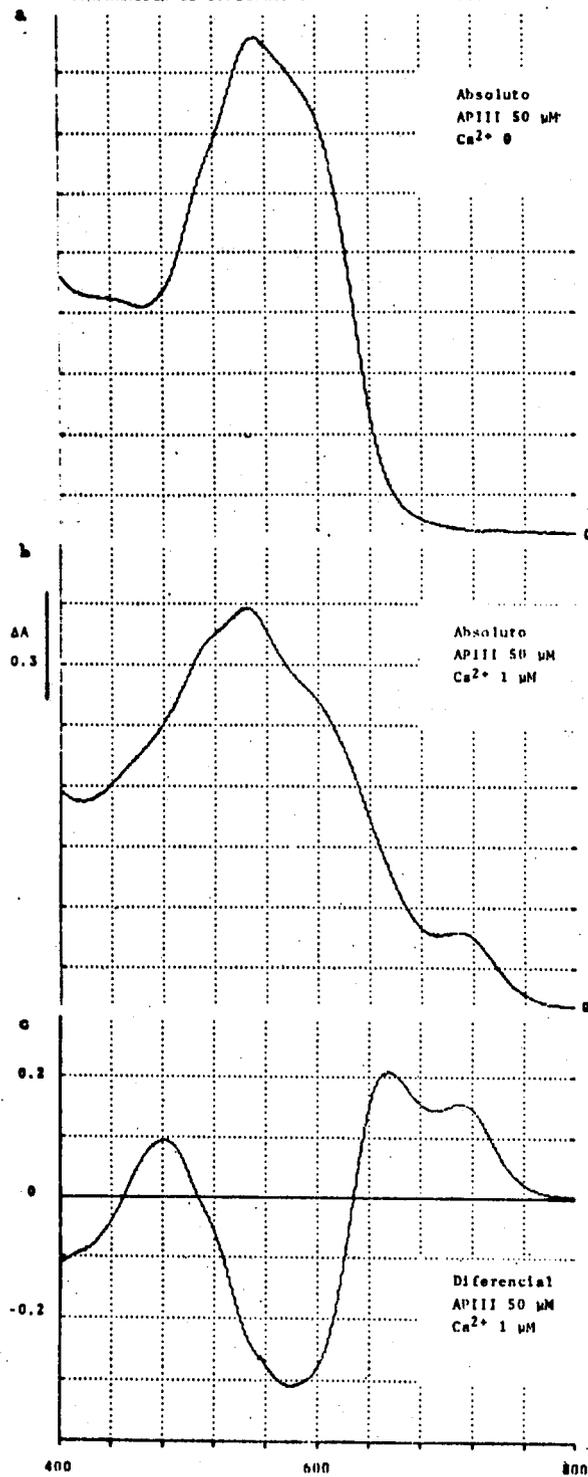


Figura 4

Comparación de los espectros de absorción de antipirilazo III su complejo con Ca^{2+} .

a) Espectro absoluto de antipirilazo III. b) Espectro absoluto del complejo antipirilazo III- Ca^{2+} . c) Espectro diferencial del complejo antipirilazo III- Ca^{2+} . (Espectrofotómetro Beckman DU-50).

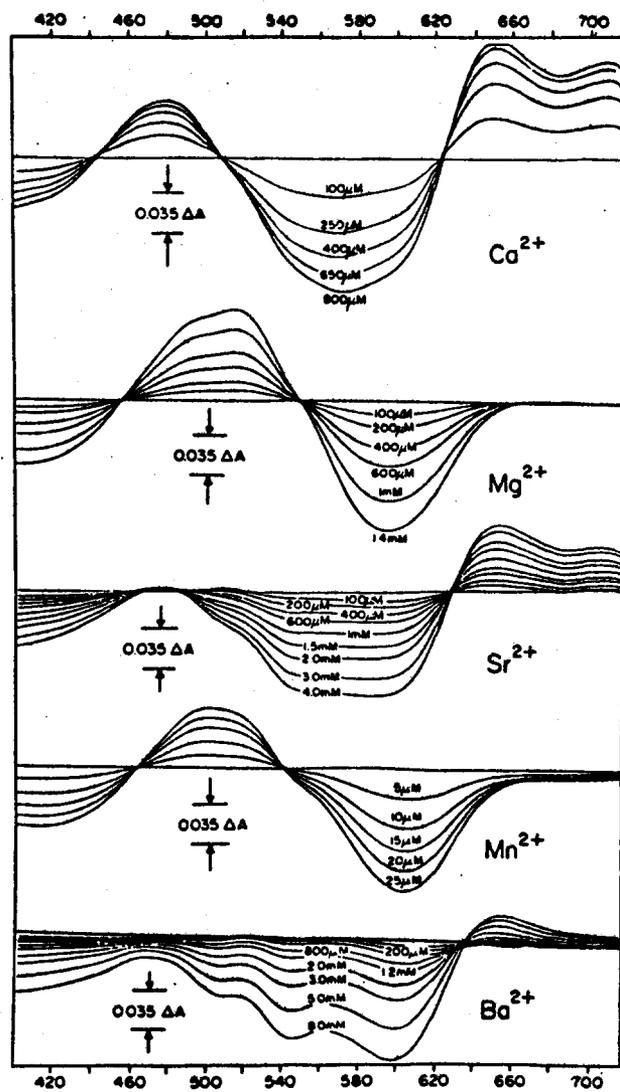


Figura 5

Comparación de los espectros diferenciales de los complejos de antipirilazo III con varios cationes divalentes

La concentración de antipirilazo III era 50 μM . El pH era igual a 7. Tomado de Scarpa, A. (58).

notablemente de factores como el pH y la concentración de Ca^{2+} (32). Sin embargo, a pH 7 y en un rango de concentraciones de 0 a 100 μM , se unen dos moléculas de antipirilazo III con un ión de Ca^{2+} (32, 34, 38, 52).

Una desventaja del indicador es que se fija considerablemente a fracciones celulares en el mioplasma (38). No se sabe si el antipirilazo III fijado también une Ca^{2+} , y esto representa una incertidumbre en los valores de Ca^{2+} libre calculados a partir de las determinaciones de cambios de absorbancia. En este trabajo se hicieron los cálculos bajo la hipótesis de que sólo el antipirilazo III en solución forma complejo con el Ca^{2+} libre.

A continuación se exponen los criterios y razonamientos empleados para la calibración del sistema antipirilazo III- Ca^{2+} , que a su vez son el fundamento de la regla de transformación de absorbancia a concentración de Ca^{2+} libre.

Sea:

I = intensidad luminosa
 λ = longitud de onda
 c = concentración del colorante o complejo absorbente
 x = distancia sobre la línea de propagación del haz luminoso en el cuerpo absorbente

Entonces, la ley de Lambert-Beer (54) dice que:

$dI = -Ic\psi(\lambda)dx$, donde $\psi(\lambda)$ = una función, determinada experimentalmente, que sólo depende de λ .

Integrando:

$$2.303 \log(I/I_0) = \ln(I/I_0) = -\psi(\lambda)cl$$

donde $l = \int_0^l dx$ = longitud del paso óptico

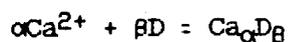
Se define:

$$A = -\log(I/I_0) = \frac{\psi(\lambda)cl}{2.303} = \epsilon(\lambda)cl$$

donde A = absorbancia

$$\epsilon(\lambda) = \frac{\psi(\lambda)}{2.303} = \text{coeficiente de extinción molar}$$

Para un sistema como el que estamos tratando, una parte de la absorbancia se debe al colorante únicamente y otra parte al complejo colorante-Ca²⁺. La suma de las dos es la absorbancia total. Denotando con D al antipirilazo libre e indicando la estequiometría de la reacción según la siguiente ecuación:



se cumple:

$$A_T = A_D + A_{\text{CaD}}$$

$$= \epsilon_D(\lambda)l(D_T - \beta[\text{Ca}_{\alpha}\text{D}_{\beta}]) + \epsilon_{\text{CaD}}(\lambda)l[\text{Ca}_{\alpha}\text{D}_{\beta}] \dots\dots\dots a)$$

donde $\epsilon(\lambda)$ y $\epsilon_{\text{CaD}}(\lambda)$ son los coeficientes de extinción molar del colorante y su complejo con Ca²⁺, respectivamente.

Puesto que en ausencia de Ca²⁺:

$$A_0 = \epsilon_D(\lambda)lD_T \dots\dots\dots b)$$

restando b) de a) tenemos:

$$\Delta A = A_T - A_0 = (\epsilon_{\text{CaD}}(\lambda) - \beta\epsilon_D(\lambda))l[\text{Ca}_{\alpha}\text{D}_{\beta}]$$

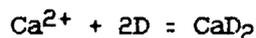
Se define:

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_{\text{CaD}}(\lambda) - \beta\epsilon_D(\lambda) = \text{coeficiente diferencial de extinción molar}$$

Luego:

$$\Delta A = \Delta\epsilon(\lambda)l[\text{Ca}_{\alpha}\text{D}_{\beta}] \dots\dots\dots c)$$

Esto quiere decir que la concentración del complejo es función lineal de la absorbancia diferencial ΔA . La dependencia de dicha concentración con respecto a la del Ca²⁺ libre está determinada por la estequiometría de la reacción. Consideremos el siguiente caso:



donde $\alpha = 1$

$\beta = 2$

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_{\text{CaD}}(\lambda) - 2\epsilon_D(\lambda)$$

La constante de disociación de esta reacción está dada por:

$$K_D = \frac{[Ca] [D]^2}{[CaD_2]}$$

Como $[D] = D_T - 2[CaD_2]$:

$$K_D = \frac{[Ca] (D_T - 2[CaD_2])^2}{[CaD_2]} \dots\dots\dots d)$$

Despejando $[CaD_2]$:

$$[CaD_2] = \frac{1}{2} (D_T + K_D / (4[Ca]) - \sqrt{(D_T K_D / (2[Ca]) + K_D^2 / (16[Ca]^2)})$$

Sustituyendo en c):

$$\Delta A = \Delta \epsilon(\lambda) \frac{1}{2} (D_T + K_D / (4[Ca]) - \sqrt{(D_T K_D / (2[Ca]) + K_D^2 / (16[Ca]^2)})$$

Esta ecuación nos permite encontrar los valores de K_D y $\Delta \epsilon(\lambda)$ por regresión lineal a partir de una colección de valores experimentales de ΔA contra $[Ca]$. Haciendo lo mismo para otras estequiometrías se pueden comparar los ajustes. El mejor ajuste corresponde a la estequiometría correcta y los valores de los parámetros libres del ajuste serán la K_D y el $\Delta \epsilon(\lambda)$ del complejo. En el rango de concentraciones de 0 a 100 μM , Ríos, E. y Schneider, M. F. (52) y Kovacs, L., et al. (34) encontraron utilizando este procedimiento que la estequiometría del complejo antipirilazo III- Ca^{2+} es efectivamente dos moléculas de colorante por un ión Ca^{2+} . Los parámetros encontrados por esos autores mediante el ajuste se exponen a continuación.

| K_D | $\Delta \epsilon(720)$ | $\epsilon(550)$ |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 13131 μM (5°C) | $8.2 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ | $2.55 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ |
| 25500 μM (23°C) | | |

(34)

Estos resultados son los que se emplearon en el presente trabajo como parámetros en las determinaciones de Ca^{2+} libre. El valor de la constante

de disociación se corrigió según la temperatura y la concentración de Mg^{2+} libre, el cual aumenta su valor 1.33 veces para $[Mg]=1mM$ dentro de las fibras (52). Dichas correcciones fueron hechas según la siguiente relación:

$$K_D(t) = 687.17t + 9695.17,$$

donde K_D está expresada en μM . Esta ecuación es una aproximación lineal a la dependencia de la constante de disociación de la temperatura (34). La temperatura (t) está dada en $^{\circ}C$.

Además,

$$K_D'(t) = 1/\alpha K_D,$$

donde K_D' es la constante de disociación corregida para una concentración dada de Mg^{2+} libre y $1/\alpha$ es una constante que depende de dicha concentración. Para las concentraciones estimadas en el interior de las fibras en la cámara experimental ($1mM$), su valor es 1.077 (52).

La importancia de estos parámetros y su relación con la estequiometría de la reacción radica en que son el fundamento cuantitativo de las determinaciones de los cambios de concentración de Ca^{2+} durante la actividad muscular a partir de cambios de absorbancia.

En reposo, la absorbancia de la fibra a una determinada longitud de onda λ es:

$$A_{\lambda}(0) = 1[D]\epsilon_D(\lambda) \cdot 0.7 + A_{i,\lambda}(0) \dots \dots \dots e)$$

donde $A_{i,\lambda}(0)$ es la absorbancia intrínseca de la fibra en reposo. El factor 0.7 está indicando que sólo una fracción del volumen de la fibra es ocupado por el colorante, la cual corresponde a la fracción acuosa. Además, se está despreciando la concentración de Ca^{2+} libre en reposo.

Esta ecuación es útil para medir la concentración del indicador a cualquier tiempo dentro de la fibra. Usando exclusivamente un filtro que sólo deje pasar un estrecho rango de longitudes de onda centrado en 550 nm, se mide primero la absorbancia absoluta sin colorante ($A_{i,550}(0)$). Luego, a distintos tiempos después de haber agregado colorante, se lee la absorbancia absoluta ($A_{550}(t)$). Considerando $A_{i,550}(t)$ constante e igual a $A_{i,550}(0)$, se despeja $[D]$.

A cualquier otro tiempo, cuando se ha liberado o se está liberando Ca^{2+} hacia el mioplasma, la expresión de la absorbancia se transforma en:

$$A_{\lambda}(t) = 1(D_T - 2[\text{CaD}_D])\epsilon_D(\lambda) \cdot 0.7 + 1[\text{CaD}_2]\epsilon_{\text{CaD}}(\lambda) \cdot 0.7 + A_{1,\lambda}(t)$$

y, por lo tanto, el cambio de absorbancia registrado durante ese intervalo de tiempo es:

$$\begin{aligned} \Delta A_{\lambda}(t) &= A_{\lambda}(t) - A_{\lambda}(0) \\ &= 0.7 \cdot 1(\epsilon_{\text{CaD}}(\lambda) - 2\epsilon_D(\lambda)) [\text{CaD}_2] + (A_{1,\lambda}(t) - A_{1,\lambda}(0)), \end{aligned}$$

$$\text{donde } A_{1,\lambda}(t) - A_{1,\lambda}(0) = \Delta A_{1,\lambda}(t)$$

Sea:

$$\Delta A_{\text{Ca}}(t) = \Delta A_{\lambda}(t) - \Delta A_{1,\lambda}(t) = \text{cambio de absorbancia debido sólo a la interacción del } \text{Ca}^{2+} \text{ con el antipirilazo III. }^1$$

Sustituyendo y despejando:

$$[\text{CaD}_2] = \frac{\Delta A_{\text{Ca}}(t)}{0.7 \cdot 1 \cdot \Delta \epsilon(\lambda)} \dots \dots \dots f)$$

Teniendo $[\text{CaD}_2]$, se puede calcular inmediatamente la concentración de Ca^{2+} libre empleando la ecuación d). Sólo hace falta, pues, conocer el cambio de absorbancia debido al Ca^{2+} ($\Delta A_{\text{Ca}}(t)$) para tener la concentración intracelular del catión.

El sistema de registro óptico está diseñado para hacer uso óptimo de las propiedades fisicoquímicas del antipirilazo III y poder determinar adecuadamente $\Delta A_{\text{Ca}}(t)$. Este sistema se muestra esquemáticamente en la figura 6. Se adaptó en el laboratorio partiendo de un microscopio binocular convencional Zeiss, haciendo las modificaciones necesarias.

Una fuente luminosa con un filamento de tungsteno emite un haz de luz blanca, el cual se hace pasar a través de un filtro (FO) y una ranura (S).

¹Las longitudes de onda más adecuadas para registrar los cambios de absorbancia debidos sólo a la interacción de Ca^{2+} con el indicador son 700 y 720 nm, ya que ahí no hay interferencia con Mg^{2+} y la absorbancia diferencial del complejo es cercana a un máximo (fig. 4 y 5).

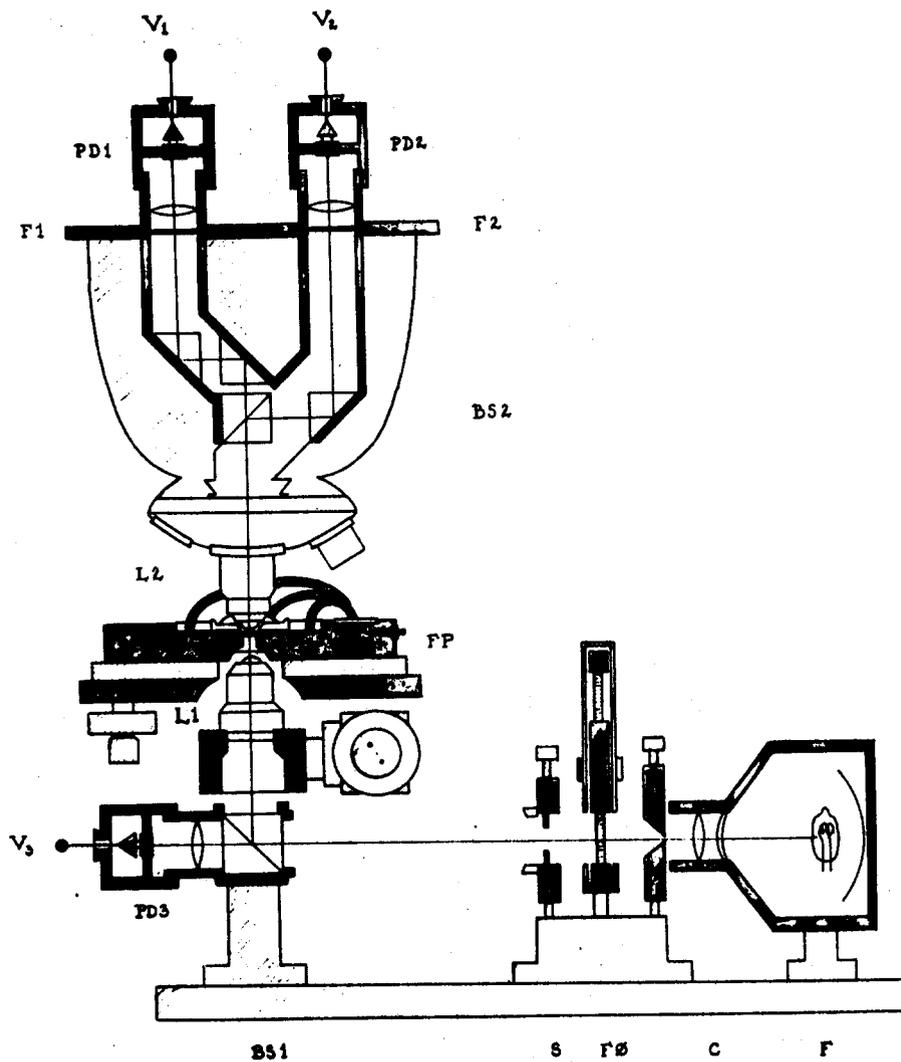


Figura 6
Equipo óptico

(F) Fuente luminosa, (C) colimador, (FO) rueda de filtros, (S) ranura, (BS1) primer divisor neutro, (PD3) fotodiodo que recibe una fracción constante de la luz emitida, (V₃) voltaje del fotodiodo PD3, (L1) condensador, (FP) platina y preparación (cámara experimental con puentes de agar), (L2) objetivo de inmersión, (BS2) segundo divisor neutro, (F1) filtro de 700 nm, (F2) filtro de 850 nm, (PD1) fotodiodo que recibe la señal dependiente de antipirilazo III-Ca²⁺, (PD2) fotodiodo que recibe la señal intrínseca a 850 nm, (V₁) potencial del fotodiodo PD1, (V₂) potencial del fotodiodo PD2.

Dicho filtro bloquea la luz de longitud de onda $\lambda < 500$ nm. Un divisor de haz (BS1), que consiste en un espejo semitransparente, transmite una fracción constante del rayo luminoso para ser enfocado sobre la superficie de un fotodiodo (PD3). La fracción reflejada del rayo atraviesa un condensador (L1). Este último es un objetivo invertido, el cual enfoca la imagen de la ranura sobre la fibra muscular en la cámara experimental. La luz transmitida es luego recolectada por un objetivo de inmersión (L2) y dividida nuevamente por un segundo divisor neutro (BS2) en dos rayos. Uno de ellos pasa a través de un filtro de banda (F2) que deja pasar luz de longitud de onda $\lambda = 850 \pm 20$ nm y luego es enfocado sobre la superficie de un segundo fotodiodo (PD2). El otro rayo pasa a través de un filtro de banda centrado en 700 ± 20 nm (F1), para ser enfocado después sobre la superficie de un tercer fotodiodo (PD1).

En la superficie de cada fotodiodo (fig. 7), la intensidad luminosa se traduce, primero en una corriente eléctrica y ésta a su vez en un nivel de voltaje. La señal de voltaje es directamente proporcional a la intensidad luminosa.

Los voltajes de los tres fotodiodos son alimentados a tres respectivas entradas de una amplificador de "track-and-hold" (fig. 8). Las señales pueden amplificarse muchas veces mediante los potenciómetros de 100 K Ω en los bucles de los amplificadores operacionales de las entradas. Los potenciales a la salida de dichos amplificadores operacionales se denotarán por $V_1(t)$, $V_2(t)$ y $V_3(t)$, correspondiendo a los tres fotodiodos respectivos. (Se simbolizan así porque las mediciones se hacen con respecto al tiempo). En ausencia de luz todos son iguales a 0. Para efectuar las mediciones en la preparación, se hace pasar una corriente constante de 9 amperios a través de la resistencia de la fuente y se llevan los tres potenciales a un mismo valor mediante los potenciómetros señalados. Este valor se escoge alrededor de los 4V y corresponde al valor basal de intensidad luminosa sobre el cual se miden los cambios de intensidad. Esto es:

$$V_1 = V_2 = V_3 = 4V$$

Las señales así amplificadas se alimentan a una etapa de "track-and-hold". Aquí, mediante la acción de un switch, se guarda el potencial inicial como carga acumulada en un capacitor. Los potenciales posteriores, $V_1(t)$, $V_2(t)$ y $V_3(t)$, se comparan respectivamente con los potenciales iniciales almacenados.

El fotodiodo PD3 tiene como finalidad proporcionar un control de las fluctuaciones de la fuente luminosa durante los registros. Estas fluctuaciones aparecen en la salida de cada amplificador operacional de la etapa de "track-and-hold". Como son iguales, se pueden cancelar mediante una resta analógica. Las salidas de los amplificadores operacionales restadores corresponden a los cambios de intensidad luminosa de PD1 y PD2, con considerable reducción del ruido proveniente de la fuente. (La relación ruido/señal basal que se obtiene con el equipo empleado es de 1/20000 a

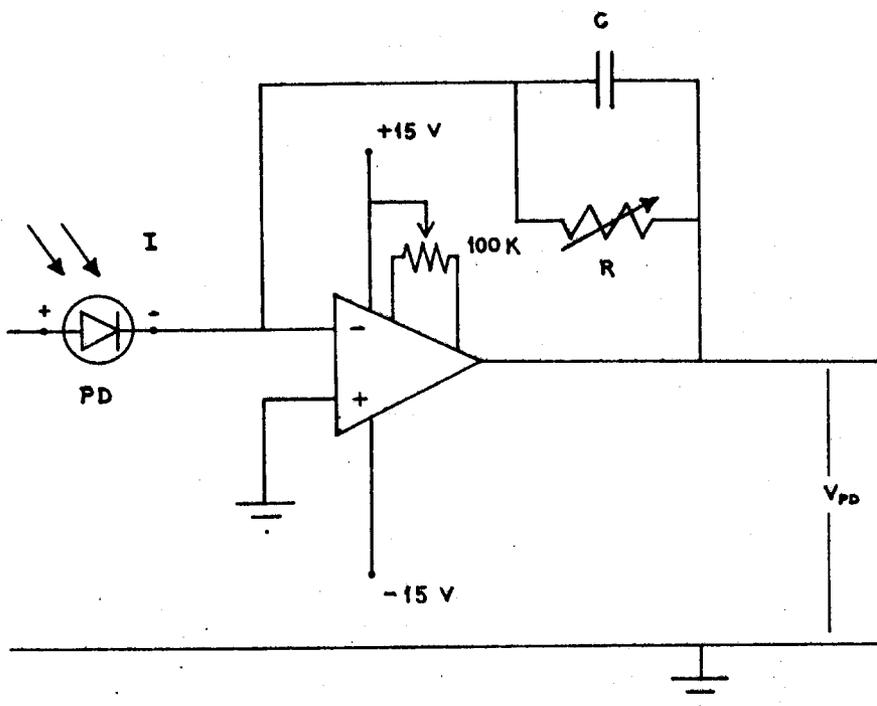


Figura 7

Circuito eléctrico de un fotodiodo

(I) Luz incidente, (PD) fotodiodo, (V) voltaje de salida del amplificador.

