COLECCIÓN ESTUDIOS

COMPENDIO HISTÓRICO DE FISIOLOGÍA MUSCULAR

CARLO CAPUTO

Compendio Histórico de Fisiología Muscular
Carlo Caputo

© Academia de Ciencias F'isicas, Matemáticas y Naturales, 2011
© Carlo Caputo, 2011

Primera Edición: 2011

Hecho el depósito de Ley
Depósito Legal: lf65920115743901
ISBN: 978-980-6195-20-2
Diseño y Diagramación: Antonio Machado-Allison
Impresión: Brima Color

Todos los derechos reservados, Ninguna parte de esta publicación ouede ser reproducida, por ningun medio, sin la previa autorización escrita del autor y de la Academia.

Impreso en Venezuela- *Printed in Venezuela*

PRÓLOGO

El objetivo del presente compendio no es el hacer una revisión exhaustiva del campo de la Fisiología Muscular, sino el de presentar una visión, muy personal, del desarrollo de las ideas, de los trabajos y de las discusiones que en los últimos 50 años han permitido establecer los mecanismos básicos que rigen la función de los músculos estriados esqueléticos de vertebrados.

Para ello ha sido necesario proveer alguna información sobre los conocimientos de fisiología muscular, logrados antes de 1960, porque no se puede hablar de proteinas contráctiles sin mencionar los trabajos de Weber, Kuhne o Szent.-Gyorgyi, ni de fisiología muscular sin hablar de los trabajos de A. V. Hill. Como tampoco se puede hablar de electrofisiología del músculo sin describir con cierto detalle los trabajos de Hodgkin y Huxley, que si bien fueron realizados usando axones de calamar, han sido de importancia capital para entender el funcionamiento de todos los tejidos excitables.

La mayoría de los trabajos discutidos en este libro ha sido realizado usando músculos esqueléticos, de rana. De hecho, desde los trabajos de Hodgkin y Horowicz de 1959-60, se ha hecho enormemente popular el uso de fibras musculares de *Rana* aisladas, en sus diferentes versiones, para la aplicación de diferentes técnicas. Sólo en los ultimos años se ha empezado a utilizar, en muchos laboratorios y de manera creciente, músculos de mamíferos, particularmente preparaciones de fibras musculares aisladas enzimáticamente.

De manera que el contenido del libro refleja este hecho, y sólo tangencialmente se discuten resultados obtenidos con otras prepa-

raciones musculares. Esta decisión se debe sobre todo al crecimiento explosivo que han tenido los estudios de Fisiologia Muscular, en sus diferentes campos. Recuerdo que en las primeras Conferencias Gordon a las cuales pude asistitir a fines de los años sesenta el tema era Músculo. Se presentaban trabajos de fisiología cardíaca, que ha ido avanzando en paralelo con la fisiología de músculos esqueléticos, trabajos sobre la estructura de diferentes tipos musculares, incluyendo los músculos de invertebrados, que han aportado, y lo siguen haciendo, valiosa información, y trabajos sobre musculatura lisa, que han permitido notables avances en el entendimiento de los mecanismos de transducción de señales intracelulares. Pero, poco a poco el campo se ha ido especializando hasta el punto que ahora hay respectivas Conferencias Gordon para todos estos diferentes temas. Esta es mi justificación por haberme limitado a los músculos esqueléticos de vertebrados.

En el libro se han presentado con particular énfasis el trabajo de algunos investigadores como R.H. Adrian, Clara Franzini-Armstrong, K.W. Chandler, Annemarie Weber, S. Ebashi, H.E. Huxley, A.F. Huxley, A.L. Hodgkin, L.E. Peachey, K.A.P. Edman, W. Hasselbach, P. Horowicz, M.F. Schneider, J. Vergara y E. Ríos.

Sin embargo los avances alcanzados durante estos últimos 50 años en el campo de la Fisiología Muscular, se deben no sólo al trabajo de estos investigadores, si no al de muchos otros que sólo me es posible reconocer de manera colectiva en este prólogo.

El libro, como he mencionado, tiene como protagonista principal a la Fibra Muscular Esquelética de Rana. Por esta razón he querido empezar el libro con la Oda a la Fibra Muscular, de Brian Jewell, en la cual si bien no se menciona directamente el origen ranístico de la fibra, este se sobreentiende, considerando la gran cantidad de trabajos de Fisiología Muscular realizados con músculos de Rana en el Departamento de Fisiologìa del University College de Londres, donde trabajó el Profesor Jewell.

El frontispicio del libro de Borelli me fue gentilmente suministrado por L.E. Peachey, y lo incluyo porque a parte de ser

Borelli napolitano, el libro constituye, según L.E., el primer intento de tratar los músculos desde el punto de vista de la Biofísica.

Lamentablemente, no me ha sido posible consultar personalmente un gran número de referencias que, por su carácter histórico, merecen ser recordadas. El monumental libro de Dorothy Needham, titulado "*Machina Carnis*" me ha servido de fuente para muchas de estas referencias y su contenido, y me he permitido marcarlas con un asterisco en la lista bibliográfica. Con dos asteriscos están algunas referencias tomadas de Ingels (1979).

AGRADECIMIENTOS

Estoy agradecido y endeudado con los Dres H.E. Huxley, L.E. Peachey, M.F. Schneider, J. Vergara, F. Bezanilla, S. Baylor, G. Meissner, X Wagenchnecht, E. Stefani, P. Edman por haberme permitido utilizar algunas de sus figuras y sobre todo a la Dra. Clara Franzini Armstrong por haberme permitido utilizar numerosas imagenes no publicadas.

Los Dres Guillermo Whittembury y Rafael Apitz han dedicado valioso tiempo no solo en corregir el texto sino tambien en tratar de enseñarme a escribir en Castellano.

Pura Bolaños me ha ayudado generosa, paciente y repetidamente en la corrección y edición del texto y sobre todo en la elaboración de las figuras. Para ella mi inmenso agradecimiento.

Mi reconocimiento al Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas, donde hubo libertad de investigar y de soñar.

A la Academia de Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales, que motivó este libro.

JOH. ALPHONSI BORELLI

Neapolitani Matheſeos Profeſſoris,

DE

MOTU ANIMALIUM,

PARS PRIMA.

Editio Nova, a plurimis mendis repurgata,

AC

DISSERTATIONIBUS PHYSICO-MECHANICIS

DE

MOTU MUSCULORUM, ET DE EFFERVESCENTIA, ET FERMENTATIONE,

CLARISSIMI VIRI

JOH. BERNOULLII

MATHESEOS PROFESSORIS BASILEENSIS,

Aucta, & ornata.

HAGÆ COMITUM,

Apud PETRUM GOSSE

MDCCXLIII.

ODE TO THE MUSCLE FIBRE

B. R. JEWELL

I would like to be
A motor nerve terminal
With outstretched fingers
Closely applied to your
Specially sensitive
Postsynaptic membranes.

I would like to check
Your Excitation-Contraction
Coupling mechanism
By sending streams
Of AC potentials
Flushing along your T-tubules.

I would like to feel
The warm surge of calcium
Released from Your S.R.
Flooding my troponins
To cancel allosterically
All my inhibitions.

I would like to be
An Actin filament
Pulled on and stroked
By busy cross bridges
As I slide merrily
Between your myosins.

I would like to examine
All Your physical properties
By suitable combinations
Of stretches and releases
Very rapid oscillations
And other manipulations.

And after that crescendo
Of contractile activity
I would like to share
In your relaxation phase
The gentle disentangling
And the gentle restoration
Of the *Status QUO*.

DEDICATORIA

Para ***Erica***
Amalia
Maurizio
Marco
Alessandra
Massimo
Adriana

CONTENIDO

PRÓLOGO. **5**

INTRODUCCION **17**

CAPÍTULO 1. Arquitectura de las Fibras Musculares **25**

Estructura de las Fibras Musculares **26**

Microanatomía de los Sarcómeros **28**

Sistemas de Membranas Intracelulares

a) Túbulos Transversales. **35**

b) Retículo Sarcoplasmático **40**

Localización de las Mitocondrias **44**

CAPÍTULO 2. Estructura Molecular del Aparato Contractil **47**

Proteínas contráctiles **47**

a) La Miosina **47**

b) La Actina **52**

Localización de la miosina y de la actina en los Sarcómeros **55**

Actividad ATPásica de la Miosina **57**

Interacción entre Miosina y Actina **58**

Tropomiosina **60**

Proteínas Reguladoras **61**

Otras proteínas Sarcoméricas **66**

CAPÍTULO 3. Mecánica y Energética de la Fibras Musculares **69**

Respuesta Contráctil **69**

Relajación de latencia **72**

Potenciación Post-tetánica **73**

Relación Longitud Tensión **74**

Teoría Visco-elástica **75**

Relación Carga-Velocidad **79**

Estado activo **85**

Energética de la Contracción Muscular **87**

Producción de calor **88**

Calor de activación **91**

Calor de relajación **92**

Calor de acortamiento **93**

Balance energético de la contracción muscular **100**

Balance de energía durante una contracción **103**

CONTENIDO

CAPÍTULO 4. Teorías de Contracción	**105**
Teorías osmóticas. Teoría del Ácido Láctico	**107**
Acortamiento de los Elementos Contráctiles	**108**
Hipótesis de los filamentos deslizantes	**110**
Teoría de los Puentes Cruzados	**114**
Generación de Fuerza	**118**
Transitorios de fuerza y de velocidad	**119**
Relación fuerza-longitud de sarcómeros	**121**
Transitorios de velocidad y de fuerza	**123**
Ciclo Mecano-Químico	**131**
Mecánica contráctil de segmentos de fibras	**132**
Relación carga-velocidad revisitada	**133**
Cambios de longitud impuestos	**137**
Efecto de estiramientos	**137**
Desactivación inducida por acortamiento	**138**
CAPÍTULO 5. Propiedades Eléctricas Pasivas	**141**
Potencial de reposo	**141**
Propiedades eléctricas pasivas. Circuitos RC	**151**
Teoría del Cable	**155**
CAPÍTULO 6. Excitabilidad. Potencial de Accción	**163**
Curvas amplitud-duración	**163**
Hipótesis de Bernstein	**166**
Potenciales de Acción	**166**
Generación del Potencial de Acción	**168**
Ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz	**170**
Experimentos de voltaje controlado en axones de calamar	**172**
Corrientes de Na y K	**173**
Conductancias de Na y K.	**175**
Inactivación de las Corrientes de Sodio	**180**
El Modelo de Hodgkin y Huxley	**181**
Conductancia de K	**182**
Conductancia de Na	**183**
Conductancia de Fuga	**184**
Potencial de acción en fibras musculares	**186**
Corrientes de Ca en fibras musculares	**190**

CONTENIDO

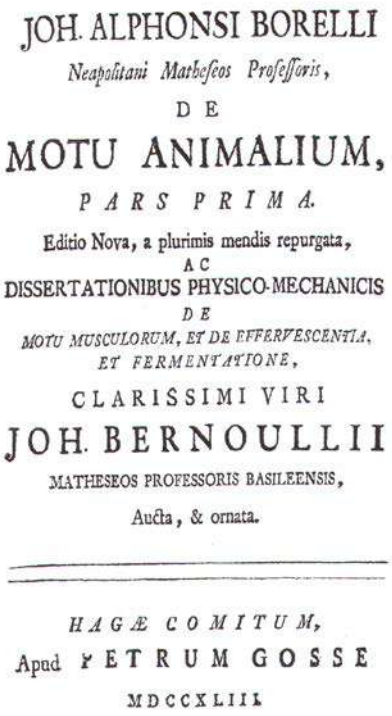
CAPÍTULO 7. Función de las Membranas Intracelulares	**195**
El Retículo Sarcoplasmático	**195**
Factor Relajante de Marsh y Bendall	**195**
Papel del Calcio	**197**
ATPasa de Calcio en el Retículo Sarcoplasmático	**199**
Papel de la Parvalbúmina (PV)	**204**
Localización del Ca en las fibras musculares	**205**
Señales ópticas en la membrana del R.S.	**206**
a) Señales ópticas intrínsecas	**207**
b) Señales ópticas extrínsecas	**209**
Función de los Túbulos Transversales	**211**
Activación Local	**212**
Desacople por tratamiento con Glycerol	**214**
Mecanismo de propagación radial	**214**
Bases estructurales del Acoplamiento Excitación-Contracción	**216**
Receptores de Dihidropiridinas en los túbulos T	**221**
Receptores de Rianodina en el RS	**224**
Caracterización de los receptores de rianodina	**225**
Identificación de los receptores de rianodina	**228**
CAPÍTULO 8. Acoplamiento Exitación-Contracción	**235**
Dependencia del potencial de membrana	**237**
Activación Contráctil	**244**
Efecto de la Temperatura	**245**
Efectos del Calcio Extracelular	**248**
Fibras desmembranadas. Preparación de Natori	**254**
Liberación de Calcio inducida por calcio. (*Calcium Induced Calcium Release*)	**258**
Control de potencial en fibras cortadas con uno, dos o tres sellos de vaselina	**262**
Corrientes intramembranarias no lineales	**264**
Movimiento de Carga	**266**
Inactivación del Movimiento de Carga	**273**
Componentes del Movimiento de Carga Q_γ	**280**
Hipótesis de transmisión química. IP3	**283**
Identificación de los Sensores de Potencial	**284**
Receptores de Dihidropiridinas y movimiento de carga	**285**

CONTENIDO

CAPÍTULO 9. Señales de Calcio	**291**
Aequorina	**291**
Colorantes metalocrómicos	**292**
Colorantes fluorescentes	**297**
Flujos de liberación de Ca	**306**
Inactivación de la liberación de Ca	**308**
Control dual de la liberación de Ca	**315**
Chispas de Calcio	**320**
Visualizacion de la actividad de las unidades liberadoras de Ca	**327**
LECTURAS RECOMENDADAS	**333**
BIBLIOGRAFÍA	**334**
INDICE DE AUTORES	
INDICE DE PALABRAS	

INTRODUCCIÓN

Los músculos han sido objeto de estudio desde los tiempos de Empédocles, quien cinco siglos antes de Cristo dió origen a la teoría neumática, según la cual, los movimientos se debían a la transferencia de una sustancia gaseosa entre las diferentes partes del cuerpo. De una u otra forma esta teoría se sostuvo prácticamente hasta finales del siglo XVII.



JOH. ALPHONSI BORELLI

Neapolitani Matheſeos Profeſſoris,

DE

MOTU ANIMALIUM,

PARS PRIMA.

Editio Nova, a plurimis mendis repurgata,

AC

DISSERTATIONIBUS PHYSICO-MECHANICIS

DE

MOTU MUSCULORUM, ET DE EFFERVESCENTIA, ET FERMENTATIONE,

CLARISSIMI VIRI

JOH. BERNOULLII

MATHESEOS PROFESSORIS BASILEENSIS,

Aucta, & ornata.

HAGÆ COMITUM,

Apud PETRUM GOSSE

MDCCXLIII.

Figura I.1 Frontispicio del libro de Giovanni Borelli sobre el movimiento de los animales.

Según Aristóteles (384-322 a.C.) la sede del neuma era el corazón, originándose los movimientos en los tendones. Erasístrato (*c.*304-250 a.C.) fue el primero en identificar a los músculos como responsables del movimiento. Perteneciente a la escuela alejandrina, postuló que había dos formas de neuma, uno que llamó Espíritu vital, que del corazón pasa a todo el cuerpo por medio de las arterias, y que al llegar al cerebro se convierte en el otro, llamado Espíritu animal. Este es llevado desde allí hacia todo el cuerpo a través de los nervios, que se visualizaban como una especie de tubos vacíos y que podían servir al mismo tiempo como órganos sensores o motores.

Por casi dos mil años no hubo mayor progreso en el campo, ya que teorías parecidas fueron sostenidas por Galeno (129-200 d.C.) y Descartes (1596-1650). Giovanni Borelli publicó uno de los primeros libros (Fig I.1) sobre el movimiento de los animales con un enfoque casi biofísico, ya que analizó el funcionamiento de los músculos desde el punto de vista matemático y mecánico. Borelli tuvo el mérito de asignarle a los nervios y a los músculos distintas funciones: a los nervios la función de transmitir información desde el cerebro hacia los músculos, y a éstos la función contráctil. Sin embargo aun pensaba que los nervios servían como conductores de un fluido o Espíritu animal que saliendo del cerebro y pasando por ellos, llegaba a los músculos, provocando su contracción. Esta idea fue finalmente desechada gracias al experimento hecho por el holandés Swammerdam (1637-1680) quien, utilizando la ingeniosa y sencilla técnica ilustrada en la figura I.2, había podido demostrar que el volumen de los músculos durante la contracción no aumentaba sino más bien disminuía. Es interesante notar que más recientemente, utilizando técnicas modernas, Abbott y Baskin (1962) han demostrado que efectivamente los músculos disminuyen su volumen al contraerse, aunque este cambio es precedido por un aumento pequeño y transitorio.

En un experimento relacionado con la conducción a lo largo de los nervios, von Haller (1766) demostró que en un nervio ligado y estimulado no se observaba hinchamiento del lado proximal, indicando que el Espíritu animal no debía tener volumen, pero aun así creía que debía ser algo más sustancial que la electricidad. Esta última había sido postulada como responsable de la conducción

nerviosa por su contemporáneo Fontana. El merito de Haller consistió en proponer que los músculos poseían su propia capacidad contráctil, independientemente de los nervios.

Sin embargo para esta época, con la invención de la Máquina eléctrica por von Guericke (1602-1686) y el descubrimiento de la Jarra de Leyden en 1745, era posible generar electricidad de alto voltaje. Con estos aparatos se estimulaban nervios y músculos, pero éstos se podían estimular también por otros mecanismos. La falta de equipo suficientemente sensible como para registrar la actividad eléctrica de nervios y músculos, retrasó la posibilidad de una hipótesis eléctrica que explicara la actividad de estos tejidos. La demostración hecha por Walsh en 1773 de la descarga eléctrica de *Torpedo* no tuvo mayor resonancia, ya que se ignoraba la naturaleza de los órganos eléctricos de estos animales.

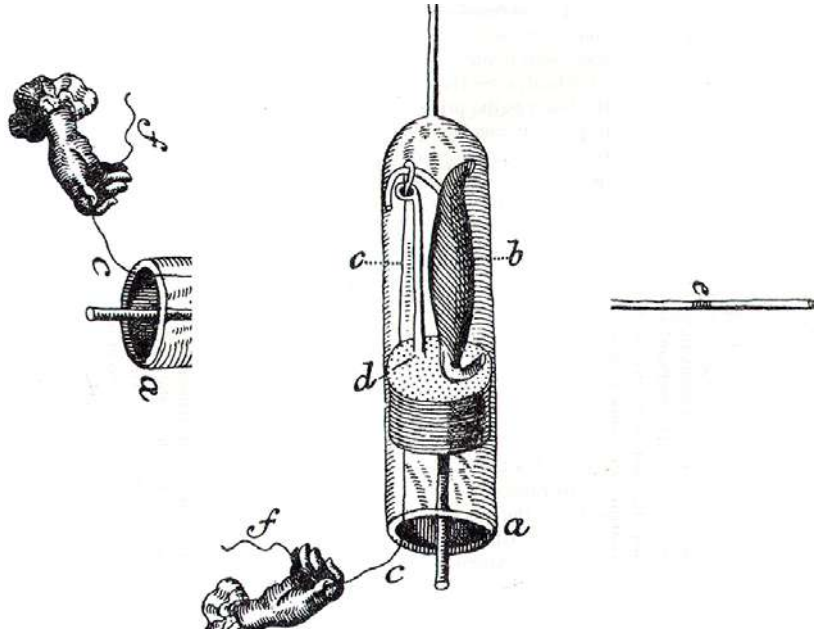


Figura I.2 Aparato utilizado por Swammerdamm para observar el cambio de volumen de un músculo durante la contracción.

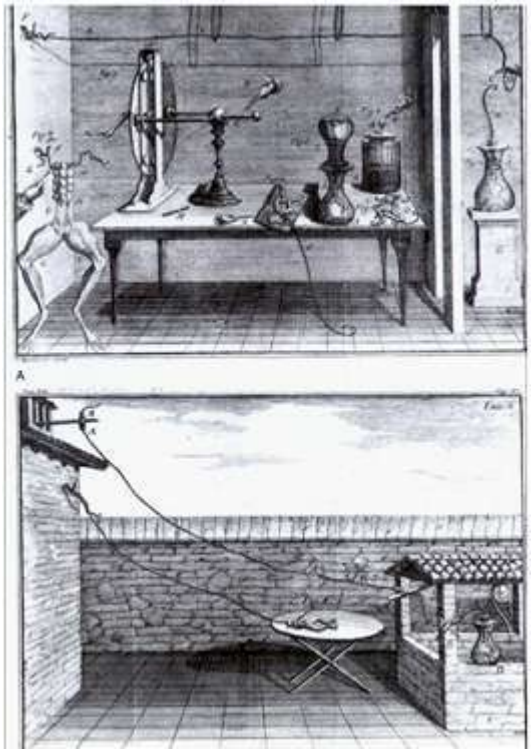


Figura I.3 Descubrimiento de la electricidad animal. Ilustración del sistema experimental utilizado por Galvani en Bolonia.

Más de un siglo después del experimento de Swammerdam, los experimentos de Galvani (1791) permitieron descubrir la naturaleza eléctrica del fenómeno que inicia el proceso de contracción muscular, demostrando que se podía estimular una preparación nervio-músculo de rana conectando el nervio y el músculo respectivamente a los dos extremos de un arco bimetálico (ver Figura I.3). Galvani pensó que el fenómeno eléctrico era de origen animal, esto provocó una controversia con Volta, quien suponía que el fenómeno que llevaba a la estimulación de la preparación de Galvani era el voltaje generado por la unión de los dos metales, lo cual lo llevó a la célebre invención de la pila voltaica. Sin embargo

la intuición de Galvani sobre la existencia de electricidad animal era básicamente correcta. De hecho, el mismo Galvani demostró que se podía inducir la contracción de los músculos sin necesidad del arco bimetálico, poniendo en contacto un nervio con el músculo.

Con la invención de la pila Voltaica en 1800 fue posible disponer de fuentes de corrientes constantes y estudiar sus efectos. Esto llevó a Oersted a descubrir la existencia de campos magnéticos alrededor de un cable que conducía corriente, y finalmente a la posibilidad de construir galvanómetros para la medición de corrientes bio-eléctricas.

Hacia 1830, Nobili demostró la presencia de corrientes de daño en la preparación músculo-médula espinal, lo cual fue confirmado por Matteucci (1838). La naturaleza eléctrica del potencial de acción fue finalmente probada por DuBois-Raymond en 1848, quien demostró que en la preparación nervio-músculo la corriente de daño disminuye paulatinamente con estimulación repetitiva. Además, DuBois-Raymond introdujo el uso de electrodos no-polarizables para reducir efectos espurios, y usó la palabra "electrotono" para definir el cambio en excitabilidad causado por una corriente condicionante sub-umbral. Von Helmoltz, en 1847, extendió estos hallazgos con la medición de la velocidad de conducción de la señal nerviosa: estimulando el nervio en diferentes puntos y midiendo el tiempo transcurrido entre la estimulación y la respuesta contráctil del músculo, obtuvo una velocidad de conducción de 30 m/s para el caso del nervio de rana, valor similar a los que se obtienen actualmente.

En los siguientes 40 años hubo contribuciones importantes: Herman (1867) planteó que la excitación se transmitía por medio de la acción de corrientes locales, Pflüger (1859) estudió el efecto electrotónico de la estimulación eléctrica, Nernst (1899) desarrolló el concepto de potencial de membrana, y Bernstein (1902) el concepto de semi-permeabilidad para explicar el potencial de acción.

Con la invención del microscopio fue posible describir la estructura microscópica de las fibras musculares. Las estriaciones características de las fibras musculares, fueron descritas por primera vez por Leewenhoeck en 1682, Figura I.4, quien la

interpretó en términos de filamentos envueltos alrededor de las fibras. Leeuwenhoeck también describió la presencia de miofibrillas dentro de las fibras.

La observación de Leewenhoeck en relación a las miofibrillas fue confirmada por Schwann en 1839 y por Bowman en 1840 quienes, además, descubrieron que las estriaciones estaban presentes en las miofibrillas. Según estos dos investigadores, las fibras que formaban los músculos estaban a su vez constituidas por fibrillas con apariencia de collar de perlas, con éstas representando las bandas claras, y los espacios entre ellas constituyendo las zonas oscuras, proveyendo así la alternancia de zonas claras y zonas oscuras a lo largo de la fibrilla.

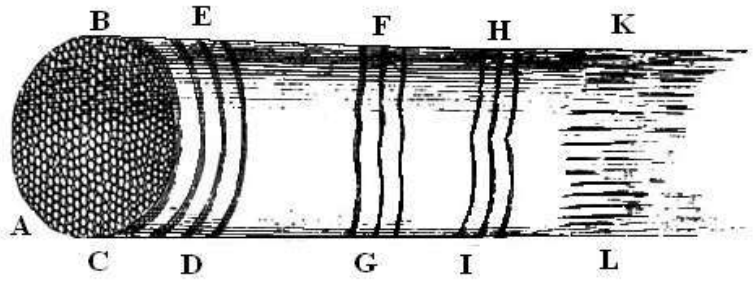


Figura I.4. Dibujo de una fibra muscular hecho por Leewenhoeck. Nótese la presencia de miofibrillas y de las estriaciones.

En la segunda mitad del siglo XIX, los adelantos en las técnicas de microscopía óptica permitieron obtener una descripción detallada de la estructura de las fibras musculares, que sólo pudo ser superada con la introducción de la microscopía electrónica en el siglo XX.

Von Brücke, en 1858, fue el primero en estudiar la estructura microscópica de los músculos utilizando luz polarizada. De las dos zonas, clara y oscura, visibles con luz normal, sólo la oscura, con índice de refracción más alto, refractaba de manera doble, luciendo clara bajo luz polarizada. Por esta propiedad óptica y en analogía con la nomenclatura en cristalografía, para las zonas que aparecían

oscuras bajo microscopía de luz normal Von Brücke usó el término "anisótropas", mientras que las que no sufrían cambios bajo la luz polarizada las denominó "isótropas". En la actualidad las bandas oscuras y claras se denominan A e I respectivamente. En 1868, Krause describió la línea oscura como Q, por Querlinie, que actualmente se conoce como línea Z, en el medio de la banda clara. También observó que cuando una fibra se contraía, la banda clara se hacía más pequeña con la línea Q acercándose a la banda oscura. Es interesante notar cómo algunos detalles estructurales obtenidos con microscopía de luz a fines de 1800, fueron confirmados luego utilizando técnicas de microscopía electrónica. Por ejemplo Veratti en 1902 describió una malla de estructuras filamentosas hoy identificada como el Retículo Sarcoplásmatico y el sistema de túbulos-T.

En relación con los mecanismos de contracción, E. Weber (1846), propuso que un músculo, al ser excitado, se convierte en un nuevo cuerpo elástico, con propiedades elásticas distintas a las de un músculo en reposo. La hipótesis de que un músculo activo se comporta como un resorte estirado ha sido, con ciertas modificaciones, sostenida por diferentes investigadores durante casi cien años, a pesar de que ya en 1864 Heidenhain había demostrado que durante contracciones isotónicas el calor total aumentaba de acuerdo a la carga, y de que Fick, en 1882 había demostrado que durante contracciones isotónicas se producía más calor que en contracciones isométricas.

Como veremos luego, aun después de que Fenn (1923) había aportado claras evidencias opuestas a la hipótesis "elástica", pasaron varios años antes de que ésta fuese descartada definitivamente.

La identificación de las proteínas contráctiles comenzó con los experimentos de Kühne, quien en 1864 descubrió que utilizando soluciones concentradas de sales, podía extraer de los músculos una proteína altamente viscosa a la que llamó miosina.

Desde la segunda mitad del siglo XIX, y durante los siguientes cien años, las investigaciones sobre el funcionamiento de los

músculos contribuyeron al desarrollo de diferentes disciplinas, en especial la bioquímica, la fisiología y la biofísica.

Para el caso de la Bioquímica, los músculos, junto con las levaduras, fueron objeto de estudio de científicos famosos como Berzelius, Bernard, Liebig, Fletcher, Hopkins, Szent-Györgyi, Meyerhof, Lohman, Embden, Fiske, Subarow, Lipmann, Warburg, etc. Para la fisiología tenemos, entre otros, a Borelli, Swammerdam, Lavoisier, Hooke, Harvey, Pflüger, Kühne, Weber, y en biofísica Galvani, Matteucci, DuBois-Raymond, von Helmholtz, Fick, Bernstein, Overton, Blix, Hill, Fenn, etc. Pero fue a partir de la segunda mitad del siglo XX, que se comenzó a dilucidar y entender los fenómenos involucrados en la contracción muscular.

CAPITULO 1

ARQUITECTURA DE LAS FIBRAS MUSCULARES

Tomados en su conjunto, los músculos esqueléticos constituyen el órgano del movimiento, el más grande del cuerpo, alcanzando alrededor del 40 por ciento de la masa total del cuerpo de un humano adulto. Los músculos están constituidos por células alargadas, las fibras musculares, el tejido conectivo o conjuntivo que las rodea y que contiene también nervios, vasos y capilares sanguíneos, y por los tendones que permiten su anclaje a los huesos.

Dentro de un músculo, las fibras musculares están dispuestas en grupos o fascículos, de hasta 20, separados entre sí por el tejido conectivo que forma el endomisio. Diferentes fascículos pueden estar agrupados en haces y separados de otros haces por el epimisio, también tejido conectivo. En su gran mayoría las fibras musculares están inervadas por un solo axón, que hace contacto con la fibra en una zona especializada denominada placa neuromuscular o placa motora. En la placa motora el terminal nervioso hace contacto casi directo con la membrana de la fibra muscular o sarcolema, estando separado de ella solo por la hendidura sináptica de 50 nm de espesor. Una neurona y las fibras musculares que inerva constituyen una unidad motora, la cual puede estar constituida desde una hasta varias decenas de fibras, dependiendo de la precisión del movimiento que se requiere del músculo en cuestión.

A partir del trabajo de Ranvier (1873) se estableció que las fibras musculares podían ser divididas en dos tipos, rápidas y lentas. Hoy se pueden distinguir no sólo por la rapidez con que pueden contraerse y relajarse, sino también por su color, sus

características metabólicas, resistencia a la fatiga, composición enzimática e isoforma de miosina. De esta manera se reconocen diferentes sub-tipos de fibras que pueden coexistir en un músculo dado. Por ejemplo los músculos de mamíferos pueden estar compuestos de fibras rápidas, tipo IIA y IID/X, y lentas, tipo I. La predominancia relativa de los diversos tipos de fibra en un músculo determina que este se considere rápido o lento.

Estructura de las fibras musculares

La figura 1.1 muestra de forma esquemática las características estructurales de un músculo, una fibra y un sarcómero. Las fibras en los músculos esqueléticos de anfibios y mamíferos son células alargadas multinucleadas, con un diámetro de 10 a 100 μm, y una longitud que puede variar entre decenas de μm y decenas de cm. Las fibras musculares se caracterizan por tener en su interior dos tipos de organelos altamente especializados: las miofibrillas que constituyen el aparato contráctil de los músculos, y el Retículo Sarcoplasmático que es análogo al Retículo Endoplasmático de otras células. En el citoplasma de las fibras musculares, denominado mioplasma, se encuentran además los núcleos, mitocondrias, ribosomas y gránulos de glucógeno.