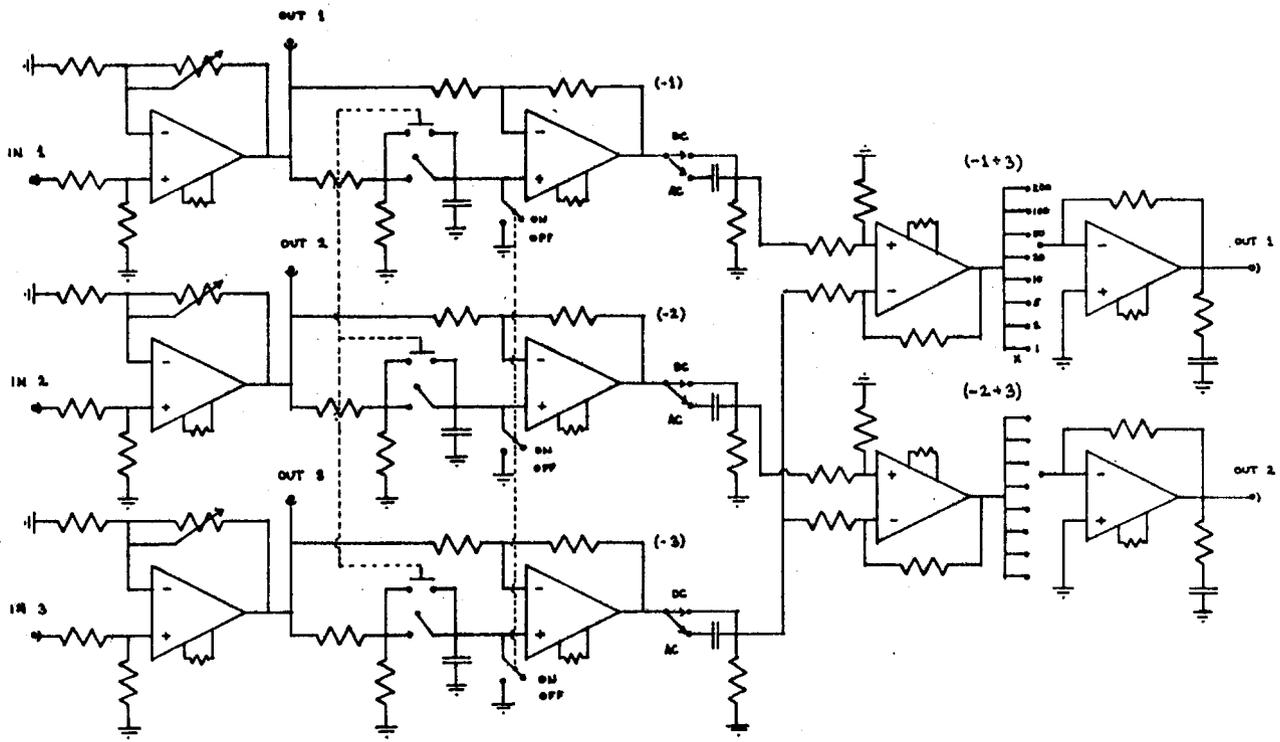


Figura 8
Circuito eléctrico del amplificador de "track-and-hold"
 (ver texto)

1/50000). Finalmente, se amplifican las veces que sea necesario y se obtienen como salidas de voltaje para el osciloscopio y la computadora. Esos voltajes se denominan, respectivamente, $\Delta V_1(t)$ y $\Delta V_2(t)$. Son directamente proporcionales a los cambios de intensidad luminosa ΔI_1 y $\Delta I_2(t)$, y debido a que se trata de valores muy pequeños comparados con el voltaje basal, son aproximadamente proporcionales a los cambios de absorbancia respectivos. Mediante un tratamiento analítico se obtiene una expresión exacta para los cambios de absorbancia a partir de los registros de voltaje.

Sea I_0 la intensidad de la luz incidente en la fibra, $I(0)$ la intensidad de la luz transmitida en el tiempo inicial de un registro, y $\Delta I(t)$ el cambio de intensidad de la luz transmitida en el tiempo t ($\Delta I(t) = I(t) - I(0)$). Entonces, el cambio de absorbancia a esa longitud de onda está dado por:

$$\begin{aligned} \Delta A(t) &= \log \frac{I_0}{I(0) + \Delta I(t)} - \log \frac{I_0}{I(0)} \\ &= \log \frac{I(0)}{I(0) + \Delta I(t)} \end{aligned}$$

y, puesto que I es proporcional a V :

$$\Delta A(t) = \log \frac{V(0)}{V(0) + \Delta V(t)}$$

Esto se cumple tanto para PD1 como para PD2, de modo que:

$$\Delta A_1(t) = \Delta A_{700} = \log \frac{V_1(0)}{V_1(0) + \Delta V_1(t)}$$

$$\Delta A_2(t) = \Delta A_{850} = \log \frac{V_2(0)}{V_2(0) + \Delta V_2(t)}$$

Pero, como ya se dijo, $\Delta A_{850}(t)$ es independiente del antipirilazo III y sus complejos, y por lo tanto es igual a la absorbancia intrínseca a esa longitud de onda. Luego:

$$\Delta A_2 = \Delta A_{i,850}(t)$$

Por otro lado, $\Delta A_{700}(t)$ tiene un componente intrínseco y otro que depende exclusivamente de la interacción del antipirilazo III con el Ca^{2+} .

Se ha encontrado que existe una relación inversa entre la absorbancia intrínseca y la longitud de onda (7):

$$\Delta A_{1,\lambda}(t) = \Delta A_{1,850}(t) (\lambda/850)^{-\alpha}, \text{ donde } \alpha \sim 1$$

A las longitudes de onda que nos interesan podemos escribir:

$$\Delta A_{1,700}(t) = \Delta A_{1,850}(t) (700/850) = \Delta A_2(t) (850/700)$$

Como $\Delta A_{\text{Ca}}(t) = \Delta A_{700}(t) - \Delta A_{1,700}(t)$, entonces:

$$\Delta A_{\text{Ca}}(t) = \Delta A_1(t) - \Delta A_2(t) (850/700)$$

Sustituyendo en la ecuación f) y luego empleando d), se obtiene la concentración de Ca^{2+} libre en cada momento.

Los cambios de voltaje $V_1(t)$ y $V_2(t)$ se digitalizan mediante un convertidor analógico-digital (Tecmar Labmaster Board) para luego ser adquiridos con una microcomputadora. La adquisición se hace con una versión del programa de adquisición de datos CLAMPEX. Este hace que la computadora genere pulsos comando y a la vez muestree los niveles de voltaje o corriente de uno o dos canales. La duración de los pulsos y los intervalos entre ellos, así como la frecuencia de muestreo se establecen mediante parámetros del programa.

Las transformaciones de voltaje a Ca^{2+} libre desarrolladas anteriormente se efectuaron con LOTUS y también con un programa específicamente creado para ello en TURBO-PASCAL. Brevemente, cada archivo entra en el programa como un vector. El programa realiza las operaciones numéricas en cada uno de los puntos. El resultado es graficado con las nuevas dimensiones.

Las curvas obtenidas a partir de dichas transformaciones fueron empleadas para hacer una estimación del curso temporal y magnitud de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El procedimiento y fundamento teórico se explican en el Apéndice I.

REGISTROS ELECTRICOS

Las mediciones eléctricas se hacen a través de electrodos de agar en contacto con las soluciones extra- o intracelulares. Estos electrodos o puentes de agar contienen 1% de agar-agar y KCl 1 M. Se extienden de cada

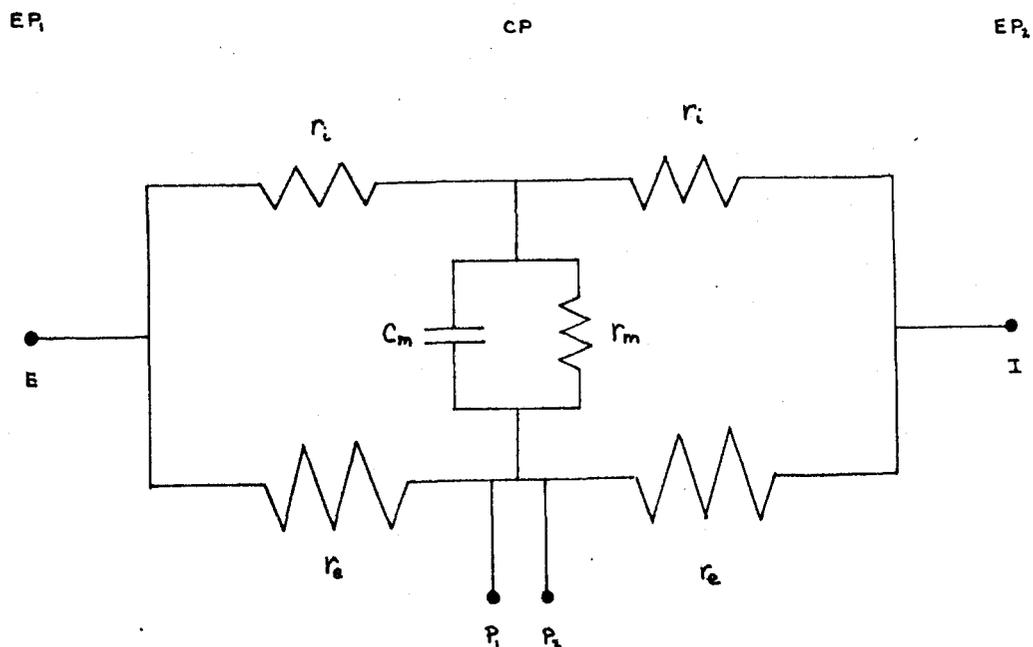


Figura 9

Equivalente eléctrico de la preparación

(EP₁, EP₂) compartimentos laterales, (CP) compartimento central, (E) electrodo de voltaje, (P₁, P₂) electrodos del compartimento central, (I) electrodo de inyección de corriente, (r_m) resistencia de la membrana, (C_m) capacitancia de la membrana, (r_i) resistencia del mioplasma, (r_e) resistencia externa bajo el sello de vaselina.

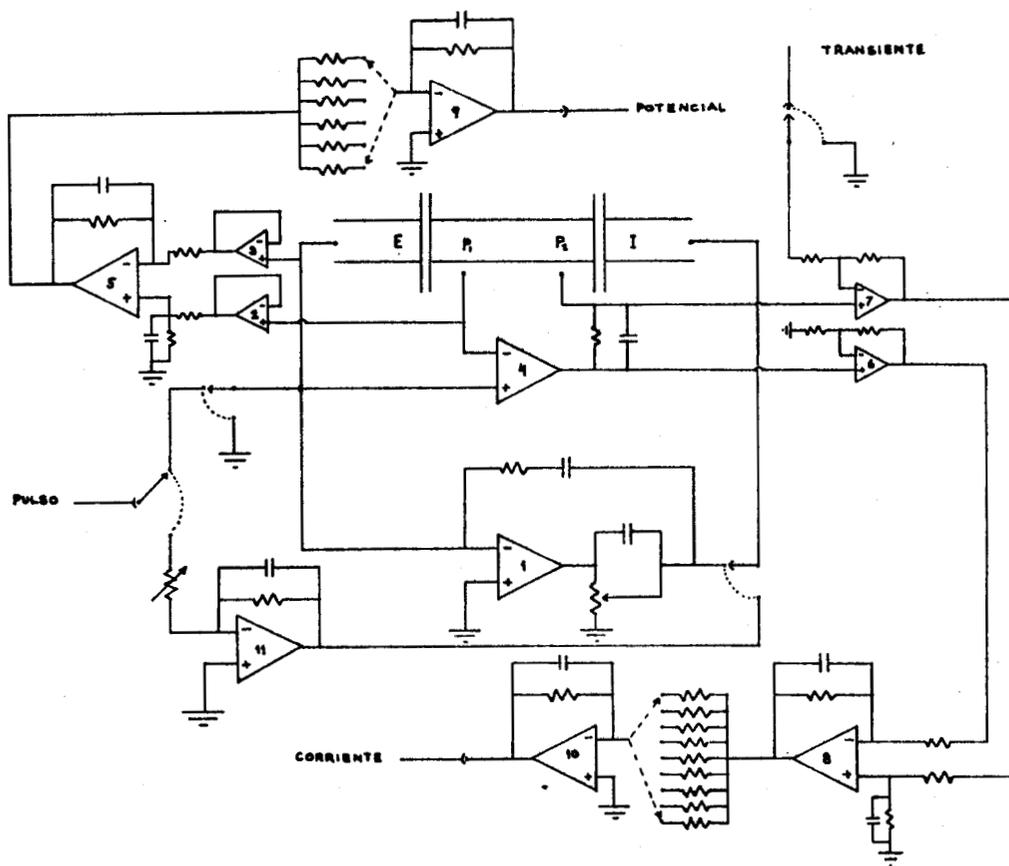


Figura 10
Circuito eléctrico del amplificador de
estimulación y registro eléctrico
 (ver texto)

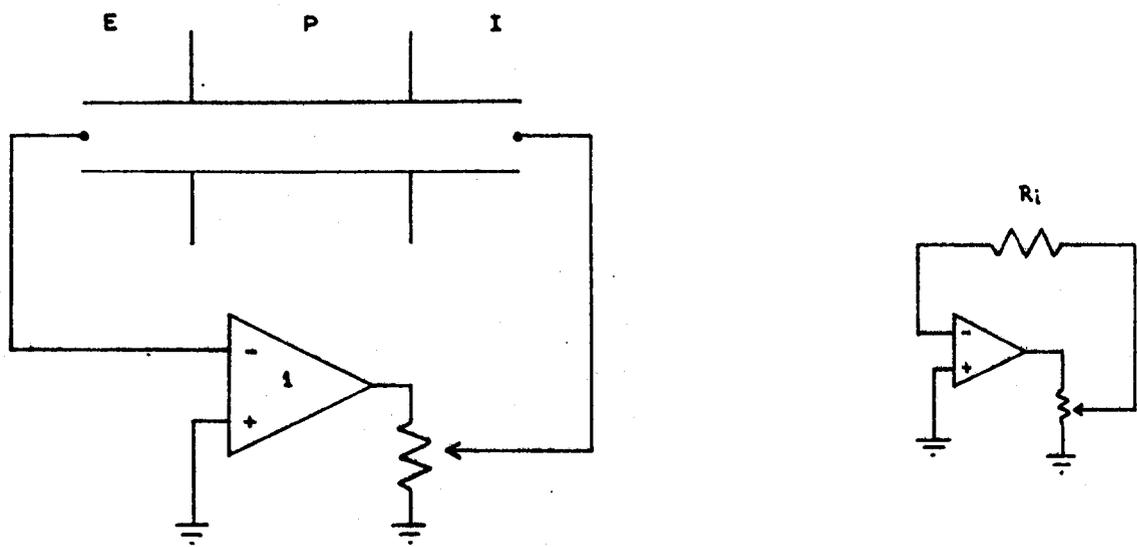


Figura 11
Fijación del mioplasma a tierra virtual
 (R_i) Resistencia del mioplasma.

uno de los compartimentos a 4 pozas independientes conectadas como terminales de un amplificador.

Eléctricamente, la preparación presenta cierta complejidad. Una primera aproximación se obtiene mediante el siguiente modelo (fig. 9). La membrana en el compartimento central está caracterizada por una resistencia (r_m) y una capacidad (c_m). Los compartimentos laterales EP_1 y EP_2 (electrodos E e I) y el compartimento central CP (electrodos P_1 y P_2) están comunicados eléctricamente por dos vías: la primera, a través de la membrana y el mioplasma (con resistencia r_i) en serie; la segunda, a través del sello de vaselina (con resistencia r_e). Idealmente r_e es infinita, pero en realidad basta con que $r_e \gg r_i$. Esto quiere decir que la diferencia de potencial entre un compartimento lateral y el central es representativa del potencial de membrana, y la corriente que se mide entre un compartimento lateral y el central corresponde a la corriente a través de la membrana. Esto se aprecia mejor en relación con el circuito del amplificador de corriente y voltaje empleado para dichas mediciones (fig. 10). El amplificador opera en dos modos: 1) fijación de voltaje y 2) pulso de voltaje. En el modo de fijación de voltaje se fija el voltaje a través de la membrana mediante retroalimentación negativa y se mide la corriente necesaria para conseguirlo. La corriente medida es entonces el negativo de la corriente a través de la membrana. Esto se logra poniendo a tierra los compartimentos laterales mediante el amplificador 1 y los electrodos E e I, que a través del mioplasma cierran un bucle de retroalimentación. El electrodo E es el que propiamente mide el potencial, mientras que a través del electrodo I se inyecta la corriente que mantiene al mioplasma a tierra virtual (fig. 11). A la vez, en la entrada positiva del amplificador 4 se aplica el pulso comando, el cual aparece en el compartimento central a través de P_1 y P_2 (fig. 12).

En el modo de pulso de voltaje, se fija a tierra el compartimento central (amp. 4) y se aplica un pulso a través del amplificador 11 en I (fig. 13). En ambos modos el potencial de membrana se mide como la diferencia de potencial entre los compartimentos EP_1 y CP (amp. 5 y 9; fig. 10). La corriente transmembranal se mide por la caída de voltaje a través de la resistencia de feedback del amplificador (amp. 8 y 10). El modo de fijación de voltaje es útil si se quiere medir las corrientes iónicas o intramembranales, mientras que el modo de pulso de voltaje es útil para trabajar con potenciales de acción.

PROPIEDADES ELECTRICAS PASIVAS

Un desarrollo analítico más detallado del modelo eléctrico de la preparación es necesario para la determinación de algunos parámetros físicos pasivos de las fibras, tales como la resistividad del mioplasma (R_i) y la resistencia específica de la membrana (R_m).

Una vez montada la fibra en la cámara experimental, queda dividida en tres segmentos aislados por dos sellos de vaselina (fig. 14). Los sellos

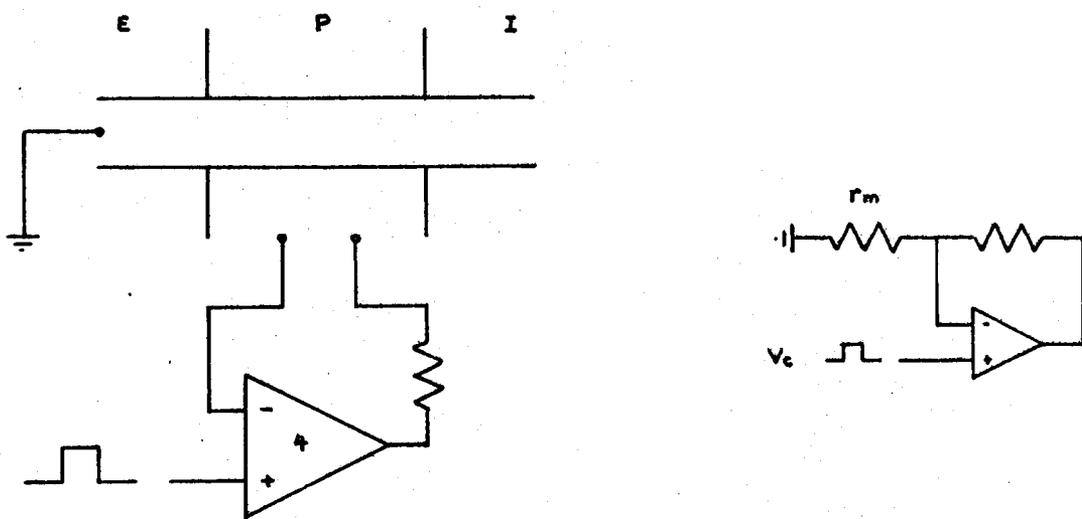


Figura 12
Configuración del modo de fijación de voltaje
 (V_c) pulso comando, (r_m) resistencia de la membrana.

085830

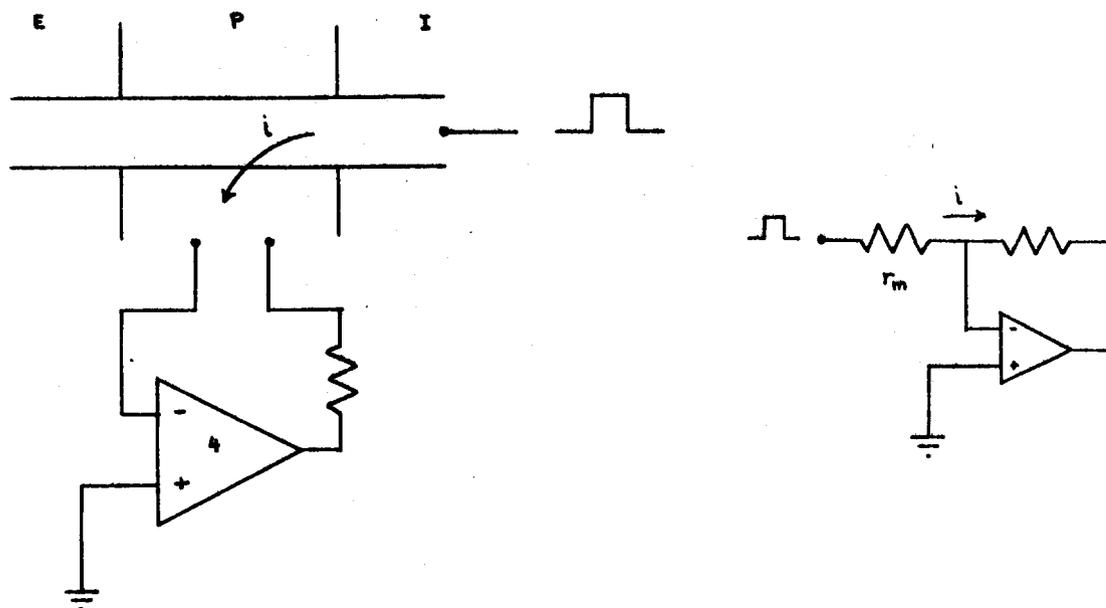


Figura 13
Configuración del modo de pulso de voltaje
 (i) corriente, (r_m) resistencia de la membrana.

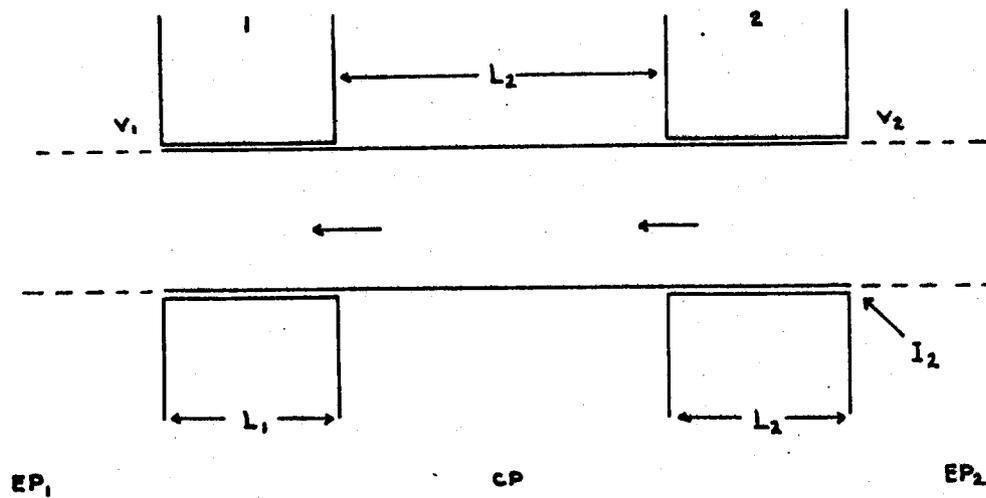


Figura 14

Diagrama de la fibra cortada en la preparación con doble sello de vaselina (EP₁) Compartimento lateral 1, (EP₂) compartimento lateral 2, (CP) compartimento central, (V₁) voltaje en EP₁, (V₂) voltaje en EP₂, (I₂) corriente inyectada en EP₂, (L₁) espesor de cada sello, (L₂) separación entre los sellos (ver texto).

tienen un espesor de 500 μm (L_1) y están separados por un espacio de 750 μm (L_2), en el compartimento central (CP). Los otros dos compartimentos (EP_1 y EP_2) están en continuidad con el mioplasma prácticamente a partir del comienzo del sello. Para el análisis de las propiedades pasivas de las fibras se emplea el amplificador en modo de pulso de voltaje, de manera que el compartimento central está fijado a tierra ($V_{CP}=0$).

El protocolo experimental consiste en dar un pulso de voltaje en EP_2 (ΔV_2) y medir: a) la corriente inyectada (ΔI_2) y b) el cambio de potencial en EP_1 (ΔV_1) al alcanzarse el estado estacionario. Estos valores están relacionados mediante un sistema de ecuaciones (ver Apéndice II):

$$V_1 = a_1 V_2 + b_1 \quad \text{g)}$$

$$I_2 = a_2 V_1 + b_2 \quad \text{h)}$$

Los parámetros a_1 , a_2 , b_1 y b_2 dependen de las propiedades pasivas de la fibra y no son todos independientes entre sí. De hecho, cuando $I_2=0$, $a_2 V_1 = -b_2$, y por simetría, $V_1 = V_2$, por lo que $(1-a_1)V_1 = b_1$. Entonces,

$$b_1 = (a_1 - 1)b_2 / a_2 \quad \text{i)}$$

Los otros coeficientes se obtienen directamente del protocolo de pulsos:

$$a_1 = \Delta V_2 / \Delta V_1 \quad \text{j)}$$

$$a_2 = \Delta I_2 / \Delta V_1 = R^{-1} \quad \text{k)}$$

$$b_2 = I_2 - a_2 V_1 \quad \text{l)}$$

V_1 es el potencial cuando no se está inyectando corriente, o bien el potencial de mantenimiento cuando se está inyectando una corriente de mantenimiento igual a I_2 . El valor del pulso de voltaje ΔV_2 es de unos +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de $V_1 = -20$ mV durante unos 20 - 100 ms.

Los coeficientes así determinados están relacionados con la resistencia de la membrana por unidad de longitud (r_m) y con la resistencia interna por unidad de longitud (r_i) mediante un complejo sistema de ecuaciones (Apéndice II). Dicho sistema de ecuaciones es un sistema no-lineal integrado por funciones hiperbólicas. Para su solución, se elaboró un programa de

computación en BASIC, el cual encuentra por una serie de iteraciones las triadas r_m , r_i , r_e que lo satisfacen para cada conjunto de valores experimentales a_1 , a_2 , b_1 , b_2 . Los valores de r_m y r_i obtenidos de esta manera para cada fibra están relacionados con la resistencia específica de la membrana (R_m) y la resistividad del mioplasma (R_i) mediante las siguientes expresiones (fig. 15).

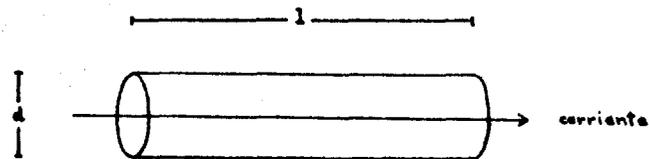
$$R_m = \pi d r_m \quad m)$$

$$R_i = \pi (d/2)^2 r_i \quad n)$$

donde d es el diámetro de la fibra.