Las miofibrillas, que son estructuras cilíndricas de aproximadamente 1 μm de diámetro, corren paralelas al eje principal de las fibras musculares. Observadas a través del microscopio, muestran un patrón repetitivo de zonas claras alternadas con zonas oscuras que confieren a la miofibrilla un aspecto estriado. Por estar las miofibrillas en fase, la fibra muscular entera también presenta las estriaciones características de los músculos esqueléticos y cardíacos. Las unidades de repetición de este patrón se denominan sarcómeros, que en músculos de vertebrados, en estado de reposo en el cuerpo, tienen una longitud que varía entre 2,1 y 2,7 μm. En fibras musculares aisladas y con las extremidades libres, la longitud de los sarcómeros puede reducirse en un 20 por ciento. No están descritos sarcómeros de longitud menor a ésta, pero sí de longitudes mayores como por ejemplo 10-15 μm en fibras musculares de cangrejo. De las dos zonas, clara y oscura, visibles con luz

normal, sólo la oscura, con más alto índice de refracción, refractaba el doble, luciendo clara bajo luz polarizada, y en analogía con la nomenclatura utilizada en cristalografía, esta banda oscura en microscopía normal fue llamada anisótropa por von Brücke (1858), y la que no sufría cambio a la luz polarizada se denominó isótropa Actualmente, las bandas oscura y clara se denominan bandas A e I respectivamente.

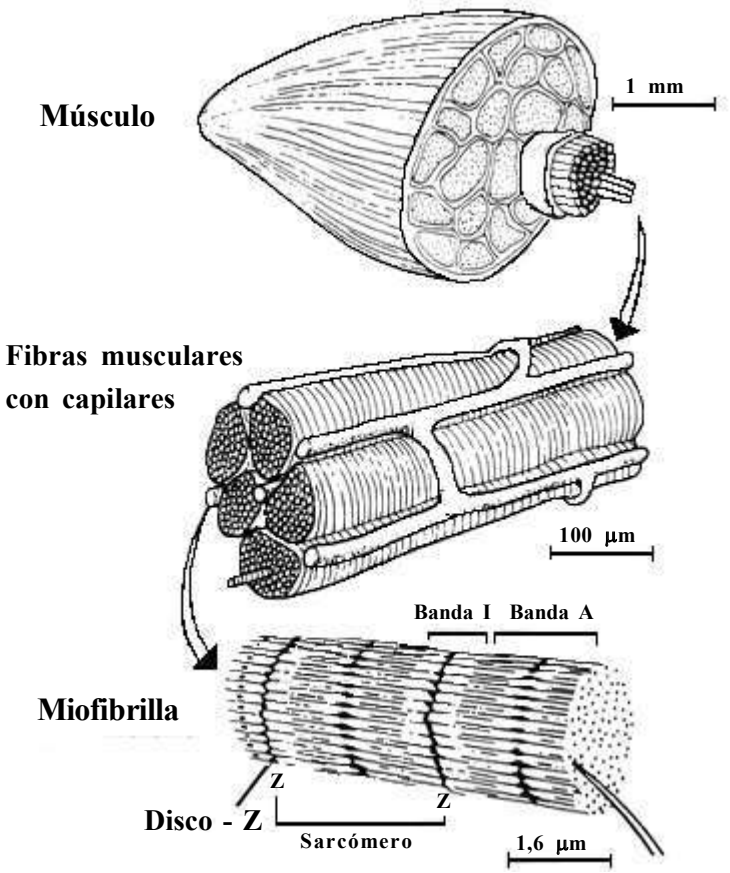


Figura 1.1. Esquema de la composición de un músculo, mostrando los paquetes de fibras envueltos en tejido conectivo, las miofibrillas dentro de las fibras y la estructura de los sarcómeros.

Utilizando microscopia de contraste de fase, se puede observar que a todo lo largo de las miofibrillas, a una distancia regular de alrededor de 2,2 µm, en el centro de las bandas I, se encuentran unas líneas oscuras, llamadas líneas Z, las cuales fueron descritas en 1868 por Krause, quien las denominó líneas Q (Querlinie). Por otra parte, en fibras no contraídas, la banda oscura o banda A presenta en el centro otra zona de discontinuidad, de apariencia mas clara denominada zona H, visible hasta por microscopia de luz.

Microanatomía de los sarcómeros

La aplicación de técnicas de microscopia electrónica y de difracción de rayos X, especialmente por Huxley (1953 a y b) desde los años 50 del siglo pasado, ha permitido confirmar las observaciones hecha con microscopia de luz y hasta ha permitido visualizar estas estructuras con una resolución molecular.

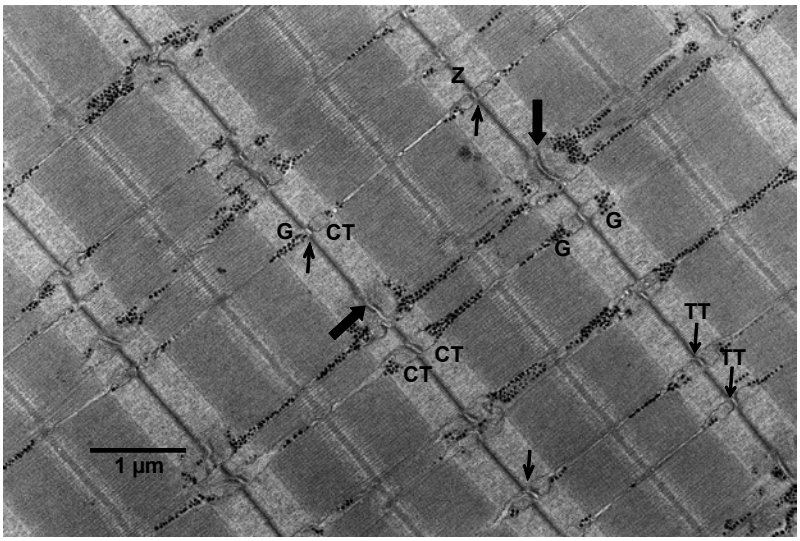


Figura 1.2. Micrografía electrónica mostrando la estructura sarcomérica de diferentes miofibrillas. Estas están en fase entre ellas, confiriéndole el aspecto estriado a toda la fibra. **CT**: cisternas terminales, **TT:** túbulos transversos, **G**: grano de glucógeno. Las flechas pequeñas indican túbulos transversos en sección transversal. Las flechas grandes indican túbulos transversos en sección longitudinal. (*Micrografía cortesía de la Dra Clara Franzini-Armstrong).*

La microfotografía electrónica de la figura 1.2, cortesía de la Dra Clara Franzini-Armstrong, muestra las principales características ultraestructurales de una fibra muscular, cortada longitudinalmente. Se puede distinguir claramente los componentes contráctiles localizados a nivel de las miofibrillas, y los componentes membranosos del Retículo Sarcoplasmático localizados entre ellas. Las miofibrillas corren longitudinalmente desde la parte superior derecha hacia la parte inferior izquierda, y pueden distinguirse claramente por espacios aparentemente vacíos entre ellas. Las líneas oscuras trasversales representan las líneas Z, que dividen las miofibrillas en sarcómeros, y como se describió por microscopia de contraste de fase se encuentran en el centro de las bandas claras, o bandas I. En el centro del sarcómero se encuentran las bandas A, que en su mitad presentan una zona más clara, las zonas H que a su vez tienen en el centro una línea oscura. Es importante notar que entre las miofibrillas, y sobre todo a nivel de las líneas Z se encuentran las vesículas membranosas del Retículo Sarcoplasmático. Estas estructuras se describirán después mas detalladamente.

El esquema de la figura 1.3 delinea las características estructurales del sistema contráctil de las miofibrillas que pueden ser visualizadas por microscopia electrónica junto a una microfotografía de un segmento de fibra muscular de rana.

La microfotografía de la figura 1.3 ilustra la estructura de un sarcómero de una fibra muscular de rana: en la mitad de los sarcómeros se encuentra una banda de aproximadamente 1,55 µm de largo, de alta densidad y fuerte birrefringencia, la banda A. En el centro de la banda A se encuentra una zona corta, de densidad intermedia y baja birrefringencia denominada zona H, que depende del grado de estiramiento de las fibras y que bajo condiciones normales tiene 0,30 µm de largo. En el centro de la zona H hay una zona de aun menor densidad, denominada "pseudo zona H", que contiene un segmento corto de mayor densidad, denominado línea M con un espesor de 40 a 80 nm. A los lados de las bandas A se encuentran bandas de baja densidad de 0,750 µm, las bandas I, que se extienden hasta la próxima banda A de la cual están divididas por la línea Z. Los segmentos de miofibrillas comprendidos entre dos líneas Z, se denominan sarcómeros como ya se ha

explicado. La compleja apariencia microscópica de los sarcomeros se debe a la presencia de filamentos gruesos y delgados y a la manera como éstos se solapan dentro de un sarcómero, como se ilustra en el esquema debajo de la microfotografía. El solapamiento de los filamentos explica como, en sección transversal, la apariencia de las imágenes depende de la zona del sarcómero por donde ha pasado el corte. Si el corte pasa por el centro de la banda A, a nivel de la zona H, sólo se ven filamentos gruesos, dispuestos en forma hexagonal, con una separación entre ellos de pocas decenas de nm, mientras que con cortes a nivel de la zona lateral de la banda H, donde hay solapamiento de filamentos gruesos y delgados,

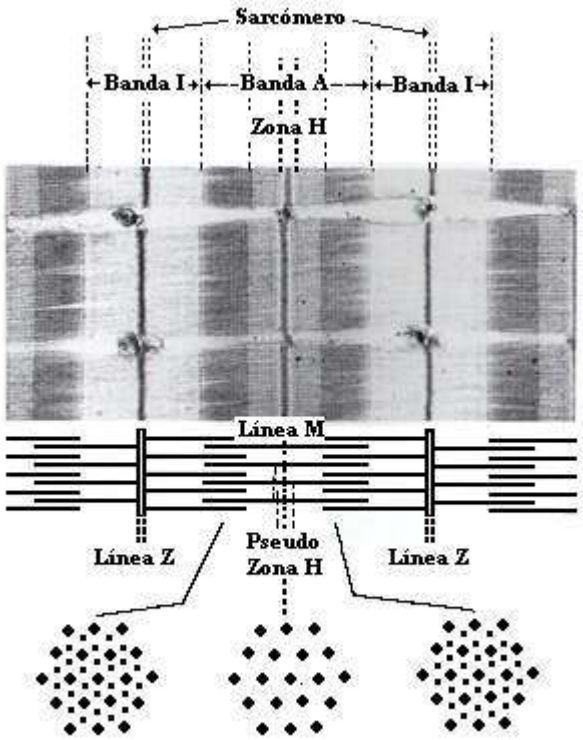


Figura 1.3. Estructura de los sarcómeros. El aspecto estriado deriva de la disposición parcialmente solapada de filamentos gruesos y delgados. (*Modificado de H.E. Huxley, 1957, con permiso*).

se ve un doble arreglo de filamentos, con los gruesos en disposición hexagonal y los delgados entre ellos. A nivel de la banda I, sólo se podrían observar los filamentos delgados (no se muestran).

La microfotografía de la figura 1.4 ha sido obtenida usando técnicas de alta resolución; de esta manera se ha podido demostrar (Huxley, 1957) que la banda A está formada por filamentos de unos 11 nm de diámetro y 1,55 μm de largo, conocidos como filamentos gruesos, que se extienden paralelamente a todo lo largo de la banda A. Un segundo conjunto de filamentos, más delgados, de aproximadamente 5 nm de diámetro y 0,980 μm de largo, se extienden desde ambos lados de la línea Z a lo largo de toda la banda I, hacia la banda A, donde llegan a solaparse parcialmente con los filamentos gruesos allí presentes.

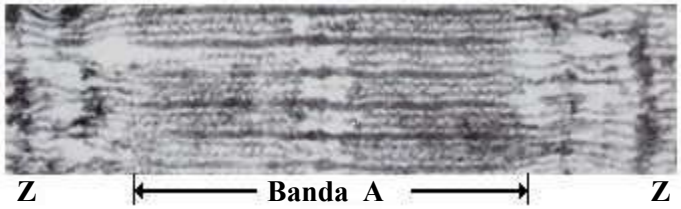


Figura 1.4. Micrografía de alta resolución de un sarcómero, mostrando puentes de unión entre los filamentos gruesos y los delgados. *Modificado de H.E. Huxley (con permiso).*

Es importante recordar que inicialmente, la longitud de los filamentos delgados se refería a la distancia entre el límite de una zona H y el otro situado del otro lado de la línea Z, y se reportaban valores alrededor de 1,85 μm. Sin embargo debido a que los filamentos delgados no son continuos a través de la línea Z (Knappeis y Carlsen, 1962), resulta que la longitud real es la mitad de este último valor, o sea alrededor de 0,9 μm, como se ha reportado arriba. La disposición de los dos conjuntos de filamentos y su superposición parcial, explican la alternancia de zonas de mayor y de menor densidad que origina el patrón de estriaciones características de las fibras musculares cardíacas y esqueléticas.

Usando microscopia electrónica de alta resolución, Huxley (1957) pudo demostrar la presencia de protuberancias, o puentes cruzados, que saliendo de los filamentos gruesos se orientan hacia los filamentos delgados, como se muestra en la microfotografía de la figura 1.4. Estos puentes solamente se observan en la región de solapamiento entre filamentos gruesos y filamentos delgados, estando ausente en la región central de la banda A.

Los primeros trabajos, a comienzos del siglo pasado, en los que se utilizaron los rayos X de ángulo ancho para el estudio de los músculos, arrojaron alguna evidencia de que soluciones de miosina dejadas secar daban patrones de difracción consistentes con la presencia de moléculas alargadas. En sus primeros experimentos, utilizando difracción de rayos X de ángulo pequeño y músculos sartorios de rana, Huxley (1951, 1953) había obtenido los primeros

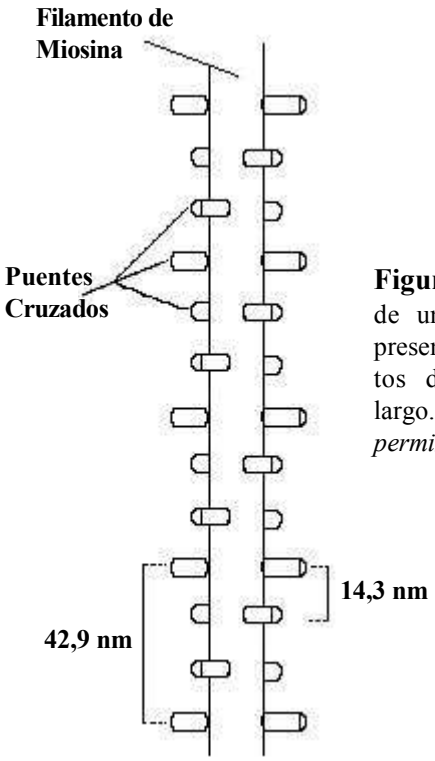


Figura 1.5. Esquema de la estructura de un filamento grueso, mostrando la presencia de puentes de unión dispuestos de manera helicoidal a todo su largo. (*Modificado de H.E. Huxley, con permiso*).

patrones de difracción de músculo vivo en estado relajado, con tiempos de exposición de pocas horas para patrones ecuatoriales, y de un par de días para patrones axiales. Las reflexiones de los patrones ecuatoriales, indicaron que provenían de un reticulado hexagonal de filamentos de 10-15 nm de diámetro y separados uno de otro por aproximadamente 45 nm. Información adicional proveniente de músculos en estado de rigor permitió inferir la presencia de un segundo set de filamentos dispuestos en las posiciones trigonales del reticulado hexagonal. De estos resultados y de los obtenidos por Hasselbach (1953) y por Hanson y Huxley (1953), Huxley pudo deducir que el primer set correspondía a filamentos de miosina y el segundo set a filamentos de actina, como lo recuerda en un artículo reciente (Huxley, 2004).

Por otra parte, a partir de los patrones axiales de rayos X se encontraron otras reflexiones que correspondían a periodicidades en la dirección axial, y por lo tanto provenientes de estructuras repetidas a lo largo de los filamentos. En ángulos muy pequeños se observó un conjunto de reflexiones con una periodicidad axial de 42,9 nm, que fue atribuida inicialmente a estructuras asociadas a los filamentos gruesos. Estas observaciones, y las conclusiones derivadas de ellas, fueron luego confirmadas en su totalidad por estudios de microscopia electrónica llevados a cabo por el mismo Profesor Huxley y sus colaboradores, en especial Jean Hanson (Hanson y Huxley, 1953, Huxley y Hanson, 1954).

Regresando a la información obtenida con rayos X, en un trabajo muy detallado, utilizando rayos X de ángulo muy pequeño y una preparación de músculo sartorio fresco, Huxley y Brown (1967) obtuvieron evidencia de que la distribución de intensidades de las reflexiones a 42,9 nm correspondían a un arreglo helicoidal de los elementos difractantes que pudieron ser identificados como estructuras salientes de los filamentos gruesos. También encontraron una reflexión meridional a 14,3 nm indicando que la repetición de las estructuras salientes correspondía a la tercera parte de la repetición helicoidal. Estos resultados eran compatibles con la evidencia obtenida por microscopia electrónica, que indicaba la presencia de 6 puentes cruzados por cada 40 nm en la longitud del

filamento grueso, y un par de puentes cruzados cada 14.3 nm, con una rotación de 120º con respecto a los pares vecinos, como se muestra esquemáticamente en el diagrama de la figura 1.5. Además de confirmar los resultados obtenidos con el microscopio electrónico, el uso de difracción de rayos X permitió también obtener información cuantitativa sobre diferentes características morfológicas repetidas a lo largo de las miofibrillas, sarcómeros y filamentos, y sobre cambios estructurales que ocurren durante la actividad contráctil.

Con rayos X de ángulo algo mayor, los autores visualizaron otras reflexiones que parecen derivarse de filamentos formados por sub-unidades que se repiten a distancia de 2,73 nm dispuestas en forma de hélice con un paso de 36-37 nm, identificables como filamentos delgados. El radio de la hélice a lo largo de la cual están las subunidades es de aproximadamente 2,5 nm. También estos resultados confirmaban plenamente aquellos obtenidos a través de microscopía electrónica por Hanson y Lowy (1963).

Huxley y Brown (1967) también encontraron otra reflexión meridional con espaciamiento de 38,5 nm, que luego se demostró que correspondía a la periodicidad de la tropomiosina en los filamentos delgados, proveyendo, con unos quince años de anticipación, las bases estructurales para la localización y la acción del sistema de tropomiosina-troponinas.

La primera evidencia experimental que sugería que los filamentos gruesos y delgados pudieran deslizarse durante cambios de longitud de los músculos había sido obtenida por Huxley (1953) utilizando rayos X de ángulo bajo y preparaciones musculares frescas o extraídas con glicerol. Huxley demostró que al estirar un músculo al 140 por ciento de su longitud de reposo, los dos conjuntos de reflexiones correspondientes a los filamentos gruesos y a los delgados no cambiaban. Igualmente el espaciamiento de las reflexiones correspondientes a los dos tipos de filamentos cambiaba menos del 1 por ciento durante la actividad contráctil bajo condiciones isométricas o isotónicas.

Estos resultados fueron confirmados por microscopia, tanto de luz (Huxley y Hanson 1954; Huxley y Niedergerke, 1954) como electrónica (Page y Huxley, 1963).

Túbulos transversales y Retículo Sarcoplasmático

El sistema contráctil de las fibras musculares constituye un ejemplo clásico de la importancia en biología de la relación entre estructura y función, ya que la disposición de los filamentos gruesos y delgados dentro de los sarcómeros constituye la base anatómica para la generación de fuerza durante el fenómeno de la contracción muscular. Sin embargo, en las fibras musculares existe otro ejemplo de este principio, dado por el Retículo Sarcoplasmático y los túbulos transversales que constituyen un sistema sumamente organizado que permite el control de la señalización de calcio la cual tiene una importancia fundamental para el fenómeno contráctil.

Túbulos transversales

Los túbulos transversos o túbulos-T se originan como invaginaciones de la membrana plasmática o sarcolema, que se extienden transversalmente a todo lo ancho de las fibras musculares formando redes que en el músculo de anfibio están localizadas a nivel de las líneas Z, como se muestra en las microfotografía de las figuras 1.2 y 1.6, 1.8 y en el esquema de la figura 1.9. (Franzini-Armstrong, 1964; Peachey, 1965). En músculos de mamíferos, los túbulos-T están localizados a nivel de la unión entre la banda A y la banda I, encontrándose por lo tanto dos redes tubulares por cada sarcómero como se muestra en el esquema de la figura 1.9 (Eisenberg, 1983). En la configuración, predominante en la microfotografía de la figura 1.2 pueden distinguirse túbulos transversos, marcados por flechas pequeñas, entre dos cisternas terminales (CT) del Retículo Sarcoplasmático formando las así llamadas triadas. Las dos flechas grandes marcan túbulos transversales cortados a lo largo de su eje principal. Una vista parecida de túbulos transversales aparece en la figura 1.6 la cual muestra también que entre la membrana de los túbulos y la de las cisternas laterales se encuentra un espacio que parece interrumpido a intervalos regu-

lares por estructuras electrón densas, las cuales serán discutidas con mayor detalle en el capítulo 7. La figura muestra también la localización de mitocondrias en la cercanía de las miofibrillas y la presencia de material denso disperso en el lumen de las cisternas terminales, probablemente calsecuestrina. La figura 1.7 muestra una sección longitudinal obtenida por criofractura mostrando la hojuela citoplasmática del Retículo Sarcoplasmático, que muestra su continuidad a lo largo de más de dos sarcomeros. Se pueden distinguir los túbulos transversales, las cisternas terminales y parte del Retículo Sarcoplasmático longitudinal.

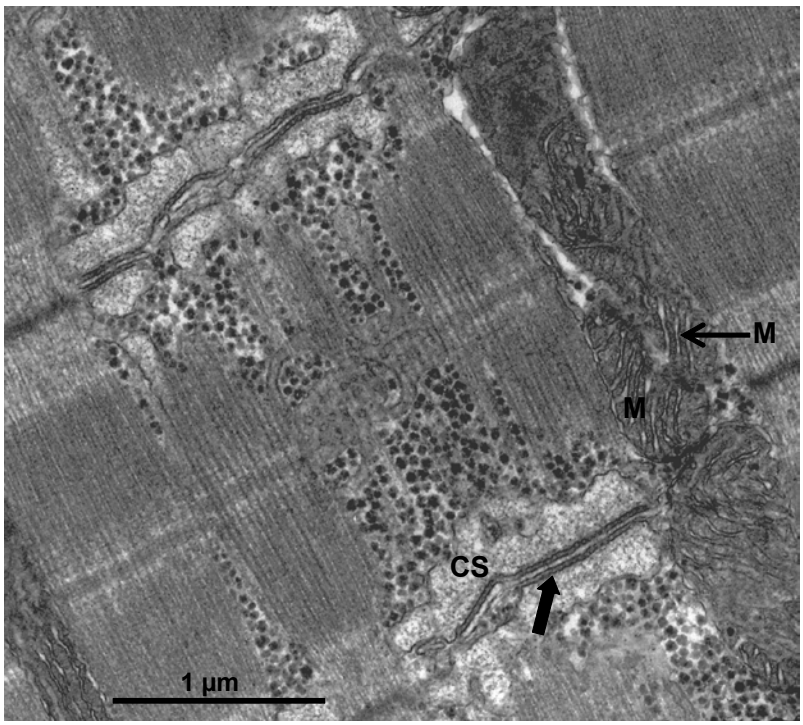


Figura 1.6. Micrografía electrónica mostrando la relación entre cisternas terminales y túbulos transversos en sección longitudinal. El material electrón denso en las cisternas terminales es probablemente calsecuestrina. (*Micrografía cortesía de la Dra Clara Franzini-Armstrong*).

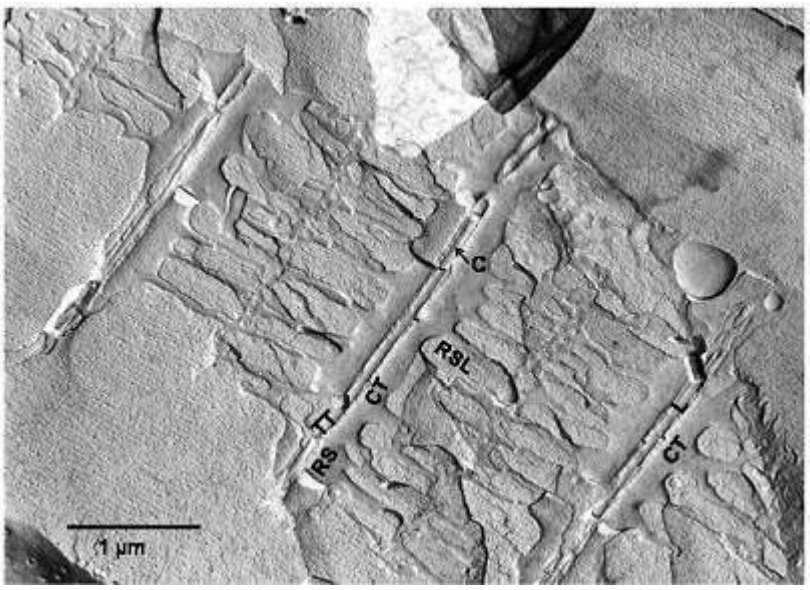


Figura 1.7. Sección longitudinal de una fibra muscular obtenida por criofractura mostrando la hojuela citoplasmática del Retículo Sarcoplasmático. Nótese la continuidad del Retículo Sarcoplasmático longitudinal, RSL, a lo largo de toda la sarcómera. En el corte se pueden distinguir los túbulos transversales (TT) y las cisternas terminales (CT). (*Micrografía cortesía de la Dra Clara Franzini-Armstrong*).

Utilizando microscopia electrónica de alto voltaje y marcando los túbulos-T con peroxidasa ha sido posible (Peachey y Eisenberg, 1978) determinar la extensión de la red de túbulos-T en planos transversales al eje longitudinal de fibras musculares de rana. Estas redes se forman por ramificación de los túbulos a nivel de nudos, lo cual permite que los túbulos se extiendan alrededor de las miofibrillas, encontrándose 5 nudos aproximadamente alrededor de cada miofibrilla. Los segmentos de túbulos entre nudo y nudo tienen un largo aproximado de unos 0,9 µm. La figura 1.8 muestra la red de túbulos-T en una sección transversal muy delgada (0,25-0,50 µm) usando la tinción de Golgi para visualizar la luz de los túbulos. Con este espesor de corte únicamente se visualiza una sola capa del sistema T (Peachey y Franzini-Armstrong, 1983). En músculo sartorio de rana, el volumen celular ocupado por los túbulos-T es del 0,3 por

ciento, mientras que la superficie total de las membranas de los túbulos es 6 o 7 veces mayor que la superficie de la membrana de las fibras.

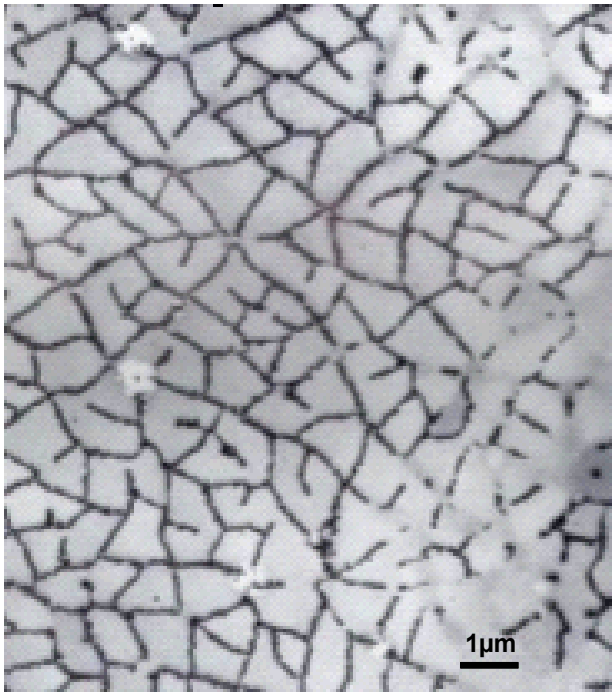


Figura 1.8. Sección transversal de una fibra muscular, obtenida por microscopía de alto voltaje, mostrando la ramificación de los túbulos transversales. Tinción de Golgi. Espesor del corte entre 0,25 y 0,5 µm. (*Modificado de Peachey y Franzini-Armstrong).*

Si bien se ha reportado que el diámetro de los túbulos-T varía entre 30 y 80 nm la mayoría de los túbulos, en particular aquellos que forman las uniones triádicas, tiene una sección ovalada, que en el caso de los músculos de la vejiga natatoria del pez sapo, tiene ejes largo y corto de aproximadamente 126 y 48 nm respectivamente. En músculos de invertebrados es común ver túbulos que corren longitudinalmente entre un sarcómero y el otro. Esta modalidad ha sido descrita también en músculo cardíaco de mamífero, pero muy raramente en preparaciones normales de

microscopía electrónica de músculos esqueléticos de vertebrados, aun cuando aparecen en los dibujos de Veratti como lo indican Peachey y Franzini Armstrong (1983). Sin embargo, se observan con cierta frecuencia en micrografías estereoscópicas obtenidas de cortes gruesos de músculos infiltrados con lantano y observados con el microscopio electrónico de alto voltaje (Peachey y Franzini-Armstrong, 1983).

Si bien en algunas preparaciones, como músculo cardíaco o músculo de insectos o peces, es posible visualizar rutinariamente las aperturas de los túbulos-T hacia el medio extracelular en la superficie de las fibras, en músculos de anfibios y mamíferos sólo se ha logrado ocasionalmente, quizás debido a su escasez (Franzini-Armstrong, Landmesser y Pilar, 1975). Con mayor frecuencia, en la superficie externa de la membrana plasmática han sido descritas cavidades cuya apertura al medio es de aproximadamente 20 nm. Junto a las caveolas, pero en mucho menor número, se han descrito aperturas de los túbulos-T con aproximadamente el mismo diámetro. A veces hay confluencia de caveolas y túbulos.

Sin embargo la apertura de los túbulos hacia el medio extracelular ha sido demostrada por métodos indirectos, como por ejemplo mediante la localización dentro de la luz de los túbulos de marcadores extracelulares tales como la ferritina, una proteína electrón-densa al microscopio electrónico (Huxley, 1964); con colorantes fluorescentes impermeables (Endo, 1964) como la fluoresceína (Endo, 1965), o con las partículas de oro coloidal de la tinción de Golgi (Peachey y Franzini-Armstrong, 1983), como se ha mostrado en la figura 1.8. Los resultados obtenidos con estos marcadores también indicaron que los túbulos no estaban comunicados con las cisternas terminales del Retículo Sarcoplasmático o con el mioplasma. La apertura de los túbulos-T al espacio extracelular era esperada después de los resultados de experimentos electrofisiológicos en los cuales, al medir las propiedades RC de las fibras musculares (ver Capítulo 5), se había encontrado que la membrana tenía una capacitancia específica excepcionalmente alta (Falk y Fatt, 1964). De hecho, mientras la mayoría de las células tienen una capacitancia específica de 1 $\mu F/cm^2$, la membrana de

las fibras musculares de rana presenta valores entre 5 y 8 $\mu F/cm^2$. Las posibles razones de este hecho se hubieran podido explicar asumiendo que:

1) la membrana las de fibras musculares tuviese un espesor menor;

2) que tuviese una constante dieléctrica mayor; o

3) que la superficie resultase mayor que la calculada utilizando sólo la longitud y la superficie de la sección transversal de las fibras.

Finalmente se demostró que esta última explicación era la correcta, ya que como se ha mencionado, se ha podido calcular por estereometría que el área de la membrana de los túbulos T es aproximadamente 6 a 7 veces mayor que el área de la membrana superficial de las fibras.