Puesto que para cada fibra se obtiene un par de valores r_m , r_i , se puede realizar una regresión no lineal sobre esos valores utilizando las ecuaciones anteriores, y así obtener la resistencia específica promedio y la resistividad promedio del conjunto de fibras analizadas y, por lo tanto, tener una estimación de dichos parámetros en el tipo de fibras empleadas en los experimentos. Para esto se implementó un programa de regresión no lineal en BASIC basado en la minimización del error estándar (mínimos cuadrados no lineales).

a)



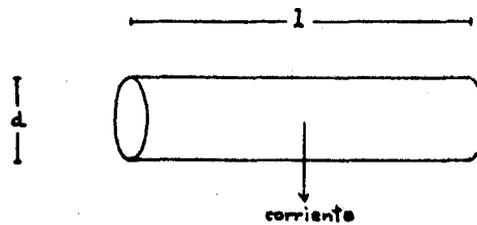
$$r' = r_i \times l \quad , \quad (r_i \text{ [M}\Omega/\text{cm]})$$

r' = resistencia total en el sentido de la corriente.

$$r' = R_i \times (1/A) \quad A = \text{área transversa}$$

$$\therefore R_i = \pi (d/2)^2 r_i \quad (R_i \text{ [M}\Omega \cdot \text{cm]})$$

b)



$$r = r_m \times l \quad (r_m \text{ [M}\Omega \cdot \text{cm]})$$

$$r = R_m / S \quad S = \text{superficie de la membrana.}$$

$$R_m = r_m \times S / l$$

$$R_m = \pi d r_m \quad (R_m \text{ [M}\Omega \cdot \text{cm}^2])$$

Figura 15.

Parámetros eléctricos de una fibra

a) Relación entre la resistencia del mioplasma por unidad de longitud (r_i) y la resistividad del mioplasma (R_i). b) Relación entre la resistencia de la membrana por unidad de longitud (r_m) y la resistencia específica de la membrana (R_m).

RESULTADOS

PROPIEDADES ELECTRICAS PASIVAS

Cuando se monta una fibra muscular en la cámara experimental, inicialmente no se hace pasar corriente a través de la membrana. El potencial que, bajo esas condiciones, se registra entre los compartimentos EP₁ y CP ($V_1(I_2=0)$) tiene un valor promedio de -26.5 mV. No presenta correlación alguna con el diámetro de la fibra (fig. 16) y es considerablemente menor en valor absoluto que el potencial de reposo normal, de aproximadamente -90 mV. Esto se debe a la resistencia externa finita bajo los sellos de vaselina, la cual actúa como shunt eléctrico de la membrana (fig. 9).

Una vez medido el potencial $V_1(I_2=0)$, se conecta el electrodo de corriente y, mediante la inyección de una cierta cantidad de corriente I_2 , se da a la fibra un potencial constante, denominado potencial de mantenimiento, que para efecto de determinar las propiedades eléctricas pasivas de la fibra tiene un valor de aproximadamente -20 mV. Puesto que $V_1(I_2=0)$ es cercano a -20 mV, la corriente necesaria para mantener ese potencial es muy pequeña, entre -20 y +20 nA (fig. 17).

La figura 18 muestra un registro típico para determinar propiedades pasivas, según el protocolo descrito en la sección anterior. Se trata en realidad de un promedio de 5 ensayos consecutivos en una fibra, espaciados por 1/2 segundo. El cambio de potencial en el estado estacionario es $\Delta V_1=16.79$ mV y la corriente inyectada es $\Delta I_2=54.29$ nA. La resistencia equivalente para esta preparación es, por lo tanto $R=\Delta V_1/\Delta I_2=0.3093$ M Ω . El potencial de mantenimiento es $V_1=-25.64$ mV y la corriente de mantenimiento $I_2=-8.33$ nA. El valor del pulso comando en este caso es $\Delta V_2=26.00$ mV.

Empleando las relaciones g) a la l) (ver Material y Métodos), se obtienen, a partir de estos resultados, los valores de los coeficientes a_1 , a_2 , b_1 y b_2 . La Tabla II muestra los valores de esos coeficientes para un conjunto de fibras analizadas.

Los valores de $a_2(-R^{-1})$ están graficados en la figura 19, donde puede apreciarse una ligera tendencia de la corriente a aumentar con el diámetro de la fibra para un mismo pulso de voltaje. Esto es de esperarse, pues es necesario inyectar más corriente a través de una membrana de mayor área para conseguir un cambio de potencial igual al obtenido con una de menor área.

La solución del sistema de ecuaciones no lineales representado por la expresión e15) (ver Apéndice II) nos da, para cada fibra, la resistencia interna por unidad de longitud, r_1 , la resistencia transversal de la membrana por unidad de longitud, r_m y la resistencia externa bajo el sello por unidad de longitud, r_e . La razón de esta última a la suma de ella más

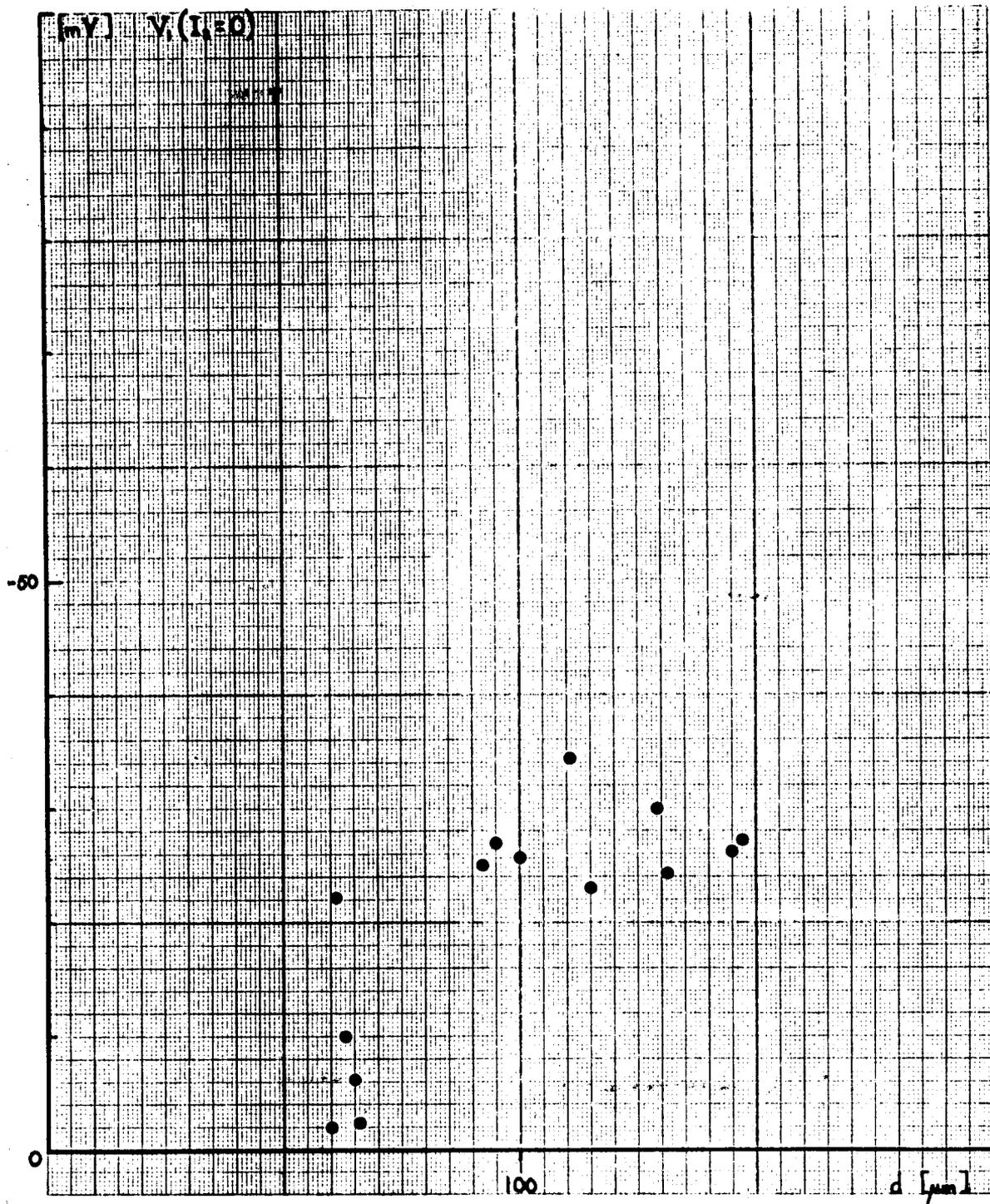


Figura 16
Potencial en el compartimento lateral EP_1 (V_1) en función del
diámetro de un conjunto de fibras, medido cuando la
corriente inyectada es igual a 0 ($I_2=0$)

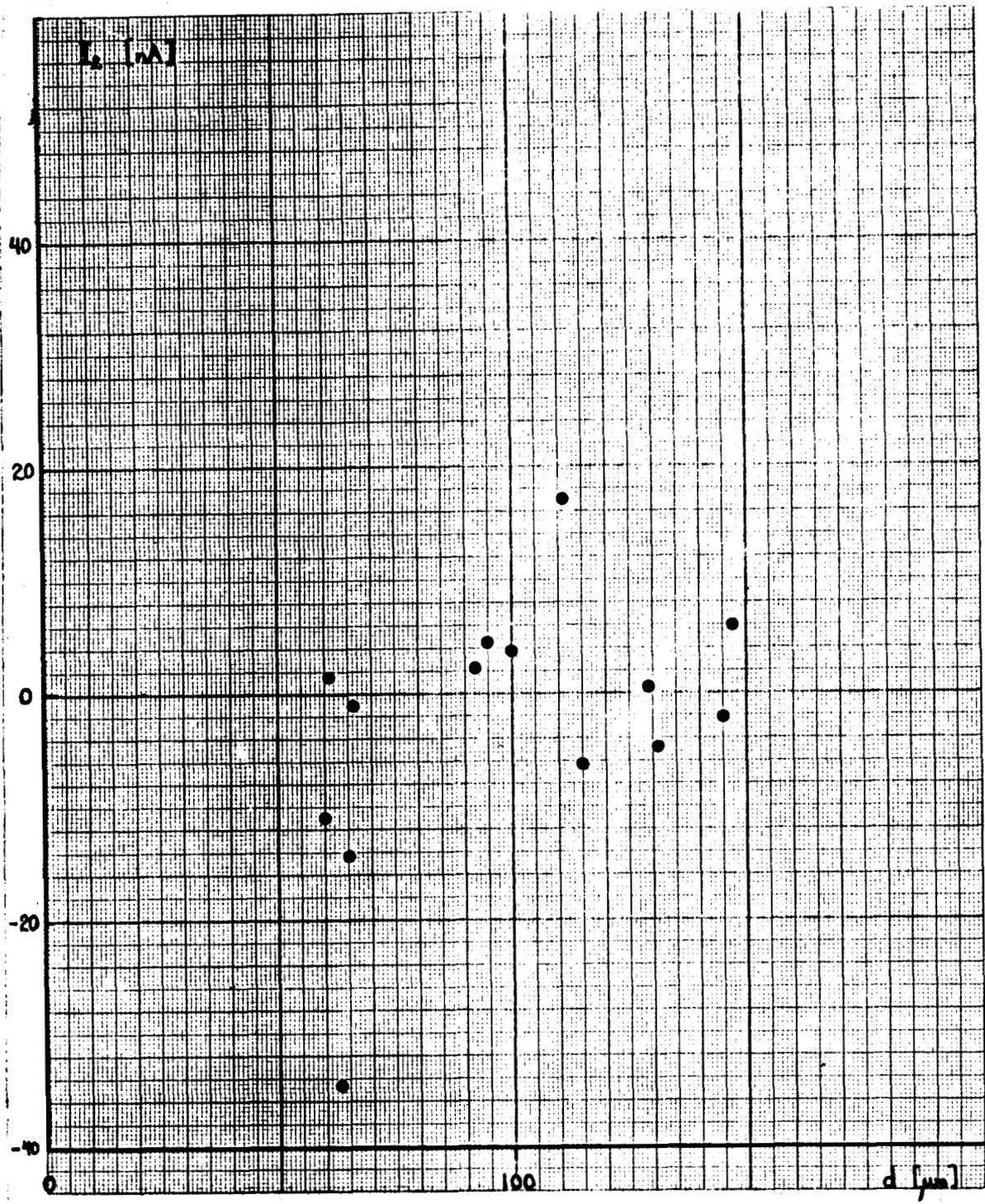


Figura 17
Corriente inyectada en diversas fibras para proporcionar un potencial mantenimiento de -20 mV, en función del diámetro

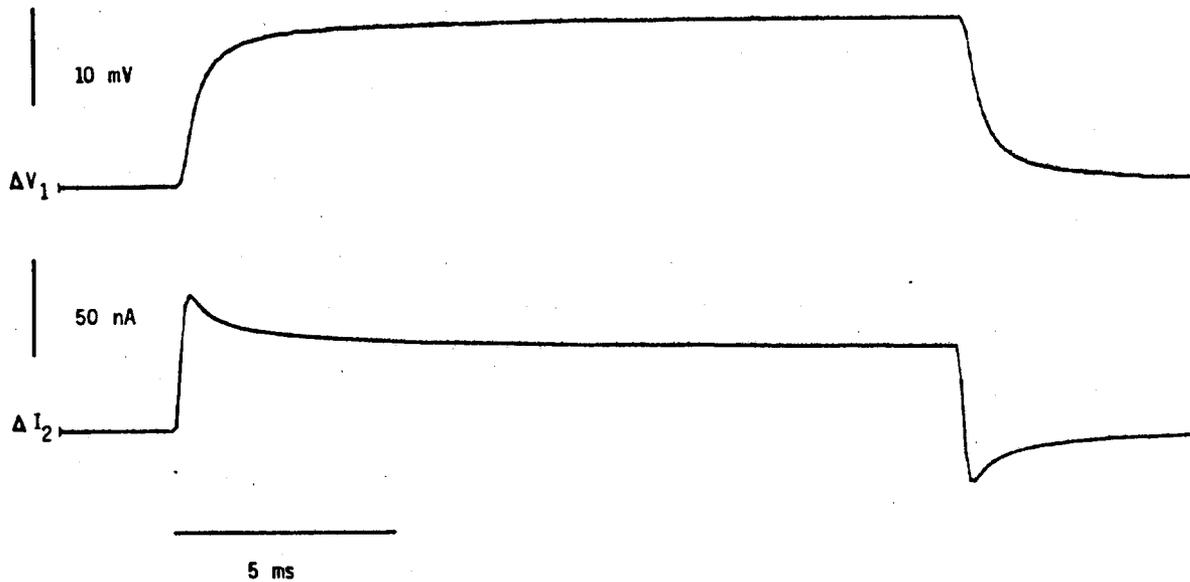


Figura 18

Cambio de potencial (ΔV_1) y de corriente (ΔI_2) para un pulso de voltaje de +26 mV durante 25 ms.

Los valores para determinar las propiedades pasivas se toman cuando se ha alcanzado el estado estacionario. (Solución extracelular: Ringer Normal).

TAELA II

| FIERA | d | V _R | I ₂ | a ₁ | a ₂ | b ₁ | b ₂ |
|----------|-----|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| | μm | mV | nA | | MΩ ⁻¹ | mV | nA |
| A7604c01 | 63 | -10.09 | -34.48 | 2.3859 | 3.9293 | 13.99 | 39.67 |
| L7604c01 | 115 | -23.06 | -8.33 | 1.5319 | 3.2335 | 12.27 | 74.58 |
| A7604c08 | 65 | -6.21 | -14.29 | 1.3806 | 0.9200 | 2.36 | 5.71 |
| A7605c01 | 147 | -27.23 | 5.88 | 1.5828 | 4.3956 | 15.87 | 119.68 |
| A7605c15 | 129 | -30.09 | 0.63 | 1.8760 | 6.9832 | 26.36 | 210.13 |
| A7606c01 | 131 | -24.25 | -4.76 | 1.7999 | 3.4329 | 19.40 | 83.26 |
| A7606c04 | 111 | -34.40 | 16.95 | 1.6530 | 3.6101 | 22.46 | 124.17 |
| A7606c08 | 145 | -26.16 | -2.22 | 1.2552 | 1.5516 | 6.68 | 40.59 |
| A7611c01 | 92 | -24.89 | 2.33 | 1.6276 | 1.5521 | 15.62 | 38.63 |
| A7615c01 | 60 | -2.10 | -10.87 | 1.4071 | 0.6556 | 0.86 | 1.38 |
| A7617c01 | 66 | -2.51 | -1.11 | 1.3033 | 0.4458 | 0.76 | 1.12 |
| A7618c03 | 61 | -22.23 | 1.56 | 1.2116 | 0.4185 | 4.71 | 9.31 |
| A7619c01 | 100 | -25.70 | 3.81 | 1.2542 | 0.5892 | 6.53 | 15.14 |
| A7625c01 | 95 | -27.04 | 4.55 | 1.0638 | 0.3320 | 1.72 | 8.98 |

085830

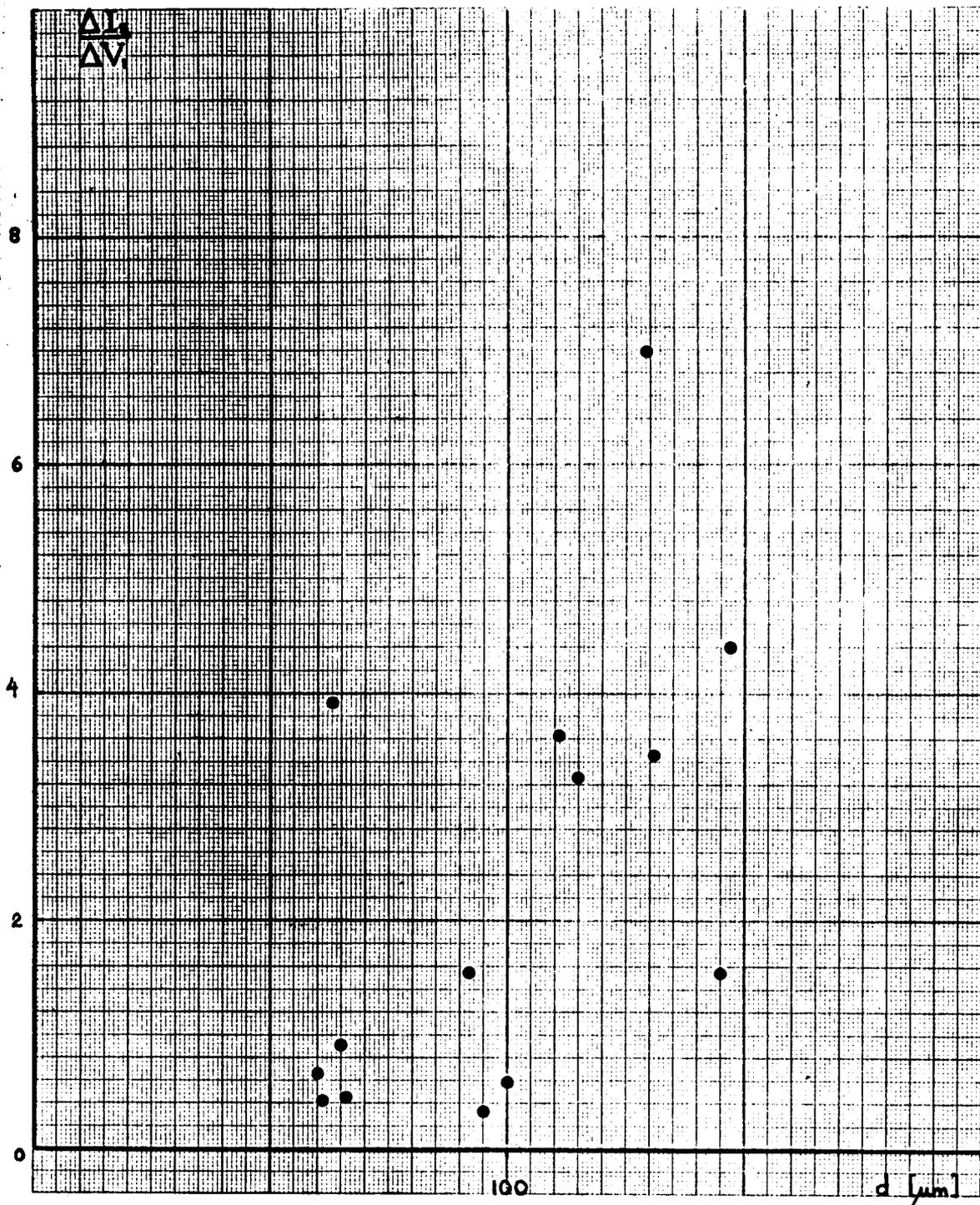


Figura 19
Valores de $a_2 = \Delta I_2 / \Delta V_1$ graficados con
respecto al diámetro de la fibra
 Nótese que a mayor diámetro, mayor es el cociente $\Delta I_2 / \Delta V_1$.

r_i , $r_e/(r_e+r_i)$, es un índice de la calidad del sello. Debe ser cercana a 1 para que se pueda hablar de un buen sello. En la Tabla III se presentan las magnitudes de r_i , r_m y $r_e/(r_e+r_i)$ para cada una de las fibras de la Tabla II, obtenidas por iteración a partir de los valores de dicha tabla, según las derivaciones presentadas en el Apéndice II.

Las gráficas de las figuras 20, 21 y 22 resumen estos resultados y muestran, además, las regresiones mediante las cuales se obtuvo la resistividad promedio del mioplasma (R_i) y la resistencia específica de la membrana (R_m) (ecuaciones m) y n), ver Material y Métodos). De acuerdo con esto, los valores de dichos parámetros en Ringer Normal para las fibras analizadas son:

$$R_i = 232 \Omega \cdot \text{cm}$$

$$R_m = 6806 \Omega \cdot \text{cmf}$$

REGISTROS OPTICOS

Para poder obtener la concentración intracelular de Ca^{2+} a partir de un registro de cambio de absorbancia, es necesario conocer la concentración total de antipirilazo III en el mioplasma. Esta se puede determinar en cada momento usando la ecuación e) (ver Material y Métodos). Midiendo la absorbancia absoluta de la fibra a 550 nm a distintos tiempos durante un experimento, obtenemos la curva que describe la difusión del indicador hacia el interior de la fibra. A continuación se presenta una curva típica de difusión de antipirilazo III hacia el interior de una fibra (fig. 23). Nótese como durante los primeros minutos no aumenta mucho la concentración del colorante en el interior de la fibra, pero a partir de aproximadamente 1 hr, el aumento de dicha concentración con respecto al tiempo es prácticamente lineal. Después de unas 2 a 3 horas el aumento deja de ser lineal, pero eso no se aprecia en la figura. Mediante una regresión simple se puede trazar la curva de difusión para ese intervalo de tiempo en que el aumento es lineal. Así es posible conocer, por interpolación, la concentración de antipirilazo III intracelular en cualquier momento durante el experimento. En el caso de la figura, la concentración del indicador en la solución intracelular (compartimentos laterales) era 3 mM. Después de casi 3 hrs, la concentración en el interior de la fibra había alcanzado un valor de 2 mM. Los registros ópticos en una fibra se comienzan a realizar aproximadamente después de una hora de difusión del colorante y se continúan mientras permanezcan bien sus propiedades eléctricas y contráctiles.

Cuando se opera en el modo de pulso de voltaje, la fibra responde produciendo un potencial de acción (fig. 24). Este parte del potencial de mantenimiento (-90 mV) y tiene una fase inicial de carga de la membrana, con una duración de aproximadamente 2 ms. Luego sigue una fase rápida de despolarización, que corresponde a la entrada de Na^+ a la fibra por un mecanismo auto-generativo. Después tenemos un pico de máxima amplitud,

TABLA III

| FIBRA | $r_e/(r_e+r_1)$ | r_1 M Ω /cm | r_m M Ω ·cm |
|----------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| A7604c01 | 0.753 | 6.371 | 0.395 |
| L7604c01 | 0.903 | 2.245 | 0.158 |
| A7604c08 | 0.909 | 5.550 | 2.013 |
| A7605c01 | 0.903 | 1.812 | 0.099 |
| A7605c15 | 0.871 | 1.824 | 0.061 |
| A7606c01 | 0.867 | 3.403 | 0.152 |
| A7606c04 | 0.906 | 2.468 | 0.095 |
| A7606c08 | 0.952 | 2.054 | 0.263 |
| A7611c01 | 0.892 | 5.641 | 0.312 |
| A7615c01 | 0.900 | 8.400 | 8.400 |
| A7617c01 | 0.923 | 8.900 | 9.925 |
| A7618c01 | 0.958 | 6.225 | 1.129 |
| A7619c01 | 0.951 | 5.393 | 0.705 |
| A7625c01 | 0.988 | 2.250 | 1.106 |

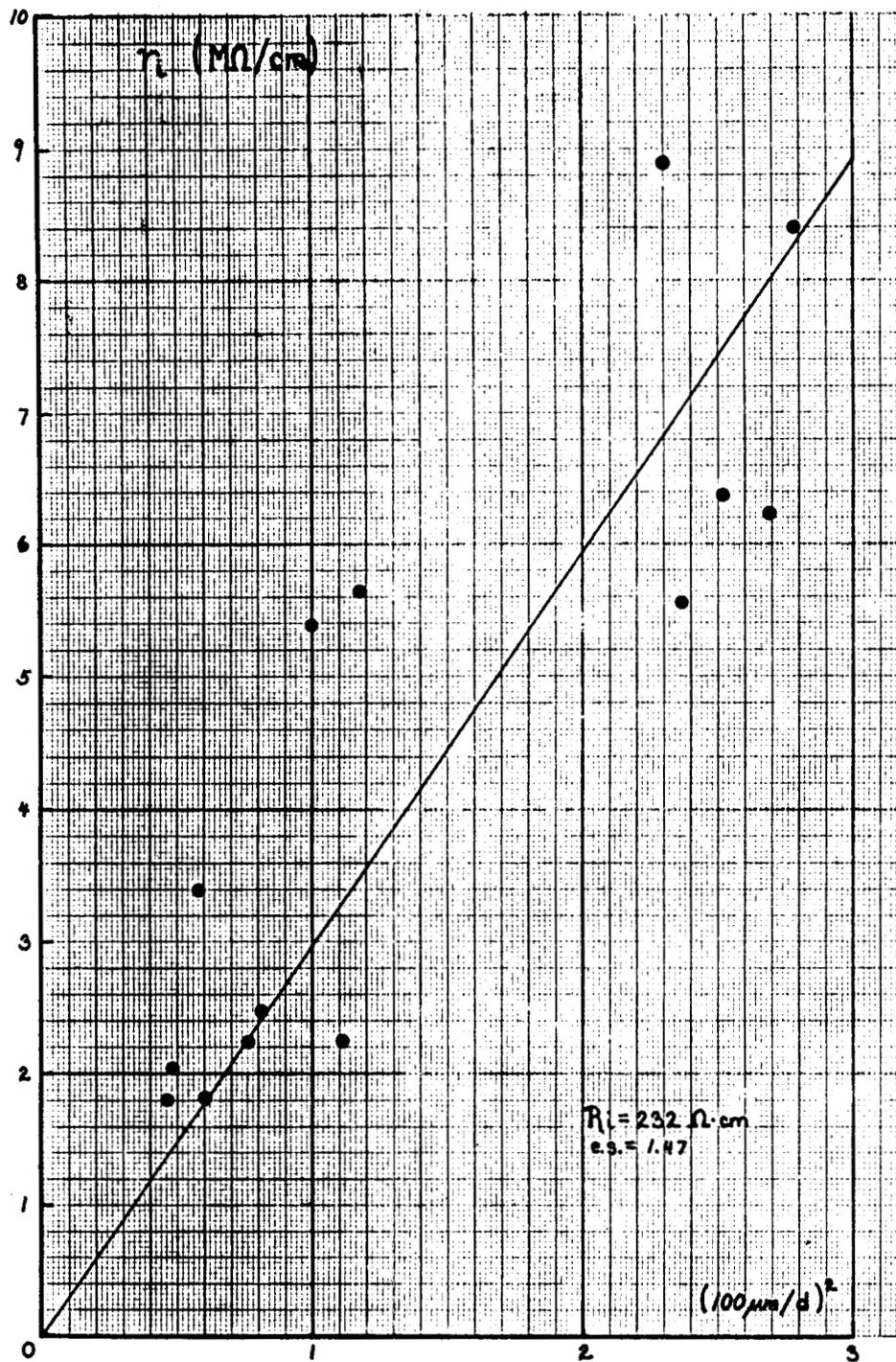


Figura 20

Regresión de r_i (resistencia del mioplasma por unidad de longitud) contra d (diámetro de la fibra)

Los datos se presentan de acuerdo a la forma linearizada de la ecuación n).
 R_i = resistividad del mioplasma, e. s. = error estándar.

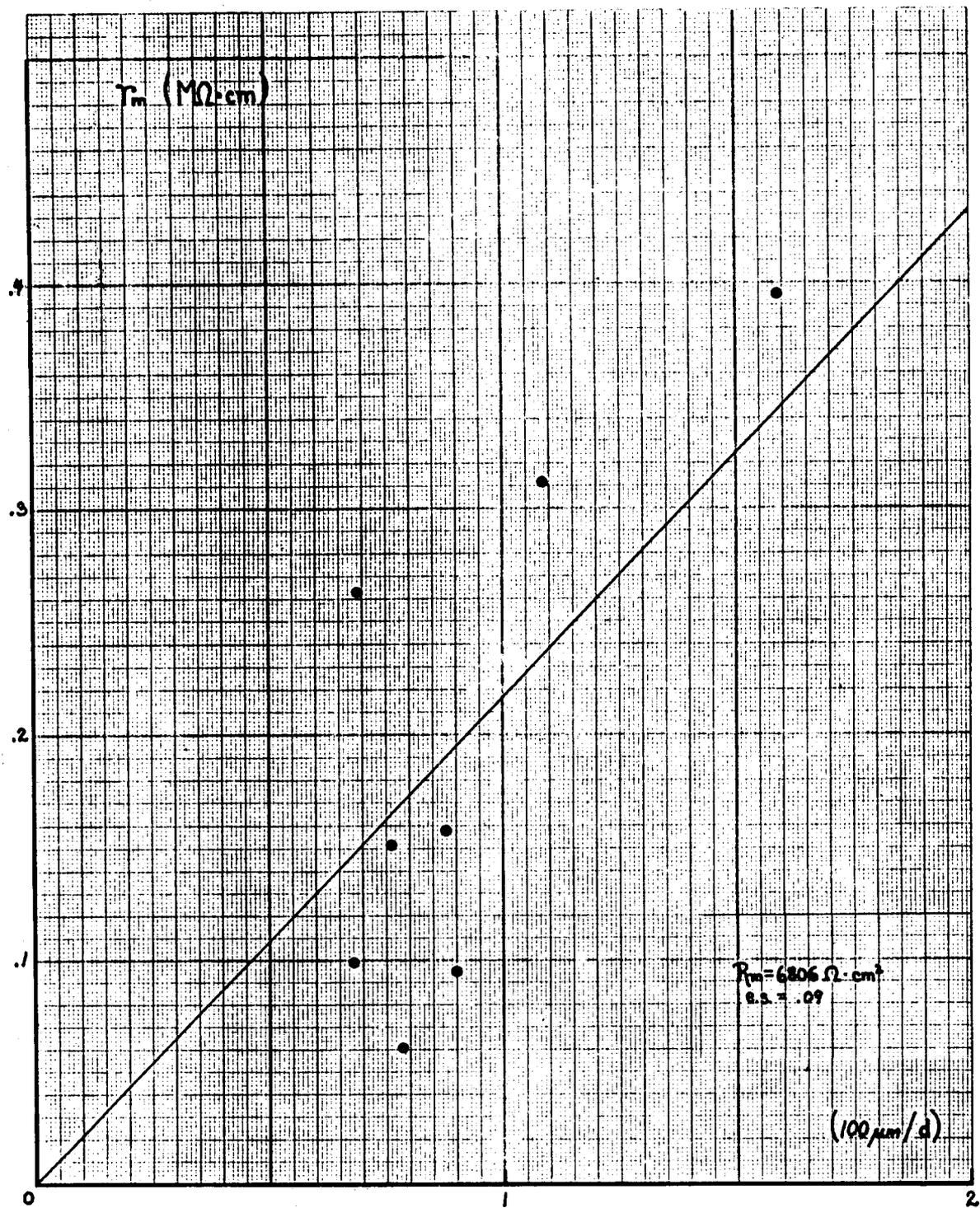


Figura 21

Regresión de r_m (resistencia transversa de la membrana por unidad de longitud) contra d (diámetro de la fibra)

Los datos se presentan de acuerdo a la forma linealizada de la ecuación m).
 R_m = resistencia específica de la membrana, e. s. = error estándar.

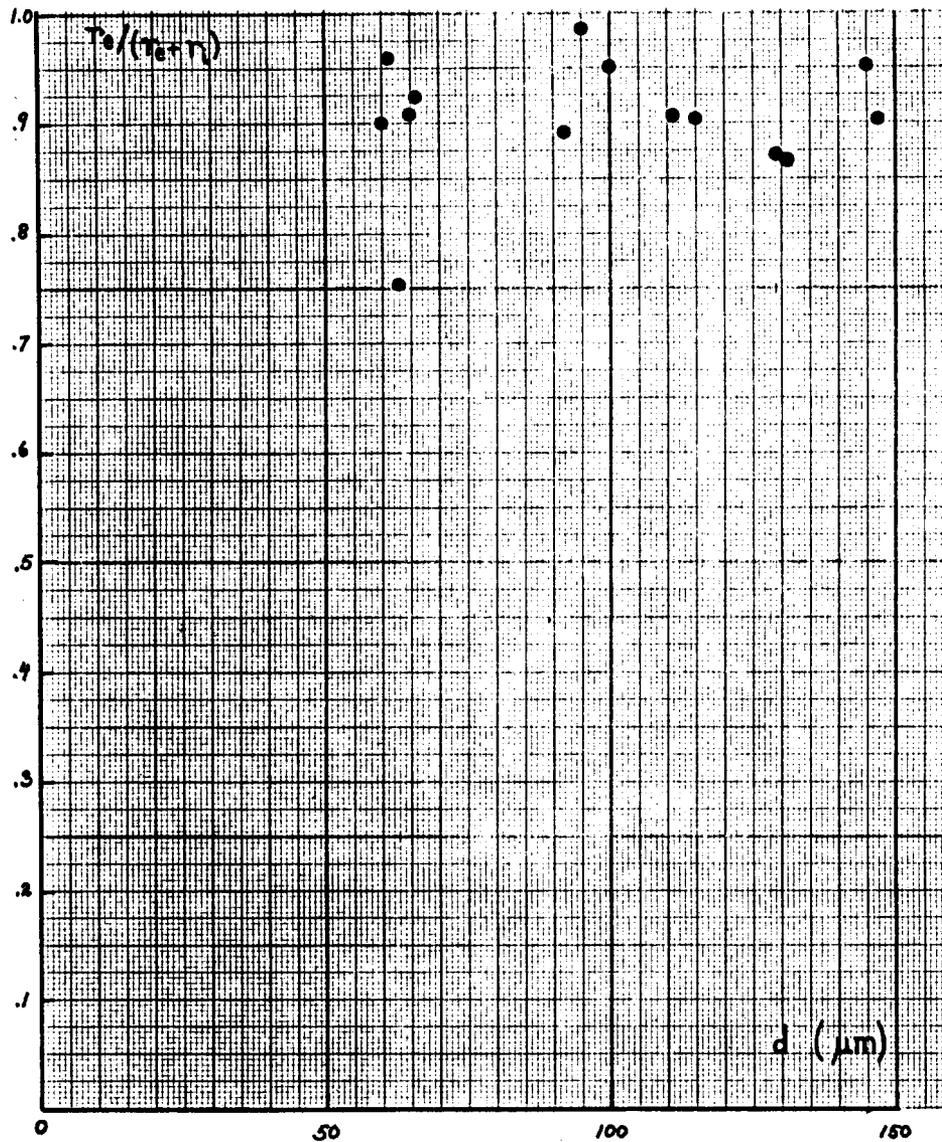


Figura 22

Calidad de los sellos de vaselina

Valores de $r_e/(r_e+r_1) \approx 0.9$ son señal de un buen sello. Esta magnitud no guarda ninguna relación con el diámetro de la fibra. (r_e = resistencia externa bajo el sello por unidad de longitud, r_1 = resistencia del mioplasma por unidad de longitud).

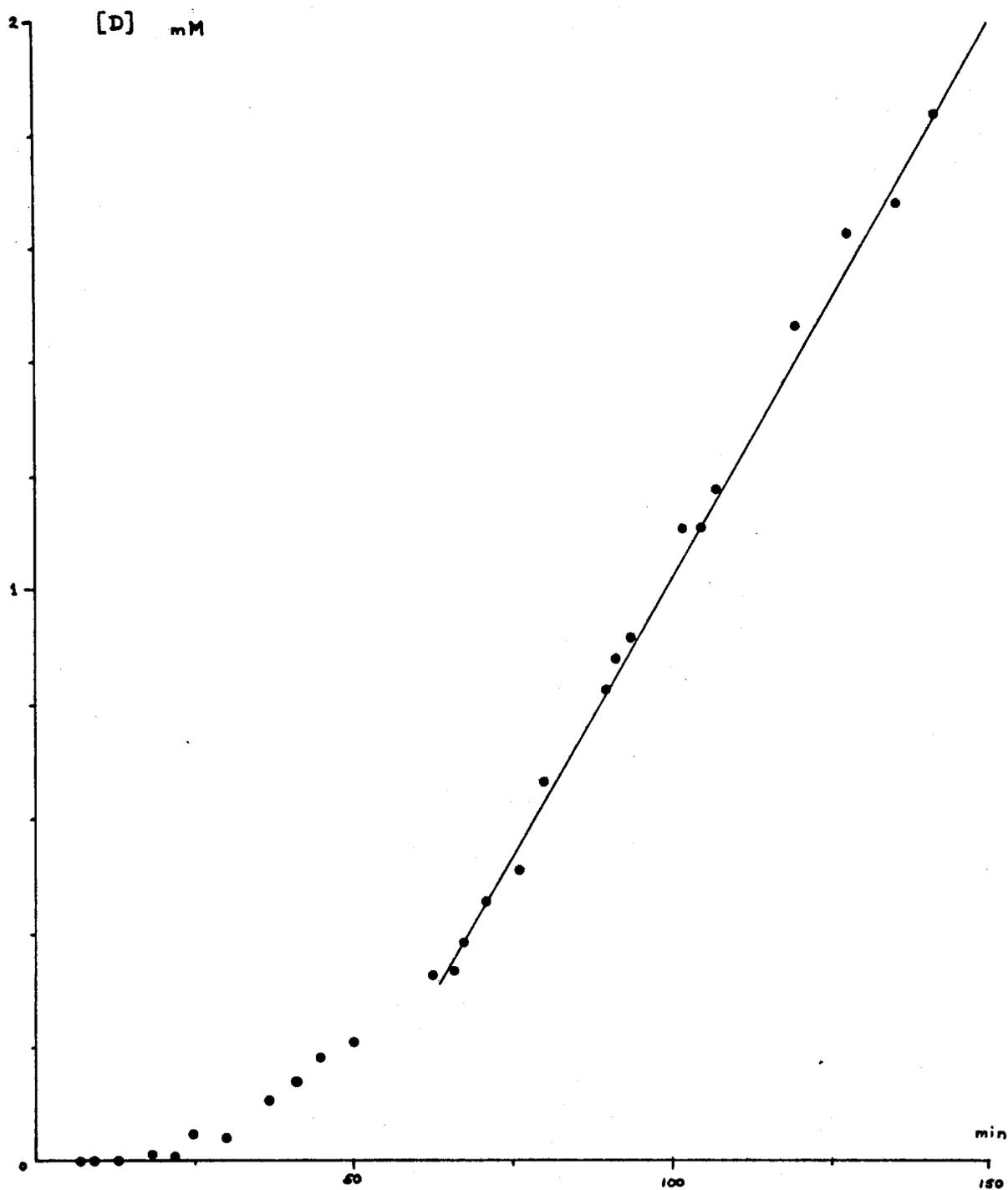


Figura 23

Curva de difusión del indicador

La relación $\Delta[D]/\Delta t$ en el interior de la fibra es lineal a partir de aprox. 1 hr. La concentración inicial del indicador en los compartimentos laterales fue 3 mM en este caso.

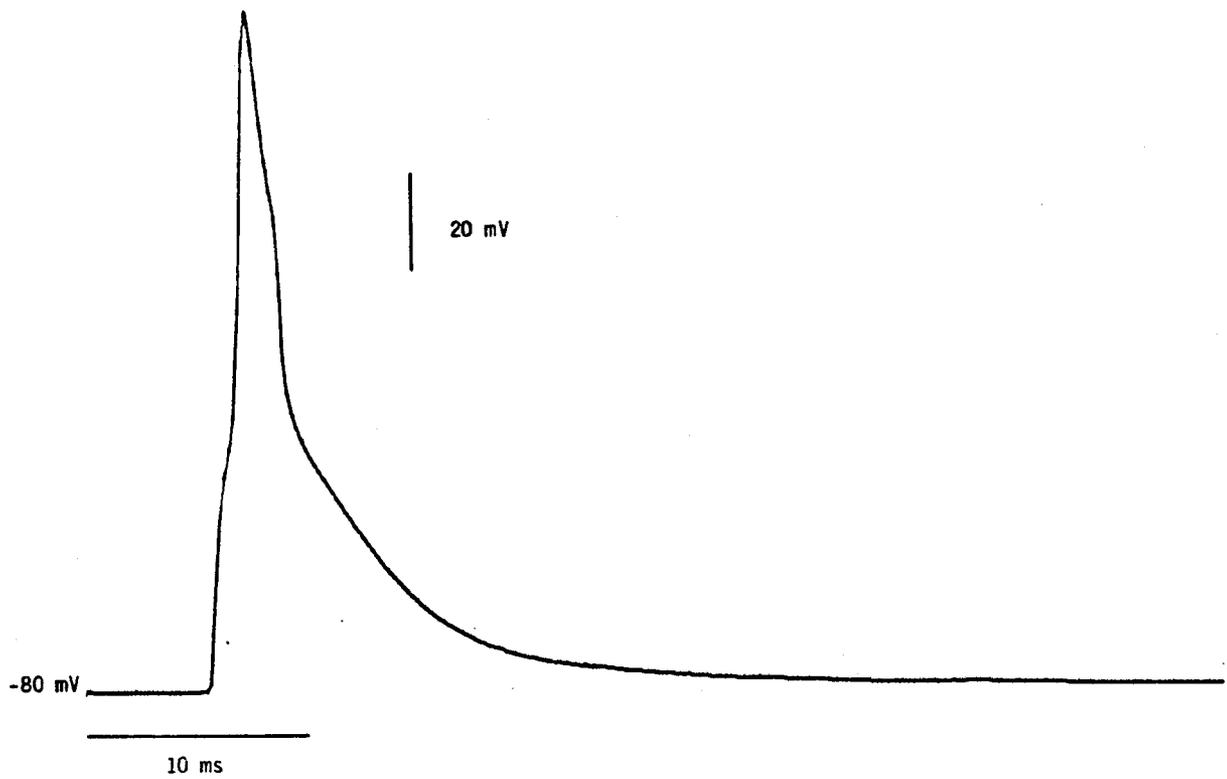


Figura 24
Potencial de acción
Potencial de mantenimiento $V_H = -80$ mV. Pulso de voltaje $V_P = -20$ mV con una duración de 3 ms. (Solución extracelular: Ringer Normal).

aproximadamente 120-130 mV (40 mV positivo), y finalmente una fase de repolarización, al principio rápida y después más lenta, acercándose al potencial inicial suavemente. La fase de repolarización se debe principalmente a la salida de K^+ de la fibra.

Entre 2.3 y 3.0 ms después del inicio de la fase regenerativa de entrada de Na^+ , comienza la liberación de Ca^{2+} del RS. Este lapso está asociado al periodo de latencia de la contracción muscular. La liberación de Ca^{2+} se manifiesta en una deflexión negativa del potencial del fotodiodo PD1 (700 nm), la cual alcanza un mínimo suavemente aproximadamente a los 7 ms y luego regresa a su valor inicial, también suavemente (fig. 25a). El registro de esta figura también muestra un cambio de potencial del fotodiodo PD2 (trazo b). Esta señal proviene de un cambio de transmitancia no dependiente de Ca^{2+} . Su magnitud es muy pequeña con respecto a la señal total y en muchos casos se puede despreciar.

La relación que guardan los registros de voltaje con la concentración de Ca^{2+} puede apreciarse a través de las transformaciones presentadas en las siguientes figuras. El registro original (fig. 26a) presenta las señales de voltaje de los dos canales ópticos, ΔV_1 y ΔV_2 expresados como cambios temporales con respecto al voltaje basal V_3 . La transformación a absorbancia (fig. 26b) es inmediata, debido a la proporcionalidad entre la intensidad luminosa y el potencial de los fotodiodos. La absorbancia intrínseca a 850 nm es un poco mayor a 700 nm (7). Por lo tanto, para conocer esta última es necesario multiplicar la primera por el factor adecuado, en este caso 850/700. Una vez hecho esto, es posible restar la señal intrínseca de la señal total y obtener el cambio de absorbancia debido solamente a la interacción entre Ca^{2+} y antipirilazo III (fig. 26c, 27a). De este cambio de absorbancia se obtiene la concentración del complejo CaD_2 , y de esta, la del Ca^{2+} libre (fig. 27b y c, fig. 28). En estas últimas figuras observamos claramente que el cambio transitorio de la concentración de Ca^{2+} tiene un curso temporal muy semejante al de la tensión isométrica durante una sacudida simple. Su duración, sin embargo, es menor.

En todos estos registros, la fibra se encuentra suficientemente estirada, con el objeto de evitar la interacción entre los miofilamentos y, por lo tanto, la contracción (el espacio sarcomérico medido con un ocular graduado era alrededor de 4 μm). En algunos casos, sin embargo, el estiramiento no resulta suficiente, lo cual se manifiesta como un artefacto mecánico. Si este no es muy grande, no presenta problema, pues afecta igualmente a ambas señales ópticas (700 y 850 nm) y la resta de la absorbancia intrínseca cancela el artefacto mecánico (fig. 29).

Una vez hechas las transformaciones anteriores, el registro simultáneo del cambio transitorio de la concentración de Ca^{2+} y el potencial de acción aparece como en la figura 30. Nótese el retardo o latencia de 3 ms (medidos desde el inicio de la fase regenerativa de entrada de Na^+). El valor máximo de concentración de Ca^{2+} es 4 μM , y se alcanza a los 7.5 ms del comienzo de la subida de la curva, durante la fase de repolarización del

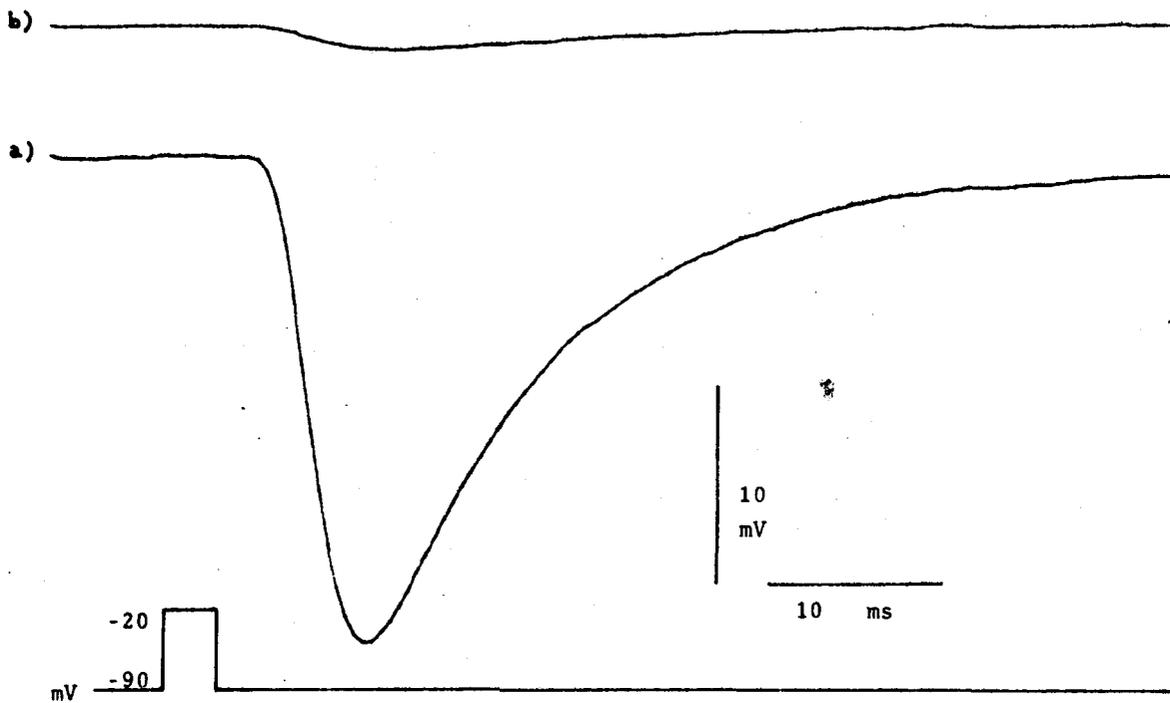


Figura 25
Cambio transitorio de absorbancia a 700 nm (a) y 850 nm (b)
producido por un potencial de acción
 $V_h = -90$ mV, $V_p = -20$ mV, con una duración de 3 ms. (Solución extracelular: Ringer Normal).

085830

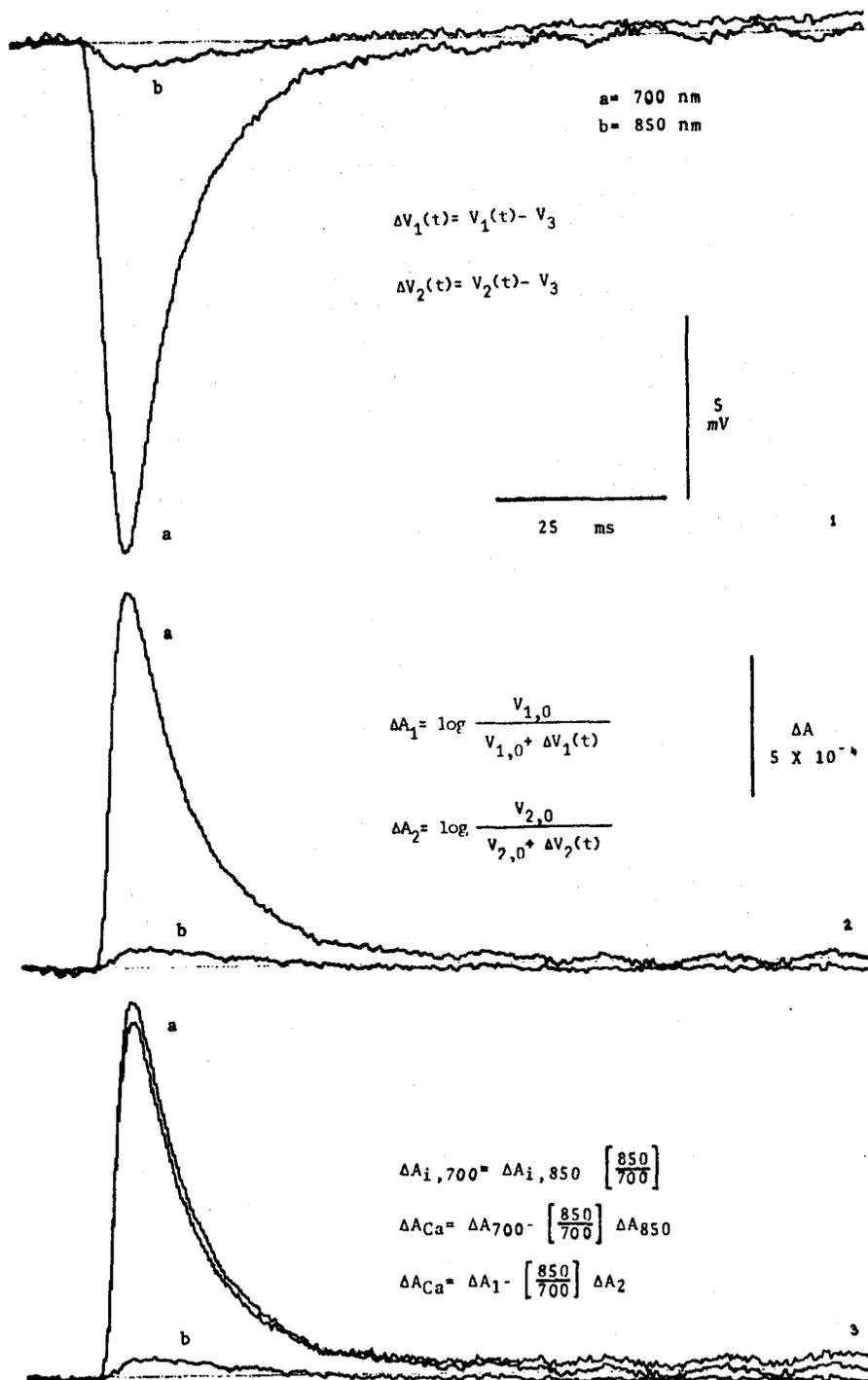


Figura 26

Transformaciones de los cambios de voltaje a cambios de absorbancia

1. Cambios de voltaje en función del tiempo. $V_1(t)$ = potencial de PD1, $V_2(t)$ = potencial de PD2, V_3 = potencial de PD3 a $t=0$. 2. Cambios de absorbancia a 700 nm (ΔA_1) y a 850 nm (ΔA_2). $V_{1,0}$ = potencial inicial de PD1, $V_{2,0}$ = potencial inicial de PD2 ($V_{1,0} = V_{2,0} = V_3$). 3. Absorbancia debida sólo a la interacción de Ca^{2+} con antipirilazo III. $\Delta A_{i,700}$ = absorbancia intrínseca a 700 nm, $\Delta A_{i,850}$ = absorbancia intrínseca a 850 nm (Solución extracelular: Ringer Normal).