Retículo Sarcoplasmático

El Retículo Sarcoplasmático (RS) de las fibras musculares, que es el equivalente del retículo endoplasmático encontrado en otros tipos celulares, constituye un sistema interno de túbulos y sacos limitados por membranas, completamente separadas de la membrana superficial. En la mayoría de los músculos el RS se encuentra en estrecha proximidad con las miofibrillas, extendiéndose longitudinalmente en paralelo con ellas y también transversalmente alrededor de ellas, mostrando una periodicidad estructural coincidente con las estriaciones de las miofibrillas.

A finales del siglo XIX ya se tenía información sobre la estructura microscópica de las fibras musculares, incluyendo la presencia de estructuras reticulares dentro de ellas. Sin embargo lo limitado de las técnicas de tinción y fijación, alimentaba las controversias sobre su naturaleza. Por ejemplo, la presencia de miofibrillas ya visualizadas por Leewenhoeck, era considerada un artefacto experimental por algunos microscopistas.

Veratti, en 1902, utilizando la tinción de plata de Golgi, demostró claramente la presencia de un sistema reticular de membranas que se extendía de longitudinalmente alrededor de las miofibrillas, y radialmente en correspondencia exacta con las estriaciones presentes en las miofibrillas. Su descripción de estas estructuras fue olvidada, redescubierta y confirmada sólo con el advenimiento de la microscopia electrónica, cuando Bennet y Porter (1953), usando esta técnica en secciones delgadas de músculo, descubrieron pequeñas estructuras tubulares o vesiculares, limitadas por membranas, que rodeaban las miofibrillas.

En analogía con el recién estudiado retículo endoplasmático, el término Retículo Sarcoplasmático se aplicó a las estructuras observadas en las fibras musculares (Porter y Palade, 1957). Para esta época estaba claro que el Retículo Sarcoplasmático estaba formado por cisternas o túbulos que se extendían longitudinalmente a lo largo de la fibra, envolviendo a las miofibrillas con interrupciones espaciadas, que coincidían con las estriaciones de las miofibrillas, para dejar espacio a vesículas que se extendían transversalmente en forma discontinua. A nivel de estas vesículas las cisternas longitudinales se ensanchan. Si bien en esos primeros estudios con microscopio electrónico no se pudo distinguir entre el Retículo Sarcoplasmático (RS) y el sistema de vesículas transversales que correspondía al retículo transversal de Veratti (1902), sí se pudieron individualizar configuraciones especiales del RS en las cuales una vesícula transversal se encontraba entre dos cisternas longitudinales formando una triada. También se pudo determinar que la localización de las triadas con respecto a las estriaciones de las miofibrillas podía variar según el animal, encontrándose que en anfibios las triadas ocurrían al lado de las líneas Z, mientras que en mamíferos se producían en la unión entre las bandas A e I.

Andersson-Cedergren (1959), utilizando cortes seriados y reconstrucción tridimensional de las estructuras presentes en fibras musculares de ratón fijadas con tetróxido de osmio, pudo demostrar que las vesículas discontinuas que constituían el elemento central de las triadas, eran en realidad túbulos continuos que se extendían

radialmente dentro de las fibras, proponiendo el término de sistema T para describirlos. Estas conclusiones han sido confirmadas en trabajos posteriores utilizando mejores métodos de fijación y de tinción.

En músculo sartorio de rana el volumen celular ocupado por el RS alcanza el 13 por ciento (Peachey, 1965), pero este valor puede variar mucho de acuerdo al tipo de músculo, siendo mucho más extenso en músculos particularmente rápidos.

Estructuralmente el RS se puede dividir en diferentes regiones: las cisternas terminales, las cisternas intermedias ensanchadas, los túbulos longitudinales y las cisternas "fenestradas". Esta secuencia determina la localización de cada una de estas regiones dentro de una mitad de sarcómero en músculo esquelético rápido de rana, tal como se muestra en las figuras 1.7 y 1.8 y en el esquema de la figura 1.10, que ilustra la disposición longitudinal del RS a lo largo de los sarcómeros. Así, las cisternas terminales se encuentran en el centro de la banda I al lado de la línea Z, las cisternas fenestradas están localizadas a nivel de la línea M, en la mitad de la banda A. A nivel de la línea Z, dos cisternas terminales se encuentran al lado de un túbulo transversal, formando las estructuras denominadas triadas, ya visualizadas en la figura 1.2. A nivel de las triadas, en los sitios de aposición de la membrana del RS y de los túbulos-T, se han descrito estructuras densas al microscopio electrónico denominadas "pies", que se repiten a lo largo de toda la distancia de aposición de las dos membranas, como se ilustra en la figura 1.7. La importante función fisiológica de estas estructuras será tratada detalladamente en los capítulos 7 y 8.

Al lado de las cisternas terminales se encuentran las *cisternas intermedias*, así llamadas porque se encuentran entre las cisternas terminales y los túbulos longitudinales. Su función no es conocida y no se encuentran en todos los músculos. Los túbulos longitudinales se funden en la zona central de la banda A para formar la región fenestrada del RS.

Estas regiones están conectadas entre sí y constituyen un solo compartimiento intracelular, como lo sugiere la microfotografía de la figura 1.7. Sin embargo en su interior, ciertas sustancias como la calsecuestrina, pueden estar preferencialmente localizadas en una

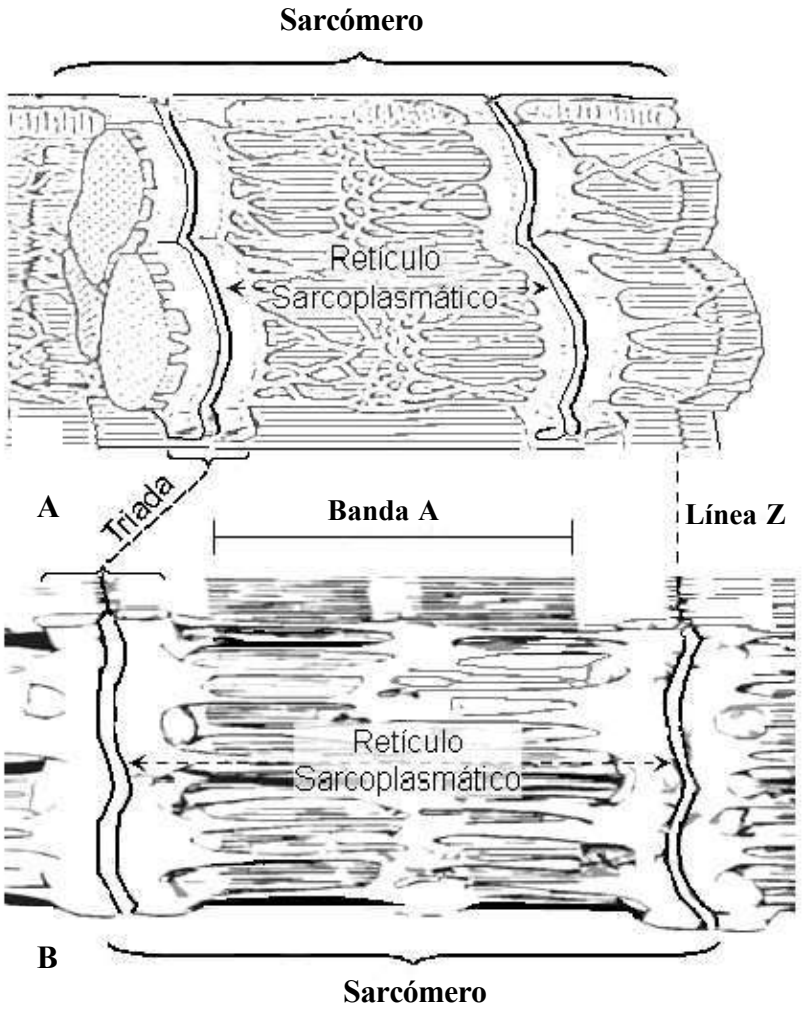


Figura 1.9. Comparación esquemática entre las estructuras de fibras esqueléticas de mamífero (**A**) y anfibio (**B**). Nótese que en anfibio los túbulos transversales se encuentran a nivel de la línea Z, mientras que en mamífero se encuentran hacia el borde de la Banda A, habiendo dos túbulos por sarcómero. (*Modificado de Peachey, 1965*).

región como las cisternas terminales, según lo muestra la figura 1.7. Además la libre difusión de sustancias en el interior del RS puede estar restringida por constricciones como ocurre en algunos músculos a nivel del sitio de unión entre cisternas terminales e intermedias, o entre cisternas terminales y túbulos longitudinales. Hay que recordar que para el caso de las fibras musculares de mamífero, los túbulos T no están localizados a nivel de la línea Z, sino a nivel de la zona de unión entre banda A y banda I, donde también se encuentran localizadas las triadas como se muestra en el esquema de la figura 1.9.

Localización de las Mitocondrias

Figura 1.10 Imagen confocal de una fibra muscular de ratón, teñida con di-8-Anneps, que marca la membrana plasmática y de los túbulos transversales y con *Mitotracker green* que marca las mitocondrias.

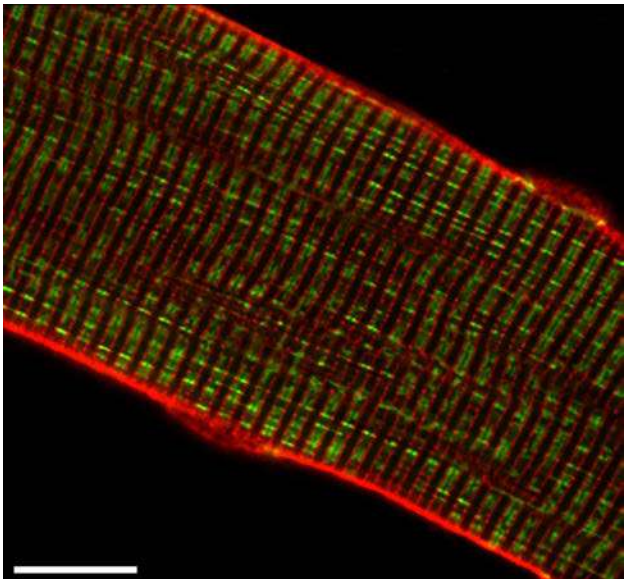


Figura 1.10. Imagen confocal de una fibra muscular de ratón, teñida con di-8-Anneps, que marca la membrana plasmática y los túbulos transversales y con *Mitotracker green* que marca las mitocondrias.

El número de mitocondrias presentes en las fibras musculares es altamente variable, esto dependerá del tipo de fibra. En general los músculos rojos tienen una mayor capacidad de resíntesis aeróbica de compuestos de fosfato de alta energía, mientras que los músculos blancos son más eficientes en la resíntesis anaeróbica de estos compuestos. La actividad ATPásica es mayor en los músculos blancos.

Cuanto más mioglobina hay, mayor es el metabolismo aeróbico y menor su actividad glicolítica. En músculos rojos por lo general se encuentran más mitocondrias que en músculos blancos.

Independientemente de esta variabilidad, e independientemente de la actividad fosforilativa de las mitocondrias, su localización dentro de las fibras musculares, aun presentando ciertas variaciones, está estrechamente relacionada con la localización del Retículo Sarcoplasmático con el cual se ha sugerido que existe una relación funcional. En la figura 1.10 se muestra una imagen obtenida con un microscopio confocal que ilustra cómo las mitocondrias, teñidas de verde con el colorante fluorescente Mitotracker green, están localizadas muy cerca de los túbulos-T, teñidos de rojo con el colorante di-8-ANNEPS. Debido a la estrecha asociación estructural que existe entre los túbulos-T y el RS, la figura muestra que en esta fibra las mitocondrias están muy cercanas a las cisternas terminales del RS. El colorante di-8-ANNEPS, no es permeable y tiñe la membrana plasmática y la membrana de los túbulos T. La imagen confocal permite también apreciar la extensión transversal de los túbulos-T dentro de la fibra (Bolaños *et al*, 2008).

CAPÍTULO 2

ESTRUCTURA MOLECULAR DEL APARATO CONTRÁCTIL

Proteínas contráctiles

El primero en extraer una proteína de músculo fue Kühne en 1864, quien utilizando músculos de rana homogeneizados a baja temperatura obtuvo una preparación que en agua a 0ºC formaba un precipitado blanco y opaco que podía ser redisuelto en solución salina (NaCl 10 %), pero precipitaba de nuevo en presencia de exceso de sal. Una solución de este material al que Kühne llamó Miosina, podía mantenerse por varios días a 0ºC, sin embargo a temperatura ambiente, coagulaba. Halliburton (1887) extendió el trabajo de Kühne y describió cómo obtener dos fracciones proteicas de un precipitado de miosina que podían separarse por precipitación selectiva a diferentes temperaturas. A éstas denominó paramiosinógeno y miosinógeno. Furth (1895) demostró que el miosinógeno no era una globulina y por lo tanto no podía ser un precursor de la miosina, y prefirió llamarlo miógeno, término que quedó en uso por mucho tiempo para indicar la fracción proteica soluble de músculo, que ahora se sabe comprende diferentes proteínas. Por otra parte Furth prefirió llamar miosina a lo que Halliburton había denominado paramiosinógeno.

La Miosina

En las primeras décadas del siglo XX se realizaron numerosos estudios sobre las propiedades físico-químicas de la miosina, en especial la naturaleza anómala de la viscosidad y la doble refrac-

ción de sus soluciones (Von Muralt y Edsall, 1930). Los resultados permitieron a estos autores concluir que la miosina era la fuente de la doble refracción de la banda A de la fibra muscular, y que sus moléculas tenían forma de bastón. Además demostraron la posibilidad de separarla en dos componentes, uno liviano y otro pesado.

La caracterización físico-química de la miosina se realizó utilizando filamentos artificiales de miosina en forma de trenzas, que se producen al inyectar una solución de miosina en un volumen de agua a través de una aguja de pequeño calibre, siguiendo el mismo procedimiento que se usaba para preparar hilos de seda (Weber, 1925a, b).

En 1939 se publicaron dos trabajos, el primero en la revista Nature (Engelhardt y Lyubimova, 1939a) y el segundo en la revista Biokhimiya (Lyubimova y Engelhardt, 1939b) que revolucionaron el campo de la bioquímica y de la fisiología muscular. En ellos se reportaba que la miosina tenía actividad enzimática de ATPasa. Existían conjeturas previas que asociaban la miosina con el ATP (Lundsgaard, 1938; Needham, 1938), sin embargo no se pensaba que la maquinaria contráctil pudiese tener una actividad enzimática importante para su función. Los autores rusos, tratando de separar la actividad enzimática de la miosina con lavados y precipitaciones repetidas, sólo lograron aumentar la actividad (específica) ATPásica de la proteína. La actividad enzimática parecía tener la misma sensibilidad a la temperatura y a los ácidos que la miosina. Esta identificación fue luego confirmada en tres laboratorios diferentes (Szent-Györgyi y Banga, 1941; Banga, 1943; Needham, 1942; Bailey, 1942).

Casi un siglo después del aislamiento de la miosina, Banga y Szent-Györgyi (1943), trabajando en la Universidad de Szeged, Hungría, repitieron el experimento de Kühne, extrayendo miosina con un tampón que contenía KCl 0,6 M. Si el extracto era dejado por 20 min a 0ºC, el sobrenadante después de centrifugar era un líquido muy poco denso, que al almacenarlo a 0ºC se ponía un poco más viscoso. Por otra parte, si el extracto de miosina era almacenado por 24 h a 0ºC se obtenía un gel semisólido que no se separaba al centrifugarlo. Si a éste se le agregaba ATP 0,25 M, se licuaba, llegando a ser parecido al extracto de 20 min. Utilizando

un viscosímetro de Ostwald determinaron que el extracto de 20 min a 0°C (miosina de Kühne), tenía baja viscosidad y no se licuaba por efecto del ATP, ellos la llamaron miosina A, y al extracto de 24h, de alta viscosidad y presentando el efecto del ATP, la llamaron miosina B. Otro colaborador de Szent-Györgyi, Straub (1943a, b) pudo demostrar que el aumento en viscosidad no se debía a un aumento en la cantidad de miosina extraída, sino a la existencia de una nueva proteína que alteraba las propiedades de la miosina A. A esta nueva proteína la llamaron **actina**. Así que la miosina de Kühne era miosina A y la miosina B era actomiosina. Estudiando las propiedades de la miosina Straub encontró dos comportamientos diferentes de la sustancia, dependiendo del tiempo de extracción en la solución ideada por Weber la cual estaba compuesta por 0,6 M KCl, 0,01 M Na_2CO_3 y 0,04 M $NaHCO_3$. Ellos además pudieron demostrar que bajo ciertas condiciones, la miosina A formaba paracristales constituidos por agregados moleculares fusiformes probablemente análogos a los filamentos gruesos. Sin embargo esta información, así como muchas otras sobre la estructura de las fibras musculares, fue prácticamente olvidada y no tomada en cuenta para la elaboración de teorías sobre los mecanismos de la contracción muscular.

La primera determinación del peso molecular de la miosina fue hecha por Portzehl (1950), quien reportó un valor de 860.000 Da. Sin embargo este se considera muy alto, posiblemente debido a que el valor del coeficiente de sedimentación de la miosina fue obtenido en soluciones medianamente concentradas. De hecho la capacidad de agregación de la miosina es una de las características más importantes de esta molécula. El valor de su peso molecular actualmente aceptado es de alrededor de 470.000 Da, pudiendo variar de acuerdo a la especie y al tipo de músculo.

Hasta hace relativamente poco se pensaba que la miosina se encontraba sólo en el tejido muscular, sin embargo a partir de 1970 se encontraron moléculas similares en una gran variedad de tejidos animales, incluyendo protozoarios, y hasta en plantas. En el caso de una ameba de agua dulce, la acantoameba, se encontró un tipo de miosina cuya molécula presentaba una estructura más sencilla, a la cual se le denominó miosina I.

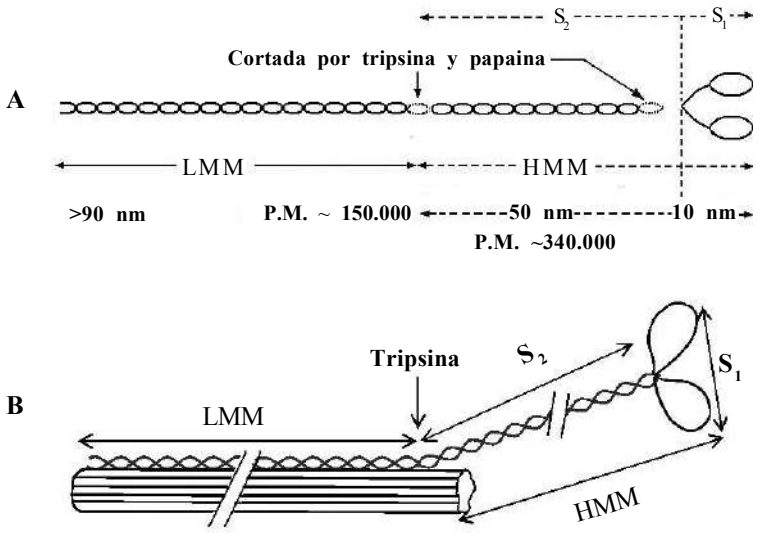


Figura 2.1. Esquema de una molécula de miosina, A y de su relación con un filamento grueso, B. (*Modificado de H. E. Huxley, 1973*).

La molécula de miosina de músculo, actualmente denominada miosina II, tiene forma de bastón alargado, con una longitud aproximada de 150-160 nm y un diámetro de 2 nm, con un extremo engrosado en forma de bulbo que tiene una longitud de 15-25 nm y un diámetro aproximado de 5 nm.

Los trabajos originales de Perry (1950) y Gergely (1950) habían demostrado que el tratamiento de la miosina con tripsina la convertía en una forma soluble, sin pérdida de la actividad. Luego Miahali y Szent-Györgyi (1952a, b) y A.G Szent-Györgyi (1952) demostraron que el tratamiento enzimático de la miosina con tripsina o papaína la divide en un sitio cercano al centro de la molécula, produciendo dos fragmentos: la meromiosina liviana o LMM (*light meromyosin*) de peso molecular cercano a 150.000 Da, constituida sólo por un segmento del bastón original de 90 nm de largo, y la meromiosina pesada o HMM (*heavy meromyosin*) con un peso molecular aproximado de 350.000 Da, formada por el otro segmento del bastón, de 50 nm de largo, y la porción globular terminal que tiene un largo de 10 nm. La figura 2.1 muestra esquemáticamente las características de la molécula de miosina (parte A)

y su relación con el esqueleto del filamento grueso (parte B). Además de tener la propiedad de agregarse, la HMM mantiene las otras dos características importantes de la miosina: la de funcionar como ATPasa y la de asociarse con la actina, constituyendo lo que viene a ser la maquinaria generadora de fuerza que, aparte de ser soluble a baja fuerza iónica, posee propiedades similares a la actomiosina. Estudios más recientes de disociación de la molécula de miosina con agentes tales como hidrocloruro de guanidina o urea a altas concentraciones han permitido demostrar que esta molécula está formada por seis unidades correspondientes a dos cadenas polipeptídicas pesadas, homólogas, de 220 KDa, y dos pares de cadenas livianas, heterólogas, de 15-20 KDa. Las cadenas pesadas están enrolladas entre sí formando una alfa-hélice de dos hebras en la parte alargada del bastón. En su terminal amino las dos hebras se separan y se pliegan individualmente para formar la parte globular constituida por dos subunidades parecidas, a cada una de las cuales se unen dos cadenas livianas, una de cada tipo.

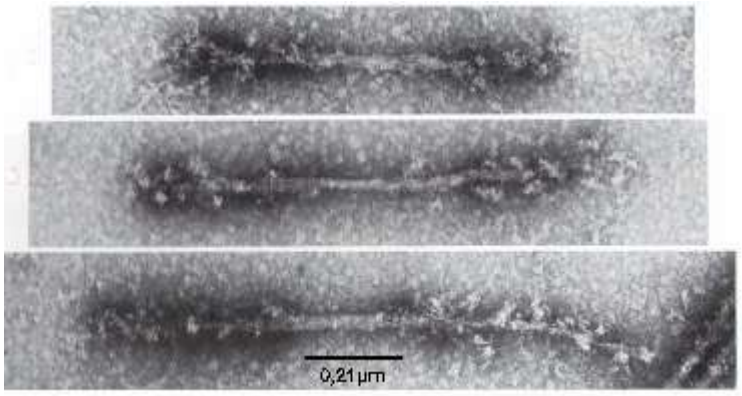


Figura 2.2. Ensamblaje de filamentos artificiales de miosina a partir de la unión de las moléculas de miosina a nivel de los segmentos de mero-miosina liviana, LMM. (*Modificado de Huxley, 1972, con permiso*).

La porción de LMM tiene la propiedad de interactuar con otras moléculas de miosina, uniéndose primero los segmentos distales de la LMM de manera antiparalela de manera que la parte correspondiente a la HMM, o cabeza, de cada molécula se encuentra en las extremidades de la estructura que se empieza a formar, como se ilustra en la figura 2.2, cuya parte central es una zona desnuda sin proyecciones de las porciones de HMM. A esta estructura se le van agregando otras moléculas de miosina de manera paralela pudiéndose de esta manera formar los filamentos gruesos en los cuales el esqueleto está formado por unidades de LMM, con unidades de la HMM sobresaliendo del esqueleto, y que corresponden a los puentes cruzados visualizados por microscopía electrónica de alta resolución como se ha mostrado en la figura 1.4 y como se muestra en el esquema de la figura 2.1. La agregación de moléculas de miosina ocurre cuando se baja la fuerza iónica del medio, y se ha postulado que ocurre por empaquetamiento de pares de moléculas, una a cada lado del filamento, a las cuales se van agregando otros pares de moléculas de manera escalonada cada 14,3 nm y con una rotación helicoidal de 42,9 nm de giro. Los filamentos artificiales así formados pueden ser de longitud variable, tienen un diámetro de 10-20 mm y muestran proyecciones parecidas a los puentes cruzados visibles en filamentos naturales observados al microscopio electrónico. Al igual que en los filamentos naturales, también en los artificiales, en la zona central del filamento de alrededor de 0,2 μm de largo, no se ven las proyecciones, independientemente del largo del filamento. Debido a que las moléculas tienen el extremo globular de un sólo lado, su asociación dentro de los filamentos ocurre de manera antiparalela como se puede ver en la figura 2.2, que muestra microfotografías electrónicas de filamentos artificiales de miosina con varios grados de agregación y en las cuales es posible identificar porciones de las moléculas individuales.

La Actina

Como ya se ha mencionado, Straub (1943a, b), estudiando la diferencias entre miosina A y miosina B, demostró que esta última resultaba de la interacción entre la miosina A y una nueva proteína,

a la que llamó actina. Trabajando con preparaciones de músculos, Straub comenzó por remover la miosina A, por medio de una extracción breve, de 20 min, con la solución de Weber, 0,6 M KCl, (1925). El residuo después de ser lavado y tratado con acetona se dejaba secar, y de este material seco se podía extraer la actina con agua. La actina también se podía extraer de los músculos por tratamiento abrasivo con arena o rompiendo la estructura de los músculos con solución de Weber alcalinizada. Una vez separada de la miosina, Straub demostró que la actina se podía encontrar bajo dos formas, ambas podían reaccionar con la miosina, pero sólo una de ellas producía la actomiosina de alta viscosidad, a ésta se le denominó forma activa y a la otra se le llamó forma inactiva. En presencia de K y Mg la forma inactiva se podía convertir en activa, proceso éste que se podía revertir por diálisis. Sin embargo la transformación de la forma activa a la inactiva se podía evitar agregando una pequeña cantidad de actina hervida, sugiriendo la presencia de un grupo prostético. La forma activa mostraba una alta viscosidad y doble refracción de flujo, indicando tener forma filamentosa mientras que la inactiva se suponía de forma globular. Szent-Györgyi introdujo los términos F-actina y G-actina para indicar las dos formas respectivamente.

Se demostró también que había ATP ligado a G-actina equimolarmente y que al separar el ATP se perdía la capacidad de polimerización. La conversión de G- a F-actina en presencia de ATP disminuye la concentración de éste, con formación de fosfato y ADP (Straub y Feuer, 1950). Mientras el fosfato es liberado en solución, el ADP es retenido en la cadena de actina y es prácticamente no intercambiable (Martonosi, 1962). La G-actina normalmente contiene un Ca intercambiable por molécula además del ATP, este Ca es retenido durante la transformación inducida por K u otro catión monovalente, y también se vuelve no intercambiable como el ADP. Cuando la concentración de Ca es muy baja o nula, el Mg puede sustituirlo.

La F-actina presenta todas las propiedades de una proteína filamentosa, con filamentos que pueden tener un largo de hasta 20 μm, sin embargo el valor promedio de los filamentos artificiales es

de 1-2 μm. La determinación del peso molecular de la G-actina presentó algunas dificultades debido a la facilidad con que se polimerizaba. Inicialmente se habían obtenidos valores tan altos como 60.000 Da, sin embargo, el valor aceptado hoy es de alrededor de 46.000 Da. La contaminación por otras proteínas, como por ejemplo la tropomiosina, durante el procedimiento de extracción, pudiera explicar la diferencia. La G-actina parece no tener subunidades ni enlaces disulfuro que puedan unir dos cadenas de polipéptidos.

El monómero está constituido por una sola cadena polipeptídica de forma globular y un diámetro de 4-5 nm con una hendidura en la cual se inserta el ATP o el ADP. Estas subunidades de G-actina polimerizan en presencia de ATP, formando filamentos de actina que son polímeros helicoidales compuestos por una doble hebra de subunidades de G-actina (Hanson y Lowy, 1963). La figura 2.3 muestra esquemáticamente el ensamblaje de las moléculas de G-actina para formar un filamento en forma de hélice, según Hanson y Lowy (1963). Aparte de ser un constituyente principal de la maquinaria contráctil de los músculos, los filamentos de actina pueden formar parte del citoesqueleto de muchas células, encontrándose unidos entre sí y con otras proteínas para formar estructuras complejas de gran rigidez. La F-actina tiene una polaridad estructural claramente demostrable cuando la miosina, la HMM o la unidad S1 interactúan con ella, formando estructuras características en forma de punta de flecha (Huxley, 1963). Cuando una unidad S1 interactúa con la actina lo hace en un ángulo constante con respecto al eje del filamento de actina, indicando que las dos hebras de actina son paralelas.

En 1965 Maruyama y Ebashi lograron una preparación de actina elaborada a partir de miofibrillas, que después de la extracción de la miosina eran tratadas con 0,6 M KI y dializadas contra 0,1 M KCl y ATP. Esta actina tenía un coeficiente de sedimentación de 40S y presentaba filamentos mucho más cortos que otras preparaciones de actina. Luego, Maruyama (1965) demostró la presencia de un factor que inhibía la formación de filamentos en su preparación de actina, este factor es conocido como α-actinina la

cual se encuentra a nivel de la línea Z. Llama la atención que, en presencia de α-actinina, la longitud de los filamentos formados artificialmente era de 1 μm, similar a la de los filamentos delgados en los sarcómeros de las fibras musculares.

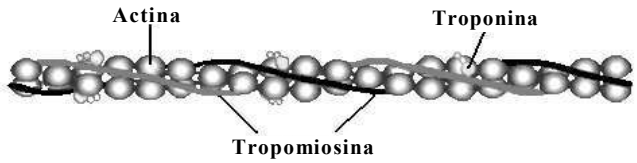


Figura 2.3. Filamento de actina formado por la polimerización de G-actina. A lo largo del filamento se encuentran las moléculas de tropomiosina y del sistema de troponina. *(Modificado de Hanson y Lowy, 1963; y Ebashi et al. 1969).*

Hoy se sabe que la actina cumple dos funciones importantes. Una es la de activar la miosina y cooperar con ésta para convertir la energía química contenida en el ATP en energía mecánica. La otra es la de proveer un sitio para las proteínas reguladoras a través de las cuales el Ca cumple su papel como activador contráctil.

Localización de la Miosina y de la Actina en los sarcómeros

La miosina presente en el músculo alcanza el 38 por ciento del total de proteínas y el 54 por ciento de las proteínas presentes en las miofibrillas, mientras que la actina constituye alrededor del 12 por ciento de la cantidad de proteína total y alrededor del 20 por ciento de la proteína fibrilar. Se logró localizar la miosina a nivel de los sarcómeros utilizando básicamente el procedimiento de extracción de miosina ideado por Albert Szent-Györgyi y Banga (1941), que consistía en una extracción en solución salina concentrada (0,47 M), aplicada a miofibrillas aisladas y bajo observación con microscopía de contraste de fase (Hanson y Huxley, 1953). La figura 2.4 demuestra que después de una breve extracción, las bandas densas A desaparecen, dejando "fantasmas" de miofibrillas formadas por líneas densas Z, y a los dos lados de estas, material fibroso de baja densidad correspondiente a los filamentos I. Por

medio de microscopía electrónica se pudo confirmar que lo que quedaba en las miofibrillas residuales eran los filamentos delgados unidos a las líneas Z. Por medio de extracciones más prolongadas en un medio de baja fuerza iónica, Perry y Corsi (1958) pudieron disolver el material correspondiente a las bandas I y las líneas Z, dejando intactas las bandas A, y encontraron que el extracto contenía actina y tropomiosina. El uso de microscopía de interferencia permitió obtener evidencia más cuantitativa sobre la cantidad de proteínas presente en los filamentos gruesos y delgados.