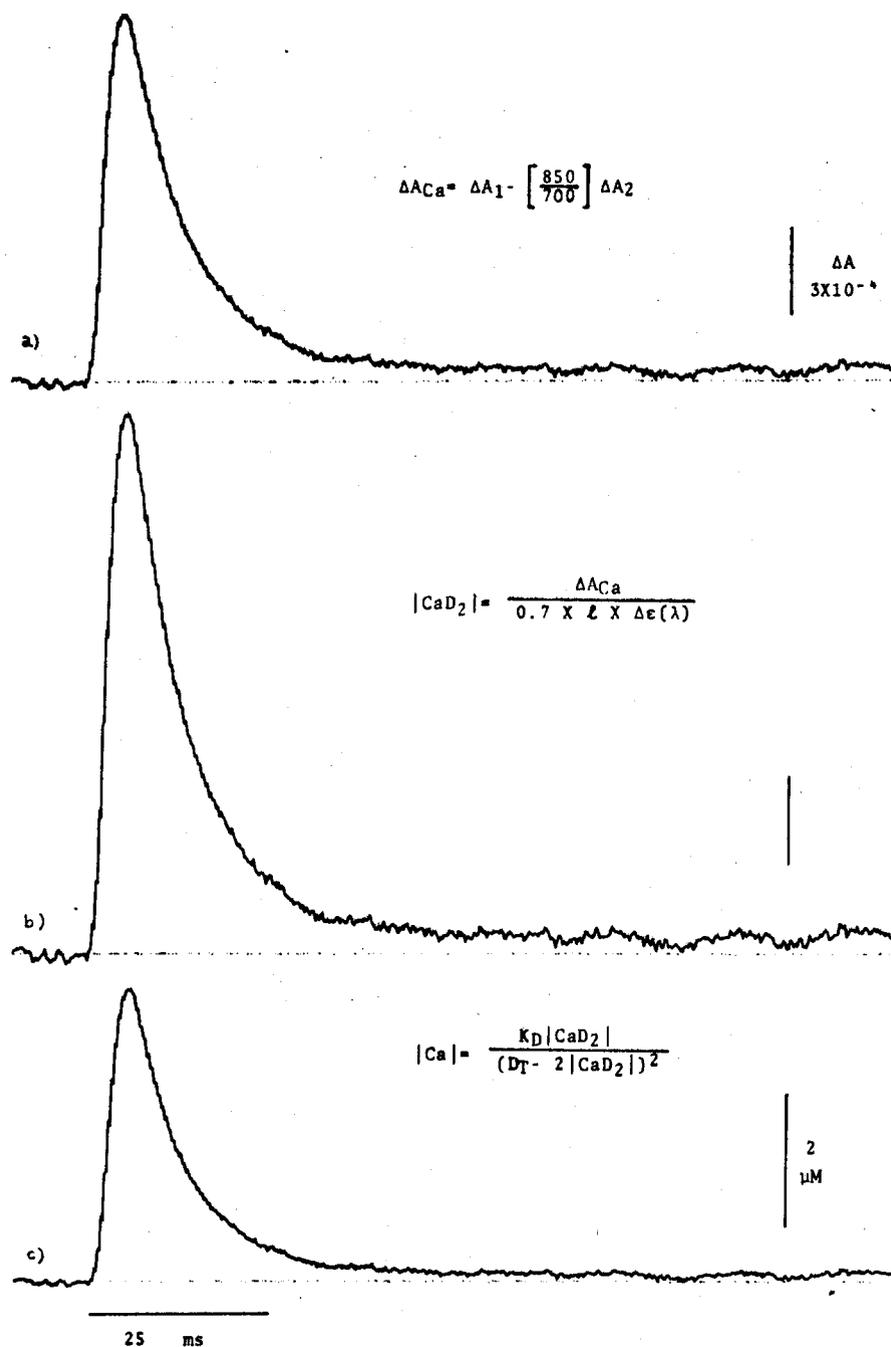


Figura 27
Transformaciones de absorbancia a Ca^{2+} libre
 a) Absorbancia debida sólo a la interacción de Ca^{2+} con antipirilazo III.
 b) Concentración del complejo antipirilazo III- Ca^{2+} (CaD_2). c)
 Concentración del Ca^{2+} libre. (Misma fibra que en la figura anterior y en
 las mismas condiciones).

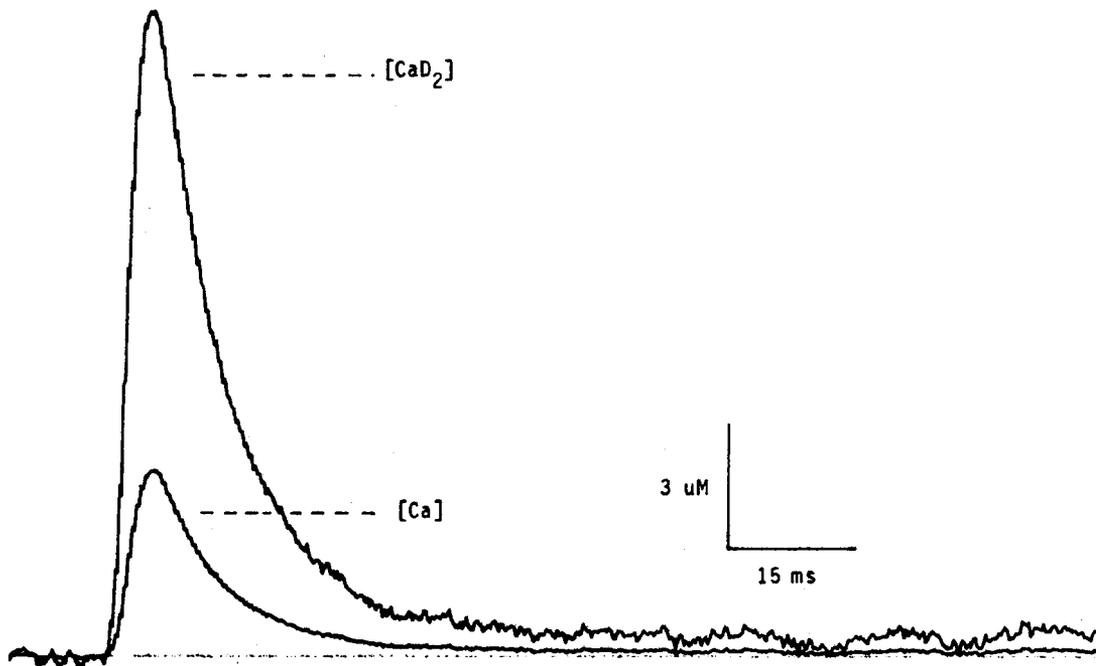


Figura 28
Comparación entre la concentración del complejo Ca^{2+} -indicador (CaD_2) y Ca^{2+} libre en función del tiempo
(Solución extracelular: Ringer Normal)

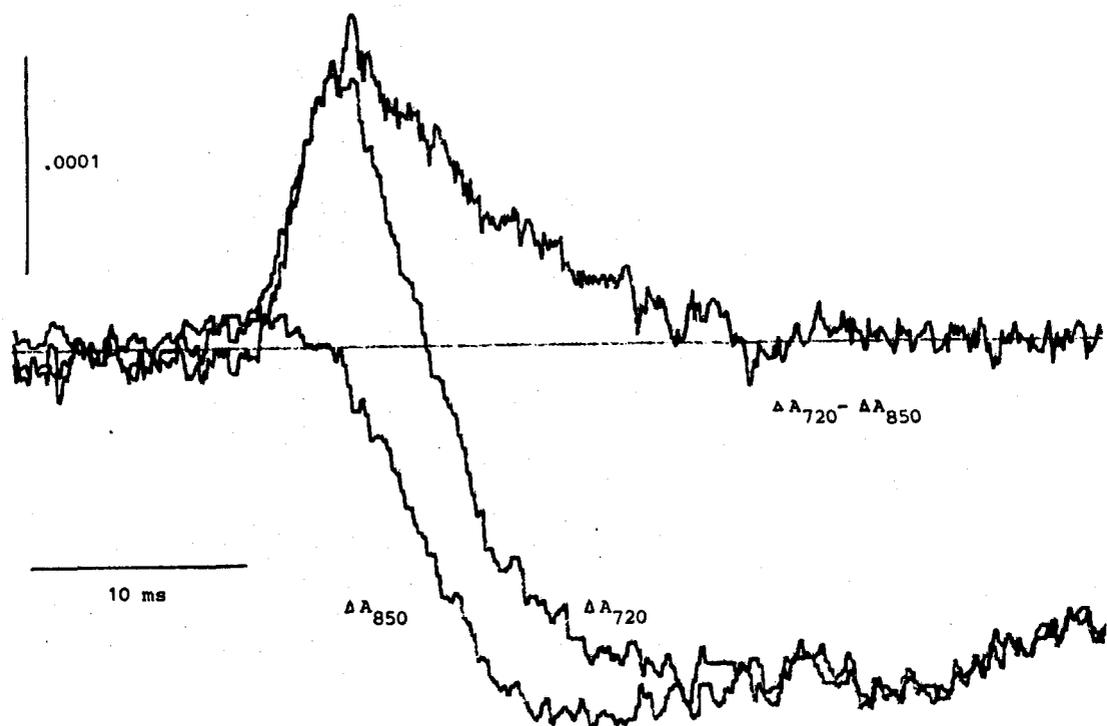


Figura 29

Registros de absorbancia con una señal intrínseca por artefacto mecánico

La resta de ambas señales proporciona la absorbancia debida sólo a la interacción del Ca^{2+} con el indicador. (Solución extracelular: Ringer Normal).

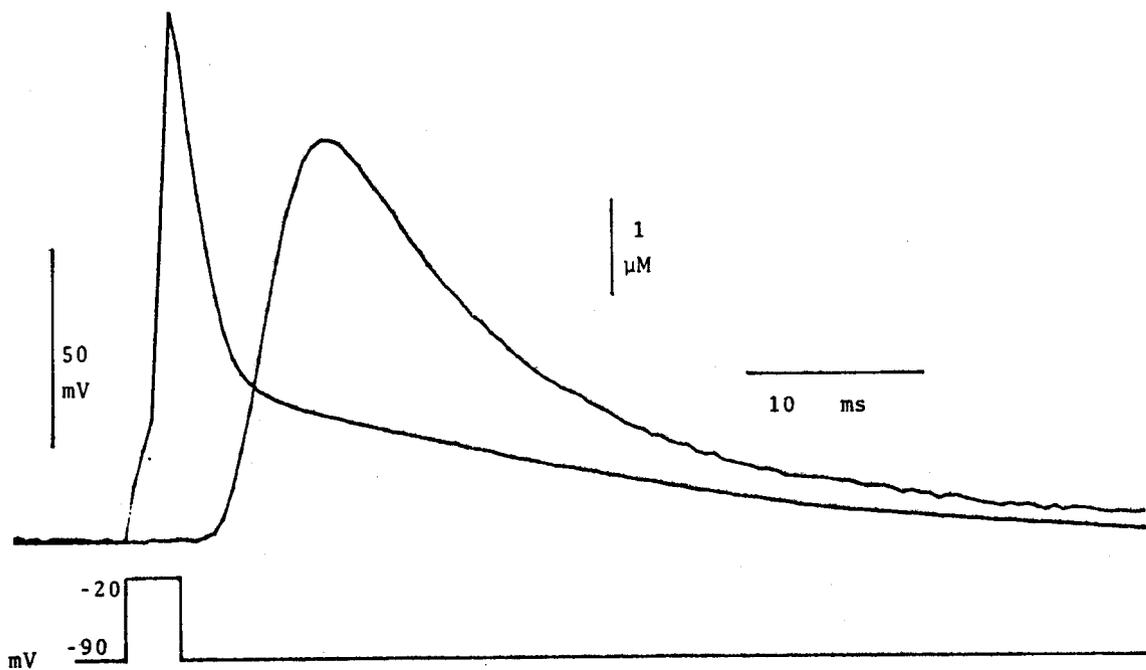


Figura 30
Registro simultáneo de transitorio de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}]$)
y potencial de acción

Pulso de voltaje de 3 ms, de -90 mV a -20 mV. El registro de concentración de Ca^{2+} se obtuvo haciendo las operaciones señaladas en figuras anteriores y en el texto. (Solución extracelular: Ringer Normal).

potencial de acción. Después de unos 60 ms, la concentración intracelular de Ca^{2+} prácticamente ha vuelto a su nivel basal.

En el modo de fijación de voltaje, el potencial de membrana cambia en unos cuantos microsegundos al nivel del pulso comando y se mantiene ahí por el tiempo que dure el pulso. Cuando se da un pulso de voltaje en este modo, también se detectan cambios en la intensidad de la luz transmitida a 700 nm, como consecuencia de la liberación de Ca^{2+} hacia el mioplasma. Al igual que con el potencial de acción, se observa una disminución del voltaje del fotodiodo PD1 (fig. 31). El curso temporal, sin embargo, es diferente. Se distingue desde el comienzo del pulso comando, crece rápidamente durante los primeros 20 ms, y luego tiende a alcanzar un valor estacionario, mientras permanezca el pulso. Al cortar el pulso, empieza a aumentar nuevamente el potencial del fotodiodo, siguiendo un curso exponencial hacia su nivel basal. El cambio de dirección de la curva al corte del pulso es instantáneo. En el fotodiodo PD2 se registra simultáneamente el cambio intrínseco de transmitancia a 850 nm, el cual aparece en este registro como una leve deflexión negativa.

Las transformaciones expuestas para los registros de pulso de voltaje se aplican igualmente a los de fijación de voltaje. En la figura 32, observamos los cambios transitorios de concentración de Ca^{2+} para tres pulsos de voltaje. Los tres parten de un potencial de mantenimiento de -90 mV, pero el primero es un pulso a 0 mV, el segundo a +20 mV, y el tercero a +40 mV. Su curso temporal es muy semejante al del cambio correspondiente del potencial del fotodiodo PD1 (fig. 31). La concentración de Ca^{2+} crece al principio rápidamente, durante unos 20 ms, y después lentamente. En los primeros dos registros, cerca de los 100 ms, cuando la curva de concentración de Ca^{2+} es prácticamente una meseta, se observa un pequeño aumento adicional momentáneo. Luego, al corte del pulso, cae bruscamente siguiendo un curso exponencial hacia su nivel basal. En estos tres registros se aprecia también que la magnitud de la concentración de Ca^{2+} alcanzada durante el pulso aumenta proporcionalmente y monotónicamente con el nivel del pulso comando.

DETERMINACIONES HECHAS CON EL MODELO DE REMOCION DE CALCIO DEL MIOPLASMA

El modelo de remoción de Ca^{2+} nos da información adicional sobre la contribución de varios componentes al cambio transitorio de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Es particularmente importante obtener una estimación del curso temporal y magnitud de la velocidad de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Esta se obtiene a partir de la integración y ajuste de las ecuaciones simultáneas que describen los componentes del modelo (ver Apéndice I). A continuación se presentan los trazos de los principales componentes del modelo obtenidos para un registro hecho con fijación de voltaje y otro con pulso de voltaje.

En primer lugar, tenemos el registro original obtenido con un pulso de voltaje controlado a +20 mV durante 100 ms (fig. 33a). Nótese que tanto la

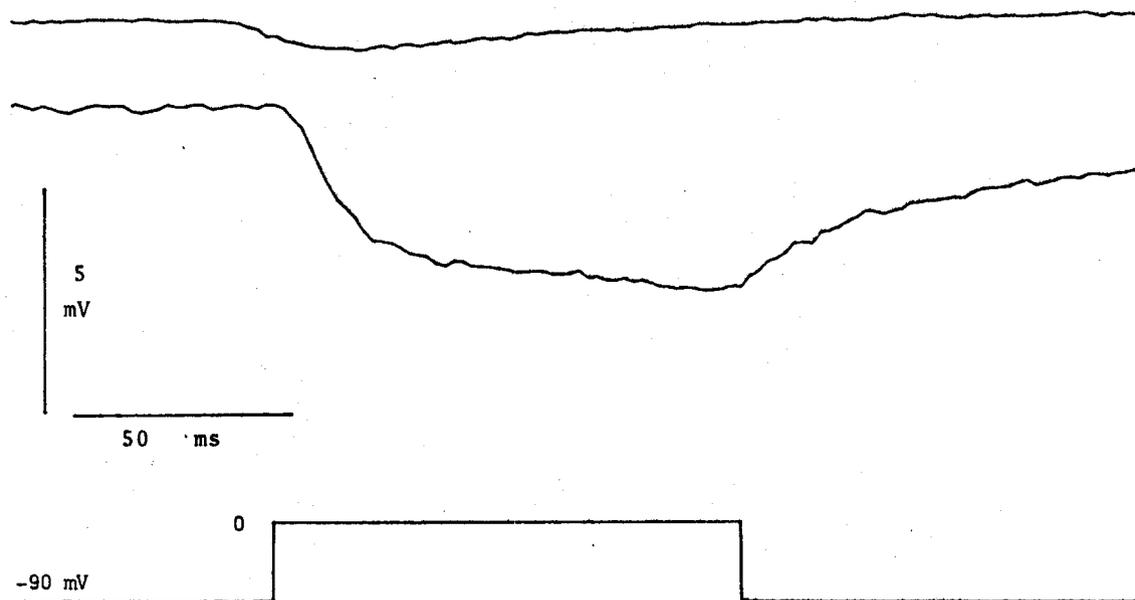


Figura 31
Registros ópticos a 700 nm y 850 nm empleando fijación de voltaje.
 Potencial de mantenimiento $V_H = -90$ mV. Pulso de voltaje controlado $V_C = 0$ mV, con una duración de 100 ms. (Solución extracelular: 10 mM Ca^{2+}).

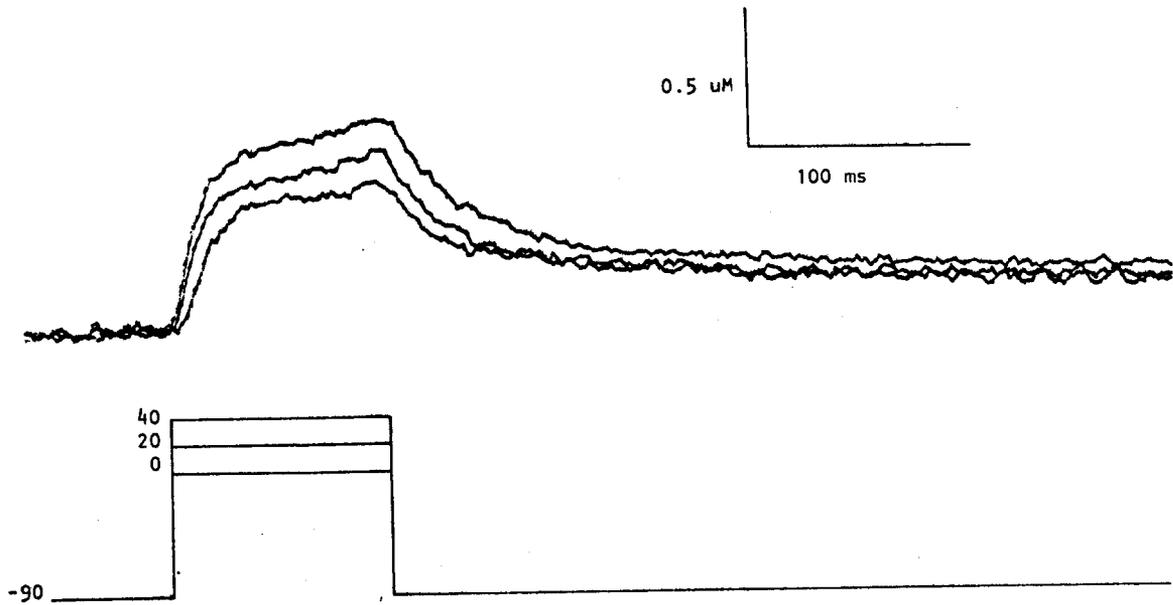


Figura 32
Transitorios de Ca²⁺ (Δ [Ca]) obtenidos con
pulsos de voltaje controlado
 $V_h = -90$ mV. $V_c = 0, +20, +40$ mV, con una duración de 100 ms. (Solución
 Extracelular: 10 mM Ca²⁺).

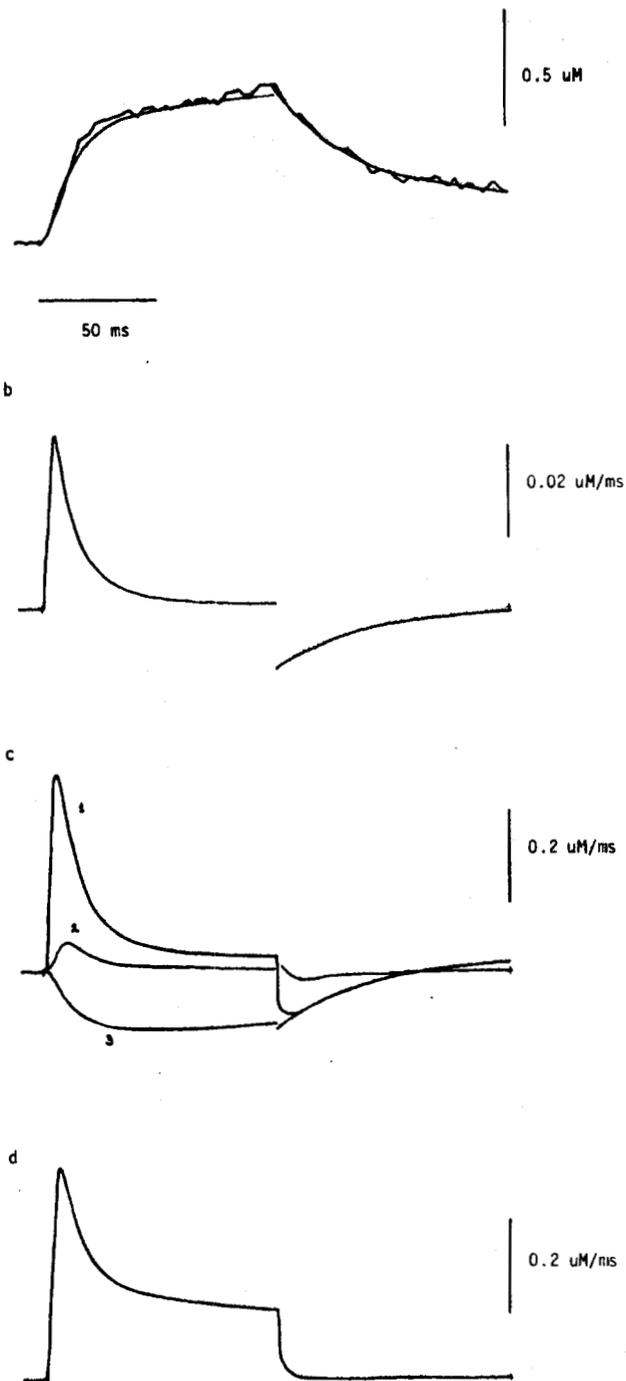


Figura 33

Obtención del curso temporal de la liberación de Ca^{2+} del RS a partir de un transitorio de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}]$)

a) Transitorio de Ca^{2+} generado por un pulso de voltaje controlado. La curva suave es el ajuste exponencial de los puntos del registro. b) Derivada de la concentración de Ca^{2+} con respecto al tiempo ($d[\text{Ca}]/dt$). c) Trazo 1: $d\text{Ca}_{\text{fast}}/dt$, trazo 2: $d[\text{CaTN}]/dt$, trazo 3: $d\text{Ca}_{\text{slow}}/dt$. d) Curso temporal de la velocidad de liberación de Ca^{2+} por el RS. Los parámetros cinéticos para esta fibra aparecen en la tabla IV.

fase ascendente como la descendente se ajustan a funciones exponenciales (trazo suave). Dichas funciones se utilizaron para evaluar la derivada $d[Ca]/dt$, que es el segundo trazo de la figura (fig. 33b). Esta derivada tiene una fase ascendente rápida seguida de un descenso más prolongado. Al corte del pulso, se invierte el sentido de la derivada, aproximándose asintóticamente a 0. La suma de los cambios

$$d[Ca]/dt + d[CaTN]/dt + d[CaP]/dt + d[CaD_2]/dt$$

representa el cambio neto del Ca^{2+} que integra el pool de Ca_{fast} (dCa_{fast}/dt ; ver Apéndice I). Este tiene un cambio temporal semejante al de $d[Ca]/dt$, pero su magnitud es bastante mayor (fig. 33c).