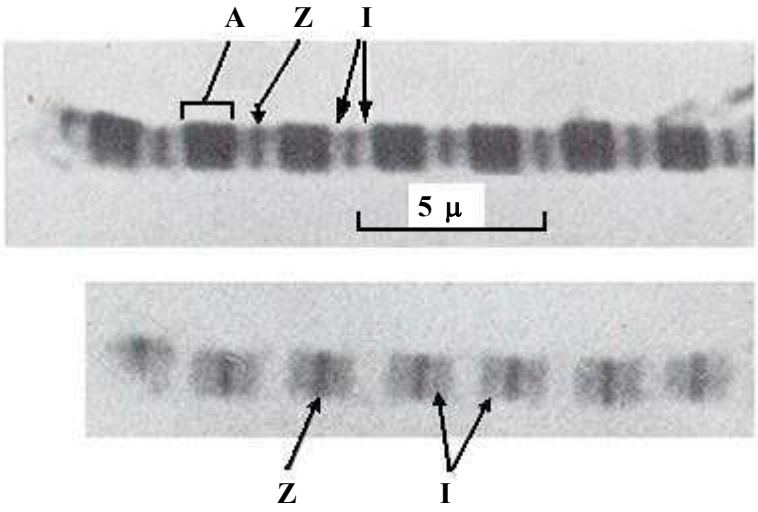


Figura 2.4. Localización de la miosina en la banda A. La foto superior muestra un segmento de una miofibrilla, mostrando la clásica estructura sarcomérica. En la foto inferior se muestra una miofibrilla después de extraer la miosina con una solución salina concentrada. *(Modificado de H.E. Huxley,1972, con permiso).*

Con esta técnica se puede medir el retardo de fase de un rayo de luz, de lo cual se puede derivar la densidad óptica y el peso seco del material, en este caso proteínas, presentes en la muestra. Utilizando esta técnica, Huxley y Hanson (1957) determinaron que la cantidad de proteína (expresada en porcentajes de la proteína miofibrillar total) presente en las bandas A, era del 50-55 por ciento, lo que concordaba con el valor de 51 por ciento obtenido

para la miosina extraída del músculo completo; mientras que el valor correspondiente a los filamentos I era del 36 por ciento, y el valor que correspondía a la actina extraída era del 30 por ciento.

Por medio de técnicas inmunológicas se ha demostrado que anticuerpos contra miosina se localizan en la banda A de miofibrillas aisladas, mientras que anticuerpos contra actina y tropomiosina se localizan en la banda I. Finalmente, las mediciones obtenidas utilizando imágenes de microscopía electrónica de filamentos artificiales de miosina y actina, indican que las dimensiones y características físicas de éstos corresponden respectivamente a los filamentos gruesos y delgados nativos (Pepe, 1966).

Toda esta evidencia no deja lugar a dudas sobre la localización de la miosina a nivel de los filamentos gruesos y de la actina a nivel de los filamentos delgados.

Actividad ATPásica de la Miosina

Después de haber demostrado la actividad ATPásica de la miosina (Engelhardt y Ljubimova,1939; Ljubimova y Engelhardt, 1939), Engelhardt y colegas (1941) fueron los primeros en probar el efecto del ATP sobre esta proteína que, como se demostró poco después, era en realidad una mezcla de actina con miosina. Ellos utilizaron la preparación de filamentos de la proteína en forma de trenza preparados según el procedimiento originalmente usado por Weber (1925), demostrando que el ATP aumentaba la extensibilidad de estas trenzas en más del 50 por ciento. Estos resultados fueron confirmados por Needham y colegas (Dainty, 1941) quienes estudiaron el efecto del ATP sobre algunas propiedades de la miosina, como la bi-refringencia de flujo y la viscosidad, encontrando que al agregar 1 mM ATP a una solución 1-3 por ciento de miosina en 0,5 M KCl la bi-refringencia de flujo aumentaba en un 40 por ciento y la viscosidad disminuía en un 14 por ciento, pero después de poco tiempo estos efectos se revertían debido al consumo del ATP.

Interacción entre Miosina y Actina

Al mismo tiempo, Albert Szent-Györgyi y Banga (1941) empezaron a estudiar el efecto del ATP sobre la miosina B. Ellos encontraron que al suspender una trenza preparada con miosina B en un extracto acuoso filtrado de músculo, esta se contraía, acortándose a menos de la mitad de su longitud inicial en unos 30 segundos. Si el extracto acuoso se dejaba 24 h, no se producía este efecto a menos que no estuviese presente el ATP junto a K y Mg. Al usar suspensiones de miosina B en 0,1 mM KCl, el grupo de Albert Szent-Györgyi demostró que el ATP en presencia de Mg causaba la precipitación de la proteína, fenómeno que él denominó "superprecipitación". Estos resultados sugirieron que el mecanismo molecular de la contracción muscular consistía en una transformación de miosina A en miosina B. Estudiando la diferencia entre las dos formas de miosina, Straub (1943) había encontrado que la miosina B resultaba de la mezcla de la miosina A con la actina. Por lo tanto el efecto del ATP sobre las trenzas de miosina B, o sobre la actomiosina, preparada artificialmente con miosina A y actina, se explicaba por la separación de las dos proteínas, y era esperado considerando el aumento de viscosidad que había sido observado cuando se mezclaban la actina y la miosina.

Con respecto a la influencia de diferentes iones sobre la actividad ATPásica de la miosina, es importante mencionar que Needham (1942) había demostrado que la actividad ATPásica de su preparación dependía de la presencia de Ca. Por otra parte Bailey (1942) trabajando en condiciones de pH alcalino, había encontrado que la actividad ATPásica de la miosina era activada por el Ca y el Mn, mientras que el Mg y el Ba no eran efectivos. Banga (1943) exploró la actividad ATPásica de la miosina A y de la miosina B: trabajando en condiciones de baja fuerza iónica (KCl 0,01 M) demostró que la miosina B era activada por Ca y Mg mientras que la miosina A era activada sólo por Ca.

Años después Mommaerts y Seraydarian (1947) encontraron que la miosina purificada era inhibida por el Mg. Esta inhibición se revertía y se trasformaba en activación en presencia de actina.

Finalmente fue Hasselbach (1952) quien estudió sistemáticamente la importancia y las condiciones de los efectos del Ca y del Mg sobre la actividad ATPásica de la miosina.

La divergencia de resultados del grupo de Albert Szent-Györgyi con los resultados previos de Engelhardt y colegas (1941) y Dainty y colegas (1941), puede explicarse por diferencias en las condiciones experimentales, y por el hecho de que el ATP, de acuerdo a las condiciones, parece tener la capacidad de activar la asociación entre miosina (M) y actina (A), o su disociación, de acuerdo al siguiente diagrama:

1) M.ATP $\longrightarrow$ M~P + ADP

2) M~P + A $\longrightarrow$ AM + P

3) AM + ATP $\longrightarrow$ M.ATP + A

La asociación entre actina y miosina energizada por ATP ha sido también estudiada en diferentes modelos contráctiles, tales como músculos, paquetes de fibras o fibras únicas extraídos con Glicerol, fibras únicas desmembradas mecánicamente (preparación de Natori) y miofibrillas aisladas mecánicamente.

La preparación de músculos psoas de conejo, o de paquetes de fibras de estos músculos glicerinados, introducida por Albert Szent-Gyorgyi (1949) fue particularmente importante ya que permitió la medida de tensión para cuantificar la respuesta contráctil de los músculos, bajo diferentes condiciones experimentales. El tratamiento por glicerol extrae la membrana plasmática dejando el sistema contráctil expuesto al medio externo. Para disminuir los retrasos de difusión, especialmente del ATP, se prefirió el uso de fibras aisladas, relativamente fáciles de obtener después del proceso de extracción con glicerol.

Otra preparación que merece un comentario especial debido a sus implicaciones estructurales para la interacción actina-miosina, es la asociación de los fragmentos S1 de miosina con filamentos

artificiales de actina, formándose las estructuras parecidas a puntas de flechas que sólo pueden ser visualizadas bajo condiciones de rigor ya que, debido a que esta estructura se descompone en presencia de ATP, es imposible visualizarla bajo condiciones fisiológicas.

Con los trabajos de Albert Szent-Györgyi y colaboradores se extendió el conocimiento sobre las proteínas contráctiles focalizando los estudios sobre la interacción Acto-Miosina ATP. Esto permitió aclarar muy bien los mecanismos de interacción entre estas dos proteínas desde el punto de vista bioquímico, pero sin asociarlo a la estructura molecular de los sarcómeros, ni a la necesidad de un activador del fenómeno contráctil. En palabras de Albert Szent-Györgyi:

> "*su mayor contribución a la fisiología muscular fue postular que la contracción muscular es una reacción entre Acto-miosina, ATP y algunos iones*."

Tropomiosina

Bailey (1946) describió una proteína de músculo cardíaco, utilizando un procedimiento de extracción que comenzando por lavar el sarcoplasma, precipitar y deshidratar el remanente constituido básicamente por proteínas fibrosas, permitía solubilizar una nueva proteína con KCl 1 M a pH 7,0, cuando ya la mayoría de las proteínas había sido desnaturalizada o precipitada. Posteriormente se encontró que esta proteína, llamada tropomiosina, se extraía junto con la actina, lo cual indicaba que formaba parte del aparato contráctil de los músculos, estando localizada en los filamentos delgados, como fue demostrado por Pepe (1966) usando técnicas inmunológicas. La tropomiosina se separa fácilmente de la actina a muy baja fuerza iónica, pero no a alta, a menos que la actina esté desnaturalizada. La tropomiosina es una proteína muy estable, con excepcionales propiedades físico-químicas por lo cual ha sido estudiada intensamente. El peso molecular de la tropomiosina es de 66.000 Da y la molécula está formada por dos cadenas de alfa hélice de 33.000 Da cada una, enrolladas entre sí, con una longitud

de 40 nm. La tropomiosina es resistente a la acción desnaturalizante de sustancias como alcohol, acetona, o éter (Bailey, 1948). La tropomiosina es soluble en agua con un pH por encima de 6,5 o por debajo de 4,5, dando lugar a una solución muy viscosa. Esta viscosidad disminuye en soluciones salinas. Una de las propiedades importantes de la tropomiosina es su tendencia a formar agregados a baja fuerza iónica. Otra, es su tendencia a asociarse con actina en forma paralela, pero la asociación no es tan fuerte como la interacción entre actina y miosina en ausencia de ATP o entre tropomiosina y troponina. La asociación actina-tropomiosina requiere la presencia de ciertos iones (0,8 mM Mg o 20 mM K). Esta última propiedad facilita su separación de la actina. La tropomiosina afecta medianamente la capacidad de asociación entre miosina y actina. Estudiando los efectos de la tropomiosina sobre la superprecipitación, o sobre la actividad ATPásica de la actomiosina, Katz (1964) encontró que la tropomiosina favorece la interacción actina-miosina si las condiciones son favorables, y la deprime en caso contrario. Su función fisiológica fue solamente aclarada en 1963, cuando Ebashi descubrió que un factor proteico, con características parecidas a la tropomiosina, y tentativamente llamado tropomiosina nativa, le confería sensibilidad al calcio al sistema contráctil, como se discute a continuación.

Proteínas reguladoras

Basada en su trabajo, A. Weber (ver Capítulo 7) había sugerido que el Ca actuaba como activador de la contracción muscular. Sin embargo quedaba por entender por qué el calcio, que resultaba efectivo para activar sistemas como fibras glicerinadas o miosina B (actomiosina natural), no era efectivo para activar la actomiosina reconstituida, preparada con fracciones puras de actina y miosina, o sea mucho más pura que la actomiosina natural. Weber y Winicur (1961) habían demostrado que la insensibilidad al Ca de la actomiosina reconstituida, dependía de la preparación de actina utilizada. Esta información impulsó a Ebashi (1960) a tratar de conseguir una preparación de actina que le confiriese a la actomiosina la debida sensibilidad al calcio, logrando preparar una fracción activa de actina, que estaba asociada a otra proteína, similar a la tropo-

miosina, por lo cual fue llamada tropomiosina nativa (Ebashi y Ebashi, 1964). Ebashi logró demostrar que el Ca a baja concentración podia inducir el fenómeno de superprecipitación de la actomiosina natural, o miosina B, libre de Ca (Ebashi, 1961), como se muestra en el experimento de la figura 2.5.

El gráfico de la figura indica el nivel de superprecipitación (como densidad óptica) que representa un modelo del sistema contráctil *in vitro*. En condiciones control, en presencia de tropomiosina y de Ca, ocurre el fenómeno de super-precipitación. En presencia de tropomiosina nativa, el sistema adquiere la sensibilidad al Ca y básicamente no hay interacción de las proteínas contráctiles en ausencia de Ca. Pero al agregar 0,2 μM de Ca, ya empieza a haber interacción que es completa en presencia de 5 μM del catión divalente. Debido a que estaba claramente demostrado que la tropomiosina no confería la sensibilidad al Ca en las preparaciones de actomiosina, pareció evidente que la tropomiosina nativa tenía que estar asociada a otra proteína que tuviese esta capacidad. Ebashi y Kodama (1965, 1966) pudieron aislar una proteína globular de 60.000 Da de masa, que tenía la característica deseada y que fue llamada troponina. En 1968 Ebashi y Endo propusieron:

a) que la troponina inhibe la interacción entre miosina, actina y ATP en ausencia de Ca;

b) que el efecto de la troponina se ejerce sobre el filamento de actina a través de la tropomiosina; y

c) que el Ca remueve la inhibición, favoreciendo el fenómeno contráctil.

Poco tiempo después Hartshorne y Mueller (1968) demostraron que en realidad había dos tipos de troponinas asociadas a la tropomiosina, troponina A y troponina B, teniendo la troponina A los sitios de unión para el Ca y la troponina B la capacidad de inhibir la interacción entre actina y miosina. Gracias al trabajo de diferentes grupos de investigadores se pudo por fin llegar a la conclusión de que había tres tipos de troponinas que fueron denomi-

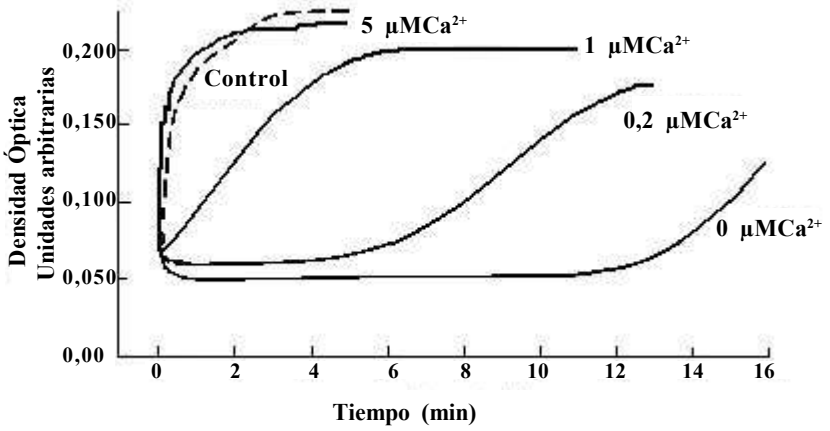


Figura 2.5. En presencia de tropomiosina nativa, la actomiosina adquiere sensibilidad al Ca. En ausencia de Ca no hay reacción de superprecipitación, que ocurre en presencia de bajas concentraciones de Ca. En ausencia de tropomiosina nativa (control) hay superprecipitación independientemente de la presencia de Ca. *(Modificado de Ebashi et al, 1973).*

nadas I, C y T (Ebashi, 1972). Siendo la I la proteína inhibitoria, la T la proteína que se unía a la tropomiosina y la C la proteína que ligaba el Ca.

El grupo de troponinas anclado a la cadena de actina a distancias regulares determinadas por la longitud de la tropomiosina, ejercía una inhibición estérica que impedía la interacción entre miosina y actina, inhibición que se anulaba si la troponina C unía Ca. La figura 2.6 muestra un experimento diseñado para aclarar el papel regulatorio de cada una de las troponinas. Midiendo los cambios de absorbancia causados por la superprecipitación del complejo actina-miosina-ATP en presencia de tropomiosina, Ebashi pudo demostrar lo siguiente:

a) en presencia de troponina nativa aumentando la concentración de Ca de $1x10^{-7}$ a $8x10^{-6}$ M se activa la reacción de superprecipitación (sección a); la troponina I inhibe la reacción de

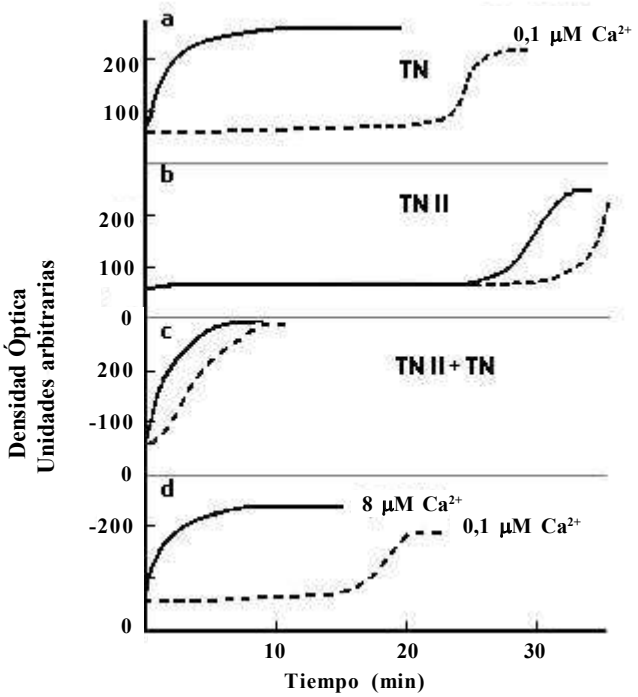


Figura 2.6. Regulación de la función del Ca por el sistema de troponinas. La interacción entre actina y miosina es inhibida por la troponina I. Esta inhibición es cancelada por la troponina C, pero independientemente del Ca. En presencia de troponina I, y C, la troponina T establece la sensibilidad al Ca. *(Modificado de Ebashi et al, 1973).*

superprecipitación, independientemente de la presencia de Ca (sección b); la troponina C, a baja concentración, revierte el efecto de la troponina I, pero quitando la sensibilidad del sistema al Ca (sección c); a concentraciones fisiológicas de troponina I y C, la troponina T establece la sensibilidad al Ca del sistema (sección d). Posteriormente Ohtsuki y colegas (1967) trabajando en el laboratorio de Ebashi, lograron separar, por medio de quimotripsina, la troponina T en dos fragmentos: T_1 y T_2, cada uno de los cuales cumple parte de la función originalmente asignada a la troponina T. Utilizando un anticuerpo anti-troponina, fue posible demostrar la localización del sistema troponina sobre el filamento de actina en músculo de pollo, con periodicidad de aproximadamente 40 nm,

consistente con la longitud de la molécula de tropomiosina (Ohtsuki *et al*, 1967). Basándose en esta evidencia se ha propuesto el modelo esquemáticamente ilustrado en la figura 2.7. De acuerdo con este modelo:

a) la tropomiosina está colocada en el surco entre las dos hebras de actina que forman el filamento delgado;

b) dos moléculas de tropomiosina colocadas en dos surcos opuestos, cubren dos grupos de 7 moléculas de actina, y;

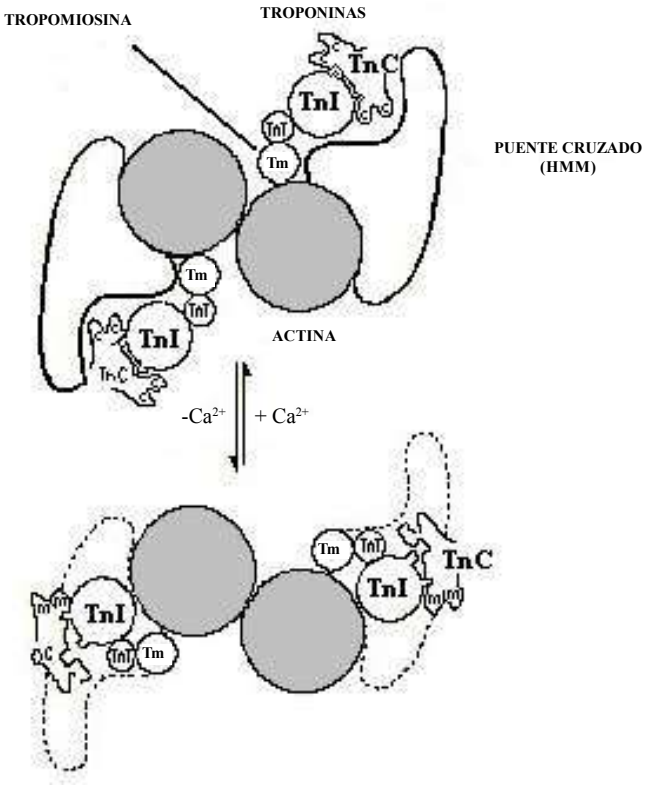


Figura 2.7. Mecanismo estérico de inhibición de la interacción miosina-actina por Troponina I (esquema inferior), y su remoción en presencia de Ca (esquema superior). *(Modificado de Huxley, 1973).*

c) la troponina está localizada en sitios específicos de la molécula de tropomiosina (Ebashi *et al*, 1969; Ohtsuki y Wakabayashi, 1972).

La figura 2.7 muestra de manera esquemática cómo el mecanismo de acción de la troponina se basa en un impedimento estérico ejercido por la troponina I, que es removido al unir calcio a la troponina C.

La troponina C de músculo esquelético rápido tiene dos tipos de sitios para el Ca: dos sitios Ca-Mg, que tienen una alta afinidad para el Ca (K_{dCa}= 2,1x10^7 M^{-1}) pero también unen al Mg competitivamente (K_{dMg}= 5x10^3 M^{-1}); y otros dos sitios que tienen que tienen una afinidad menor para el Ca (K_{dCa}= 3,2x10^3 M^{-1}), pero son específicos para el Ca y no para el Mg.

El papel de la troponina como proteína reguladora de la contractilidad está bien establecido para el caso de músculo estriado de vertebrados, sin embargo no constituye un modelo general para la regulación de la contractilidad, ya que en músculos de invertebrados como los moluscos no hay troponina, y los sitios de unión para el Ca se encuentran a nivel de las moléculas de miosina (Kendrick-Jones *et al*, 1970). Además, para el caso de los músculos lisos, la cadena liviana de miosina con actividad de kinasa (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) fosforila la miosina (Stull y colegas 1985, 1998.) y activa la contracción cuando es activada por la calmodulina unida a 4 Ca.

Otras proteínas sarcoméricas

Dentro de los sarcómeros se encuentran otras proteínas asociadas a los filamentos de miosina y de actina, como la dineína, la distrofina, la titina, etc.

La Titina, descubierta por Maruyama (1976), y antes llamada conectina, es la proteína más grande conocida, con un peso molecular de 3-4 MDa para 1 sola cadena peptídica; además es la tercera proteína en orden de abundancia en los músculos. Un fila-

mento de titina abarca la distancia entre una línea Z hasta la región M en la banda A.

Su función parece ser la de otorgarle estabilidad y elasticidad a los sarcómeros. El segmento del filamento que cubre la banda I presenta una gran elasticidad como se indica esquemáticamente en la figura 2.8. Recientemente se ha presentado evidencia (Udaka y col. 2008) que en mamíferos, la atrofia muscular debida a falta de uso, está asociada a una importante disminución, 45%, en la expresión de titina en los músculos. Además de disminución de masa muscular, la pérdida de titina está acompañada por alteraciones severas en la estructura sarcomérica; por disminución de longitud de los filamentos gruesos y delgados (tanto en fibras Tipo I que expresan sólo la miosina tipo MHC I como en fibras tipo I/II que expresan también la miosina tipo MHCII); disminución de la sensibilidad de fibras desmembranadas al Ca; y corrimiento de la curva fuerza longitud hacia longitudes menores. Estos resultados atestiguan la gran importancia de esta proteína en la integración de las funciones sarcoméricas.

A la altura de la línea M, cada filamento grueso parece estar conectado con los filamentos adyacentes por medio de filamentos muy delgados. También se ha descrito la presencia de una proteína específica llamada miomesina.

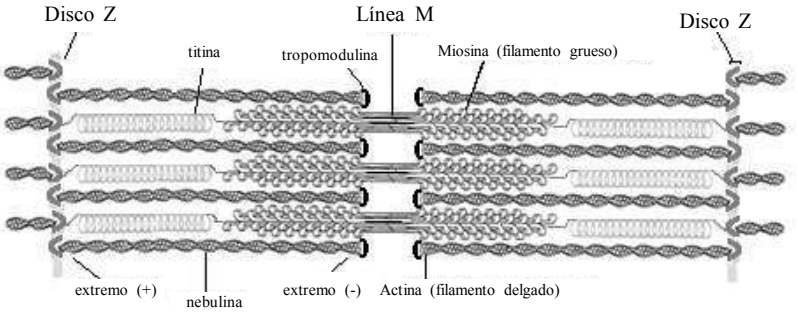


Figura 2.8. Dibujo esquemático de un sarcómero, mostrando la posible localización de diferentes proteinas contractiles y reguladoras.

En la línea Z también parecen existir filamentos cuya naturaleza no está clara. Sin embargo un constituyente bien definido es la α-actinina. La desmina parece formar un collar alrededor de cada miofibrilla a nivel de la línea Z. La β-actinina, que regula la polimerización de la G-actina, está localizada en el centro de la banda A, y no es afectada por la extracción de la miosina.

La Nebulina parece formar bandas transversales en la banda I, que han sido observadas al microscopio electrónico y también a finales del siglo XIX por microscopía de luz.

CAPÍTULO 3

MECÁNICA Y ENERGÉTICA DE LAS FIBRAS MUSCULARES

Respuesta contráctil

En condiciones fisiológicas la estimulación de un nervio motor causa la respuesta contráctil del músculo que inerva, la cual puede consistir en una sacudida simple o tetánica dependiendo de si al terminal nervioso le llega un sólo potencial de acción, o un tren de potenciales de acción, cuya duración y frecuencia pueden variar. Debido a que un único axón de un nervio motor puede inervar desde una hasta 100 o más fibras, constituyendo lo que se denomina una unidad motora, la respuesta contráctil de un músculo entero puede ser modulada bien sea aumentando el número de unidades motoras estimuladas (aumentando la intensidad del estímulo) o aumentando la frecuencia de estimulación.

Bajo condiciones experimentales, un músculo puede ser estimulado a través de su nervio motor o directamente a través de electrodos de estimulación. En todo caso, el estímulo que desencadena la respuesta contráctil de una fibra muscular es un cambio rápido y transitorio del valor del potencial de membrana de las fibras musculares o potencial de acción, que se propaga a lo largo de la fibra. Debido a la naturaleza todo o nada del potencial de acción, la respuesta contráctil de una sola fibra también es de naturaleza todo o nada, como fue demostrado por Keith Lucas (1905; 1909), y no puede ser modulada por la intensidad del estímulo, pero sí por la frecuencia de estimulación o por intervenciones farmacológicas variadas, como se verá luego. Históricamente las contracciones han sido clasificadas en dos grupos.

De acuerdo a la terminología introducida por Fick (1882), cuando un músculo se contrae a longitud constante, se tiene una contracción isométrica, mientras cuando se acorta en contra de una carga se tiene una contracción isotónica. Fenn (1941) propuso una clasificación que define mejor lo que ocurre cuando los músculos se contraen en el cuerpo y según la cual hay contracciones acompañadas por acortamiento, y contracciones acompañadas por estiramiento. Sobre todo por razones experimentales es conveniente considerar también las contracciones isométricas pero sin olvidar que pueden ocurrir cambios de longitud a nivel de los sarcómeros, o de otras estructuras internas, pudiendo algunas de éstas acortarse a expensas de otras estructuras extensibles en serie presentes en el sistema.

La figura 3.1 ilustra esquemáticamente el sistema experimental utilizado por Jewell y Wilkie (1958) para registrar contracciones isométricas e isotónicas y realizar experimentos de poscarga o de liberación instantánea, como se explicará a continuación. Para el primer caso el tope para liberación instantánea se quita y en su puesto va el cabezal de un transductor mecano-electrónico, que permite obtener registros isométricos de la tensión desarrollada, como lo muestran los mecanogramas de la figura 3.2, obtenidos estimulando a diferentes frecuencias una fibra aislada del músculo semitendinoso de *Rana temporaria* a 2ºC.

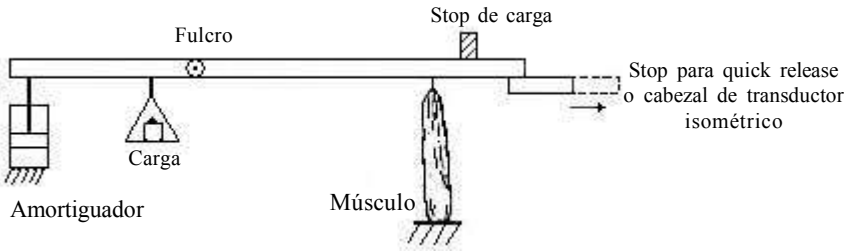


Figura 3.1. Aparato experimental para la determinación de las propiedades mecánicas de los músculos. Además de registrar contracciones isométricas e isotónicas el aparato permite realizar experimentos de poscarga y de liberación instantánea.

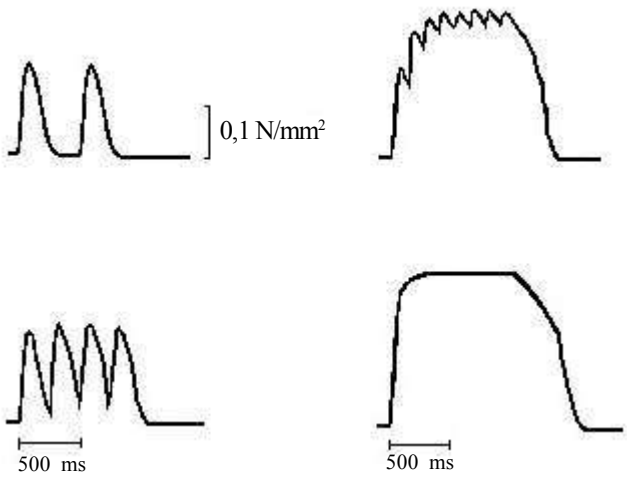


Figura 3.2. Registros isométricos de las respuestas mecánicas de una fibra aislada de *Rana temporaria* estimulada a diferentes frecuencias. Temperatura 2 ºC. (*Modificado de Caputo et al., 1994*).

En esta figura puede verse como aumentando la frecuencia de estimulación se tiene un tétano en el cual se ven los picos individuales de las sacudidas simples antes de llegar a tener un tétano completamente fusionado. Por lo general en fibras musculares de anfibio la magnitud de la respuesta contráctil de una sacudida simple es alrededor de un tercio de la de un tétano a temperatura ambiente. A bajas temperaturas, debido a la prolongación del potencial de acción, la tensión desarrollada en una sacudida simple es mayor y puede llegar al 80 % de la tensión tetánica como es el caso de las respuestas contráctiles de la figura 3.2. Para registrar contracciones isotónicas con el aparato ilustrado en la figura 3.1, se quitan tanto el tope de poscarga como el de liberación instantánea. El acortamiento del músculo puede medirse utilizando un sensor óptico que mide el desplazamiento de la leva. El músculo en este caso se contrae partiendo de longitudes diferentes determinadas por la carga. Para evitar esto, y medir contracciones isotónicas partiendo siempre de la misma longitud del músculo, se usa el tope de post-carga que impide que la carga estire el músculo. La parte superior de la figura 3.3 muestra los

registros de contracciones isotónicas, durante las cuales el músculo levanta diferentes cargas identificadas por los números que corresponden a los diferentes niveles de la fuerza alcanzada durante la contracción isométrica que aparece en la parte inferior de la figura. En los registros superiores se puede apreciar que la velocidad inicial con que se acorta el músculo es mayor cuanto menor sea la carga.