La figura 33c muestra, además, el curso temporal de dCa_{slow}/dt , el cual está dominado por $d[CaPARV]/dt$. También aparece el curso temporal de $d[CaTN]/dt$. Nótese como al corte del pulso $-dCa_{slow}/dt \rightarrow dCa_{fast}/dt$, lo cual se observa como un traslape de las dos curvas. La diferencia entre los valores absolutos de dCa_{fast}/dt y dCa_{slow}/dt durante el resto del registro es igual a Φ_{in} , es decir, el flujo de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Este flujo se observa en el cuarto trazo de la figura (fig. 33d). Tiene primero una fase ascendente rápida y después un descenso más lento hacia un valor medio, formando una especie de meseta. El valor máximo, en este caso 4.7×10^{-7} M/ms, lo alcanza a los 6 ms en este registro. Al corte del pulso, Φ_{in} cesa abruptamente.

Durante el tiempo que dura el pulso, aumenta la concentración de $CaTN$, así como la de $CaPARV$ (fig. 34). Al corte del pulso, $[CaTN]$ comienza a disminuir inmediatamente, mientras que $[CaPARV]$ sigue aumentando por unos milisegundos y después empieza a disminuir lentamente. Los valores de los parámetros libres obtenidos para esta fibra con el modelo de remoción se muestran en la Tabla IV.

Si se hacen estas determinaciones en un registro generado por un potencial de acción se obtiene algo muy semejante (fig. 35, 36). En este caso, sin embargo, la repolarización de la membrana no es instantánea. Por esta razón, $dCa_{fast}/dt - dCa_{slow}/dt$ aún difiere bastante de 0 al principio de la fase descendente de la curva de concentración de Ca^{2+} , debido a que todavía hay liberación de Ca^{2+} en ese momento, pero la igualdad se alcanza unos milisegundos después. Esto se observa como un traslape de las curvas de dCa_{fast}/dt y dCa_{slow}/dt a partir de los 25-30 ms del registro. La figura 36 muestra como sustancialmente no hay liberación de Ca^{2+} del RS después del máximo de la curva de $[Ca]$. Los parámetros obtenidos para esta fibra aparecen en la Tabla V.

La figura 37 muestra el curso temporal de $[CaTN]$ y $[CaPARV]$. Nótese como, a semejanza con el registro de pulso de voltaje controlado, $[CaTN]$ aumenta durante la fase ascendente de $[Ca]$ y disminuye en la fase descendente, siguiendo un curso temporal muy parecido al de dicha

085830

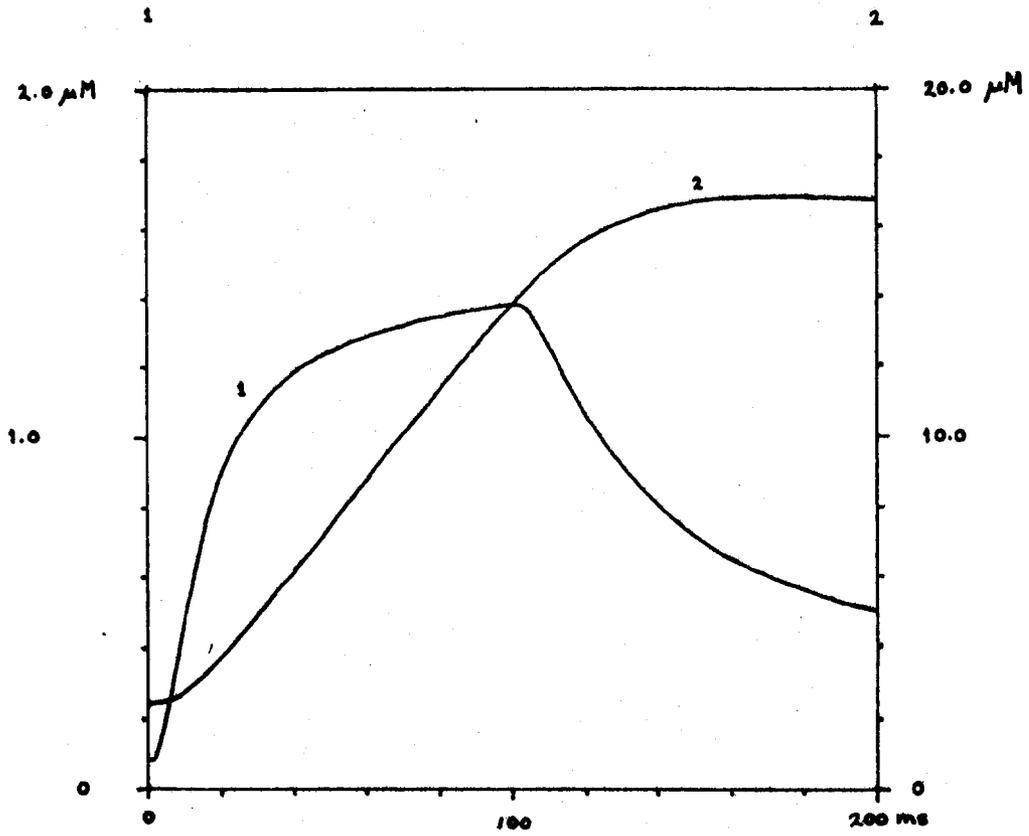


Figura 34
Curso temporal de [CaTN] (1) y [CaPARV] (2) durante un transitorio de Ca^{2+} generado por un pulso de voltaje controlado.

TAFLA IV

PARAMETROS CINETICOS PARA LA FIBRA DE LA FIG. 33
(pulso de voltaje controlado a +20 mV)

| | |
|---|---|
| $K_{on}(CaTN) = 4.7 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ | $TN_T = 2.40 \times 10^{-4} M$ |
| $K_{off}(CaTN) = 545 s^{-1}$ | $PARV_T = 2.35 \times 10^{-3} M$ |
| $K_{on}(CaPARV) = 1.7 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ | $[Mg]_{rest} = 9.0 \times 10^{-4} M$ |
| $K_{off}(CaPARV) = 4.5 s^{-1}$ | $[Ca]_{rest} = 4.0 \times 10^{-8} M$ |
| $K_{on}(MgPARV) = 3.0 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ | $P_T = 1.0 \times 10^{-6} M$ |
| $K_{off}(MgPARV) = 2.0 s^{-1}$ | $M = 8.0 \times 10^{-4} M \cdot s^{-1}$ |
| $K_{on}(CaEGTA) = 2.0 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ | $K_p = 5.0 \times 10^{-5} M$ |
| $K_{off}(CaEGTA) = 0.4 s^{-1}$ | $K_D = 1.896 \times 10^{-8} M$ |

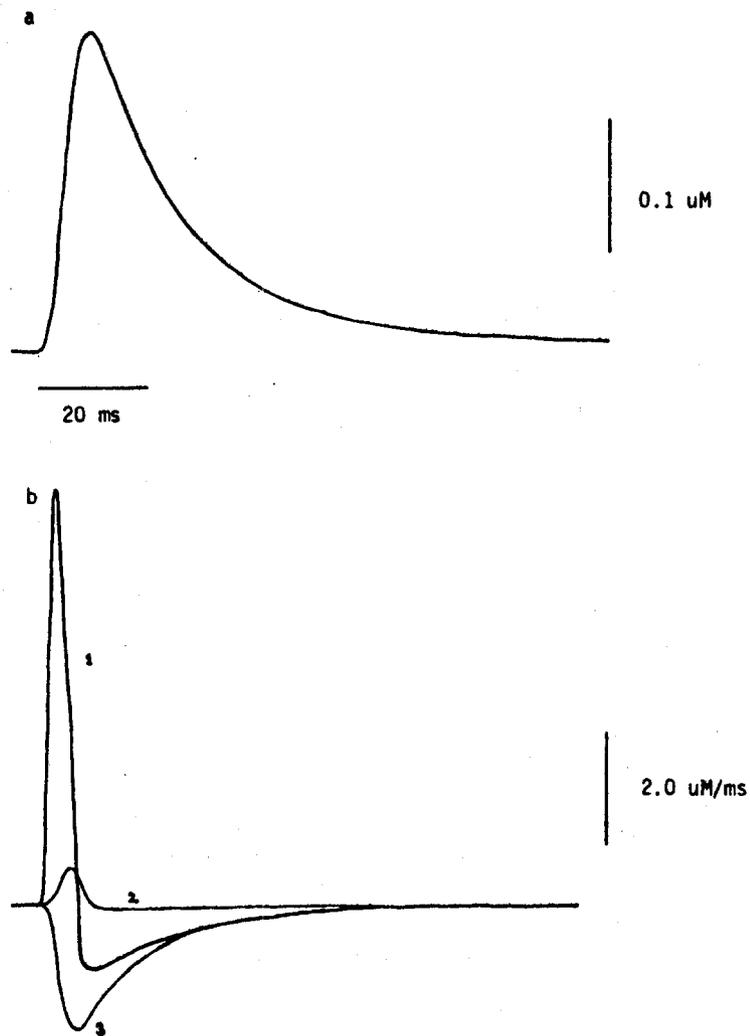


Figura 35
Flujos de Ca^{2+} durante un transitorio de Ca^{2+}
generado por un potencial de acción

a) Transitorio de Ca^{2+} ($\delta[\text{Ca}]$). b) Trazo 1: $d\text{Ca}_{\text{fast}}/dt$, trazo 2: $d[\text{Ca}_{\text{IN}}]/dt$, trazo 3: $d\text{Ca}_{\text{slow}}/dt$.

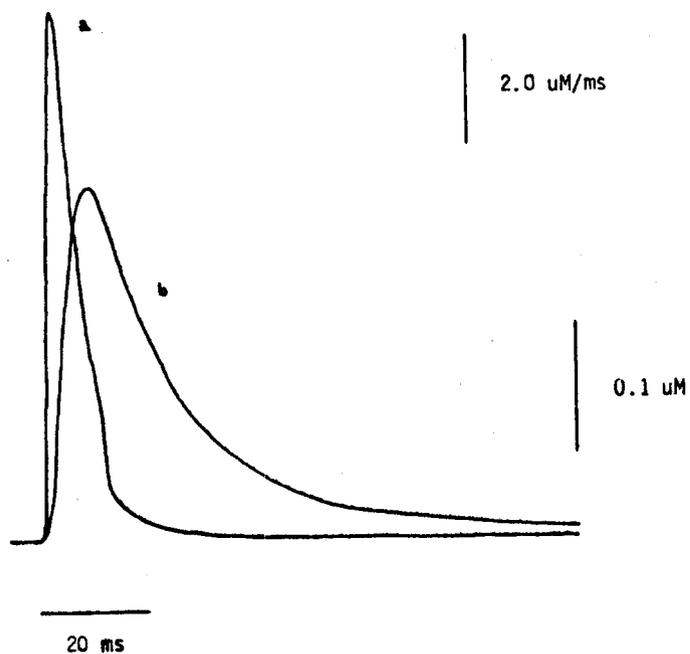


Figura 36
Liberación de Ca^{2+} durante un transitorio de Ca^{2+}
generado por un potencial de acción

a) Velocidad de liberación de Ca^{2+} del RS. b) Transitorio de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}]$). Los parámetros cinéticos para esta fibra aparecen en la tabla V.

TAULA V

PARAMETROS CINETICOS PARA LA FIBRA DE LA FIG. 35
(registro generado por un potencial de acción)

| | |
|---|---|
| $K_{on}(CaTN) = 5.75 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ | $TN_T = 2.40 \times 10^{-4} M$ |
| $K_{off}(CaTN) = 1200 s^{-1}$ | $PARV_T = 2.35 \times 10^{-3} M$ |
| $K_{on}(CaPARV) = 1.0 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ | $[Mg]_{rest} = 9.0 \times 10^{-4} M$ |
| $K_{off}(CaPARV) = 0.5 s^{-1}$ | $[Ca]_{rest} = 5.8 \times 10^{-8} M$ |
| $K_{on}(MgPARV) = 3.0 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ | $P_T = 1.0 \times 10^{-6} M$ |
| $K_{off}(MgPARV) = 3.2 s^{-1}$ | $M = 1.2 \times 10^{-3} M \cdot s^{-1}$ |
| $K_{on}(CaEGTA) = 2.0 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $K_p = 5.0 \times 10^{-5} M$ |
| $K_{off}(CaEGTA) = 0.4 s^{-1}$ | $K_D = 1.896 \times 10^{-8} M$ |

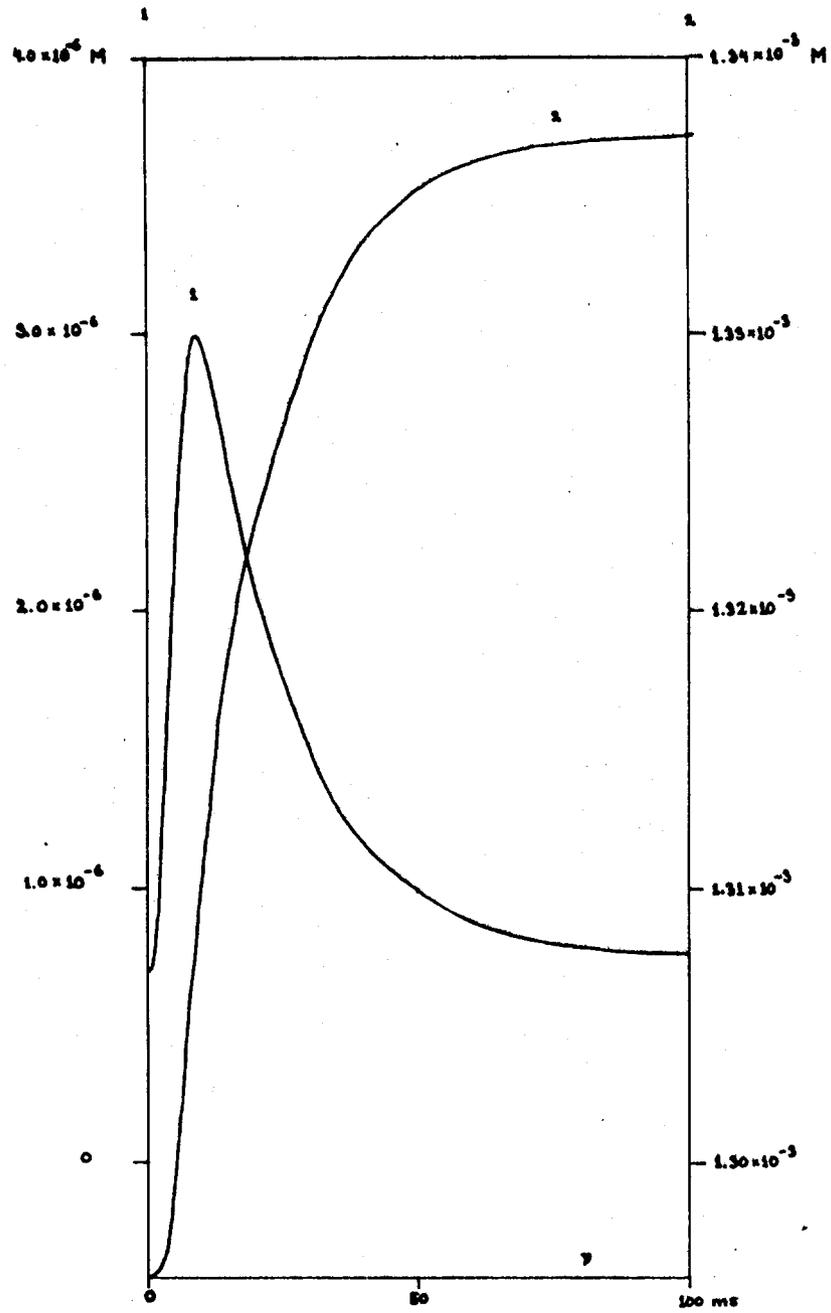


Figura 37
Curso temporal de [CaIN] (1) y [CaPARV] (2) durante un transitorio de Ca^{2+} generado por un potencial de acción

concentración de Ca^{2+} .

La unión del Ca^{2+} a los sitios de la bomba de Ca^{2+} y el flujo de este ión a través de ella representan contribuciones muy pequeñas comparadas con las de CaTN , CaPARV y CaD_2 . Sus magnitudes son del orden de 10^{-8} M o menor. La figura 38 muestra el trazo que corresponde al flujo de Ca^{2+} a través de la bomba.

La unión del Ca^{2+} con el buffer (EGTA) también representa una contribución mínima en el lapso que duran estos registros. Dicha unión tiene un tiempo de relajamiento de ~ 41 ms (64), aproximadamente 230 veces más lento que el complejo Ca^{2+} -indicador (fig. 39). Sin embargo, en todas los cálculos se incluyeron todos los componentes del modelo, aún los que representan una contribución mínima.

La aplicación del modelo a los registros de la figura 32 revela, como era de esperarse, que la liberación de Ca^{2+} del RS aumenta con la magnitud del pulso comando, como se aprecia en la figura 40. Con un pulso a 0 mV, la máxima velocidad de liberación de Ca^{2+} fue 3.6×10^{-7} M/ms, mientras que con un pulso a +40 mV dicha velocidad fue de 6.5×10^{-7} M/ms. La velocidad de liberación que se alcanza en la meseta antes del corte del pulso fue de 1.1×10^{-7} M/ms y 2.2×10^{-7} M/ms para esos pulsos, respectivamente. Con el pulso a +20 mV (trazo medio), la velocidad máxima de liberación fue de 4.7×10^{-7} M/ms, y en la meseta antes del corte del pulso 2.5×10^{-7} M/ms. En los tres casos el máximo se alcanzó a los 6 ms del inicio de la liberación de Ca^{2+} , y ésta se detiene bruscamente al corte del pulso.

Cuando se estimula una fibra repetidamente con intervalos de unos cuantos segundos, puede suceder que la concentración de Ca^{2+} no haya llegado a su nivel basal al comienzo de cada registro consecutivo. El nivel de Ca^{2+} en reposo al inicio de los registros también puede estimarse con el modelo de remoción. La figura 41a muestra cinco registros consecutivos obtenidos por estimulación repetida de la fibra con intervalos de 20 segundos entre cada pulso. Además de que el nivel basal de Ca^{2+} aumenta en cada registro consecutivo (ver abajo), la amplitud de $[\text{Ca}]$ disminuye ligeramente, disminución que está asociada a una menor liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (fig. 41b).

| # del trazo | tiempo (min) | Ca^{2+} basal (nM) |
|-------------|--------------|-----------------------------|
| 1 | 0 | 40 |
| 2 | 20 | 52 |
| 3 | 40 | 58 |
| 4 | 60 | 62 |
| 5 | 80 | 63 |

Dicha velocidad de liberación fue de 9.8×10^{-7} M/ms en el primero y 6.95×10^{-7} M/ms en el último. El máximo se alcanzó a los 5 ms en los

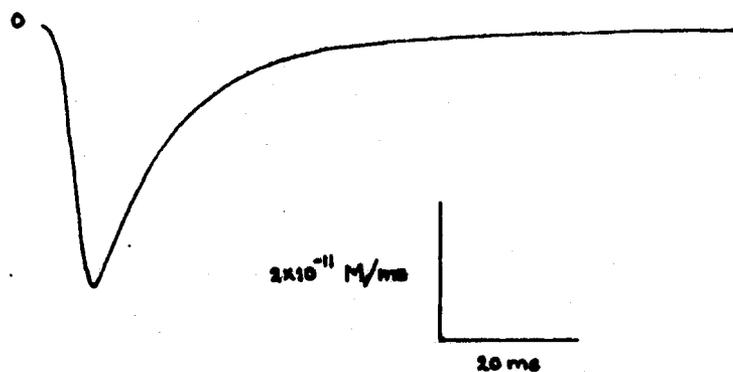


Figura 38
Curso temporal del flujo de Ca^{2+} a través de la bomba de Ca^{2+} durante un transitorio de Ca^{2+} generado por un potencial de acción

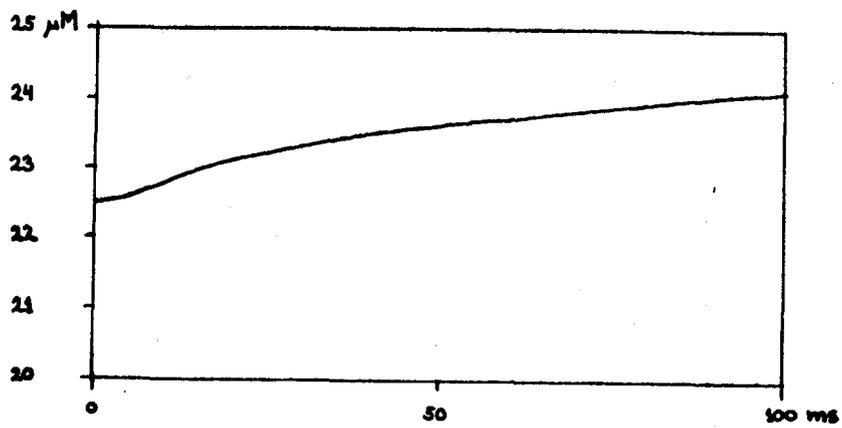


Figura 39
Aumento de la concentración del complejo CaEGTA durante 100 ms de duración de un transitorio de Ca^{2+} generado por un potencial de acción

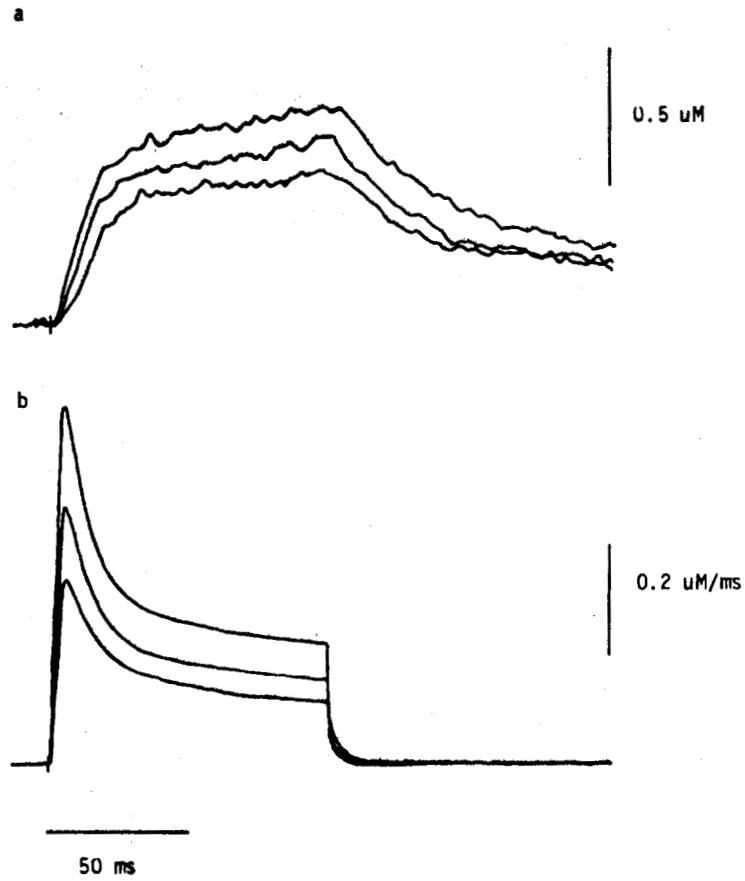


Figura 40
Velocidad de liberación de Ca^{2+} del RS en tres transitorios de Ca^{2+}
obtenidos con pulsos de voltaje controlado a 0 mV, +20 mV y +40 mV
 a) Transitorios de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}]$). b) Velocidad de liberación de Ca^{2+} .

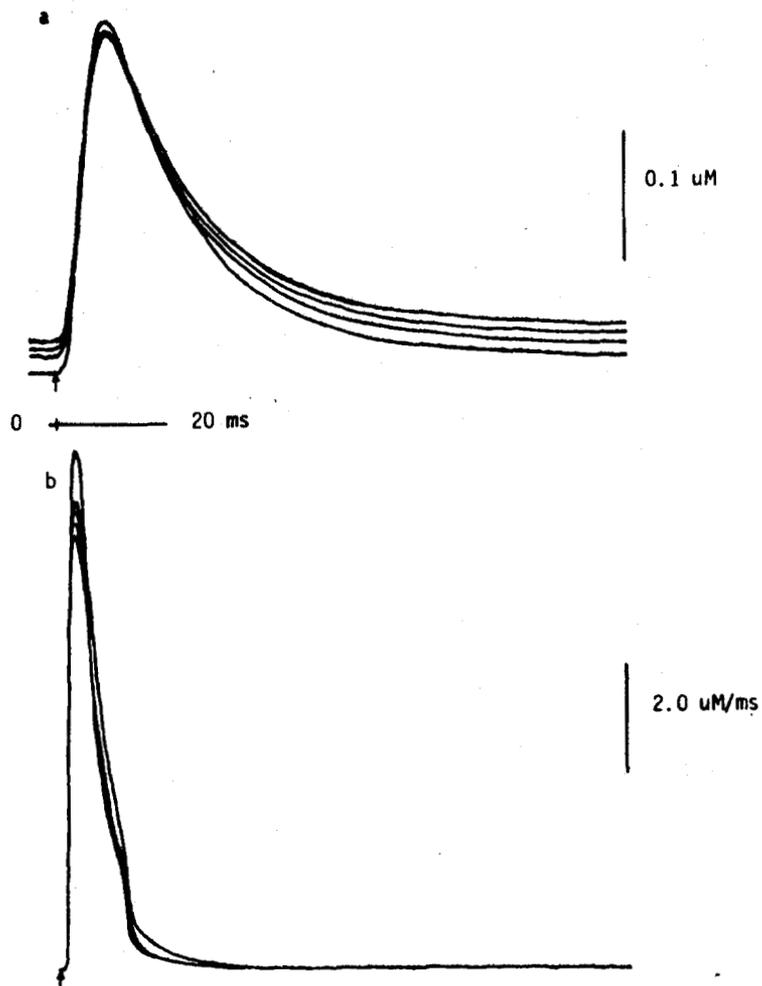


Figura 41

Cinco transitorios de Ca^{2+} consecutivos obtenidos en el modo de pulso de voltaje con un intervalo de 20 segundos entre cada pulso

a) Transitorios de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}]$). Nótese el diferente nivel basal de Ca^{2+} libre en reposo para cada uno de estos registros. b) Velocidad de liberación de Ca^{2+} del RS. (Solución extracelular: Ringer Normal).

cinco registros. El descenso de la curva de liberación de Ca^{2+} tiene una forma particular. Primero tiene una pendiente pronunciada, luego una especie de joroba, después desciende rápido nuevamente y finalmente se aproxima a 0 suavemente. A los 40 - 50 ms del inicio del aumento de $[\text{Ca}]$, la liberación de Ca^{2+} del RS ha regresado prácticamente a 0.