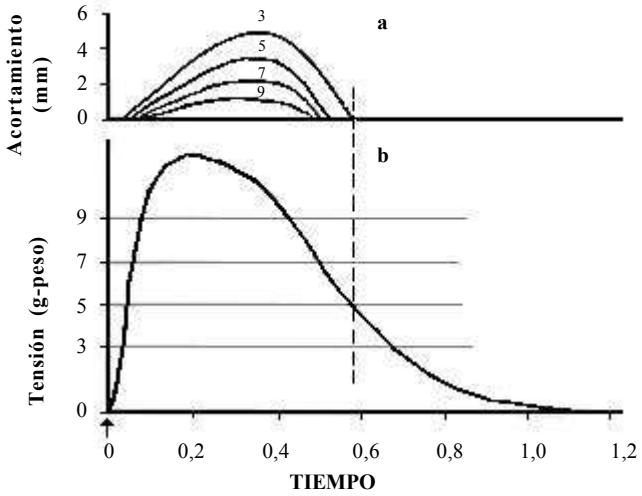


Figura 3.3. Panel inferior: registro isométrico de una sacudida simple de un músculo sartorio. Panel superior: registros isotónicos de sacudidas simples bajo diferentes cargas. Los números corresponden a los valores de la fuerza isométrica, expresados en g.peso, marcados con líneas horizontales en el panel inferior.

Relajación de latencia

La figura 3.4 muestra que existe un pequeño retraso, llamado período latente, entre un estímulo aplicado directamente a un músculo y la respuesta contráctil. El período latente depende de la temperatura, siendo 3.5 ms a 23°C y alrededor de 15 ms a 0°C. Con sistemas de alta sensibilidad, se observa que durante el período latente, el desarrollo de fuerza es precedido por una breve y pequeña relajación que depende de la longitud inicial del músculo, (Haugen y Sten-Knudsen 1976), alcanzando su amplitud máxima a una longitud de sarcómeros entre 2.8 y 3.2 μm (Mulieri, 1972).

Este fenómeno que ocurre simultáneamente con un cambio de opacidad, registrado por D. K. Hill, (1949) y que claramente antecede el desarrollo de tensión, ha sido interpretado como la primera manifestación de cambios moleculares a nivel de las proteínas contráctiles cuando un músculo es estimulado. En un trabajo reciente (Yagi, 2007), utilizando difracción de rayos X con alta resolución temporal y músculos de Rana, se ha encontrado que los cambios en la distancia entre reflexiones a 14.3 nm ocurren simultáneamente con la relajación de latencia, sugiriendo que el fenómeno se debe a la ruptura de los puentes cruzados entre miosina y actina que pueden formarse en el músculo en reposo (ver Capítulo 4).

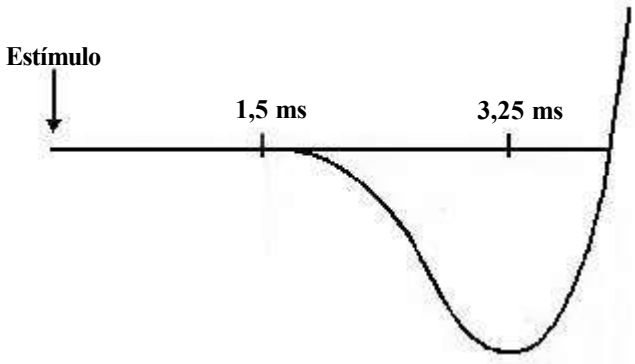


Figura 3.4. Esquema de las relaciones temporales de la relajación de latencia, con el estímulo y el desarrollo de tensión isométrica. Los tiempos están dados en ms.

Potenciación post-tetánica

Un fenómeno interesante cuya naturaleza no ha sido aun explicada en detalle es el de la potenciación de las sacudidas simples que ocurre después de un tétano. Esta potenciación, denominada post tetánica, (PPT) se desarrolla con un curso temporal de una decena de segundos después de un tétano y luego lentamente, durante varios minutos, desaparece, regresando la amplitud de las sacudidas a su nivel inicial. Este fenómeno se observa tanto en músculo sartorio (Connolly *et al*., 1971) como en fibras únicas de rana (Vergara *et al*., 1977). Estos autores han

demostrado que en fibras aisladas, soluciones hipertónicas que bloquean la contracción en respuesta a estimulación tetánica, no afectan la potenciación post-tetanica. Este fenómeno que coincide con un aumento en la duración del estado activo que sigue un periodo de actividad contráctil (Ritchie y Wlikie, 1955), ha sido explicado en términos de alteraciones homeostáticas del Ca o en términos de fosforilación de la cadena regulatoria liviana (RLC) de la miosina (ver capítulo 4); por ejemplo, Tubman y colegas (1997) han demostrado que tanto la PPT como la fosforilación de la RLC de la miosina son reducidas significativamente en músculos atrofiados experimentalmente.

Relación Longitud-Tensión

Desde principios del siglo pasado diferentes autores han estudiado la relación que existe entre la tensión y la longitud de músculos en estado de reposo y durante la actividad tetánica. La figura 3.5 muestra en la parte A, el diagrama longitud-tensión obtenido por Ramsey y Street en 1940 con fibras musculares aisladas estimuladas tetánicamente. Puede apreciarse cómo en este experimento las fibras todavía desarrollan tensión cuando están estiradas casi al doble (180%) de su longitud de reposo. Con respecto a la rama ascendente de la curva, Ramsey y Streert encontraron que al disminuir la longitud de las fibra por debajo del 60 % el acortamiento se hacia irreversible y la fibra entraba en el estado Delta. El acortamiento de la fibra se lograba estimulándola repetitivamente con los tendones libres. En la parte B se muestra esquemáticamente el procedimiento experimental que permite separar el efecto del estiramiento sobre la tensión de un músculo en reposo (curva b) de la tensión obtenida en un músculo estimulado (curva a). Puede apreciarse que el músculo en condición de reposo puede ser estirado en casi el 20 por ciento de su longitud inicial antes de que se aprecie una resistencia al estiramiento. A longitudes mayores la resistencia al estiramiento aumenta, generándose una fuerza pasiva que se suma a la activa, y de la cual debe ser sustraída para obtener la curva (a-b). La curva (a-b) y la curva en la parte A de la figura muestran la relación que existe entre la tensión tetánica y la longitud del músculo. Esta figura ilustra una de

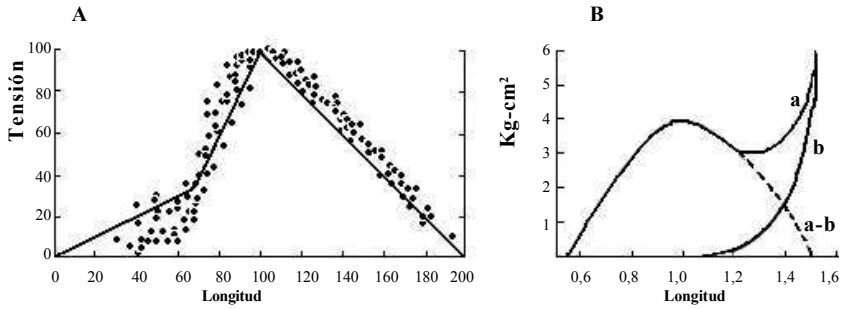


Figura 3.5. **A.** Diagrama fuerza *vs* longitud obtenido en fibras aisladas por Ramsey y Street en 1940. **B.** Diagrama esquemático de la relación tensión longitud. La curva a muestra la relación entre fuerza y longitud en un músculo estimulado. La curva b muestra la misma relación en un músculo en reposo, y corresponde al estiramiento de los elementos elásticos en serie. Restando las dos curvas (a-b) se obtiene la relación fuerza longitud del sistema contráctil.

las propiedades más interesantes del sistema contráctil muscular: la fuerza máxima que pueden desarrollar las fibras musculares depende de su longitud. Esta propiedad constituye el fundamento de la teoría de los filamentos deslizantes, que es la teoría de contracción generalmente aceptada en la actualidad y que será discutida posteriormente. La figura 3.5 B muestra claramente la diferencia entre las propiedades mecánicas de un músculo en reposo y la de un músculo contrayéndose

Teoría visco-elástica

En 1922, estudiando la eficiencia mecánica de músculos humanos, A. V. Hill había encontrado que cuanto mayor era la carga, menor era la velocidad con la cual los sujetos podían levantarla. Esta característica dependía sólo de los músculos, sin intervención del sistema nervioso, ya que como se demostró luego (Gasser y Hill, 1924) el fenómeno se repetía en músculos aislados. De hecho, este fenómeno ya había sido observado por Fick (1882), y fué

confirmado por numerosos investigadores después de Hill (1922) y de Gasser y Hill (1924). En sus experimentos Hill (1922) había medido la velocidad de contracción (V) con diferentes cargas, encontrando que el trabajo realizado (W) disminuía linealmente con la carga de acuerdo a la ecuación:

$$W = W_o - k\ V, \qquad (3.1)$$

donde **W** es el trabajo realizado, **V** es la velocidad de contracción y W_0 y **k** son constantes.

La manera mas obvia de explicar estos resultados era asumir que los músculos tenían una cierta viscosidad interna. Fick había explicado su observación suponiendo que una importante fracción de la energía elástica de los músculos era utilizada para vencer resistencias internas disipándose luego en forma de calor. De acuerdo a Fick, la naturaleza de las resistencias internas era tal que éstas aumentaban con la velocidad del movimiento muscular.

Ya desde 1922 Hill había propuesto un simple análogo mecánico que podía explicar casi todas las propiedades mecánicas de los músculos, conocidas hasta entonces. Básicamente el modelo suponía que el sistema contráctil de los músculos se comportaba como una resistencia amortiguada por una viscosidad interna, capaz de ejercer fuerza o realizar trabajo en contra de una carga, como se muestra esquemáticamente en la figura 3.6 (I). El músculo estimulado se consideraba como un nuevo cuerpo elástico, que podía almacenar energía como lo haría un resorte estirado. De acuerdo a Hill (1922) la activación contráctil estaba ligada a la liberación de energía inicial, que se manifestaba como energía contráctil en los músculos, y era utilizada indistintamente para realizar trabajo o producir calor.

Pero, cuando se deja acortar un resorte previamente estirado su energía elástica disminuye, convirtiéndose en calor si el resorte al acortarse no realiza trabajo. Si por el contrario el resorte al acortarse mueve una carga, o sea realiza un trabajo útil, la diferencia en la energía elástica entre el estado inicial y el final es

convertida en parte en calor y en parte en trabajo mecánico. Si la carga aumenta, mayor será la fracción de energía elástica convertida en trabajo y menor la convertida en calor.

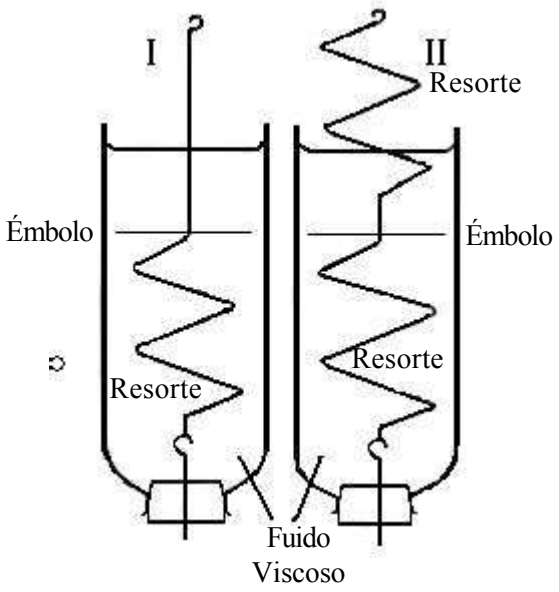


Figura 3.6. Modelos viscoelásticos. I según Hill (1922) y II. (*Modificado según Levin y Wyman, 1924*).

En realidad esta relación no se cumple para el caso de los músculos. De hecho, Fenn (1923) demostró que, para el caso de un músculo activado máximamente que se contrae de manera isotónica en contra de una carga, o sea cuando el músculo realiza trabajo, la cantidad total de energía liberada depende de la carga, siendo la energía posiblemente derivada de una reacción bioquímica acoplada a la contracción, durante la cual se consume un sustrato. Fenn concluyó que la energía liberada en una sola contracción no dependía solamente de las condiciones mecánicas y fisiológicas del músculo sino que podía ser modificada por la carga que el músculo descubría que debía levantar. Este efecto, conocido como efecto Fenn, indica la existencia de un mecanismo regulatorio propio del

sistema contráctil, que no es compatible con la teoría visco-elástica. Para explicar el "efecto Fenn" en términos de una viscosidad habría que suponer que la viscosidad en un músculo contrayéndose fuese mucho mayor que en un músculo en reposo. Experimentos adicionales, llevados a cabo por Gasser y Hill (1924) y por Levin y Wyman (1927) permitieron la reformulación del modelo original, proponiendo un análogo mecánico de un músculo activo, constituido por dos componentes en serie; de éstos, uno estaba amortiguado por una viscosidad, representando el sistema contráctil como se ilustra en la figura 3.6 (II).

Un experimento simple, ilustrado en la figura 3.7 puede servir para explicar el funcionamiento del modelo. Si durante una contracción tetánica isométrica, cuando el músculo ejerce su fuerza máxima, se permite que el músculo se acorte a diferentes niveles y se mantenga a la nueva longitud, la tensión máxima decae instantá-

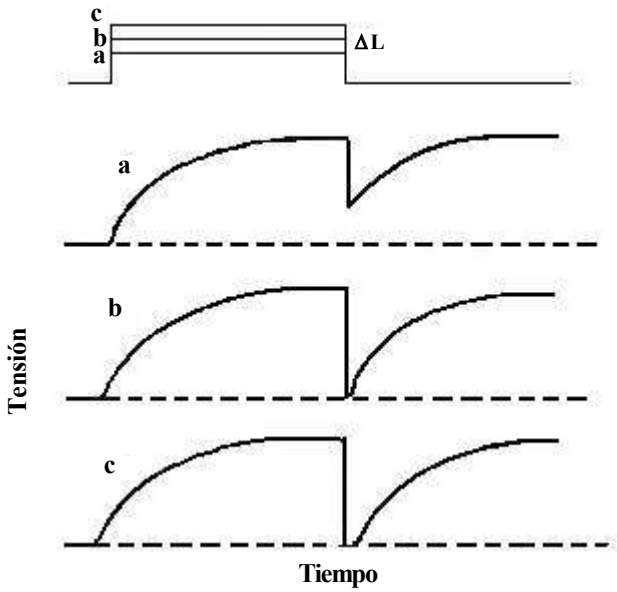


Figura 3.7. Experimento de liberación instantánea. Durante una contracción tetánica isométrica el músculo se deja acortar a diferentes longitudes, causando una caída en la tensión, que luego se recupera a la misma velocidad de la contracción inicial. (*Modificado de Gasser y Hill, 1924*).

neamente, pudiendo llegar hasta el valor cero, debido al retroceso del resorte que se acorta absorbiendo la energía contráctil del músculo, y luego la tensión se desarrolla de nuevo, debido al acortamiento del componente contráctil que estira el componente elástico. Lo interesante del experimento es que la fuerza se recupera a la misma velocidad inicial, indicando que el retraso en el desarrollo de fuerza no se debe al fenómeno de activación contráctil, sino a la presencia de un elemento elástico que amortigua el desarrollo de la tensión.

Relación Carga-Velocidad

Hill (1922), trabajando con humanos había encontrado que existía una relacion lineal entre la velocidad de acortamiento de los músculos del brazo y la carga que el sujeto podia levantar. Sin embargo, experimentos realizados con músculos de rana (Gasser y Hill, 1924), indicaban que esta relacion no era lineal, lo cual fue confirmado por Levin y Wyman (1927) quienes, utilizando diferentes tipos de músculos, tampoco encontraron una relación líneal entre la velocidad de contracción y el trabajo realizado. La relación cuantitativa entre carga y velocidad fue determinada por primera vez por Fenn y Marsh en 1935. Ellos encontraron que cuando un músculo es activado por un sólo estímulo bajo condiciones isotónicas, se acorta a una velocidad que es una función hiperbólica de la carga, contra la cual el músculo se está acortando. La figura 3.8 muestra el resultado de un experimento llevado a cabo para determinar esta relación, siguiendo el procedimiento llamado de *post-carga* con el aparato ilustrado en la figura 3.1. En el experimento el músculo se contrae en contra de diferentes cargas. El *stop* (tope) de post-carga impide que el músculo se acorte, y al ser estimulado tetánicamente se contrae de manera isométrica, como se muestra en el registro superior. Al quitar el tope a diferentes tiempos durante la contracción isométrica, el músculo se deja acortar en contra de diferentes cargas y la velocidad de acortamiento va a depender de la carga como se ilustra en los registros de la figura 3.8.

En los experimentos ilustrados en las figuras 3.3 y 3.8 la velocidad de acortamiento se medía antes de que la tensión isométrica hubiera llegado a su máximo valor, y cabe la posibilidad

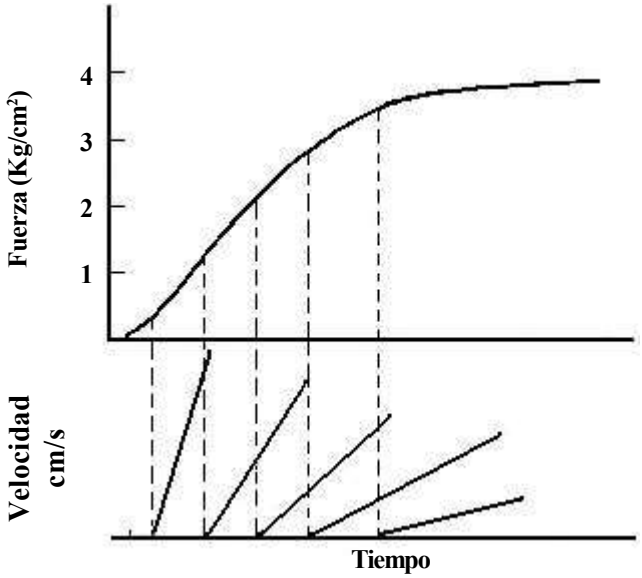


Figura 3.8. Experimento de poscarga para determinar la velocidad de acortamiento en contra de diferente cargas. El registro superior representa una contracción tetánica isométrica. Los registros inferiores muestran la velocidad de acortamiento del músculo levantando las cargas correspondientes, a los niveles de fuerza del tétano isométrico, marcados por las líneas verticales.

que los valores de la velocidad, así obtenidos, no fuesen los valores máximos posibles. Para aclarar este punto y al mismo tiempo caracterizar los elementos elásticos en serie, Jewell y Wilkie (1958) utilizaron un elegante método, denominado de liberación instantánea, que después de algunos años, con instrumentación mejorada, y con mayor resolución temporal, permitiría determinar las propiedades mecánicas de los puentes cruzados. Este procedimiento consiste en interrumpir un tétano isométrico quitando el tope ilustrado en la figura 3.1 y dejar que el músculo se acorte en contra de diferentes cargas. Los registros de la figura 3.9 indican que inmediatamente después de quitar el tope se observa un acortamiento del músculo, casi instantáneo, debido al acortamiento pasivo de los elementos elásticos en serie. Esta fase es seguida por un cambio de longitud más lento, debido al acortamiento a velocidad constante, de los elementos contráctiles. La relación carga-velocidad así obtenida se

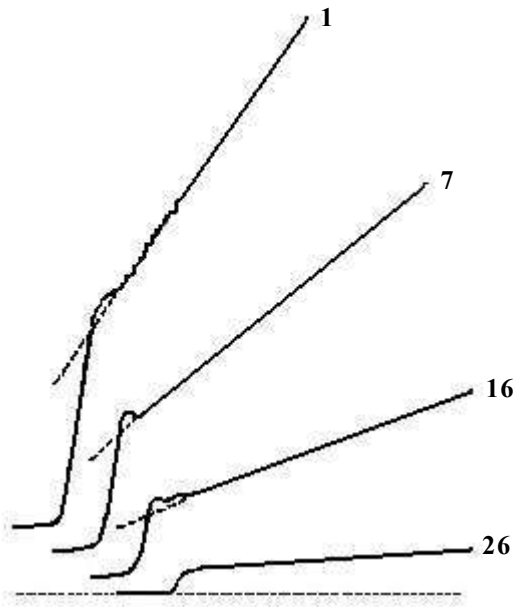


Figura 3.9. Registros de acortamiento de un músculo en contra de diferentes cargas en un experimento de liberación instantánea. En este tipo de experimento el músculo se acorta durante la fase de meseta cuando ha alcanzado el nivel máximo de activación. (*Redibujado de Jewell y Wilkie, 1958, con permiso*).

presenta en la figura 3.10. La magnitud del acortamiento se determina por extrapolación de la fase lenta de acortamiento.Confirmando los resultados de Fenn y Marsh (1935), Hill (1938), había demostrado que una de las funciones que podía describir esta relación era la de una hipérbola cuadrática:

$$(P + a)\ (V + b) = (P_0 + a)\ b = \text{constante} \qquad (3.2)$$

en la cual **V** es la velocidad de acortamiento, **P** es la carga, $\mathbf{P_0}$ es la carga máxima equivalente a la tensión máxima desarrollada durante un tétano isométrico y **a** y **b** son dos constantes características del estado contráctil del músculo, cuyos valores son definidos por:

$$a = 1/4P_0 \qquad y \qquad b = a/\ P_0V_{max}$$

respectivamente. La curva descrita por esta ecuación e ilustrada en la figura 3.10, expresa la capacidad de los músculos de convertir energía de acuerdo a las condiciones experimentales, pudiéndose establecer correlatos entre experimentos mecánicos y experimentos en los que se mide la producción de calor, como se verá luego al tratar el tema de la Energética de la contracción muscular.

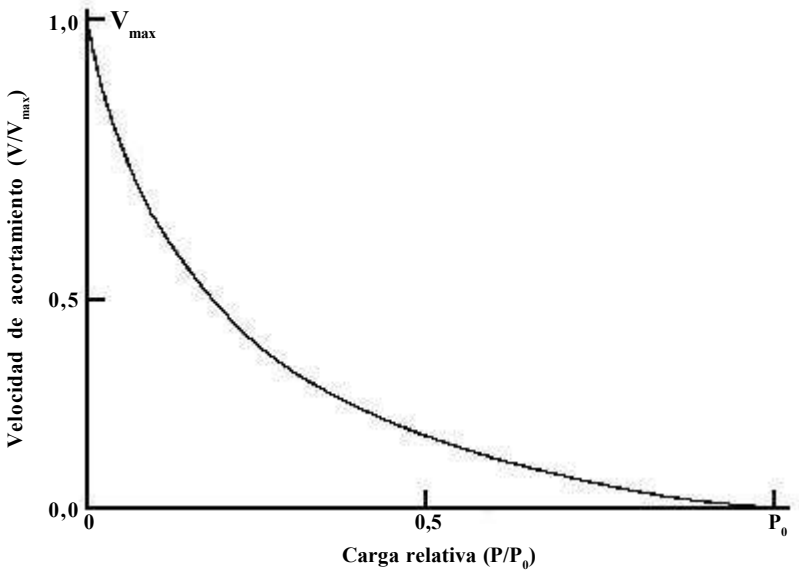


Figura 3.10. Relación entre la velocidad de acortamiento de un músculo y la carga contra la cual se deja acortar, obtenida en un experimento similar al de la figura 3.9. El punto Po, corresponde a la carga máxima, o sea a la tensión isométrica. (*Redibujado de Jewell y Wilkie, 1958 con permiso*).

Los resultados obtenidos por Jewell y Wilkie, confirmaban los resultados previos de Fenn y Marsh (1935). Además, los autores pudieron determinar la relación entre la carga y la extensión de los elementos elásticos en serie, que se manifiesta como el primer componente de los trazos presentados en la figura 3.9. La relación entre la velocidad de acortamiento y la carga contra la cual el músculo se acorta, realizando trabajo, constituye otra de las

propiedades importantes de los elementos contráctiles, ya que indica que, contrariamente a lo que ocurre en un sistema elástico simple, una fibra muscular es capaz de ajustar su desempeño contráctil, y por ende ajustar su gasto energético de acuerdo a la carga. Es importante destacar que esta característica de los músculos se basa en el hecho que la velocidad con que el músculo se acorta se ajusta contínua y precisamente a la fuerza activa desarrollada por el aparato contráctil. Así, cuando la carga es pequeña, la fuerza desarrollada por el músculo se hace pequeña aumentando adecuadamente la velocidad de acortamiento. Por otra parte, cuando la carga es grande la fuerza activa aumenta a un nivel adecuado disminuyendo en lo necesario la velocidad de acortamiento.

La figura 3.11 muestra el modelo mecánico de un músculo, propuesto por Jewell y Wilkie (1958), también basado en las ideas de Hill. Este análogo mecánico, compatible con los resultados experimentales, considera un músculo constituido por elementos contráctiles, o generadores de fuerza, que en estado de reposo son altamente extensibles, asociados con dos sistemas elásticos, uno en serie y el otro en paralelo con los elementos contráctiles. Debido a la gran extensibilidad de los elementos contráctiles, que en estado de reposo es muy grande, las propiedades mecánicas de los músculos en reposo están determinadas por los elementos elásticos paralelos. Las propiedades del componente elástico en serie están definidas por ser su longitud totalmente dependiente de la fuerza, mientras que el componente contráctil es definido por la relación entre fuerza y velocidad que indica que a cada instante la velocidad de acortamiento del músculo depende de la fuerza o carga, en contra de la cual el músculo se contrae.

Hasta recientemente se había considerado que los elementos elásticos en serie podían estar constituidos por los tendones, los sarcómeros no activados, o algún componente mecánico del sistema experimental. Estudios recientes han demostrado la presencia de otras proteínas dentro de los sarcómeros, que ya se mencionaron, como la titina y la nebulina que también pudieran contribuir a las propiedades elásticas de las fibras musculares. Inclusive se ha demostrado que elementos constituyentes de los generadores de fuerza contribuyen a la elasticidad en serie como se verá luego. El

sistema elástico en paralelo está constituido por el sarcolema, el sistema de membranas intracelulares y el tejido conectivo, epimisio y perimisio.

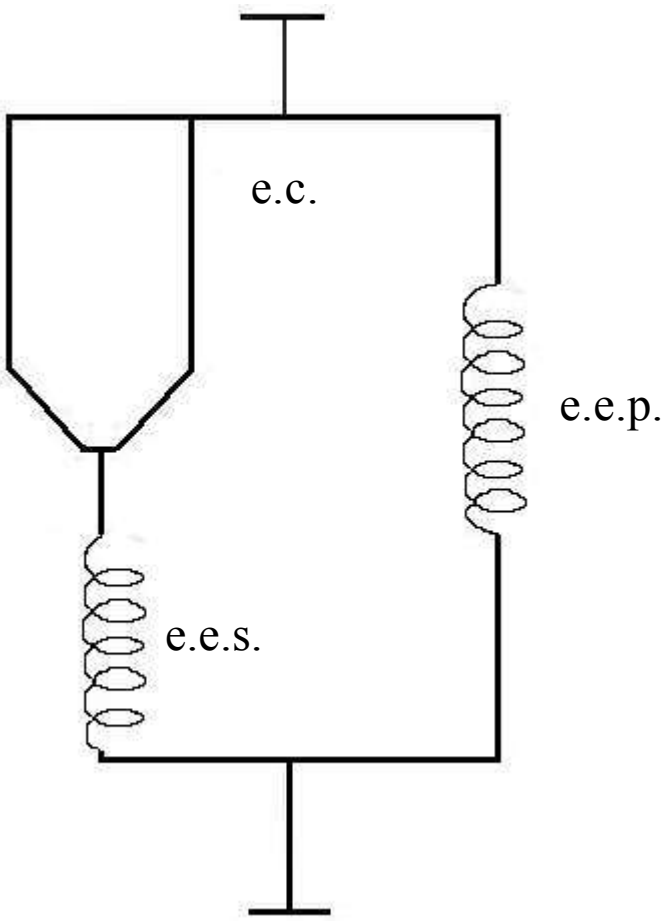


Figura 3.11. Análogo mecánico de un músculo con un componente contráctil un elemento elástico en serie y uno en paralelo (*según Jewell y Wilkie, 1958*).

Estado activo

De acuerdo a Hill, inmediatamente después del estímulo, y antes de que se detecte desarrollo de fuerza contráctil, las fibras musculares alcanzan un estado de plena activación llamado estado activo, durante el cual aumenta la resistencia de las fibras al estiramiento. Hill (1938) había propuesto que durante una contracción isométrica el componente contráctil se acorta a expensas del componente elástico en serie.

Es justamente la presencia de los elementos extensibles o elásticos dispuestos en serie, que causa el retraso de la manifestación contráctil con respecto al estado activo, evidenciado por el cambio de rigidez de la fibra, ya que estos elementos deberán ser estirados por los elementos contráctiles antes de poder verse el resultado externo de la activación contráctil. En una sola sacudida el estado activo no dura lo suficiente para que los elementos elasticos en serie, o EES, sean estirados completamente, por lo tanto la fuerza desarrollada en una sacudida no alcanza el máximo valor posible. Debido a los efectos atenuadores de los EES, el desarrollo de tensión y la relajación quedan rezagados con respecto a la fase de subida y de caída del estado activo.

Por otra parte, durante una sacudida tetánica, la estimulación repetitiva prolonga la duración del estado activo de manera que los elementos contráctiles pueden estirar los EES y el músculo logra desarrollar su fuerza máxima.

El efecto retardador de los EES pudo ser puesto en evidencia dejando acortar un músculo durante una contracción, o estirándolo rápidamente a diferentes longitudes después de la estimulación. En la figura 3.7 ya se ha mostrado un experimento de liberación instantánea realizado por Gasser y Hill (1924) en el cual se demostraba la existencia de un retraso que no dependía del fenómeno de activación de la contracción. Un experimento contrario puede hacerse estirando un músculo durante una contracción.

En la figura 3.12 se muestra un ejemplo idealizado del procedimiento experimental seguido. En el gráfico, P_n representa el mecanograma de una sacudida simple; P_i la fuerza intrínseca del

elemento contráctil en todo momento, o sea la tensión en la cual ni se acorta ni se estira. P_s es la tensión desarrolladla en un músculo estirado rápidamente inmediatamente después del período latente, justo lo necesario para que el componente contráctil ni se alargue ni se acorte; P_o el valor de la tensión isométrica máxima, equivalente al valor máximo de P_i y P_s. El valor inicial de P_i es P_0, la tensión máxima durante una contracción tetánica y durante la fase de desarrollo de tensión en una sacudida simple P_n empieza a subir porque el componente contráctil está estirando al componente elástico en serie. Debido a que el período de activación durante una sacudida simple es corto, P_i empieza a declinar y su valor se va acercando al de P_n hasta que se cruzan cuando este alcanza su máximo valor. Desde este punto en adelante el proceso se invierte, y ahora el elemento elástico en serie estira el elemento contráctil. Así que de un lado del valor máximo, P_0 es menor que P_i porque el componente contráctil se está acortando, y del otro lado P_n es mayor que P_i porque está siendo estirado. Durante la fase de relajación el componente contráctil se resiste al estiramiento con una fuerza mayor que P_i. En el caso en que el músculo sea estirado rápidamente durante una sacudida de manera que se alcance la tensión máxima P_0, cuando empieza la fase de relajación la fuerza P_i del componente contráctil se hace menor que P_0 y empieza a ser estirado. A medida que la relajación continúa, P_s decae estando siempre retrasado con respecto a P_i.