DISCUSION

El estudio del acople excitación-contracción presenta una serie de dificultades que han promovido el desarrollo de enfoques diferentes con metodologías sofisticadas. A estos enfoques corresponde el empleo de las propiedades espectrofotométricas de los complejos de Ca^{2+} con varios indicadores para monitorear la concentración de Ca^{2+} durante la actividad muscular. El objetivo es obtener registros simultáneos de cambios de concentración de Ca^{2+} y actividad eléctrica de la membrana de las fibras musculares, tanto en condiciones normales como en aquellas que modifiquen el acople excitación-contracción. El presente trabajo es un acercamiento al problema del estudio de dicho acople, consistente en la implementación y refinamiento de una metodología, desarrollada originalmente por Kovacs, L., Ríos, E. y Schneider, M. F. (34), para registrar simultáneamente los eventos eléctricos de la membrana y el cambio transitorio de la concentración de Ca^{2+} durante la actividad muscular. Dichos registros se realizaron en una preparación de fibra cortada en una cámara experimental de tres compartimentos aislados por sellos de vaselina. Esta preparación tiene particularidades eléctricas importantes y es idónea para realizar determinaciones espectrofotométricas (6, 33, 34).

Los resultados obtenidos a través del procesamiento de los datos relativos a las propiedades eléctricas pasivas representan una caracterización eléctrica de las fibras empleadas y de la preparación en general. Mediante el uso de un modelo matemático que describe dichas propiedades (ver Apéndice I), se calcularon valores promedio de la resistividad del mioplasma y de la resistencia específica de la membrana en Ringer Normal. El valor de la primera ($R_i=232 \Omega \cdot \text{cm}$) es muy cercano al reportado por Irving, M., et al (33) en una preparación similar y es ligeramente mayor que el estimado en fibras intactas (30). El valor de la resistencia específica ($R_m=6806 \Omega \cdot \text{cm}^2$) es mayor que el determinado en fibras intactas (1) y también que el determinado por Irving, M., et al (33). Esta diferencia puede deberse a variación interespecífica. Sin embargo, dentro de esta variabilidad, los valores determinados son una estimación congruente con los resultados reportados en la literatura y son representativos de la preparación empleada en estos experimentos.

El otro aspecto fundamental de la preparación y del equipo de registro es que ha sido especialmente adaptado para aprovechar al máximo las propiedades ópticas del indicador y su complejo con Ca^{2+} . Las propiedades ópticas del antipirilazo III han sido estudiadas por varios autores (7, 9, 16, 32, 33, 34, 38, 52, 57, 58, 59). En este trabajo se emplearon los resultados reportados por Kovacs, L., Ríos, E. y Schneider, M. F. (34), considerando que son los que se han obtenido en forma más relacionada con los requerimientos experimentales de la preparación. Otras determinaciones valiosas (32) coinciden o se acercan a los resultados de aquellos autores, pero además reportan resultados correspondientes a concentraciones de Ca^{2+} libre mayores que $100 \mu\text{M}$ y pH diferente de 7, condiciones no fisiológicas que

no son aplicables a nuestra preparación.

Tanto el amplificador de fijación de voltaje como el de las señales ópticas son un diseño del Dr. E. Stefani y fueron integrados totalmente en el Dpto. de Fisiología y Biofísica del CINVESTAV-IPN. Junto con una combinación idónea de elementos ópticos en una mesa con aislamiento neumático, se logró obtener registros ópticos con una relación ruido/señal basal de 1/45000. Esto representa un avance notable en las condiciones de experimentación y simplifica el procesamiento de los datos. La finalidad principal de desarrollar este equipo y metodología es registrar simultáneamente los cambios de concentración de Ca^{2+} y la actividad eléctrica de la membrana. Esto abre un gran número de posibilidades para el estudio del acople excitación-contracción.

En este trabajo se presentan registros obtenidos con dos modos diferentes de estimulación de la fibra: a) fijación de voltaje y b) pulso de voltaje. En ambos casos, la respuesta óptica es similar en cuanto a dirección y magnitud de los cambios. Sin embargo, el curso temporal es distinto. En el primer modo, la concentración de Ca^{2+} tiende a alcanzar un valor máximo de una manera aproximadamente exponencial, mientras dura el pulso. Al corte del pulso, se produce un cambio brusco en la dirección de la curva y la concentración de Ca^{2+} decrece también exponencialmente. Con el modo de pulso de voltaje, se produce un potencial de acción en la membrana de la fibra, el cual tiene como consecuencia el aumento temporal de la concentración de Ca^{2+} en el mioplasma. Dicho aumento comienza después de un tiempo de latencia que corresponde al tiempo de latencia de la contracción (~ 4 ms) y su curso temporal es semejante al de la tensión isométrica de una sacudida simple, sólo que más rápido. Puesto que el Ca^{2+} libre en el mioplasma es el activador de la contracción, el curso temporal de la concentración de Ca^{2+} probablemente este más bien relacionado con el del estado activo.

La información más relevante que nos da un registro del cambio transitorio de $[\text{Ca}]$ para el estudio de el acople excitación-contracción es la velocidad de liberación de Ca^{2+} del RS. Como se detalla en el Apéndice I, dicha velocidad de liberación se obtiene como la diferencia entre la derivada $d[\text{Ca}]/dt$ y la suma algebraica de todos los flujos de Ca^{2+} hacia y del mioplasma. Estrictamente, dicha diferencia incluye la contribución del Ca^{2+} que penetra a la fibra desde el exterior de la fibra por corrientes iónicas. Para separar la contribución de esas corrientes iónicas de la del RS, Brum, G., et al (14) han restado el flujo por corrientes iónicas del flujo total de aportación de Ca^{2+} al mioplasma. La corriente iónica de Ca^{2+} por los canales lentos contribuye un flujo máximo del orden de 75 nM/ms en una solución extracelular que contiene 10 mM Ca^{2+} (4). Esto entre los 100 y 200 ms del inicio del cambio transitorio de $[\text{Ca}]$, es decir, al final de los registros presentados en este trabajo. La corriente rápida de Ca^{2+} es más pequeña y sostenida durante el tiempo de duración del pulso de voltaje controlado (23, 27). Los registros obtenidos con pulsos de voltaje controlado a 3 voltajes diferentes (fig. 32) se realizaron en una solución con 10 mM Ca^{2+} . Es posible que el pequeño aumento adicional momentáneo de

la concentración de Ca^{2+} a los ~ 100 ms en los registros correspondientes a pulsos comando a 0 mV y +20 mV esté relacionado con el flujo adicional de Ca^{2+} por la corriente lenta de Ca^{2+} . En los registros por potencial de acción, el cambio transitorio de $[\text{Ca}]$ termina mucho antes que el pico de la corriente lenta de Ca^{2+} . Por estas razones, la estimación de la liberación de Ca^{2+} del RS como el flujo total de Ca^{2+} hacia el mioplasma es una buena aproximación, pues la contribución de las corrientes iónicas es muy pequeña, principalmente durante los primeros milisegundos de los registros, cuando la liberación de Ca^{2+} del RS tiene su máximo.

El modelo de remoción de Ca^{2+} aquí presentado considera un componente más que el modelo original de Brum, G., et al (14). Incluye al buffer de Ca^{2+} (EGTA) dentro del sistema de remoción de Ca^{2+} del mioplasma. Este componente tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} , pero la cinética de su reacción de acomplejamiento con él es lenta, en comparación con la de los eventos principales que tienen lugar durante el cambio transitorio de $[\text{Ca}]$. La velocidad máxima de aumento de CaEGTA es del orden de 1×10^{-8} M/ms, 1/100 de la máxima velocidad de remoción de Ca^{2+} por PARV. La concentración de CaEGTA aumenta unas 26 veces menos que la de CaPARV en 200 ms (fig. 37, 39).

Los registros presentados en este trabajo y el procesamiento de los datos para obtener estimaciones de la velocidad de liberación de Ca^{2+} del RS demuestran la factibilidad de esta metodología en el estudio del acople excitación-contracción. No obstante, esta metodología puede mejorarse aún más. Las principales mejoras que pueden hacerse son en el sentido de obtener resultados cuantitativamente más precisos. Para esto es necesario realizar calibraciones de la reacción antipirilazo III- Ca^{2+} que tengan un mínimo de error y eliminen las controversias suscitadas por diferentes tratamientos del problema por distintos autores. Alternativamente, esto podría lograrse cuando se tenga un indicador más adecuado para realizar las determinaciones de Ca^{2+} intracelular durante la actividad muscular. Ahora bien, los registros ópticos obtenidos en este trabajo y en otros que emplean metodologías similares representan un promedio de los cambio de absorbancia en todo el volumen de fibra cubierto por el área transversa del haz luminoso utilizado. Una mejora importante desde el punto de vista del estudio del acople excitación-contracción será el empleo de rayos de luz laser de espesor muy pequeño dirigidos a zonas específicas de una sarcómera, como por ejemplo la región de las triadas. Eso permitirá hacer una evaluación más precisa de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico en función de la posición dentro de la fibra. También será muy provechoso conocer las propiedades del indicador fijado a fracciones celulares y saber si contribuye a unir el Ca^{2+} liberado por el RS.

En conclusión, el empleo simultáneo de espectrofotometría y registro eléctrico para estudiar el acople excitación-contracción es un enfoque promisorio y versátil, especialmente en la preparación de fibra cortada y cámara experimental con doble sello de vaselina, representando, además, una importante área de investigación abierta al desarrollo tecnológico.

APENDICE I

MODELO CINETICO DE REMOCION DE Ca^{2+} DEL MIOPLASMA²

La concentración de Ca^{2+} libre en el mioplasma en un momento dado durante un transitorio de Ca^{2+} es el resultado de la contribución simultánea de un conjunto de factores. Estos factores se pueden dividir en dos grupos: los que aportan Ca^{2+} al mioplasma y los que eliminan Ca^{2+} del mioplasma. Se puede, entonces, hablar de flujos de Ca^{2+} en dos sentidos: hacia el mioplasma (aumentan la concentración de Ca^{2+} en el mioplasma) y del el mioplasma (disminuyen la concentración de Ca^{2+} en el mioplasma). Si a los primeros se les asigna signo positivo y a los segundos negativo, entonces el cambio neto de la concentración de Ca^{2+} con respecto al tiempo es en cada momento la suma algebraica de todos los flujos participantes.

La figura 42 sintetiza la contribución de los diversos factores a la concentración del Ca^{2+} libre. Consideramos que los flujos hacia el mioplasma son: 1) la liberación de Ca^{2+} del RS y 2) la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular por corrientes iónicas. A la suma de estos dos factores la designaremos por ϕ_{in} . La contribución del Ca^{2+} que entra del espacio extracelular durante el tiempo normal de una contracción es muy pequeña en comparación con la liberación de Ca^{2+} del RS, por lo cual ϕ_{in} es básicamente igual a la liberación de Ca^{2+} del RS. Los flujos del mioplasma, por otro lado, son varios: 1) unión de Ca^{2+} a sitios específicos de la troponina C, 2) unión de Ca^{2+} a sitios de la parvalbúmina que también pueden unir Mg^{2+} , 3) unión de Ca^{2+} a sitios específicos de la bomba de Ca^{2+} , 4) transporte de Ca^{2+} a través de la bomba de Ca^{2+} , 5) unión de Ca^{2+} al indicador (antipirilazo III) y 6) unión de Ca^{2+} al amortiguador de Ca^{2+} (EGTA). A la suma de estos flujos la designaremos por ϕ_{out} .

Una parte de ϕ_{out} está dada por sitios que entran rápidamente en equilibrio con el calcio. Estos son el indicador, los sitios de la bomba de Ca^{2+} , y los sitios de la troponina C. El Ca^{2+} total removido por estos componentes más el Ca^{2+} libre en el mioplasma constituye un pool de Ca^{2+} , el cual, debido a la cinética rápida de los componentes que los constituyen, se denomina Ca_{fast} . El resto del ϕ_{out} está determinado por sitios de cinética lenta. Estos son el transporte a través de la bomba de Ca^{2+} , la unión de Ca^{2+} con los sitios de la parvalbúmina y la unión con el amortiguador de Ca^{2+} . El pool de Ca^{2+} removido por estos componentes se denomina Ca_{slow} .

²Este modelo está basado en las derivaciones hechas por Brum, G., Ríos, E. & Schneider, M. F. (14) y Melzer, W., Ríos, E. & Schneider, M. F. (41).

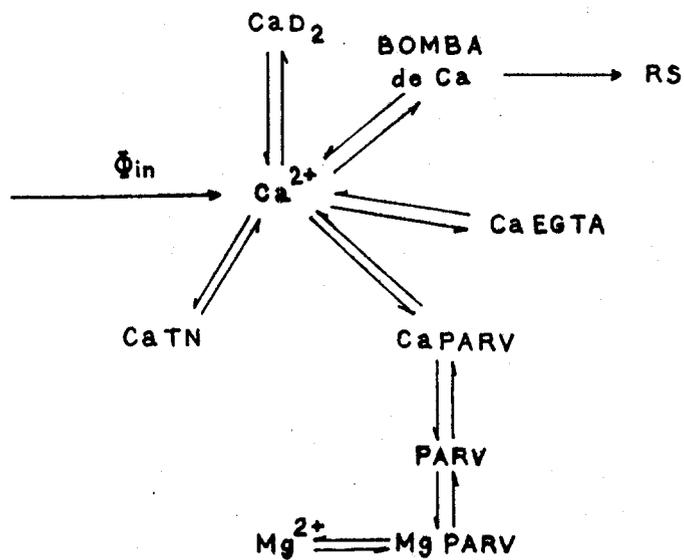
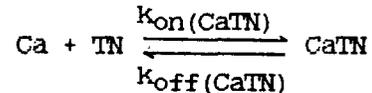


Figura 42
Componentes del sistema de remoción de Ca^{2+} del mioplasma
 Modificado de Erum, G., et al. (14).

Cada uno de los componentes del modelo está caracterizado por una ecuación cinética o de equilibrio, según el caso. Los flujos determinados por dichos componentes están descritos por ecuaciones diferenciales de primer orden. En el caso de expresiones de equilibrio, dichas ecuaciones son simples derivadas y no tienen mayor complicación. Sin embargo, las ecuaciones que describen flujos en que el equilibrio no se alcanza rápidamente no se pueden integrar analíticamente, por lo que se requiere resolverlas simultáneamente por métodos numéricos. A continuación se presentan las ecuaciones correspondientes a cada uno de los componentes del modelo. Por claridad en la notación, se omiten las cargas formales de los iones en las expresiones siguientes.

Ca_{fast}:

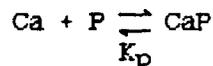
- 1) Flujo hacia y de un conjunto de sitios independientes que unen Ca²⁺ en la troponina C.



$$d[\text{CaTN}]/dt = k_{\text{on}}(\text{CaTN}) [\text{Ca}] [\text{TN}] - k_{\text{off}}(\text{CaTN}) [\text{CaTN}] \dots\dots a1)$$

donde TN representa a los sitios de la troponina y $k_{\text{on}}(\text{CaTN})$, $k_{\text{off}}(\text{CaTN})$ son constantes de velocidad de asociación y disociación, respectivamente.

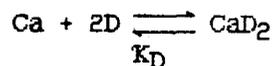
- 2) Equilibrio con los sitios de la bomba de Ca²⁺.



$$[\text{CaP}] = \frac{P_T[\text{Ca}]}{K_p + [\text{Ca}]} \dots\dots\dots a2)$$

donde P representa los sitios libres y P_T es la concentración total de sitios de la bomba. K_p es la constante de disociación del complejo.

- 3) Equilibrio con el indicador (antipirilazo III).

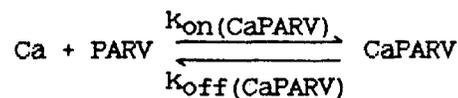


$$[\text{CaD}_2] = \frac{4[\text{Ca}]D_T + K_D - \sqrt{(K_D^2 + 8[\text{Ca}]D_TK_D)}}{8[\text{Ca}]} \dots\dots a3)$$

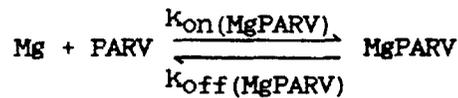
donde D representa al indicador libre, D_T la concentración del indicador total y K_D es la constante de disociación del complejo.

Ca_{slow}:

- 4) Flujos hacia y de un conjunto de sitios independientes de la parvalbúmina, los cuales también unen Mg²⁺. Estos sitios también se encuentran en la troponina, y tienen las mismas propiedades cinéticas, por lo que se les considera incluidos en el conjunto (14).



$$d[\text{CaPARV}]/dt = k_{\text{on}}(\text{CaPARV}) [\text{Ca}] [\text{PARV}] - k_{\text{off}}(\text{CaPARV}) [\text{CaPARV}] \dots\dots\dots \text{a4)}$$



$$d[\text{MgPARV}]/dt = k_{\text{on}}(\text{MgPARV}) [\text{Mg}] [\text{PARV}] - k_{\text{off}}(\text{MgPARV}) [\text{MgPARV}] \dots\dots\dots \text{a5)}$$

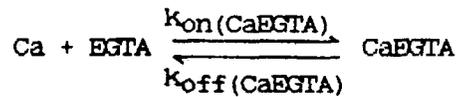
donde PARV representa los sitios libres de parvalbúmina y troponina. $k_{\text{on}}(\text{CaPARV})$, $k_{\text{off}}(\text{CaPARV})$, $k_{\text{on}}(\text{MgPARV})$ y $k_{\text{off}}(\text{MgPARV})$ son constantes de velocidad de asociación y disociación para las respectivas reacciones.

- 5) Flujos de Ca²⁺ hacia el RS a través de la bomba de Ca²⁺, tomando en cuenta que dos sitios por bomba deben estar ocupados para que ocurra traslocación (14).

$$d[\text{Ca}]/dt, \text{pump} = -M \cdot ([\text{CaP}]/P_T)^2 \dots\dots\dots \text{a6)}$$

donde M es la máxima velocidad de transporte de la bomba.

- 6) La unión del Ca²⁺ con el amortiguador de Ca²⁺ en el mioplasma.



$$d[\text{CaEGTA}]/dt = k_{\text{on}}(\text{CaEGTA}) [\text{Ca}] [\text{EGTA}] - k_{\text{off}}(\text{CaEGTA}) [\text{CaEGTA}] \dots\dots\dots \text{a7)}$$

donde $k_{\text{on}}(\text{CaEGTA})$, $k_{\text{off}}(\text{CaEGTA})$ son las constantes de velocidad de asociación y disociación del complejo.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se cumple:

$$\frac{d\text{Ca}_{\text{fast}}}{dt} = \frac{d[\text{CaTN}]}{dt} + \frac{d[\text{CaP}]}{dt} + \frac{d[\text{CaD}_2]}{dt} + \frac{d[\text{Ca}]}{dt}$$

$$\frac{d\text{Ca}_{\text{slow}}}{dt} = \frac{d[\text{CaPARV}]}{dt} + \frac{d[\text{Ca}]}{dt}, \text{pump} + \frac{d[\text{CaEGTA}]}{dt}$$

Φ_{out} está dado por:

$$\begin{aligned} \Phi_{\text{out}} &= - \frac{d[\text{CaTN}]}{dt} - \frac{d[\text{CaP}]}{dt} - \frac{d[\text{CaD}_2]}{dt} - \frac{d[\text{CaPARV}]}{dt} - \frac{d[\text{Ca}]}{dt}, \text{pump} - \frac{d[\text{CaEGTA}]}{dt} \dots \text{a8)} \\ &= \frac{d[\text{Ca}]}{dt} - \frac{d\text{Ca}_{\text{fast}}}{dt} - \frac{d\text{Ca}_{\text{slow}}}{dt} \end{aligned}$$

Además:

$$\frac{d[\text{Ca}]}{dt} = \Phi_{\text{in}} + \Phi_{\text{out}}$$

Por lo tanto, Φ_{in} se obtiene de la diferencia:

$$\Phi_{\text{in}} = \frac{d[\text{Ca}]}{dt} - \Phi_{\text{out}} \dots\dots\dots \text{a9)}$$

y, como ya se indicó, está determinado básicamente por la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. La derivada $d[\text{Ca}]/dt$ se obtiene de cada registro, ajustando primero una función analítica compuesta de términos

exponenciales y luego derivando la ecuación. Alternativamente, se puede derivar el registro numéricamente. ϕ_{out} se obtiene integrando numéricamente las ecuaciones a1), a4), a5), y a7), y evaluando las ecuaciones a2), a3) y a6) en cada punto del registro. Puesto que la integración es muy sensible a las fluctuaciones de $[Ca]$ y $d[Ca]/dt$, en este trabajo se adoptó el procedimiento de ajustar primero una función analítica al registro, para evitar la dispersión de los valores de las variables.

Los valores de los parámetros libres de las ecuaciones se tomaron inicialmente de la literatura (8, 14, 31, 41, 64). En cada caso, sin embargo, se hizo un ajuste basado en la suposición de que al corte del pulso de voltaje controlado, o bien en la fase descendente del registro de $[Ca]$ producido por un potencial de acción, la liberación de Ca^{2+} del RS cesa o tiende a 0. Esto quiere decir que en dicha fase

$$\phi_{out} \longrightarrow \frac{d[Ca]}{dt}$$

$$-\frac{dCa_{slow}}{dt} \longrightarrow \frac{dCa_{fast}}{dt}$$

En el ajuste se buscó la combinación de parámetros que mejor cumplía con dicha condición. Luego, en base a los valores obtenidos se hizo una estimación de la velocidad de liberación de Ca^{2+} del RS empleando las ecuaciones a8) y a9). La integración numérica se hizo mediante el método de Runge-Kutta (20).

APENDICE II³

Este apéndice presenta una derivación de las relaciones que guardan los parámetros a_1 , a_2 , b_1 y b_2 , determinados para cada fibra según el protocolo descrito en Material y Métodos, con las propiedades eléctricas r_m y r_i . Como ya se definió en aquella sección, r_m es la resistencia transversa de la membrana por unidad de longitud y r_i es la resistencia interna por unidad de longitud. Debido a los sellos de vaselina, tenemos otra resistencia importante, r_e , la resistencia externa bajo el sello por unidad de longitud. Las variables físicas asociadas a estos parámetros son las siguientes:

V_e = voltaje externo bajo el sello

V_i = voltaje interno

i_e = corriente externa a través del sello

i_i = corriente interna a través del mioplasma

i_m = corriente a través de la membrana por unidad de longitud

Como se muestra en la figura 43, la preparación está dividida en tres secciones: dos compartimentos laterales (EP_1 y EP_2) y uno central (CP). El protocolo experimental consiste en dar un pulso de voltaje en el compartimento EP_2 y medir el cambio de potencial en EP_1 , así como la corriente inyectada. Las variables externas asociadas a la preparación son:

V_1 = potencial en el compartimento EP_1

I_1 = corriente inyectada en el compartimento EP_1 (= 0 en esta preparación)

V_2 = potencial en el compartimento EP_2

I_2 = corriente inyectada en el compartimento EP_2

Consideremos la variación de las variables físicas con respecto a la posición, empezando por el compartimento donde se inyecta la corriente (EP_2). Se denotará la variable de posición por x , siendo $x=0$ en la frontera entre EP_2 y el primer sello.

³Este apéndice está basado en el trabajo de Irving, M., et al. (33) sobre las propiedades eléctricas y ópticas pasivas de fibras cortadas.

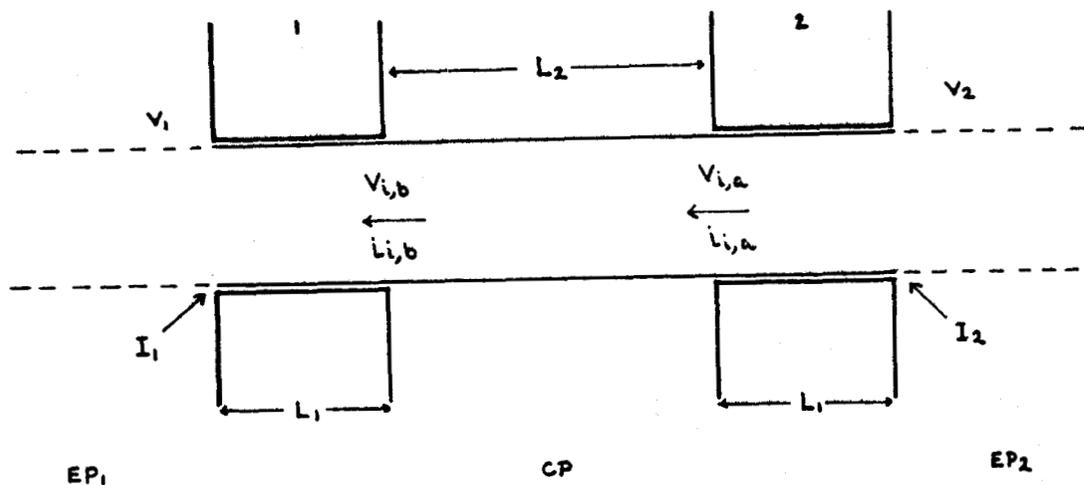


Figura 43

Preparación de la fibra cortada con doble sello de vaselina

Variables empleadas en el desarrollo del modelo eléctrico.

(EP_1) compartimento lateral 1, (EP_2) compartimento lateral 2, (CP) compartimento central, (V_1) voltaje en EP_1 , (V_2) voltaje en EP_2 , (I_1) corriente inyectada en EP_1 , (I_2) corriente inyectada en EP_2 , (L_1) espesor de cada sello de vaselina, (L_2) separación entre los sellos, ($V_{i,a}$) potencial interno de la fibra en el extremo izquierdo del sello 2, ($V_{i,b}$) potencial interno de la fibra en el extremo derecho del sello 1, ($i_{1,a}$) corriente interna a través del mioplasma en el extremo izquierdo del sello 2, ($i_{1,b}$) corriente interna a través del mioplasma en el extremo derecho del sello 1. Las flechas señalan la dirección de la corriente según el protocolo empleado (Ver Material y Métodos).

COMPARTIMIENTO EP₂

El voltaje externo bajo el sello (V_e) y el voltaje interno (V_i) están relacionados con las corrientes externa e interna (i_e , i_i) por las siguientes formas particulares de la ley de Ohm:

$$dV_e/dx = -r_e i_e$$

$$dV_i/dx = -r_i i_i$$

Además,

$$I_2 = i_e + i_i$$

Integrando desde $x=0$ hasta $x=L_1$ ($V_{i,a}=V_i$, $i_{i,a}=i_i$ en el punto a):

$$\int_{V_2}^{V_{i,a}} dV_i = -r_i i_i \int_0^{L_1} dx \quad V_{i,a} = V_2 - r_i i_i L_1$$

$$\int_{V_2}^0 dV_e = -r_e i_e \int_0^{L_1} dx \quad V_2 = r_e i_e L_1$$

Por lo tanto:

$$V_{i,a} = \frac{r_e + r_i}{r_e} V_2 - r_i L_1 I_2 \quad \dots \dots \dots e1)$$

Sea $V = V_i - V_e$. Entonces

$$dV/dx = r_i i_i + r_e i_e = -i_i (r_i + r_e) + r_e I_2$$

Por lo tanto:

$$i_i = \frac{1}{r_e + r_i} (r_e I_2 - dV/dx) \quad \dots \dots \dots e2)$$

La corriente a través de la membrana está relacionada con las corrientes interna y externa por:

$$i_m = -di_1/dx = di_e/dx$$

Por lo tanto:

$$d^2V/dx^2 = r_1 i_m + r_e i_m$$

Luego:

$$d^2V/dx^2 = (r_1 + r_e) i_m \dots\dots\dots e3)$$

Sea $V_r = V(i_m = 0)$; si suponemos un comportamiento óhmico de la membrana, tenemos:

$$i_m = (V - V_r)/r_m \dots\dots\dots e4)$$

Supondremos, además, para esta preparación, que V_r varía linealmente con la distancia bajo el sello, valiendo 0 cuando $x=0$ y V_{RP} cuando $x=L_1$, esto es:

$$V_r = (x/L_1)V_{RP} \dots\dots\dots e5)$$

Combinando e3), e4) y e5), tenemos:

$$\frac{d^2V}{dx^2} = \frac{(r_1 + r_e)(V - (x/L_1)V_{RP})}{r_m}$$

La solución de esta ecuación, para las siguientes condiciones de contorno

$$\begin{aligned} V &= 0 \text{ en } x=0 \\ V &= V_{1,a} \text{ en } x=L_1 \end{aligned}$$

es:

$$V = (x/L_1)V_{RP} + (V_{1,a} - V_{RP}) \frac{\sinh(x/\lambda_1)}{\sinh(L_1/\lambda_1)}$$

$$\text{donde } \lambda_1 = (r_m/(r_1+r_e))^{1/2}$$

Derivando:

$$dV/dx = V_{RP}/L_1 + (V_{i,a} - V_{RP}) \frac{\cosh(x/\lambda_1)}{\lambda_1 \sinh(L_1/\lambda_1)}$$

Sea $f(x) = \frac{x}{\tanh x}$

Entonces:

$$dV/dx(L_1) = \frac{V_{RP} + (V_{i,a} - V_{RP}) \cdot f(L_1/\lambda_1)}{L_1}$$

Sustituyendo esta expresión en e2) y reorganizando, obtenemos:

$$i_{i,a} = \frac{r_e}{r_e + r_1} I_2 - \frac{1}{(r_e + r_1)L_1} (V_{RP} + (V_{i,a} - V_{RP}) \cdot f(L_1/\lambda_1))$$

Sustituyendo la expresión de $V_{i,a}$ según la ecuación e1) en esta última, y reorganizando obtenemos:

$$i_{i,a} = -\frac{f(L_1/\lambda_1)}{r_e} V_2 + \frac{r_e + r_1 f(L_1/\lambda_1)}{r_e + r_1} I_2 - \frac{1 - f(L_1/\lambda_1)}{r_e + r_1} V_{RP}$$

En conjunto podemos expresar e1) y e6) en notación matricial, definiendo:

$$\bar{Y}_2 = \begin{bmatrix} V_2 \\ I_2 \end{bmatrix} \quad \bar{Y}_a = \begin{bmatrix} V_{i,a} \\ i_{i,a} \end{bmatrix}$$

$$\bar{S} = \begin{bmatrix} (r_e + r_1)/r_e & -r_1 L_1 \\ -f(L_1/\lambda_1)/r_e L_1 & (r_e + r_1 f(L_1/\lambda_1))/(r_e + r_1) \end{bmatrix}$$

$$\bar{A} = \begin{bmatrix} 0 \\ (f(L_1/\lambda_1) - 1)/((r_e + r_1)L_1) \end{bmatrix}$$

Luego:

$$\bar{Y}_a = \bar{S}\bar{Y}_2 + V_{RP}\bar{A} \dots\dots\dots e7)$$

COMPARTIMENTO CENTRAL (CP)

En el compartimento central (0 < x < L₂), tenemos:

$$V_r = V_{RP}, r_e = 0 \qquad d^2V/dx^2 = r_i i_m$$

Entonces, empleando la ecuación e4):

$$d^2V/dx^2 = \frac{r_i}{r_m} (V - V_{RP})$$

cuya solución para las condiciones de contorno

$$\begin{aligned} V &= V_{i,a} \text{ en } x=0 \\ V &= V_{i,b} \text{ en } x=L_2 \end{aligned}$$

es:

$$V = V_{RP} + (V_{i,a} - V_{RP}) \frac{\sinh((L_2-x)/\lambda_2)}{\sinh(L_2/\lambda_2)} + (V_{i,b} - V_{RP}) \frac{\sinh(x/\lambda_2)}{\sinh(L_2/\lambda_2)}$$

$$\text{donde } \lambda_2 = (r_m/r_i)^{1/2}$$

Sea:

$$\begin{aligned} y &= V - V_{RP} \\ Y_{i,a} &= V_{i,a} - V_{RP} \\ Y_{i,b} &= V_{i,b} - V_{RP} \end{aligned}$$

Entonces:

$$y = Y_{i,a} \frac{\sinh((L_2-x)/\lambda_2)}{\sinh(L_2/\lambda_2)} + Y_{i,b} \frac{\sinh(x/\lambda_2)}{\sinh(L_2/\lambda_2)} \dots\dots\dots e8)$$

$$\frac{dV}{dx} = \frac{dy}{dx} = -Y_{i,a} \frac{\cosh((L_2-x)/\lambda_2)}{\lambda_2 \sinh(L_2/\lambda_2)} + Y_{i,b} \frac{\cosh(x/\lambda_2)}{\lambda_2 \sinh(L_2/\lambda_2)}$$

Pero, como $V_e=0$ en CP,

$$dV/dx = dV_1/dx = -r_1 i_1$$

Luego, en $x=L_2$:

$$-r_1 i_{1,b} = \frac{dV}{dx}(L_2) = - \frac{Y_{1,a}}{\lambda_2 \sinh(L_2/\lambda_2)} + \frac{Y_{1,b} \cosh(L_2/\lambda_2)}{\lambda_2 \sinh(L_2/\lambda_2)}$$

Por lo tanto:

$$Y_{1,a} - Y_{1,b} \cosh(L_2/\lambda_2) = r_1 \lambda_2 i_{1,b} \sinh(L_2/\lambda_2) \dots \dots \dots e9)$$

Además, en el compartimento central $i_e=0$, por lo que

$$i_m = - \frac{di_1}{dx}$$

y

$$i_{1,b} = i_{1,a} + \int_{(a)}^{(b)} di_1$$

$$= i_{1,a} + (1/r_m) \int_0^{L_2} y \, dx$$

De e8), obtenemos:

$$\int_0^{L_2} y \, dx = - \frac{1 - \cosh(L/\lambda)}{2 \lambda^2} \lambda^2 (y_{1,a} + y_{1,b})$$

Por lo tanto:

$$i_{1,b} = i_{1,a} + \frac{1 - \cosh(L_2/\lambda_2)}{\lambda_2 r_1 \sinh(L_2/\lambda_2)} (Y_{1,a} + Y_{1,b}) \dots \dots \dots e10)$$

Sustituyendo e10) en e9), efectuando operaciones y reorganizando, obtenemos:

$$V_{i,b} = \cosh(L_2/\lambda_2) \cdot V_{i,a} - r_1 \lambda_2 \sinh(L_2/\lambda_2) \cdot i_{i,a} + (1 - \cosh(L_2/\lambda_2)) \cdot V_{RP} \dots e11)$$

Sustituyendo $y_{i,b}$ de e9) en e10) y efectuando operaciones, tenemos:

$$i_{i,b} = i_{i,a} \cosh(L_2/\lambda_2) - y_{i,a} \frac{\sinh(L_2/\lambda_2)}{\lambda_2 r_1}$$

Sustituyendo nuevamente y reorganizando:

$$i_{i,b} = - \frac{\sinh(L_2/\lambda_2)}{\lambda_2 r_1} \cdot V_{i,a} + \cosh(L_2/\lambda_2) \cdot i_{i,a} + \frac{\sinh(L_2/\lambda_2)}{\lambda_2 r_1} \cdot V_{RP} \dots e12)$$

Definiendo:

$$\bar{Y}_b = \begin{bmatrix} V_{i,b} \\ i_{i,b} \end{bmatrix} \quad \bar{B} = \begin{bmatrix} 1 - \cosh(L_2/\lambda_2) \\ (\sinh(L_2/\lambda_2)) / \lambda_2 r_1 \end{bmatrix}$$

$$\bar{F} = \begin{bmatrix} \cosh(L_2/\lambda_2) & -\lambda_2 r_1 \sinh(L_2/\lambda_2) \\ -(\sinh(L_2/\lambda_2)) / \lambda_2 r_1 & \cosh(L_2/\lambda_2) \end{bmatrix}$$

Las ecuaciones e11) y e12) en notación matricial, entonces se combinan así:

$$\bar{Y}_b = \bar{F} \bar{Y}_a + V_{RP} \bar{B} \dots e13)$$

COMPARTIMENTO EP₁

Para el compartimento EP₁, la situación es igual que par EP₂, sólo que el sentido de la corriente es el opuesto. Por lo tanto:

$$V_{1,b} = \frac{r_e + r_i}{r_e} \cdot V_1 - r_i L_1 I_1$$

$$-1_{i,b} = -\frac{f(L_1/\lambda_2)}{r_e L_1} \cdot V_1 + \frac{r_e + r_i f(L_1/\lambda_1)}{r_e + r_i} \cdot I_1 - \frac{1 - f(L_1/\lambda_1)}{(r_e + r_i)L_1} \cdot V_{RP}$$

Sea

$$\bar{Y}_1 = \begin{bmatrix} V_1 \\ I_1 \end{bmatrix}$$

Entonces, en notación matricial:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \bar{Y}_b = \bar{S} \bar{Y}_2 + V_{RP} \bar{A}$$

$$\bar{Y}_1 = \bar{S}^{-1} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \bar{Y}_b - V_{RP} \bar{S}^{-1} \bar{A} \dots\dots\dots e14)$$

Juntando las expresiones para los tres compartimentos, es decir e7), e13 y e14), obtenemos:

$$\bar{Y}_2 = \bar{S}^{-1} \bar{F}^{-1} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \bar{S} \bar{Y}_1 + V_{RP} \bar{S}^{-1} \bar{F}^{-1} \left(\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \bar{A} - (\bar{B} + \bar{F} \bar{A}) \right) \dots\dots\dots e15)$$

Puesto que en el protocolo empleado I₁=0, la forma de las ecuaciones se reduce a:

$$V_2 = a_1 V_1 + b_1$$

$$I_2 = a_2 V_1 + b_2$$

que son las ecuaciones g) y h) (ver Material y Métodos).

BIBLIOGRAFIA

1. Adrian, R. D. 1983. Electrical properties of striated muscle. In Handbook of Physiology. Section 10: Skeletal Muscle. L. D. Peachy and R. D. Adrian, editors. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. 275-300.
2. Almers, W., Fink, R. & Palade, P. T. 1981. Calcium depletion in frog muscle tubules: the decline of calcium current under maintained depolarization. J. Physiol. Lond. 312, 177-207.
3. Armstrong, C. M., Bezanilla, F. M. & Horowicz, P. 1972. Twitches in the presence of ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid. Biochim. Biophys. Acta 276, 605-608.
4. Avila-Sakar, A. J., Cota, G., Gamboa-Aldeco, R., García, J., Huerta, M., Muniz, J. & Stefani, E. 1986. Skeletal muscle Ca^{2+} channels. J. Muscle Res. Cell Motility 7, 291-298.
5. Avila-Sakar, A. J., García, J. y Stefani, E. 1986. Efecto de la ausencia de Ca^{2+} extracelular sobre la sacudida simple de fibras musculares esqueléticas de anfibio (*Rana pipiens*). Resúmenes del XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Guanajuato, Gto., Mexico, 131.
6. Avila-Sakar, A. J., García, J., Toro, L. y Stefani, E. 1987. Registro de transitorios de Ca^{2+} en fibras musculares esqueléticas con antipirilazo III. Resúmenes del XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Jalapa, Ver., Mexico, 171.
7. Baylor, S. M., Chandler, W. K. & Marshall, M. W. 1982. Use of metallochromic dyes to measure changes in myoplasmic calcium during activity in frog skeletal muscle fibres. J. Physiol. Lond. 331, 139-177.
8. Baylor, S. M., Chandler, W. K. & Marshall, M. W. 1983. Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from arsenazo III calcium transients. J. Physiol. Lond. 344, 625-665.
9. Baylor, S. M., Hollingworth, S., Hui, C. S. & Quinta-Ferreira, M. E. 1985. Properties of the metallochromic dyes arsenazo III, antipyrilazo III and azo 1 in frog skeletal muscle fibres at rest. J. Physiol. Lond. 377, 89-141.
10. Bean, B. P. 1986. Calcium channels in skeletal muscle: what do they do? TINS - Nov./Dec., 535-536.

11. Beaty, G. N. and Stefani, E. 1976. Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibres of the frog. Proc. R. Soc. Lond. B 194, 141-150.
12. Blinks, J.R., Rudel, R. & Taylor, S. R. 1978. Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin. J. Physiol. Lond. 227, 291-323.
13. Brum, G. and Rios, E. 1986. Ca^{2+} and the voltage sensor of skeletal muscle excitation-contraction coupling. Biophys. J. 49, 459a.
14. Brum, G., Rios, E. & Stefani, E. 1988. Effects of extracellular calcium on the calcium movements of excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres. (With an appendix by Brum, G., Rios, E. & Schneider, M. F.). J. Physiol. Lond. 398, 441-473.
15. Brum, G., Stefani, E. & Rios, E. 1987. Simultaneous measurements of Ca^{2+} currents and intracellular Ca^{2+} concentrations in single muscle fibres of the frog. Can. J. Physiol. Pharmacol. 65, 681-685.
16. Budesinsky, B. W. 1974. Photometric determination of calcium with antipyrilazo III. Analytica Chimica Acta 71, 343-347.
17. Chandler, W. K. 1980. Voltage dependence of calcium release in vertebrate skeletal muscle fibres. In Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms, Ebashi, S. et al., editors. Japan Sci. Soc. Press, Tokio/Springer Verlag, Berlin, 411-420.
18. Chiarandini, D. J., Sánchez, J. A. & Stefani, E. 1980. Effect of calcium withdrawal on mechanical threshold in skeletal muscle fibres of the frog. J. Physiol. Lond. 303, 153-163.
19. Chiarandini, D. J. & Stefani, E. 1976. Ca^{2+} and excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. In Electrobiology of Nerve, Synapse and Muscle, Reuben, J. P. et al., editors. Raven Press, New York., 321-333.
20. Collatz, L. 1960. The Numerical Treatment of Differential Equations. 3d edition (translated). Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
21. Cota, G., Nicola-Siri, L. & Stefani, E. 1983. Calcium-channel gating in frog skeletal muscle membrane: effect of temperature. J. Physiol. Lond. 338, 395-412.
22. Cota, G. and Stefani, E. 1981. Effects of external calcium reduction on the kinetics of potassium contractures in frog twitch muscle fibres. J. Physiol. Lond. 317, 303-316.

23. Cota, G. and Stefani, E. 1986. A fast-activated calcium current in twitch muscle fibres of the frog (*Rana montezumae*). J. Physiol. Lond. 370, 151-163.
24. Endo, M., Tanaka, M. & Ogawa, Y. 1970. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. Nature 228, 34-36.
25. Frank, G. B. 1984. Blockade of Ca^{2+} channels inhibits K^+ contractures but not twitches in skeletal muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62, 374-378.
26. Gamboa-Aldeco, R., Huerta, M. & Stefani, E. 1986. Effect of Ca^{2+} channel blockers on K^+ contractures in twitch muscle fibres of the frog (*Rana pipiens*). J. Physiol. Lond. 397, 389-399.
27. García, J. & Stefani, E. 1987. Appropriate conditions to record activation of fast Ca^{2+} channels in frog skeletal muscle (*Rana pipiens*). Pflugers Archiv 408, 646-648.
28. Gilly, W. F. 1981. Intramembrane charge movement and excitation-contraction (E-C) coupling. In The Regulation of Muscle Contraction: Excitation-Contraction Coupling. Academic Press, Inc., 3-22.
29. González-Serratos, H., Valle-Aguilera, R., Lathrop, D. A. & García, M. del C. 1982. Slow inward calcium currents have no obvious role in muscle excitation-contraction coupling. Nature 298, 292-294.
30. Hodgkin, A. L. and Nakajima, S. 1972. The effect of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle fibres. J. Physiol. Lond. 221, 105-120.
31. Hellam, D. C. and Podolsky, R. J. 1969. Force measurements in skinned muscle fibres. J. Physiol. Lond. 200, 807-819.
32. Hollingworth, R. W., Aldrich, R. W. & Baylor, S. M. 1987. In vitro calibration of the equilibrium reactions of the metallochromic indicator dye antipyrilazo III with calcium. Biophys. J. 51, 383-393.
33. Irving, M., Maylie, J., Sizto, N. L. & Chandler, W. K. 1987. Intrinsic optical and passive electrical properties of cut frog twitch fibers. J. Gen. Physiol. 89, 1-40.
34. Kovacs, L., Rios, E. & Scheider, M. F. 1983. Measurements and modification of free calcium transients in frog skeletal muscle fibres by a metallochromic indicator dye. J. Physiol. Lond. 343, 161-196.

35. Lüttgau, H. Ch. and Spiecker, W. 1979. The effects of calcium deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. J. Physiol. Lond. 296, 411-429.
36. Lüttgau, H. Ch. and Stephenson, G. D. 1986. Ion movements in skeletal muscle in relation to the activation of contraction. In Physiology of Membrane Disorders. Andrerli, Th. E., et al., editors. Plenum Publishing Corporation, 449-468.
37. Martosini, A. N. and Beeler, T. J. 1983. Mechanism of Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum. In Handbook of Physiology. Section 10: Skeletal Muscle. L. D. Peachy and R. D. Adrian, editors. American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 417-485.
38. Maylie, J., Irving, M., Sizto, N. L. & Chandler, W. K. 1987. Calcium signals recorded from cut frog twitch fibers containing antipyrilazo III. J. Gen. Physiol. 89, 83-143.
39. Melzer, W., Ríos, E. & Schneider, M. F. 1984. Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibres. Biophys. J. 45, 637-641.
40. Melzer, W., Ríos, E. & Schneider, M. F. 1986. The removal of myoplasmic free calcium following calcium release in frog skeletal muscle. J. Physiol. Lond. 372, 261-292.
41. Melzer, W., Ríos, E. & Schneider, M. F. 1987. A general procedure for determining the rate of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. Biophys. J. 51, 849-863.
42. Melzer, W., Schneider, M. F., Simon, B. J. & Szucs, G. 1986. Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle. J. Physiol. Lond. 373, 481-511.
43. Miledi, R., F. R. S., Parker, I. & Schalow, G. 1977. Measurement of calcium transients in frog muscle by the use of arsenazo III. Proc. R. Soc. Lond. B. 198, 201-210.
44. Miledi, R., Parker, I. & Schalow, G. 1977. Calcium transients in frog slow muscle fibres. Nature 268, 750-752.
45. Nicola Siri, L., Sánchez, J. A. & Stefani, E. 1980. Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog skeletal muscle. J. Physiol. Lond. 305, 87-96.
46. Palade, Ph. and Vergara, J. 1982. Arsenazo III and antipyrilazo III calcium transients in single skeletal muscle fibers. J. Gen. Physiol. 79, 679-707.

47. Parker, I. 1979. Use of arsenazo III for recording calcium transients in frog skeletal muscle fibres. In Detection and Measurement of Free Ca^{2+} in Cells. Ashley, Ch. C. and Campbell, A. K., editors. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford, 269-285.
48. Peachy, L. D. 1965. The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of frog's sartorius. J. Cell Biol. 25, 209-231.
49. Rakowski, R. F., Best, P. M. & James-Kracke, M. R. 1985. Voltage dependence of membrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle fibres. J. Musc. Res. Cell Motility 6, 403-433.
50. Rios, E. and Brum, G. 1987. Effects of nifedipine on skeletal muscle suggest a role of dihydropyridine receptor molecules in excitation-contraction coupling. Nature 325, 717-720.
51. Rios, E., Brum, G. & Stefani, E. 1986. E-C coupling effects of interventions that reduce slow Ca^{2+} current suggest a role of T-tubule Ca^{2+} channels in skeletal muscle function. Biophys. J. 49, 13a.
52. Rios, E. & Schneider, M. F. 1981. Stoichiometry of the reactions of calcium with the metallochromic indicator dyes antipyrylazo III and arsenazo III. Biophys. J. 36, 607-621.
53. Rios, E., Stefani, E., Brum, G. & Goldman, J. 1985. Extracellular Ca^{2+} modifies Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR) in skeletal muscle fibers. Biophys. J. 47, 353a.
54. Rudel, R. and Taylor, S. R. 1973. Aequorin luminescence during contraction of amphibian skeletal muscle. J. Physiol. Lond. 233, 5P-6P.
55. Sánchez, J. A. and Stefani, E. 1978. Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. J. Physiol. Lond. 283, 197-209.
56. Sánchez, J. A. and Stefani, E. 1983. Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog. J. Physiol. Lond. 337, 1-17.
57. Scarpa, A. 1979. Measurement of calcium ion concentrations with metallochromic indicators. In Detection and Measurement of Free Ca^{2+} in Cells. Ashley, Ch. C. and Campbell, A. K., editors. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford.
58. Scarpa, A. 1979. Measurement of cation transport with metallochromic indicators. In Methods in Enzymology, vol. LVI, Academic Press, Inc., 301-338.

59. Scarpa, A., Brinley, F. J. & Dubyak, G. 1978. Antipyrilazo III, a "middle range" Ca^{2+} metallochromic indicator. Biochemistry 17, 1378-1386.
60. Schneider, M. F. and Chandler, W. K. 1973. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. Nature 242, 244-246.
61. Stefani, E. and Chiarandini, D. J. 1982. Ionic channels in skeletal muscle. Ann. Rev. Physiol. 44, 357-372.
62. Stefani, E. and Cota, G. 1984. Inactivation as a mechanism for Ca^{2+} current decay in intact skeletal muscle fibres of the frog. Biophys. J. 45, 37a.
63. Somlyo, P. 1985. The messenger across the gap. Nature 316, 298-299.
64. Thomas, M. V. 1982. Techniques in Calcium Research. Biological techniques series. Academic Press, Inc., London, New York.
65. Tsien, R. Y. 1980. New calcium indicators with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis and properties of prototype structures. Biochemistry 19, 2396-2404.
66. Volpe, P., Di Virgilio, F., Pozzan, T. & Salviati, G. 1986. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. FEBS 3422 (Federation of European Biochemical Societies) 197, 1-4.

Esto trabajo recibió apoyo financiero por donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico, y del National Institute of Health (NIH), U.S.A., al Dr. E. Stefani.

AGRADECIMIENTOS

al Dr. Enrico Stefani, por su apoyo y dedicación
en la supervisión de este trabajo

a la Dra. Ligia Toro y al Dr. Yunni Meas,
por su valiosa asesoría

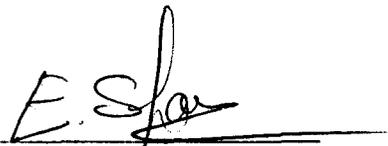
a la M. en C. Concepción Gutierrez, por su apoyo
como responsable de la Maestría en
Biología Experimental

al Fis. Angel Marín y al Fis. Octavio Miramontes,
por su ayuda en el trabajo de programación

al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,
por su apoyo económico

al Ing. Joel Herrera, por su ayuda para
la impresión de esta tesis

El jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó el presente trabajo de tesis.



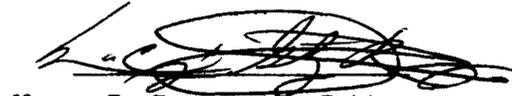
Dr. Enrico Stefani
Tutor



Dra. Ligia Toro
Asesor



Dr. Yanni Meas
Asesor



M. en C. Concepción Gutierrez
Asesor

Mexico, D. F. a 30 de enero de 1989.

El Jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó el presente trabajo de tesis.

Dr. Enrico Stefani
Tutor

Dra. Ligia Toro
Asesor

Dr. Yurni Meas
Asesor

M. en C. Concepción Gutierrez
Asesor

Mexico, D. F. _____