Trabajos posteriores permitieron determinar el curso temporal del estado activo, demostrándose que éste dependía de la longitud de los sarcómeros, a pesar de la contradicción inherente a la definición inicial basada en un experimento en el cual justamente se cambiaba la longitud del músculo. Una manera de resolver el problema, propuesta por Edman y Kiesling (1971), es definir el estado activo como el estado en que los elementos contráctiles pueden generar fuerza o acortarse. Estos autores determinaron que en fibras aisladas de rana a 2ºC, el estado activo se establece en menos de 10 ms y por lo tanto parece coincidir con la liberación masiva de calcio del RS. Este estado correspondería entonces al tiempo en que el Ca esté unido al sistema de troponina. El avance en las técnicas de medición del calcio extracelular han permitido deter-

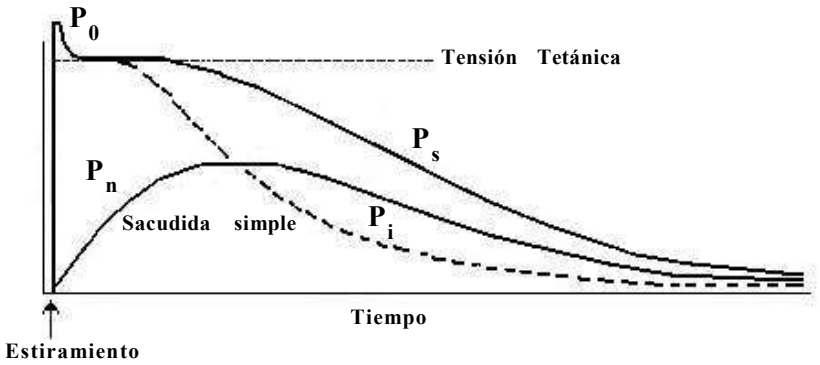


Figura 3.12. Efecto de un estiramiento inicial sobre la tensión de una sacudida simple. El experimento demuestra la capacidad de músculo en alcanzar la tensión tetánica máxima, de acuerdo con el concepto de *estado activo* de A.V. Hill. (*Modificado de Hill, 1949*).

minar precisamente el curso temporal de la elevación del Ca intracelular durante el proceso de activación y, notablemente, dicho curso temporal se establece muy rápidamente después de la estimulación de las fibras musculares. De manera que parece posible identificar operacionalmente el estado activo con el período en que la concentración míoplasmática de Ca es alta. De acuerdo con esto, el aumento en la concentración de Ca determinaría la fase de establecimiento del estado activo, mientras que los mecanismos de recaptura del Ca determinarían la velocidad de disociación del Ca de la troponina y por ende el tiempo de duración del estado activo.

Energética de la Contracción Muscular

Los músculos constituyen una maquinaria especializada para movimiento y realización de trabajo. La energía que se necesita para cumplir estas funciones proviene de reacciones químicas, cuya naturaleza ha sido objeto de estudio por más de ciento cincuenta años. En realidad, Von Helmoltz (1848) trabajando en el problema de conservación de la energía, había sido el primero en interesarse en el origen de la energía necesaria para la contracción muscular. Heidenheim (1864), trabajando con un equipo muy sencillo y de

escasa sensibilidad, obtuvo la primera evidencia de que la energía total liberada, cambiaba cuando cambiaban las condiciones de la contracción muscular. Según Fick (1882), este fue uno de los descubrimientos fisiológicos más relevantes de la época. Como contraparte bioquímica, Heidenheim demostró que en dos músculos, estimulados bajo cargas diferentes, una liviana y la otra pesada, por un tiempo prolongado, el cambio de color del papel de tornasol era mayor en el músculo que había realizado mayor trabajo. Fick también llegó a la conclusión de que los procesos que ocurren en músculos estimulados tienen un origen y naturaleza diferentes a los que ocurren en una banda de goma elástica que es estirada.

Producción de calor

A principios del siglo XX los estudios de calorimetría experimentaron un gran avance, gracias a A.V. Hill, quien empezó a utilizar una termocupla integrada a un galvanómetro, originalmente desarrollada por Blix en Suecia, y luego utilizó termopilas mejoradas y galvanómetros siempre mas rápidos, lo cual le permitió a el y a sus colaboradores dominar el campo de la calorimetría muscular durante los primeros cincuenta años del siglo XX.

La figura 3.13 muestra el registro de una contracción tetánica de 300 ms de duración, obtenido con un músculo sartorio de Rana bajo condiciones isométricas, acompañado por el registro de producción de calor. Puede notarse que en el registro de calor se nota un componente inicial que antecede al movimiento, y corresponde al calor de activación, que está ligado a los eventos que conllevan al estado activo. Este componente es igual en condiciones isométricas o isotónicas. Al terminar la estimulación, al comienzo de la relajación, hay una segunda fase de liberación de calor justamente asociada a la fase final de la contracción. Según Hill y Hartree (1920) la producción de calor de un músculo contrayéndose, podia ser dividida en cuatro fases: Calor Inicial, Calor de mantenimiento, Calor de relajación y Calor de recuperación.

Inicialmente se pensaba que las contracciones isométricas fuesen mas sencillas de estudiar, sin embargo como lo relata Fenn

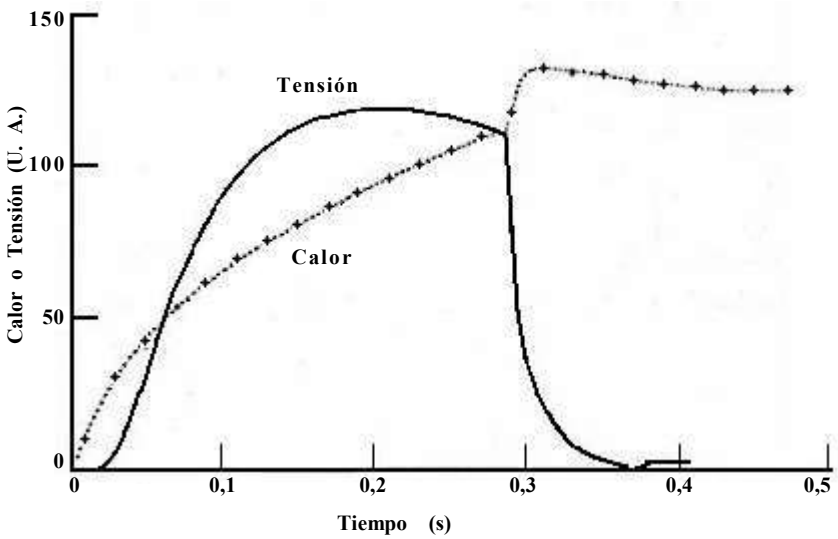


Figura 3.13. Registro del calor asociado a una contracción tetánica isométrica, nótese como la liberación de calor empieza antes del desarrollo de tensión, y se mantiene por mucho tiempo después.

(1945), ya desde 1922, Hill se había dado cuenta de que aun bajo condiciones isométricas, los músculos podían experimentar acortamientos internos difíciles de medir y de cuantificar, por lo cual prefirió llevar a cabo experimentos bajo condiciones isotónicas. Cuando un músculo se contrae acortándose y realiza trabajo, se libera una cantidad extra de calor, que es cuantitativamente igual al trabajo hecho. De acuerdo con Fenn (1945), y solamente agregando el calor de activación, se puede dividir el calor liberado durante una contracción en las siguientes fracciones:

1. **Calor de contracción**
   a) calor de activación
   b) calor de acortamiento
   c) calor asociado a trabajo
   d) calor de mantenimiento

2. Calor de relajación

3. Calor de recuperación

a) aeróbico

b) anaeróbico

Bajo condiciones aeróbicas, durante una contracción asociada a una sacudida simple o a un tétano, el calor que se libera puede ser dividido en dos fases: el calor inicial y el calor de recuperación o calor retardado. El calor inicial esta constituido por el calor de contracción y el de relajación. Durante una sola sacudida, el calor inicial dura lo que dura la contracción, o sea una fracción de segundo. Este calor inicial es seguido por el calor de recuperación, que a pesar de ser parecido en magnitud puede durar hasta diez minutos.

Para caracterizar el calor de recuperación, Hill y Howarth (1959) midieron la producción de calor de músculo sartorio de rana, a 20°C en atmósfera de oxigeno, de $10x10^{-4}\times erg\times gm^{-1}\times min^{-1}$ correspondiente a $2{,}4x10^{-3}$ $cal\times gm^{-1}\times min^{-1}$. Al estimular un músculo isométricamente se producía una cantidad adicional de calor.

La figura 3.14 muestra la diferencia en el curso temporal de producción de calor asociado a dos contracciones obtenidas en condiciones normales y en atmósfera de nitrógeno, respectivamente. En el registro obtenido bajo condiciones aeróbicas, al terminar el período de estimulación, la producción de calor disminuye abruptamente a valores bajos pero apreciables, que continúan bajando lentamente por un período muy prolongado, de manera que el valor total del calor de recuperación es aproximadamente igual al valor del calor inicial. Bajo condiciones anaeróbicas, o sea en atmósfera de N_2, el calor inicial es ligeramente reducido, mientras que el componente que decae lentamente, y que corresponde al calor de recuperación, desaparece. La pequeña disminución en el calor inicial se debe a que desaparece el calor de recuperación correspondiente al tiempo que dura el tétano. Este hecho junto con la observación de que la tensión desarrollada bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas es la misma, indica que la energía necesaria

para la contracción muscular se deriva de reacciones no-oxidativas, de acuerdo a los resultados de D. K. Hill (1940) referentes a mediciones de consumo de oxígeno. El componente de calor de recuperación desaparece cuando los músculos están en atmósfera de N_2.

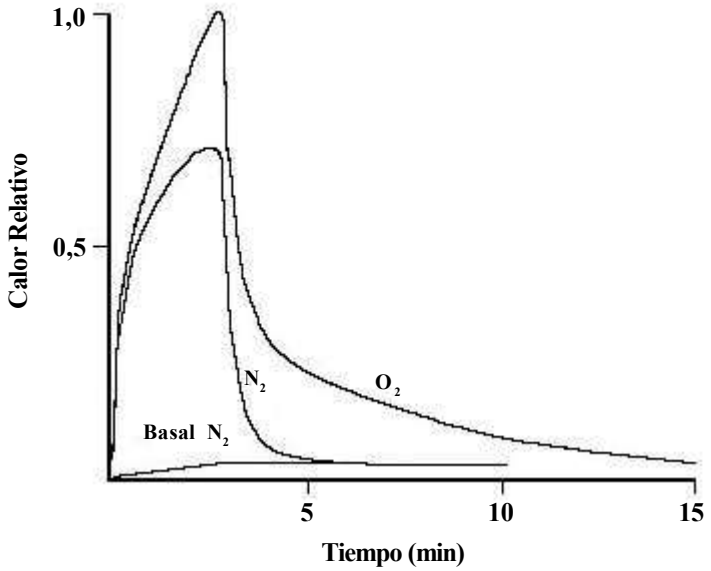


Figura 3.14. Producción de calor durante un tétano isométrico bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El experimentos demuestra que el calor de recuperación está ligado a reacciones metabólicas oxidativas. (*Modificado de Hill y Howarth, 1959*).

Calor de activación

La figura 3.15 muestra un registro simultáneo del acortamiento y del calor liberado por un músculo contrayéndose isotónicamente en respuesta a un estímulo simple. Puede notarse como la liberación de calor antecede el acortamiento del músculo. Esta observación indicaba la existencia del calor de activación; de trabajos posteriores de Hill surgió el concepto de que el calor de activación no

estaba relacionado con el desarrollo de la actividad mecánica, y que representaba la activación del mecanismo que ponía el músculo en capacidad de acortarse y realizar trabajo. Hill (1948) también reportó un método bastante complicado para la determinación exacta de la magnitud y el curso temporal del calor de activación. Sin embargo, procedimientos mas sencillos para medir el calor de activación han sido desarrollados por diferentes autores, incluyendo el uso de dos estímulos aplicados variando la separación entre ellos, (Gibbs y colegas, 1964) o eliminando el fenómeno contráctil utilizando soluciones hipertónicas o estirando los músculos por encima de la longitud de solapamiento entre filamentos gruesos y delgados (Homsher y Kean, 1978; Yamada, 2005).

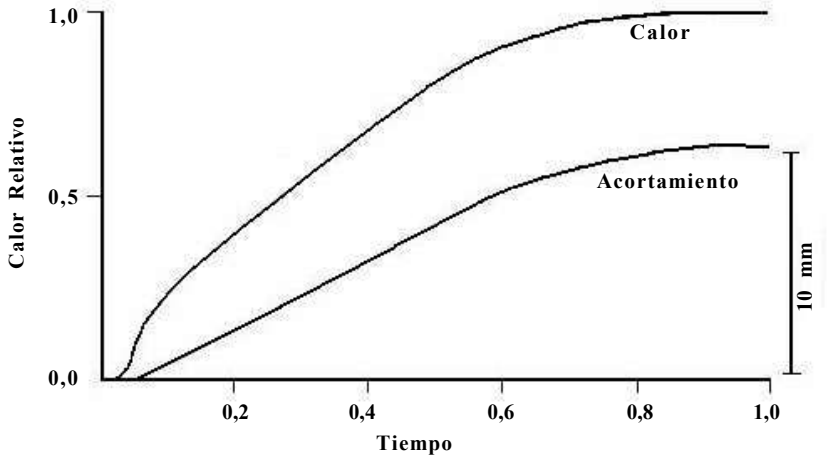


Figura 3.15. Determinación del calor durante un twitch isotónico a 0 ºC. En otros experimentos se había determinado que el calor registrado bajo condiciones isométricas era menor.

Calor de relajación

Cuando un músculo se contrae y se relaja isotónicamente, el trabajo realizado acortándose en contra de una carga aparece en el músculo como calor de relajación. En la figura 3.16 el registro **B**

representa el calor que se libera durante una contracción isotónica con post-carga en la cual el músculo está realizando trabajo levantando una carga pesada, digamos 50 gr y acortándose lentamente como se muestra en el registro **b**. Cuando el estímulo tetánico termina, a los 0,6 s, y el músculo deja de acortarse, es liberado de la carga mediante un dispositivo electro-magnético y el músculo se relaja lentamente en contra de una carga pequeña. Sin embargo si la carga no se elimina y se deja libre para que pueda estirar el músculo, este recupera su longitud inicial, como lo muestra el registro **c**. En este caso la energía potencial almacenada en la carga, equivalente al trabajo hecho por el músculo, aparece como calor, como lo muestra el trazo **C**.

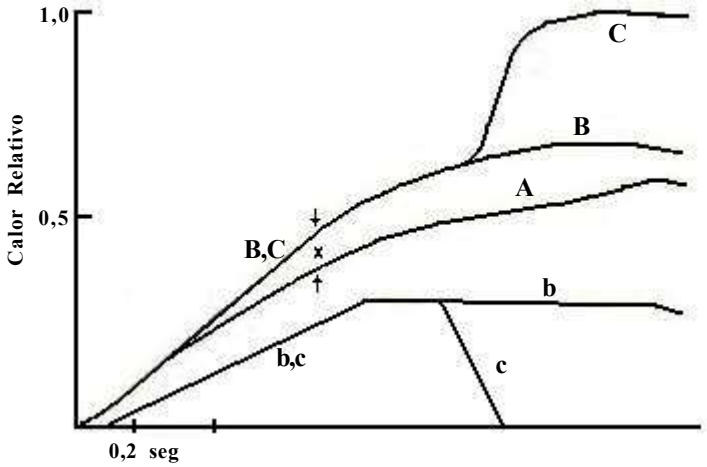


Figura 3.16. Determinación del calor de relajación según A.V. Hill. (*Modificado de Hill y Hartree, 1920*).

Calor de acortamiento

Durante una contracción isotónica, cuando un músculo se contrae en contra de una carga, convierte energía química en trabajo y en calor. El trabajo depende de la carga y del acortamiento. En 1938 Hill publicó un trabajo en cual demostró la presencia de un componente del calor liberado que dependía del acortamiento del músculo y no dependía de la carga.

Este punto reviste una particular importancia ya que ha tenido consecuencias importantes para el entendimiento de los mecanismos que regulan la función contráctil de los músculos.

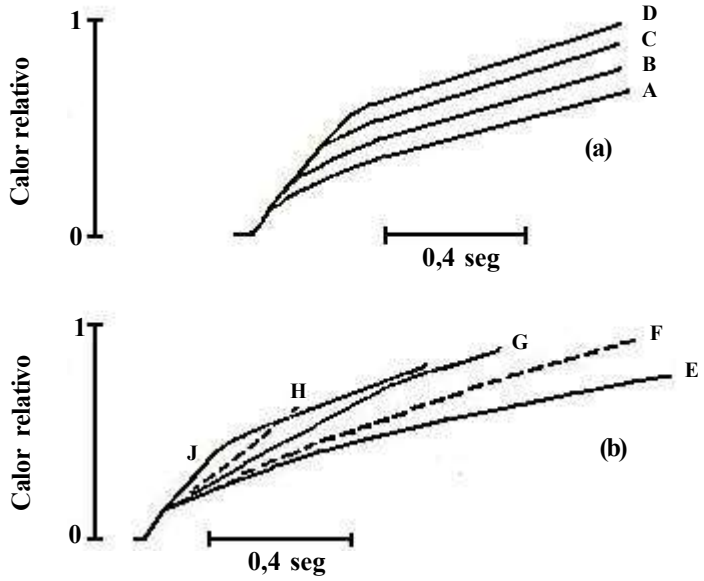


Figura 3.17. Producción de calor asociado a acortamientos controlados durante tétanos isotónicos a 0ºC. Los trazos A en **a**) y E en **b**) representan el calor liberado durante tétanos isométricos. (*Modificado de Hill, 1938*).

En 1938 A.V. Hill, utilizando termopilas y galvanómetros adecuadamente mejorados en cuanto a su sensibilidad, pudo demostrar que cuando un músculo se acorta durante una contracción tetánica, libera energía extra bajo dos formas: como calor de acortamiento y como trabajo mecánico externo. Un punto importante a destacar es que Hill consideró que el calor de acortamiento sólo dependía del cambio de longitud del músculo y era independiente de la carga. Estas conclusiones estaban basadas en experimentos en los cuales se medía la producción de calor de un músculo bajo diferentes condiciones experimentales. En la figura 3.17, en el panel superior se muestran registros superimpuestos de calor, en los cuales un músculo estimulado tetánicamente se dejó contraer isotónicamente dejándolo acortar a tres diferentes longi-

tudes: B, C y D correspondientes a 3,4, 6,5 y 9,6 mm en contra de una carga de 1,9 gr. El trazo A corresponde a una contracción isométrica. Puede notarse cómo inicialmente el calor de acortamiento se suma al calor de activación y luego, debido a que la carga es la misma, y el calor de mantenimiento no depende del cambio de longitud del músculo, los trazos corren paralelos. Puede verse cómo el aumento de calor liberado depende del cambio de longitud del músculo.

En el panel inferior de la figura se muestran registros de liberación de calor, obtenidos con un músculo que se dejó acortar en 6.5 mm, bajo diferentes cargas F: 31,9 g; G: 23,7 g; H: 12,8 f g y J: 1,9.g. El trazo E fue obtenido bajo condiciones isométricas, mientras que los trazos marcados F, G, H y J representan contracciones isotónicas con cargas progresivamente más livianas. Puede verse cómo con las cargas menos pesadas, trazos J y H, el calor de acortamiento se libera más rápidamente debido a la más alta velocidad de acortamiento, de acuerdo a la relación Carga-Velocidad, que ya ha sido discutida. Con las cargas más pesadas el calor es liberado más lentamente, pero la cantidad total es igual. Sin embargo la energía total no es la misma ya que la cantidad de trabajo hecho es diferente dependiendo de la carga. La fracción de energía utilizada para realizar trabajo puede ser hasta más grande que la fracción liberada como calor. En este experimento, los trazos han sido truncados antes de que terminara la contracción y el músculo empezara a relajarse. Como se ha discutido al explicar el calor de relajación, de haberse registrado el calor de relajación se hubiera encontrado una cantidad extra de calor correspondiente a la energía potencial almacenada en la carga levantada. De estos experimentos Hill pudo concluir que el calor de acortamiento

$$\mathbf{\Delta H = ax,} \qquad \mathbf{(3.3)}$$

en donde **x** es el acortamiento y **a** una constante con dimensiones de fuerza. Por otra parte, el trabajo mecánico realizado bajo estas condiciones es:

$$\mathbf{W = Px,} \qquad \mathbf{(3.4)}$$

donde **P** es la carga

y la suma de los dos va a ser:

$$\textbf{Energía} = E = Px + ax = (P+a)x \qquad (3.5)$$

La tasa de liberación de energía es:

$$dE/dt = (P + a)V \qquad (3.6)$$

Midiendo la velocidad de acortamiento de un músculo contrayéndose isotónicamente en contra de diferentes cargas, y conociendo el valor de **a**, se pudo llegar a la ecuación:

$$(P + a)V = b(P_0 - P) \qquad (3.7)$$

que es equivalente a la ecuación 3.2

$$(P + a)\ (V + b) = (P_0 + a)b = \text{constante} \qquad (3.2)$$

donde P_0 es la tensión máxima equivalente a la tensión isométrica y **b** una constante con dimensiones de velocidad.

Esta ecuación describe una hipérbola cuadrática que relaciona la velocidad con la carga en términos puramente mecánicos, y es muy similar a la ecuación que describe la relación Carga-Velocidad (ver figura 3.10). La conclusión que Hill derivó de este hecho era que, la constante **a** de la ecuación que describía la relación entre carga y velocidad de acortamiento era la misma que la constante **a** del calor de acortamiento indicando que tanto la fuerza como la tasa de gasto de energía extra, asociada al calor de acortamiento, estaban relacionadas con la velocidad de acortamiento de acuerdo a la misma ecuación. A pesar de que en estos experimentos se había notado que el calor de acortamiento tendía a aumentar con las cargas mas pesadas, este efecto era bastante pequeño y no parecía tener mayor significado. Por lo tanto Hill pensó que:

"*como primera aproximación se puede concluir que el calor de acortamiento es independiente de la carga, de la velocidad de acortamiento y del trabajo*".

Sin embargo, experimentos posteriores llevados a cabo por Aubert (1952; 1956) y otros autores incluyendo el mismo Hill empezaron a dar indicación que las dos constantes, determinadas por métodos diferentes no tenían el mismo valor. Esto indujo a Hill (1964) a repetir los experimentos de 1938.

Como resultado de estos nuevos experimentos, en los cuales encontró que el calor de acortamiento era mucho mas grande con una carga pequeña (mayor velocidad de acortamiento) que con una carga grande (menor velocidad). Hill tuvo que concluir que la constante **a** de su ecuación característica derivada de experimentos mecánicos no era la misma de la constante análoga derivada de los experimentos de calorimetría y a la cual él designó con el término α (alfa), para recalcar que eran diferentes, aun cuando las dos estaban seguramente relacionadas. Como se verá en un próximo capítulo, la corrección aportada por Hill tuvo repercusión sobre un aspecto cinético de la teoría de los puentes cruzados formulada por A.F. Huxley en 1957.

En 1963, Carlson, Hardy y Wilkie (1963) midiendo la hidrólisis de la fosfocreatina (PC), bajo condiciones en las cuales esta reacción era la única fuente posible de energía, lo cual se había logrado utilizando músculos envenenados con iodoacetato y bajo condiciones de anoxia, no lograron balancear la ecuación:

$$\mathbf{E = A + W + aX} \qquad \mathbf{(3.8)}$$

donde **E** es la energía total liberada A es el calor de activación, **W** es el trabajo, **X** es el acortamiento y **a** una constante. El balance podía obtenerse eliminando el término correspondiente al calor de acortamiento. Con base en estos resultados, estos autores llegaron a la conclusión que o la ecuación de Hill estaba equivocada o había una fuente de energía química extra para explicar el calor de acortamiento. Es interesante destacar que para realizar las respectivas mediciones de calor los autores tuvieron que pedirle prestada una termopila al Profesor Hill. Como respuesta a este trabajo Hill aclaró que sus mediciones habían sido hechas durante

el acortamiento de los músculos, y no durante un ciclo completo en el cual los músculos se relajaban bajo tensión. En este caso la ecuación a considerarse debía ser:

$$\mathbf{E = A + W + aX + h} \qquad \mathbf{(3.9)}$$

Donde **h** es al calor liberado debido a la tensión que continúa ejerciendo la carga sobre el músculo, después que el trabajo y el acortamiento han terminado como se ha mostrado en la figura 3.16, relacionada con el calor de relajación.

Hill (1948) pudo demostrar y cuantificar el calor de acortamiento producido durante una sola sacudida, superando las dificultades derivadas del hecho de que en una sacudida simple el músculo no alcanza a desarrollar su tensión máxima, porque interviene el fenómeno de relajación.

El calor que se libera durante una contracción isotónica es mayor del que se libera durante una contracción isométrica. La diferencia se ha atribuido al calor de acortamiento. Sin embargo la diferencia entre los dos puede ser afectada por dos factores comunes a las contracciones isométricas, que son el trabajo interno y el efecto termoelástico. El trabajo interno es el trabajo realizado por el aparato contráctil en estirar los elementos elásticos en serie presentes en los músculos o cualquier otra distensibilidad asociada al sistema experimental de registro. Jewell y Wilkie demostraron que estos elementos elásticos no cambian durante una contracción, y por lo tanto su efecto puede ser corregido fácilmente. Por lo que concierne el efecto termoelástico, éste de acuerdo a Hill (1953), produce una liberación de calor cuando durante una contracción isométrica la tensión disminuye, y una absorción de calor cuando la tensión aumenta. Por lo tanto durante un ciclo completo de contracción y relajación bajo condiciones isométricas, el calor termoelástico neto es igual a cero. Además, sólo habría que corregir por él cuando la medición de calor se limita a la fase de desarrollo de tensión, sin considerar la fase de relajación. Además su tasa de cambio es cero cuando la tensión no cambia, lo cual ocurre durante la fase de meseta de un tétano

isométrico o durante una contracción isotónica. Si bien no hay mucha información sobre su naturaleza molecular,se ha propuesto que la termoelasticidad de los músculos deriva de los miofilamentos o de los puentes cruzados (Kometani y Yamada, 1984).

En la sección anterior hemos visto como el trabajo de A.V. Hill sobre producción de calor, empezado utilizando una termocupla acoplada a un galvanómetro, construida por Blix en Lund, Suecia, continuó con sofisticadas termopilas que permitieron mediciones siempre más precisas y sensibles. Los avances tecnológicos han permitido registrar la producción de calor en fibras musculares aisladas, lo cual significa que comparado con las mejores termopilas utilizadas en experimentos con músculo entero ha habido un aumento en la sensibilidad de por los menos 10 veces. La figura 3.18 presenta unos registros de producción de calor de una sola fibra obtenidos por Curtin y colegas (1983).

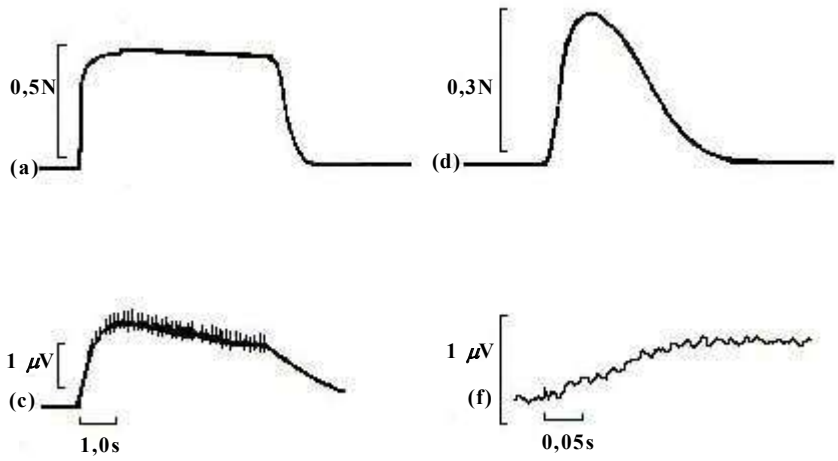


Figura 3.18. Producción de calor durante un tétano y una sacudida simple de una fibra única. (*Modificado de Curtin et al, 1983, con permiso*).

Balance energético de la contracción muscular

Fick y sus discípulos, entre los cuales se encontraba Blix, produjeron numerosos trabajos sobre las propiedades térmicas de los músculos. Un músculo contrayéndose libera energía bajo dos formas: calor y trabajo.

En principio, para tener un balance energético completo de la contracción muscular, sólo es necesario determinar la cantidad de energía producida, la cual consiste en calor liberado + trabajo hecho y la cantidad de energía química utilizada para ello. Así que únicamente se trataría de determinar la entalpía de las reacciones químicas que proveen la energía necesaria a los músculos, y aplicar la 1ª ley de la termodinámica.

El primer estudio en que se trató de identificar las reacciones metabólicas que producían la energía necesaria para la contracción muscular fue realizado por Fletcher y Hopkins (1907), quienes encontraron que en un músculo contrayéndose bajo condiciones anaeróbicas hasta llegar al estado de fatiga, se acumulaba ácido láctico. Otros investigadores (Parnas y Wagner, 1914) determinaron que el ácido láctico se producía a partir del glicógeno presente en los músculos. Meyerhof (1920) demostró la relacion entre la cantidad de ácido láctico que se formaba en los músculos y la cantidad de calor producido y de trabajo realizado. De hecho la conversión de glucógeno a ácido láctico producía 162 kcal/mol, lo suficiente como para proveer la energía necesaria para la contracción. Por lo tanto había razones para pensar que la fuente de energía inmediata para la contracción muscular era la reacción por la cual se formaba lactato a partir de piruvato, originándose de esta manera la teoría del ácido láctico.

Sin embargo, la evidencia obtenida con diferentes tipos de experimentos indicaba que las reacciones químicas, que proveían la energía inmediata necesaria para la contracción, no eran de tipo oxidativo. Así por ejemplo, el calor inicial liberado al contraerse un músculo, alcanzaba los mismos valores independientemente de si la contracción ocurría en presencia o ausencia de oxígeno. De acuerdo con esto, posteriormente se demostró que el consumo de

oxígeno, asociado a contracciones muy breves, empezaba cuando las contracciones ya habían terminado (D.K. Hill, 1940).

Por otra parte, Embden (1924) había demostrado que la formación de ácido láctico en un músculo ocurría, en gran parte, mucho después de que finalizara la contracción. Estos resultados constituían evidencia en contra de la teoría del ácido láctico, según la cual este compuesto participaba en el fenómeno contráctil no sólo, como parte del mecanismo contráctil, sino también como fuente de energía.

Pocos años después, Lundsgaard (1930) demostraba que músculos envenenados con Iodoacetato, IAA, el cual inhibe la glicólisis y la formación de ácido láctico, continuaban contrayéndose. El trabajo realizado bajo condiciones similares, presencia de IAA, resultó ser proporcional al consumo de fosfocreatina, que había sido recién descubierta de manera independiente por Eggleton y Eggleton (1927), y Fiske y Subarow (1928). Estos autores habían encontrado que la mayor parte, un 70 %, del fósforo presente en los músculos formaba parte de un compuesto muy labil, que llamaron fosfageno. Durante episodios de estimulación repetitiva, el fosfageno de los músculos disminuía liberándose creatina y fosfato al mismo tiempo que se iba produciendo acido láctico. Eggleton y Eggleton (1927) habían encontrado que el cociente (fosfageno hidrolizado)/(ácido láctico producido) disminuía durante la actividad contráctil prolongada. Meyerhof y Lohman (1927) demostraron que la hidrólisis del fosfageno era acompañada de producción de calor, pudiendo de esta manera identificar la fuente de energía necesaria para balancear el cociente calórico del ácido láctico. Sin embargo, NacMahnson (1928-1929), en experimentos muy cuidadosos, pudo demostrar que en un tétano de 2 segundos, la cantidad de fosfato de creatina que se hidrolizaba era suficiente para proveer toda la energía necesaria, y que su re-síntesis hasta una cantidad de aproximadamente un 30 %, empezaba inmediatamente después de la relajación, sin que al mismo tiempo ocurriesen cambios equivalentes en la cantidad de ácido láctico. De manera que la reacción endotérmica de re-síntesis de fosfocreatina no era balanceada por una reacción exo-térmica, hecho que fue confirmado por Hill (1928) en experimento miotérmicos en los cuales no pudieron

demostrar absorción de calor después de un periodo de actividad contráctil. La demostración (Lehnarz, 1931) de que la mayor cantidad de ácido láctico que se producía durante una contracción tetánica en atmósfera de nitrógeno ocurría después de un tétano, reforzó la idea de que la producción retrasada de ácido láctico estaba asociada a la resíntesis de la fosfocreatina.

Con el descubrimiento del ATP, realizado de manera independiente por Lohman (1928) y Fiske y Subarow (1928), se pudo demostrar la relación entre la sustancia recién descubierta y la PC.

Lohman demostró que la PC se hidrolizaba sólo en presencia de nucleótidos de adenina y que el contenido de ATP de músculos envenenados con iodoacetato disminuía solamente en estado avanzado de fatiga, o sea, después que se había agotado la reserva de PC. La importancia del ATP como fuente de energía para la contracción muscular recibió un fuerte apoyo por el descubrimiento de la actividad ATPásica de la miosina por Engelhardt y Ljubimova (1939), sin embargo para la demostración inequívoca del rol del ATP como fuente directa de energía para la contracción hubo que esperar 30 años más.

Hasta 1962 la transformación de ATP en ADP durante la contracción no se había podido demostrar satisfactoriamente, excepto en casos de fatiga extrema, porque la ruptura del enlace del tercer fosfato estaba enmascarada por la síntesis rápida de ATP a partir de fosfato de creatina. De hecho, se había pensado que podía ocurrir sólo con evidencia indirecta, suponiendo una rápida resíntesis del ATP a partir de ADP por transfosforilización a partir de fosforilcreatina. Hacia 1960 el consumo de ATP había sido demostrado en diferentes preparaciones en las cuales el material contráctil estaba directamente expuesto al medio, como fibras glicerinadas, miofibrillas fragmentadas, o la preparación de Natori, o sea fibras desmembranadas mecánicamente.

En 1962, Davies y colegas (Infante y Davies, 1962; Cain y colegas, 1962) pudieron demostrar consumo de ATP en músculos intactos, excitados eléctricamente, utilizando el fluorodinitrobenzene

para inhibir la creatina-fosfokinasa y prevenir la fosforilación del ADP en ATP según la reacción de Lohman. Bajo estas condiciones, los autores demostraron en el músculo *Rectus abdominis* de la rana una hidrólisis de 0,4 µM ATP/gr de músculo, durante una breve contracción tetánica a 4ºC. Trabajando con músculo sartorio del mismo animal pudieron determinar que la cantidad de ATP que se consumía en una sola sacudida simple era de 0,22 µM por gramo de músculo, que se calculó era justo lo suficiente para energizar una contracción.

El ATP tiene una importancia capital en el metabolismo celular, ya que su hidrólisis provee la energía inmediata para la contracción muscular, y otros fenómenos, de acuerdo a la reacción:

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \quad (-\Delta H_{ATP} = 11 \text{ kcal/mol})$$

Esta reacción es catalizada por la miosina y está acoplada a las proteínas contráctiles que permiten que la energía química liberada por la hidrólisis del ATP sea trasformada en energía mecánica.

Esta reacción también ocurre a nivel de la membrana del Retículo Sarcoplasmático, donde es catalizada por una ATPasa de Ca que transfiere el Ca libre del mioplasma hacia el interior del Retículo Sarcoplasmático, contribuyendo de manera importante a la relajación de los músculos.

Balance de energía durante una contracción

El balance de energía realizado en la sección anterior se hizo utilizando un valor para el calor de hidrólisis del ATP de 46.4 kJ/ mol. Determinaciones más precisas de este valor, realizadas por Dickinson y Woledge (1973) arrojaron un valor de 34 kJ/mol, lo cual indicaba un desbalance energético de alrededor del 28 por ciento. Este desbalance fue confirmado por diferentes autores y bajo diferentes condiciones experimentales. El desbalance indicaba que una fracción de la suma de **calor + trabajo**, producido por un músculo contrayéndose, no tenía una reacción química que la balanceara. Esta fracción se llamó calor-trabajo o **Entalpía** no

explicada. Para cumplir con la primera ley de la termodinámica se supuso que debía de haber una reacción exotérmica, no identificada, que contribuyera con la energía necesaria para balancear la ecuación energética. Para resolver el problema se utilizaron diferentes estrategias experimentales. Por ejemplo, utilizando bloqueadores de la interacción actina-miosina, como el BTS, o estirando los músculos por encima de una longitud de sarcómero de 3,7 μm se logró separar el calor liberado por la interacción de los filamentos contráctiles, del calor liberado por otros procesos vitales de las células, como por ejemplo la energía involucrada en el funcionamiento de las bombas sodio-potasio de la membrana celular y la bomba de calcio del RS o la energía asociada a la salida del Ca del RS y su unión a la troponina y a la parvalbúmina. La determinación precisa del consumo de oxígeno durante varios ciclos de actividad contráctil, junto a mediciones de producción de calor permitió establecer que el exceso de calor + trabajo durante las contracciones era balanceado durante la fase de recuperación. Estudios microcalorimétricos de Yamada y Kometani (1984) sobre este último punto, permitieron concluir que los movimientos de Ca durante el fenómeno de la contracción permitían explicar casi todo el desbalance energético que ocurría durante la fase de contracción.

CAPÍTULO 4

TEORÍAS DE CONTRACCIÓN

"*De teorías sobre la contracción muscular hay docenas.*
Yo mismo soy responsable de algunas de ellas."

Albert Szent-Gyorgyi

Hacia fines del siglo XIX había suficiente información y un razonable consenso sobre la estructura de los músculos estriados basada en la alternancia de zonas de alto y bajo índice de refracción a lo largo de las fibras. Con el trabajo de Kühne (1864) incluso había evidencia de la presencia de miosina en las bandas de alto índice de refracción, entonces llamadas bandas Q, mientras que las de bajo índice de refracción se conocían como bandas J, correspondiendo hoy en día a las Bandas A e I respectivamente. Según lo relatado por A.F. Huxley (1980), se pensaba que la birrefringencia de las bandas Q se debía a la formación de filamentos que corrían de un extremo de una banda al otro, y cuya longitud no cambiaba apreciablemente durante una contracción o cuando el músculo se estiraba. Hasta se había visualizado la línea Z, de alto índice de refracción en el centro de la banda J. El consenso sin embargo no era unánime, y existían diferentes ideas sobre los mecanismos de la contracción. Por ejemplo, Ranvier pensaba que el acortamiento ocurría en las bandas Q, mientras que Krause pensaba que los filamentos de bandas Q cercanas se atraían los uno a los otros. Sin embargo, el conocimiento que se tenía sobre la estructura de los músculos no fue debidamente

apreciado, y para fines del siglo 19, Kühne (1888) consideraba que el fenómeno de la contracción se generaba en el protoplasma y se debía a los mismos mecanismos tanto en músculo de mamífero como en ameba. Aparte de la información sobre la estructura de las fibras musculares, para mediados del siglo 20 existía información valiosa sobre las propiedades mecánicas de los músculos y sobre los aspectos energéticos de la contracción muscular. Los estudios calorimétricos de Hill y sus colaboradores (1920-1950) habían permitido establecer que durante una contracción, la energía liberada bajo la forma de trabajo y calor es mayor en una contracción isotónica en contra de una carga, que durante una contracción isométrica. Además, en una contracción isotónica, la tasa de liberación de energía, formada por trabajo más calor, depende de manera inversa, de la velocidad de acortamiento. Sin embargo, en un músculo estirado por encima de su longitud de reposo, la tasa de liberación de energía es menor en una contracción isotónica que en una isométrica.

A partir de los trabajos de Engelhardt y Ljubimova(1941), demostrando la acción ATPasica de la miosina, se realizaron numerosos trabajos estudiando el efecto del ATP sobre modelos musculares como trenzas de miosina (Enghelardt *et al*., 1941), o actomiosina misma (Needham, 1942), que permitieron reconocer el papel energético de este compuesto, mediado por la reacción de Lohman discutida en el capítulo 3. La demostración directa de la hidrólisis del ATP durante la actividad contráctil fue lograda por Davies y colegas en 1962 (Cain *et al.*, 1962).

A pesar de esta cantidad de información, desde fines del siglo 19 hasta mediados del siglo 20 se propusieron diferentes hipótesis sobre los mecanismos de la contracción de los músculos, prácticamente sin tomar en cuenta ni la información referente a su estructura, ni la información sobre la energética de la contracción muscular. Algunas de estas hipótesis se basaban en cambios de volumen de los músculos debidos a movimiento de agua en respuesta a cambios osmóticos, mientras que otras, la mayoría, consideraban el acortamiento de los elementos contráctiles, como el mecanismo principal del fenómeno contráctil.

Teorías osmóticas-ácido láctico

La producción de ácido láctico fue observada por primera vez en músculos de ciervos en 1807 por Berzelius, quien notó que la cantidad de ácido formado dependía de la cantidad de ejercicio hecho por los ciervos antes de ser cazados, y pudo demostrar que el compuesto formado en los músculos era el mismo que se formaba en la leche fermentada.

Desde los comienzos del siglo 20, la formación de ácido láctico en los músculos ha sido considerada una consecuencia de la actividad muscular y hasta hace poco este compuesto era considerado el causante de la fatiga muscular.

Curiosamente, hacia fines del siglo XIX se pensó que este compuesto pudiese jugar de alguna manera u otra un papel importante en la activación del fenómeno contráctil. Por ejemplo, Gad (1893) lo consideraba la causa de la contracción, que luego se revertía, al ser oxidado el ácido láctico produciendo calor. Por otra parte, MacDougall (1897) propuso que las fibras musculares estaban constituidas por diferentes compartimientos, en los cuales al iniciarse el fenómeno contráctil se formaba ácido láctico produciéndose así cambios internos de presión osmótica que causaban movimiento de agua entre los compartimientos y cambios de volumen en las fibras musculares. La desaparición del ácido láctico por oxidación causaba la reversión de los movimientos de agua y la relajación. Bernstein a su vez (1915) demostró que las fuerzas osmóticas producidas de acuerdo a MacDougall no eran suficientes para explicar la fuerza contráctil, el mismo propuso que esta ultima podía ser generada en respuesta a cambios de la tensión superficial causados por el mismo ácido láctico.

Finalmente, en 1921 Hartree y Hill consideraron al ácido láctico como posible activador de la contracción, al ser producido y liberado en espacios restringidos de las fibras, de manera análoga a la que hoy en día se considera ser la función del Calcio (Ingels, 1979).

Acortamiento de los elementos contráctiles

Ya se ha relatado como Kuhn consideraba que el movimiento en las amebas y en los músculos ocurriese por el mismo mecanismo, independiente de las respectivas estructuras celulares. Engelman (1873) propuso que la contracción muscular se debía a la producción de calor en sitios específicos en las fibras, lo que inducía cambios de estado y acortamiento de elementos en el citoplasma causando la contracción de las fibras. En un trabajo posterior, Buchtal y colegas (1936) concluían que la banda A era la que se acortaba mientras que la banda I permanecía constante o hasta se podía alargar. De hecho, a partir de los trabajos de Albert Szent-Györgyi (1948), en los cuales había demostrado que las trenzas de actomiosina se acortaban en presencia de ATP, se había establecido la idea de que el material contráctil, constituido por las proteínas actina y miosina, formaba filamentos continuos que podían acortarse doblándose o enrollándose.

Esta idea pareció estar apoyada por las primeras imágenes de microscopia electrónica del tejido muscular, que parecían mostrar filamentos continuos en los sarcómeros (Rozsa, Szent-Györgyi y Wyckoff, 1950).

Por lo tanto hasta mediados del siglo XX, casi todas las teorías se basaban en la presencia de filamentos continuos dentro de los sarcómeros, que se acortaban uniformemente durante la contracción proponiéndose diferentes mecanismos para explicar su acortamiento.

Por ejemplo, en 1940 Astbury propuso que las cadenas de miosina que se creía corrían de una línea Z a la otra, podían acortarse causando la contracción. Una modificación de esta teoría fue propuesta por Riseman y Kirkwood (1948), según los cuales eran filamentos de actomiosina los que se extendían de una línea Z a la otra, manteniéndose estirados debido a la influencia de cargas electrostáticas. Como consecuencia de la estimulación, estas cargas desaparecían, permitiendo que los filamentos proteicos pasaran de cadenas extendidas a cadenas enrolladas.

Algunas otras, de las muchas teorías que se propusieron entre 1940 y 1956, se señalan a continuación:

- Relajación-energización vía ATP (Engelhardt, 1946): la transferencia de ATP a la miosina, induce cambios micelares o moleculares responsables por la contracción.

- Teorías termoelásticas (Meyer, 1952;): la tendencia al acortamiento surge de la formación de nuevos enlaces en el estado de relajación.

- Teorías entrópicas (Prior, 1950; Morales y Botts, 1952): la tendencia a acortarse se debe a la mayor posibilidad de enrollarse debido la agitación térmica.

- En 1954 Polissar, basándose en principios de la físico-química de los polímeros, propuso que la contracción se debía al acortamiento de pequeñas unidades en serie que constituían los filamentos delgados, y que podían encontrarse en dos estados: **L** y **S** (por *Long* y *Short*). La premisa básica en que se apoyaba la teoría de Polissar, era que:

"*La idea que la tensión desarrollada por los músculos es debida al acortamiento de los filamentos dentro del músculo era bien aceptada por la mayoría de los investigadores en el campo*."

Esta premisa resume de manera ejemplar las ideas que sobre los mecanismos de la contracción muscular se tenían hasta el año 1954. En base a lo cual, A.F. Huxley (1974) pudo resumir de la siguiente manera los principales hechos que, entre 1945 y 1953, se creía que constituyesen las bases del fenómeno contráctil:

1) En un músculo en reposo la actina y la miosina existen en forma separada.

2) Cuando el músculo es estimulado, la actina y la miosina interactúan formando filamentos continuos de actomiosina.

3) Esta actomiosina funciona como una ATPasa, causando o facilitando el acortamiento de los filamentos.

Las teorías basadas en el acortamiento de filamentos de actomiosina fueron completamente invalidadas al demostrarse, como ya se ha descrito en el capítulo 2, que la miosina está localizada exclusivamente en la banda A (Hanson y Huxley, 1953), y que los sarcómeros, visualizados mediante métodos mejorados de microscopía electrónica, consisten de dos set de filamentos interdigitados (Huxley, 1953a) y finalmente que el largo de la banda A no se altera cuando un músculo es estirado o cuando se acorta, (Huxley y Hanson, 1954; Huxley y Niedergerke, 1954).

Hipótesis de los Filamentos deslizantes

Como lo relata A.F. Huxley (1980) en su libro: *Reflections on Muscle*, la información estructural que llevó a la formulación de la hipótesis de los filamentos deslizantes, ya existía para 1860. Pero fue olvidada junto a algunas ideas precursoras que llevaron a la formulación de la hipótesis en 1954. De manera que la historia recomienza en 1952, cuando H.E. Huxley en su trabajo de tesis doctoral demostró la presencia de un doble orden de filamentos en músculos estudiados con técnica de difracción de Rayos X de ángulo pequeño, aun cuando se creyó que los filamentos se extendían a lo largo de todo el sarcómero. Luego H.E. Huxley (1953a) demostró el solapamiento del doble arreglo de filamentos por microscopía electrónica de cortes trasversales.

Utilizando microscopía de contraste de fase, Hanson y Huxley (1953), estudiaron el patrón de bandas en músculo estriado, y con la información ya disponible obtenida con microscopía electrónica y rayos X (Huxley 1953 a y b), pudieron concluir que el patrón de estriación se debía a dos grupos de filamentos que se superponían o solapaban en una determinada región del sarcómero sin extenderse a lo largo de todo el sarcómero.

Al usar microscopia de contraste de fase en fibras musculares de diámetro relativamente grande (50 a 100 μm) se debe considerar la posibilidad de artefactos. Estos pueden surgir debido a la forma cilíndrica y al grosor de las fibras, y a la presencia de materiales en su interior, con diferentes índices de refracción a

nivel de las diferentes bandas. Estos factores fueron tomados en cuenta y minimizados por Huxley y Hanson (1954) utilizando miofibrillas cuyo espesor era de alrededor de 1 μm, y por A.F. Huxley y Niedergerke (1954) utilizando fibras aisladas bañadas en un medio cuyo índice de refracción era el mismo que el de la fibra y objetivos cuya profundidad de foco era suficientemente pequeña como para abarcar una sección óptica muy delgada. Los resultados de los dos grupos coincidían en que, en un rango muy grande de longitudes de sarcómeros, durante estiramientos y durante contracciones isotónicas o isométricas, el ancho de la banda A no cambiaba apreciablemente.

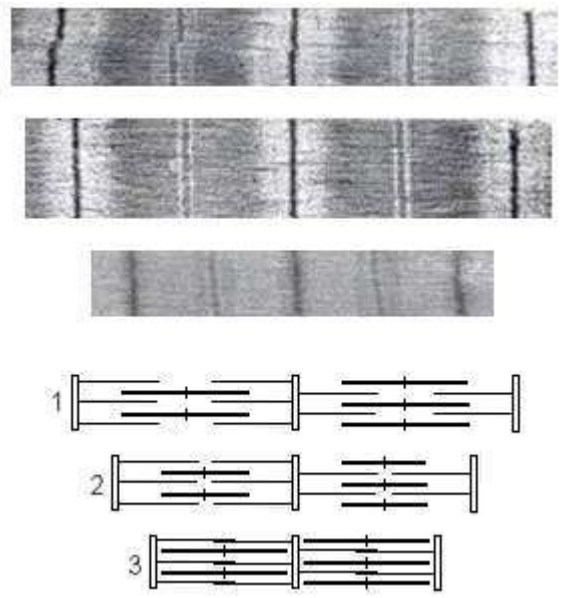


Figura 4.1. Micrografías y dibujos esquemáticos de sarcómeros a diferentes longitudes. La disposición solapada de los filamentos gruesos y delgados permite cambiar la longitud de los sarcómeros manteniéndose constante la longitud de los filamentos. (*Modificado de H.E. Huxley 1972 con permiso*).

La figura 4.1 muestra microfotografías de sarcómeros a diferentes longitudes. Puede verse cómo la longitud de la banda A permanece constante a pesar de los cambios de longitud de los sarcómeros. El esquema en la parte inferior de la figura muestra el mecanismo que explica los resultados obtenidos con rayos X y microscopia electrónica. Este mecanismo constituye la base de lo que se conoce como teoría de los filamentos deslizantes. Si bien la magnitud de los parámetros obtenidos con rayos X por diferentes autores puede variar de acuerdo al tipo de músculo, la especie animal y la técnica experimental, los resultados obtenidos por H.E. Huxley y Brown (1967) describen con precisión admirable las características generales de la arquitectura molecular de los filamentos gruesos. En una fibra en reposo, el ancho de la banda A es de aproximadamente 1,5 μm, mientras que la banda I (medida de los dos lados de la línea Z) tiene 0,8 μm; al acortarse la fibra a un 60% de su longitud la banda I desaparece mientras que la banda A entra en contacto con las dos líneas Z en ambos lados. Si el acortamiento es mayor (lo cual no ocurre bajo condiciones fisiológicas) se forman bandas de contracción a los dos lados de las líneas Z.

Por otra parte, en miofibrillas aisladas la zona H aumenta cuando las miofibrillas son estiradas. Al acortarse las miofibrillas la zona H se hace más estrecha y desaparece cuando los sarcómeros alcanzan el 85% de su longitud normal; si se acortan más, la zona H es reemplazada por una línea más densa. La distancia entre la línea Z y el borde la zona H permanece constante cuando los sarcómeros cambian desde un 140 hasta un 80% de su longitud normal. Todos estos datos indican que también la longitud de los filamentos delgados permanece constante al cambiar la longitud de los sarcómeros en un rango muy grande.

Con base en estos resultados y de manera independiente, H.E. Huxley y J. Hanson (1954) y A.F. Huxley y R. Niedergerke (1954) propusieron independiente y simultáneamente la hipótesis de los filamentos deslizantes, en dos trabajos publicados en el mismo número de la revista Nature.

Entre diferentes posibilidades, una razón para escoger este modelo, era que permitía explicar de manera directa la disminución

en la tensión tetánica de fibras estiradas a longitudes de sarcómeros mayores de la normal (Ramsey y Street, 1940), asumiendo que la fuerza contráctil depende del nivel de solapamiento o superposición entre filamentos (Huxley y Niedergerke, 1954, 1958).

Las características generales de este modelo se han presentado en la figura 1.3 del capítulo 1. Dicha figura muestra que los dos grupos de filamentos contráctiles en una fibra muscular están dispuestos en forma interdigitada con un grado variable de solapamiento. La figura 4.1 ilustra el hecho que la longitud de los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina no cambia cuando el músculo se contrae, o se acorta, o se estira pasivamente. Como consecuencia de la disposición interdigitada de los filamentos el largo de la banda A permanece constante cuando el músculo cambia de longitud. La presencia de puentes cruzados, constituidos por los elementos S1, o cabezas, de la molécula de miosina, facilita la interacción entre las dos proteínas, y provee las bases moleculares para que los músculos se acorten o generen fuerza.

Sin embargo, el modelo fue criticado debido a algunos resultados contrarios, obtenidos por otros autores en otras preparaciones o con otras técnicas. Por ejemplo, Hodges (1955) obtuvo imágenes de músculos de dípteros en las que sólo aparecía un set de filamentos, contradiciendo los resultados de H.E. Huxley (1953). Por otra parte Carlsen y Knappeis, utilizando microscopía de luz y electrónica (1955), encontraron que las bandas A cambiaban de longitud más que las bandas I al estirar fibras musculares de rana. Estas críticas fueron contestadas experimentalmente por S.G. Page y H.E. Huxley (1963) quienes confirmaron por microscopía electrónica que tanto los filamentos de miosina como los de actina no cambiaban apreciablemente de longitud en músculos en reposo o contrayéndose, y mantenían su longitud constante (1,5 μm y 0,8 μm respectivamente) a toda longitud de sarcómero mayor que 2,1μm. En un trabajo en que pudieron obtener patrones de Rayos X bidimensionales, H.E. Huxley y colegas (1965) pudieron observar directamente que las periodicidades axiales de los filamentos de actina y miosina no cambiaban en músculos sartorios que se contraían isotónicamente con acortamiento apreciable.

Después de 1954, a partir de los trabajos de H.E. y de A.F. Huxley y de la aceptación de los elementos básicos de la teoría de los filamentos deslizantes, se propusieron muchas hipótesis, basadas en esta teoría, para explicar los mecanismos moleculares responsables del acortamiento de los músculos y de la generación de fuerza. Por otra parte, también siguieron apareciendo diferentes trabajos que refutaban las bases estructurales de la teoría de los filamentos deslizantes. A pesar de no ser siempre bien fundamentadas, estas críticas tuvieron algún efecto positivo, ya que estimularon la realización de nuevos experimentos que reforzaron aun más la teoría.

Teoría de los puentes cruzados

En 1957, A.F. Huxley publicó un extenso artículo de revisión sobre el tema, en el cual también propuso una nueva hipótesis para explicar el mecanismo de contracción, basado en la teoría de los filamentos deslizantes.

De hecho, una vez establecido que los filamentos de actina y miosina se deslizaban uno con respecto al otro, había que explicar cómo ocurría este movimiento relativo. Entre las diferentes posibilidades, A.F. Huxley escogió una explicación basada en la generación de una fuerza relativa entre los dos filamentos en cada uno de sus múltiples puntos de interacción, presentes en la zona de solapamiento, y correspondientes a los puentes cruzados visualizados por microscopia electrónica de alta resolución. Además de estar basada en la teoría de los filamentos deslizantes, la nueva hipótesis era compatible con todas las propiedades fisiológicas de los músculos, tales como la relación entre fuerza y longitud, las relaciones conocidas entre velocidad de acortamiento y carga o generación de calor.

La hipótesis proponía que cada uno de los puentes cruzados establecía contactos transitorios con sitios específicos localizados a nivel del filamento de actina más cercano, de manera que por cada ciclo de unión-desunión entre los filamentos hubiese un pequeño movimiento relativo entre los filamentos delgados (de actina) y los

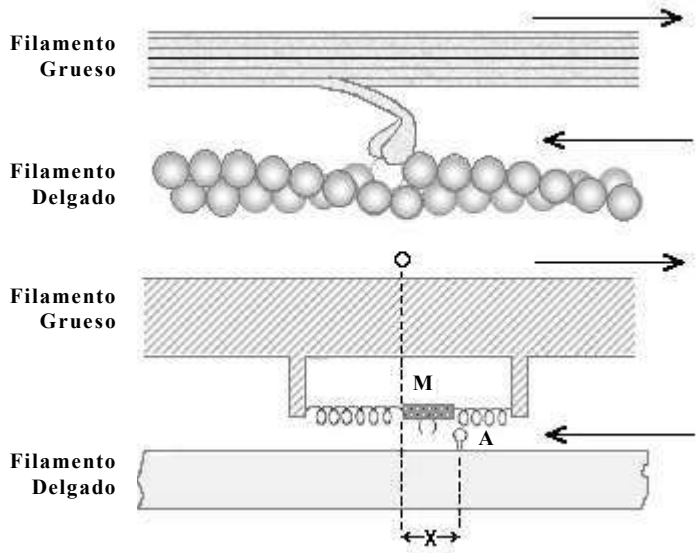


Figura 4.2. Esquemas explicativos de la acción de los puentes cruzados. En la parte inferior aparece el esquema propuesto por A.F. Huxley (1957). En la parte superior aparece un esquema actualizado de acuerdo a la información estructural de los miofilamentos. (*Modificado de A.F.Huxley, 1957*).

filamentos gruesos (de miosina). El acortamiento de los sarcómeros se debía a este movimiento relativo y el desarrollo de tensión se producía por la presencia de generadores de fuerza, correspondientes a los puentes cruzados visualizados por microscopia electrónica y rayos X que estaban distribuidos a lo largo de los filamentos, actuando de manera independiente. El esquema en la parte inferior de la figura 4.2 ilustra el modo de operación de los generadores de fuerza, según el modelo original de A F Huxley. De acuerdo con este modelo, el sitio activo **M** experimenta fluctuaciones en su posición, generadas por movimiento Browniano, y las fluctuaciones favorables resultan en la formación de enlaces con sitios activos **A** en el filamento de actina, de manera independiente de los demás generadores de fuerza. Al formarse el enlace, el resorte de la derecha queda comprimido, y al relajarse lleva el sitio activo de la actina hacia la izquierda en el paso que pudiera constituir el golpe de fuerza.

La distancia entre **A** y el sitio de equilibrio **0** de **M** es **x**. La distancia **x** disminuye cuando el sarcómero se acorta. Cuando esto ocurre, el sitio **A** se mueve con respecto al punto **0** con la velocidad **v.** Si un extremo de la fibra está fijo, **v** se relaciona con la velocidad **V** con la cual se mueve el extremo libre de la fibra por medio de la expresión **v = sV/2L**, donde **s** es la longitud del sarcómero y **L** la longitud de la fibra. El esquema de la figura 4.3 ilustra cómo la probabilidad de interacción entre **M** y **A** depende de la posición relativa de **M** con respecto a su punto de equilibrio **0**. La constante de velocidad de la reacción **A + M = AM** es **f** mientras que la constante de la reacción inversa **AM = A + M** es **g**. Tanto **f** como **g** dependen de la distancia **x** de acuerdo al esquema de la figura 4.3.

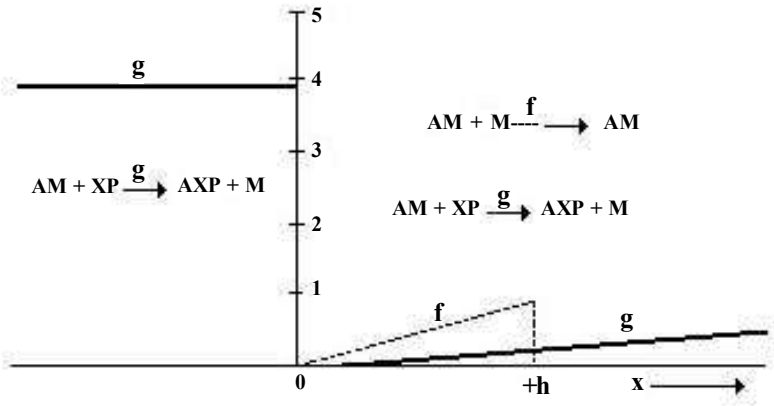


Figura 4.3. Dependencia de las constantes de velocidad de las reacciones de unión y separación de actina y miosina, de la posición del generador de fuerza.

Cuando los sitios **M** y **A** no están unidos **M** oscila alrededor del punto **0** por agitación térmica. Cuando **M** se encuentra a la derecha del punto **0** y en un punto en que **f** no es cero, hay una cierta probabilidad de que interactúe con el sitio **A**. Cuando esto ocurre, la tensión existente en la porción elástica se ejerce sobre el filamento de actina, favoreciendo el acortamiento del sarcómero,

mientras el complejo **AM** se mueve hacia el punto **0**. Debido a que el valor de **g** es siempre mayor que cero, excepto en el punto **0**, hay siempre una probabilidad de que el complejo **AM** se rompa. Sin embargo esta probabilidad es pequeña mientras el complejo **AM** se encuentra a la derecha del punto **0**, pero cuando se encuentra a la izquierda del punto **0**, la probabilidad de ruptura aumenta y los sitios **A** y **M** se separan. Cuando esto ocurre, la tensión en el segmento elástico, que ahora es en la dirección contraria, no se opone al acortamiento del músculo. Cuando, la velocidad de acortamiento es muy grande, una proporción apreciable de los enlaces no se rompe a tiempo y por lo tanto se genera una resistencia: la velocidad de acortamiento de un músculo no cargado llega a su límite cuando esta resistencia se hace igual a las fuerzas generadas por todos los complejos **AM** que se encuentran a la derecha del punto **0**. Al llegar el complejo **AM** al punto de equilibrio de la miosina, la unión rápida de ésta con el ATP causa la separación de la actina. La parte superior de la figura 4.2, muestra cómo el modelo propuesto por Huxley en 1957 puede ser reinterpretado en términos de los conocimientos actuales sobre la estructura de los filamentos contráctiles, y sobre todo de los puentes cruzados.

Para cuantificar la generación de fuerza, Huxley tomó en cuenta el número de puentes cruzados presentes en cada mitad de sarcómero, por cm^3 de músculo, mientras que para cuantificar la velocidad de acortamiento estimó la frecuencia con la cual podían ocurrir las interacciones entre los puentes cruzados y los sitios específicos presentes en los filamentos de actina, utilizando las constantes de reacción **f** y **g**. Suponiendo que un fosfato de alta energía (ATP) es utilizado en cada interacción miosina-actina en cada ciclo, pudo calcular la velocidad con que se realizaba trabajo y se liberaba calor. De manera que empleando valores razonables para las 2 constantes **f** y **g**, pudo demostrar que la tasa de liberación de calor aumenta linealmente con la velocidad de acortamiento, y que la tasa de liberación de energía aumenta en proporción a la reducción de carga por debajo del valor de la tensión isométrica, en casi perfecto acuerdo con los resultados obtenidos por Hill (1938), quien había realizado medidas de producción de calor, bajo diferentes condiciones experimentales.

Generación de fuerza

Una vez consolidada la hipótesis de los filamentos deslizantes se intensificaron los esfuerzos para aclarar la naturaleza de los mecanismos responsables de la generación de fuerza y movimiento durante la contracción muscular. Estos esfuerzos se dirigieron hacia varias metas, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes:

a) poner a prueba las predicciones y los postulados de la hipótesis;

b) entender la relación temporal entre los diferentes pasos del ciclo mecánico y los pasos equivalentes de las reacciones del ciclo químico; y

c) descubrir la naturaleza de los cambios estructurales que ocurren a nivel de los puentes cruzados durante un ciclo contráctil y finalmente entender el mecanismo de generación de fuerza durante el corrimiento de los filamentos entre sí.

Con respecto al primer punto, los postulados más importantes de la hipótesis eran los siguientes:

1) la fuerza desarrollada por los músculos depende del grado de interdigitación entre filamentos de miosina y filamentos de actina;

2) la velocidad de acortamiento no depende, dentro de un cierto intervalo, del grado de interdigitación;

3) la idea que los generadores de fuerza, localizados en los sitios de interacción entre miosina y activa, operan como unidades independientes.

Si bien la relación tensión-longitud había sido estudiada desde el trabajo de Ramsey y Street (1940), había ciertos puntos de discrepancia que era necesario aclarar. De hecho tanto estos autores como Carlsen, Knappeis y Buchtal (1961) habían registrado tensiones de un 30-40 por ciento de la tensión máxima con fibras estiradas hasta alcanzar una longitud de sarcómero 3,7 μm, longitud

a la cual no había solapamiento entre los filamentos de actina y miosina, y por lo tanto no podía haber generación de fuerza de acuerdo a la hipótesis de los filamentos interdigitados y de los puentes cruzados.

Transitorios de fuerza y de velocidad

Sin embargo, en estos experimentos se habían utilizado procedimientos normales, registrando la tensión con los extremos de la fibra mantenidos fijos durante el tétano, con lo cual podía haber variación en la longitud de los sarcómeros a lo largo de la fibra, y especialmente en sus extremos. A.F. Huxley y Peachey (1961) habían demostrado que la distribución de la longitud de los sarcómeros, especialmente en las extremidades de fibras estiradas no era homogénea.

La no homogeneidad de la longitud de los sarcómeros, es la causa del fenómeno de aumento progresivo de la fuerza isométrica durante un tétano de una fibra muscular. Al registrar la fuerza isométrica de una fibra entera durante un tétano, es común observar que ésta no llega a una meseta estable si no que sigue subiendo. Como se verá luego, este fenómeno desaparece o disminuye si el registro de fuerza se efectúa con segmentos cortos de fibras, en los que hay mayor homogeneidad de longitud de los sarcómeros.

Para minimizar esta complicación, y poder confirmar experimentalmente el postulado según el cual la fuerza desarrollada por los músculos depende del grado de interdigitación entre filamentos de miosina y filamentos de actina, Huxley y sus colegas (Gordon, Huxley y Julián, 1966a, 1966b) desarrollaron una técnica, con la cual podían controlar por un mecanismo de retroalimentación la longitud de un segmento de las fibras, de 7 a 10 mm de largo, delimitado por dos marcadores de oro pegados a la superficie de la región central de las fibras, donde la longitud de los sarcómeros es bastante uniforme. La distancia entre los dos marcadores, era medida por un sistema óptico, que acoplado al mecanismo de retroalimentación, permitía imponer de manera instantánea, durante una contracción, cambios de longitud, o de tensión al segmento de

fibra bajo estudio, con una alta resolución temporal. Con esta técnica era posible estudiar las propiedades mecánicas de poblaciones de sarcómeros bastantes homogéneas, con respecto a su longitud. El sistema que se muestra esquemáticamente en la figura 4.4 es una modificación mejorada del sistema experimental diseñado originalmente por A.F. Huxley (Gordon *et al*. 1966), utilizada por Edman y Reggiani (1984) para medir las propiedades contráctiles de segmentos de fibras.

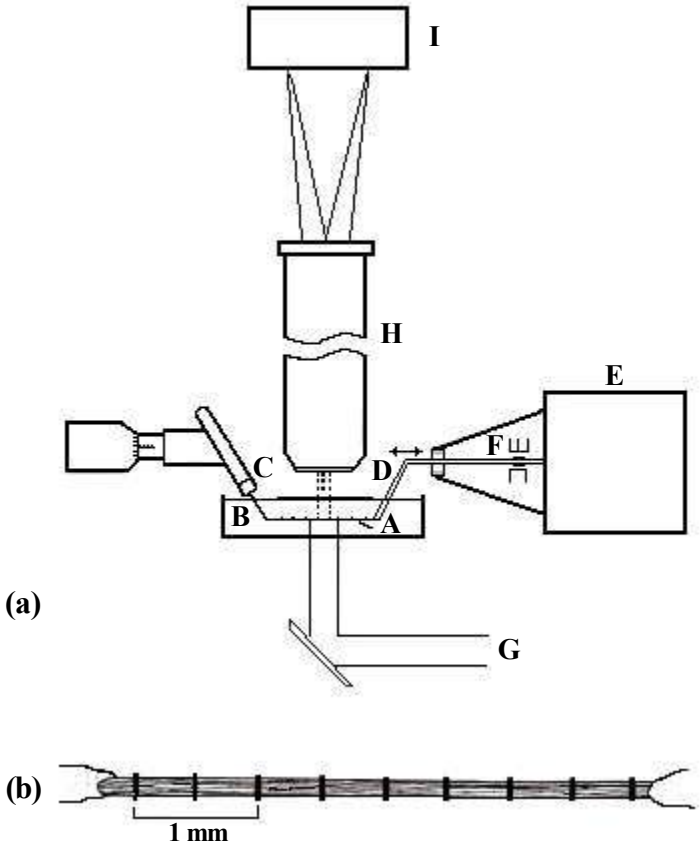


Figura 4.4. Sistema experimental para control de la longitud y de la fuerza de segmentos de una fibra muscular. Los segmentos de fibra están delimitados por marcadores , como se muestra en la parte inferior de la figura. La longitud de los sarcómeros se determina por difracción de láser. (*Modificado de Edman y Reggiani, 1984, con permiso del autor).*

En el aparato, la fibra está ligada de un lado al transductor mecano-electrónico y del otro a un jalador (*puller*) que permite imponer de manera muy rápida cambios de longitud a la fibra, mediante un sistema de retroalimentación que podía controlar o la longitud de la fibra, o la fuerza, cambiando rápidamente de una configuración a la otra en menos de un milisegundo. En el sistema utilizado por Edman, en vez de utilizar dos marcadores para delimitar un solo segmento de fibra, se fijan a la superficie de la fibra, varios marcadores opacos, colocados aproximadamente a 0,5 mm de distancia entre ellos, para subdividir la fibra en muchos más segmentos (entre 6 y 10, dependiendo del largo de la fibra). Utilizando una serie de fotodiodos, el sistema puede controlar tanto la longitud de la fibra como la longitud de cada segmento por separado.

Relación fuerza-longitud de sarcómeros

Un primer resultado importante obtenido con esta técnica, por Gordon y colegas fue la determinación de la longitud de los sarcómeros en la cual no se generaba fuerza. La figura 4.5 muestra la disminución lineal de la tensión en la rama descendiente de la curva, hasta llegar a cero a la longitud de sarcómero de 3,65 μm, que es el valor donde el solapamiento o superposición, dentro del error experimental, es cero. Un segundo resultado importante logrado con la técnica mejorada, fue la obtención con alta precisión de la relación longitud-tensión, ilustrada en la figura 4.5. De esta manera se pudo demostrar claramente que la relación longitud-tensión es consecuencia de la disposición de los filamentos gruesos de miosina, y delgados de actina, en los sarcómeros. En la figura 4.5, la meseta y el quiebre de la curva a 1,67 μm se explican por las interacciones entre filamentos gruesos y delgados. El grado de sobreposición de los filamentos cambia con la longitud del sarcómero de acuerdo al esquema que se muestra en la parte izquierda de la figura. En resumen, la figura 4.5 muestra con detalle cómo la tensión tetánica es proporcional al grado de sobreposición de los filamentos, a cada longitud de sarcómero. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Edman y Reggiani (1987) utilizando, segmentos de fibra de menos de 1 mm de longitud. Experimentos de Taylor y Rüdel (1970)

sugieren que la fase ascendente de la relación tensión-longitud, o sea la porción de la curva correspondiente a longitudes cortas de los sarcómeros, puede ser afectada por el proceso de activación de liberación de calcio, que parece disminuir cuando los sarcómeros están comprimidos. De hecho, debido a que las fibras musculares mantienen un volumen constante cuando son estiradas, la distancia entre filamentos gruesos y delgados cambia de aproximadamente 9 nm cuando estan acortadas a 4 nm cuando están estiradas. La afinidad de los filamentos delgados puede cambiar bajo estas condiciones. Este efecto parece ocurrir también en músculos cardíacos, complicando así la interpretación según la cual la relación tensión-longitud constituye la base para explicar la Ley de Starling para eficiencia cardiaca. Sin embargo, estas interesantes observaciones no afectan los hechos básicos de la teoría de los filamentos deslizantes.

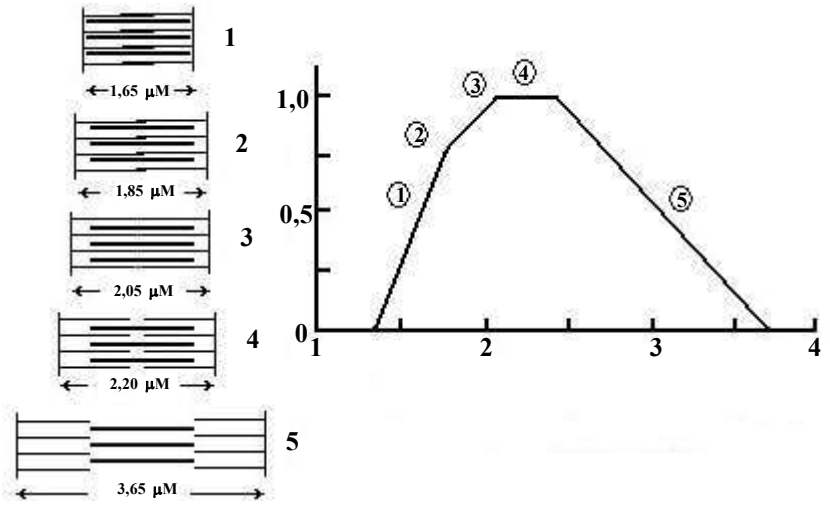


Figura 4.5. Efecto del nivel de solapamiento entre filamentos gruesos y delgados sobre la tensión tetánica de un segmento de fibra muscular. Los números indican aproximadamente la correspondencia entre fuerza contráctil y longitud de los sarcómeros. (*Modificado de Gordon et al. 1966*).

Un segundo resultado importante obtenido por A.F. Huxley y sus colegas (Gordon *et al.*, 1966) fue evidenciar que la velocidad de acortamiento de una fibra sin carga, no varía con el grado de sobreposición de los filamentos.

Sin embargo la demostración definitiva de este punto fue lograda por Edman (1979), quien desarrolló un nuevo método para medir con precisión la velocidad de acortamiento de los sarcómeros en condiciones de cero carga. La parte superior de la figura 4.6 muestra tres registros sobrepuestos de la tensión tetánica de una fibra que, mientras se contrae isométricamente a una longitud de sarcómero de 2,25 μm, se deja acortar sucesivamente a tres longitudes diferentes, 2,16, 2,12 y 2,09 μm, con valores de ΔL de 0,09, 0,13 y 0,16 μm respectivamente, como lo muestran los registros inferiores. Al acortarse, la tensión desarrollada por la fibra cae a cero, y después de un intervalo de tiempo Δt, que depende del valor de ΔL, la fibra vuelve a desarrollar tensión. El valor de la relación $\Delta L/\Delta t$ extrapolado a tiempo cero es una medida precisa de V_o, o sea la velocidad estacionaria a cero carga. Al repetir esta medida a diferentes longitudes de sarcómero, Edman pudo demostrar que V_o no depende de la longitud de los sarcómeros, en un rango de longitudes entre 1,65 y 2,7 μm, como se muestra en el gráfico de la figura 4.7, confirmando la idea de que los generadores de fuerza operan de manera independiente.

Transitorios de Velocidad y de Fuerza

Como ya se ha reportado en el capítulo 3, numerosos autores (Gasser y Hill, 1924; Levin y Wyman, 1927 y Jewell and Wilkie, 1958) habían estudiado las propiedades mecánicas de los músculos aplicando pequeñas perturbaciones (cambio de longitud, de fuerza, etc.) bajo diferentes condiciones experimentales, y determinando el curso temporal con el cual se reestablece el estado estacionario. Durante una contracción isotónica en contra de una carga constante, la fuerza contráctil de un músculo balancea la fuerza de la carga, y la velocidad de acortamiento del músculo es constante. Bajo estas condiciones el estado estacionario es caracterizado por la relación fuerza-velocidad. Sin embargo, según Hill, la velocidad

con que se pueden acortar los elementos contráctiles depende sólo del valor instantáneo de la carga, lo cual implica que la velocidad alcanza un valor estacionario sin retraso alguno. El trabajo de Jewell y Wilkie (1958) había demostrado que al cambiar la carga, la velocidad de acortamiento constante se establecía muy rápidamente en pocos milisegundos, sin embargo sus registros estaban afectados por problemas de inercia del sistema experimental.

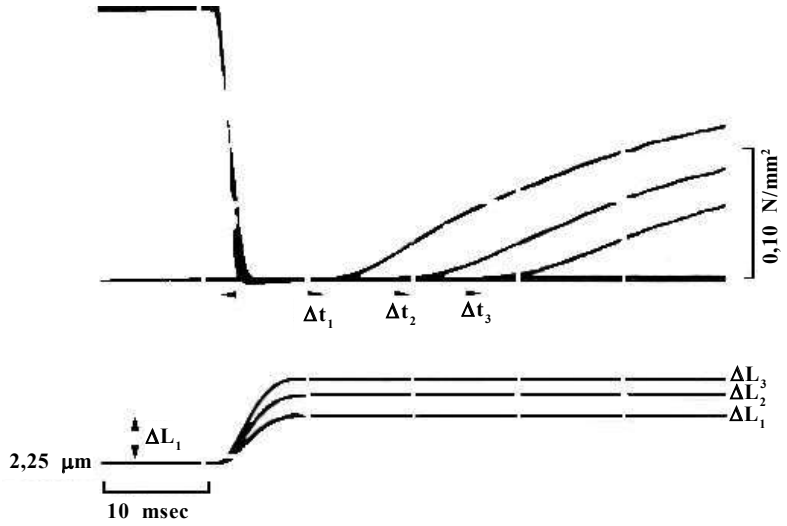


Figura 4.6. Experimento de liberación instantánea con una fibra única. En la parte inferior se muestran los cambios de longitud impuestos a la fibra durante la fase de meseta de un tétano isométrico, iniciado a una L.S. de 2.25 μm. En la parte superior se muestran los registros sobrepuestos de la caída y recuperación de tensión en respuesta a los cambios de longitud. El tiempo, Δt, para que la fibra desarrolle de nuevo tensión depende de la magnitud del cambio de longitud de los sarcómeros, ΔL. (*Modificado de Edman, 1979, con permiso*).

Hay que recordar, que como resultado de estos experimentos, se había propuesto que un músculo activo puede ser representado por dos elementos en serie, uno elástico y otro contráctil. Según esta idea el elemento contráctil puede ser definido por su curva fuerza-velocidad, de acuerdo a la cual en cada instante la velocidad de acortamiento está determinada por la carga. El elemento

elástico, por otra parte, también se caracteriza por tener una longitud que es determinada por la carga. Si bien adecuados para definir las propiedades mecánicas macroscópicas, estos experimentos habían sido hechos con músculos enteros y sin la necesaria resolución temporal de unos pocos milisegundos. Además no permitían la identificación precisa del elemento elástico en serie con una estructura determinada, ya que podía haber contribuciones del sistema experimental, de los tendones y de la fibra misma.

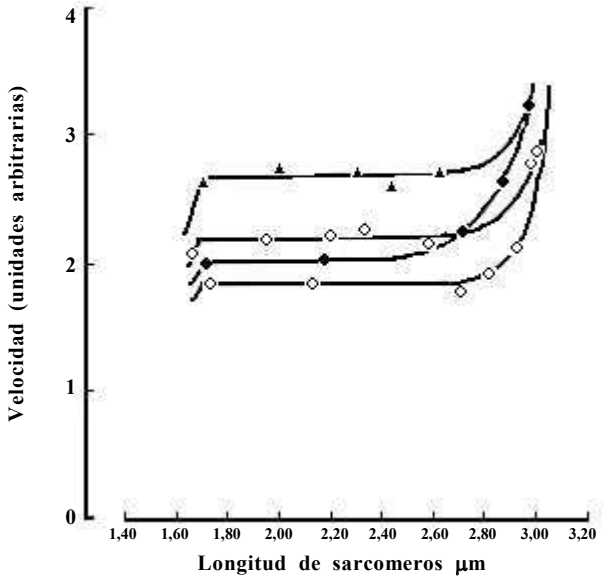


Figura 4.7. Demostración que la velocidad máxima de acortamiento de un segmento de fibra muscular, no depende de la longitud de los sarcómeros, entre 1,8 y 2,8 μm, rango en el cual la tensión muestra una fuerte dependencia. (*Modificado de Edman, 1979*, *con permiso*).

Trabajando con fibras aisladas, o paquetes de pocas fibras, y utilizando un sistema experimental con mayor sensibilidad y resolución temporal, Podolsky y colegas (Podolsky, 1960; Civan y Podolsky, 1966; Podolsky y Nolan, 1973) repitieron los experimentos de Jewell y Wilkie, y al imponer un cambio en la carga en contra de la cual se contraían las fibras, pudieron registrar la velocidad de acortamiento de la preparación. Después de un

acortamiento rápido, debido a la presencia de los elementos elásticos en serie, los transitorios de velocidad mostraban una secuencia compleja de cambios en la velocidad de acortamiento, con un curso temporal de hasta 20 milisegundos. Estas respuestas transitorias fueron llamadas transitorios isotónicos de velocidad. En estos transitorios Podolsky y colegas pudieron caracterizar la contribución del acortamiento retrasado de la preparación y las oscilaciones amortiguadas del sistema experimental. Estos transitorios no podían ser atribuidos solamente a la interacción entre la inercia de la palanca y el elemento elástico en serie de las fibras musculares, sino que podían deberse a la presencia de un componente adicional a nivel de los elementos contráctiles, lo cual permitió inferir la participación de los puentes cruzados en estos transitorios de velocidad.

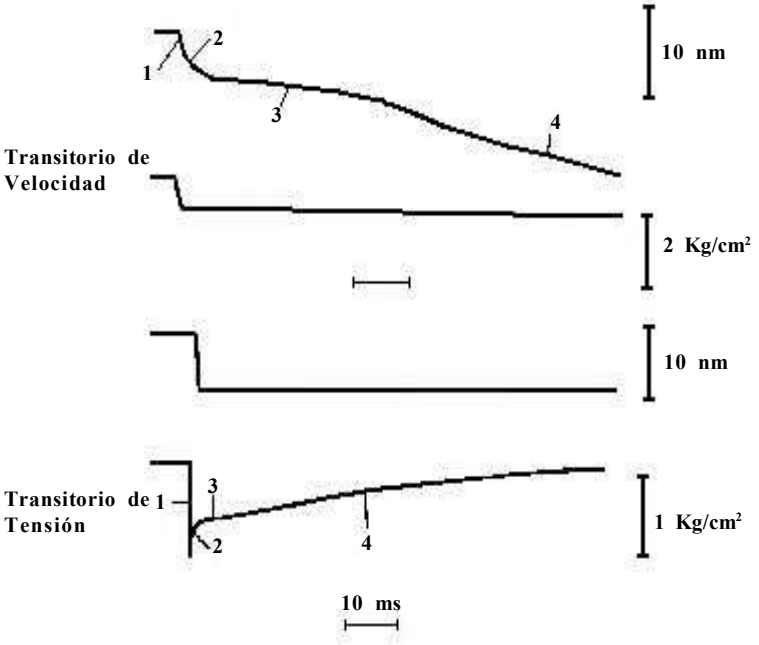


Figura 4.8. Transitorios de velocidad y de tensión obtenidos imponiendo cambio de tension y longitud, respectivamente, a segmentos de fibras musculares. Nótese la presencia de diferentes fases que corresponden a cambios que occurren a nivel de los puentes cruzados. (*Redibujado de A. F. Huxley, 1971*).

Este punto fue retomado por A.F. Huxley y colegas, (Huxley, 1974; Huxley y Simmons, 1973; Ford *et al*., 1977; 1985; 1986) quienes, utilizando el sistema anteriormente descrito, basado en el uso del mecanismo servo-motor retroalimentado, estudiaron el comportamiento mecánico de segmentos de fibras, sometidos a cambios rápidos de longitud o de carga, para poder entender las propiedades de los puentes cruzados. La parte superior de la figura 4.8 muestra un transitorio de velocidad obtenido cambiando la carga repentinamente. Esto causa un cambio en la longitud del músculo que ocurre siguiendo un curso temporal complejo. Primero se produce un acortamiento inicial, simultáneo con el cambio en la carga, indicativo de un elemento elástico en serie (fase 1), seguido por una fase de acortamiento más rápido de lo esperado por la carga aplicada (fase 2). Esto es seguido por un período en que la velocidad de acortamiento disminuye a un valor muy bajo (fase 3), para luego alcanzar un valor estacionario, precedido o no de oscilaciones amortiguadas (fase 4).

La parte inferior de la figura 4.8 muestra un transitorio de fuerza obtenido acortando rápidamente el segmento de fibra bajo control. Hay primero una caída inicial de tensión, que ocurre simultáneamente con el cambio de longitud (fase 1), seguida por un período de recuperación de tensión que tiene un curso temporal más complejo que la exponencial simple esperada de un sistema de dos elementos en serie. De hecho, la tensión primero parece recuperarse parcialmente de forma rápida (fase 2), y luego de forma más lenta (fase 3), para luego alcanzar asintóticamente el valor inicial (fase 4). Las diferentes fases en las dos modalidades son equivalentes, y asociadas a los mismos eventos que parecen ocurrir a nivel de los puentes cruzados. Sin embargo los transitorios de tensión parecen ofrecer mayor información, por lo cual fueron objeto detallado de estudio por parte de A.F. Huxley y colegas. El curso temporal de los transitorios de tensión varía muy poco a diferentes longitudes de sarcómeros, mientras que su amplitud varía en proporción directa con la tensión isométrica y con el grado de interdigitación entre filamentos gruesos y delgados. El curso temporal complejo de estos transitorios puede interpretarse de la siguiente manera: la fase 1 se debe a la presencia de una elasticidad instantánea, localizada a nivel de los mismos puentes

cruzados, la cual evidentemente tiene que estar relacionada con su estructura molecular que incluye los fragmentos S2 y S1 de las moléculas de miosina. La fase 2, o sea el período de recuperación rápida de la tensión ha sido interpretado en términos de puentes cruzados que no están unidos a filamentos delgados, pero que se unen a ellos durante el cambio de longitud impuesto (Podolsky *et al*., 1969). Por otra parte, la caída rápida de tensión seguida por una recuperación parcial puede explicarse en términos del comportamiento elástico de un elemento de Voigt, ilustrado en el gráfico superior de la figura 4.9. Un elemento de Voigt está compuesto por un resorte en serie con una combinación de otro resorte y un amortiguador dispuestos en paralelo. Finalmente, las fases 3 y 4 se consideran producidas por procesos de desenganche y de re-enganche de los puentes cruzados, que pueden ocurrir con mayor número de desacoplamientos en la fase 3 y mayor número de reacoplamientos en la fase 4.

Para analizar los transitorios de fuerza, es conveniente hacerlo en términos de las tensiones fraccionales T1 y T2, como se ilustra en el inserto de la figura 4.9. Si estos dos parámetros obedecieran la ley de Hooke, deberían variar linealmente con los cambios de longitud. Experimentalmente se ha comprobado, como se ilustra en el gráfico de la figura 4.9, que para el caso de las fibras musculares, T1 parece comportarse de manera aproximadamente lineal, mientras que T2 tiene un comportamiento lineal en un cierto rango de longitudes de sarcómero, desviándose apreciablemente a mayor longitud de sarcómeros. Este comportamiento del parámetro T2 descarta la posibilidad de que la recuperación rápida de la tensión se deba simplemente a un elemento visco/elástico pasivo, y más bien indica que los mismos puentes cruzados o generadores de fuerza son los responsables del fenómeno. Para confirmar este punto, A.F. Huxley y Simmons (1971) realizaron experimentos con fibras estiradas a 3,2 μm, o sea con un 39% de solapamiento. La figura 4.9 muestra el comportamiento de los parámetros T1 y T2 para el caso de resortes que obedecen la ley de Hooke, y lo compara con el comportamiento de una fibra muscular a dos longitudes de sarcómero, 2,1 y 3,1 μm, donde el nivel de solapamiento es 100% y 39% respectivamente, indicando que la tensión

y el nivel de solapamiento están directamente relacionados. Estos resultados indicaban la presencia de un elemento extensible a nivel de los generadores de fuerza. Cada puente cruzado, parece entonces tener un elemento elástico instantáneo y un elemento elástico atenuado que puede sostener la tensión con cambios de longitud, de aproximadamente 10 a 12 nm por sarcómero.

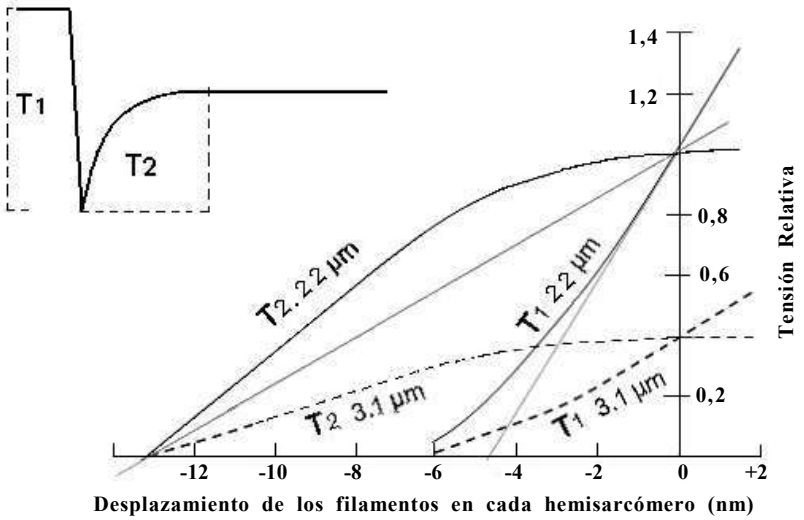


Figura 4.9. Comportamiento mecánico no lineal de los puentes cruzados.La figura muestra que mientras el componente T1 del transitorio de fuerza de un segmento de fibra se comporta como un elemento elastico lineal, el componente T2 que describe la recuperación inicial de la fuerza despues de un cambio de longitud, presenta un comportamiento no lineal, compatible con la participacion de los generadores de fuerza en esta fase del transitorio. (*Redibujado de A. F. Huxley, 1974*).

H. E. Huxley (1969,) usando fuentes de Rayos X de mayor intensidad y mejores sistemas de detección y registro logró obtener información estructural sobre músculos contrayéndose, con una mayor resolución temporal debido a la reducción de los tiempos de exposición. De esta manera, pudo detectar cambios en la organización de los filamentos de miosina que indicaban un movimiento azimutal de transición entre reposo y contracción, posiblemente correspondiente a la unión de los puentes cruzados con la actina.

Los resultados obtenidos indicaban que la generación de fuerza se debía a la capacidad de la cabeza de miosina de poder rotar,

sobre su punto de unión con el segmento S2 después de haberse unido con el filamento delgado, y transmitir la fuerza al segmento S2 que funciona como un elemento de acople de fuerzas, como se muestra esquemáticamente en la figura 4.10A. Esta información estructural, junto a los resultados del estudio de las propiedades mecano-elásticas de los puentes cruzados permitió elaborar un nuevo modelo en el cual se incluía también una modificación que se hacía necesaria debido a la nueva información obtenida por Hill (1964) con respecto al comportamiento del calor de activación, que ha sido descrita en el capítulo 3. La modificación del modelo consistía en agregar un elemento bisagra entre las porciones S1 y S2 de la molécula de miosinas y luego considerar que la unión entre un puente cruzado y la actina ocurre en dos pasos, pudiendo romperse fácilmente, sin gasto energético, durante el primer paso, hasta el momento en que ocurre el segundo paso, como se muestra esquemáticamente en la figura 4.10B.

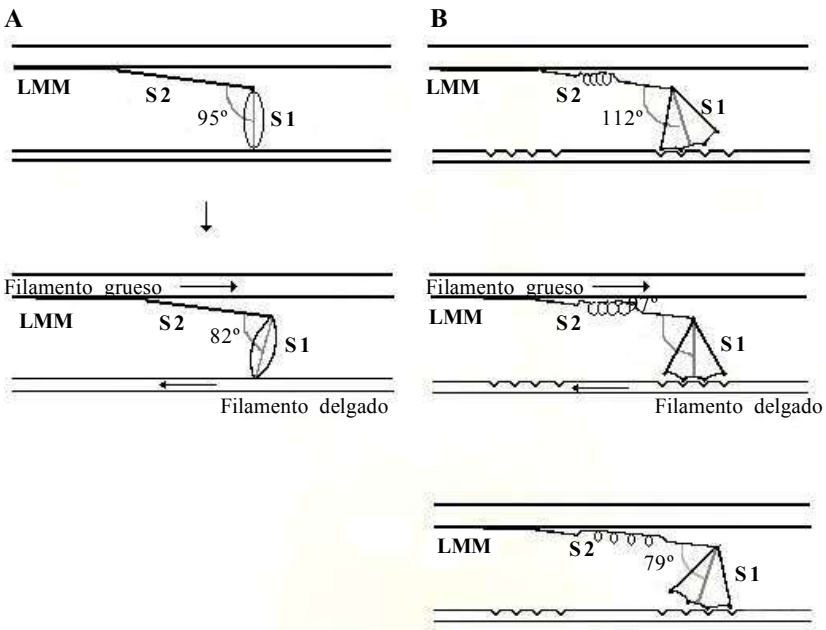


Figura 4.10. Esquemas de puentes cruzados, mostrando los sitios de torque de las subunidades S2 y S1 de la molécula de miosina, y la inclusión de un elemento elástico. (*Modificado de AF Huxley, 1964)*.

Ciclo Mecano-químico

Con respecto a la relación entre ciclo mecánico y ciclo químico, Taylor y colegas (1970) hicieron un enorme progreso estudiando la cinética de hidrólisis de ATP desarrollando un aparato que permitía medir la producción de fosfato inorgánico, Pi para tiempos de reacción tan rápidos como 10-15 ms (Lynn y Taylor, 1970). Bajo diferentes condiciones experimentales y con diferentes nucleosidos, describieron una primera fase rápida de liberación de P_i, como producto de la hidrólisis del ATP catalizada por miosina mucho más rápida que la fase de producción de P_i en estado estacionario.

La importancia de estos resultados radica en que se demuestra que la liberación de P_i no es el factor limitante de la velocidad de la hidrólisis del ATP por la miosina. Del trabajo anterior se sabía que:

$$\mathbf{M + XP \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} MXP \xrightarrow{K_2} M \cdot X \cdot P}$$

donde la naturaleza del complejo M•X•P no es determinada y:

$k_1 \sim 5 \times 10^5\ M^{-1} x\ sec^{-1}$ y $k_2 \sim 50\text{-}75\ sec^{-1}$

En un segundo trabajo, Taylor y colegas (1970), utilizando una técnica de separación rápida en columnas de sephadex estudiaron las propiedades cinéticas de esta reacción bajo una serie de condiciones experimentales, encontrando que la tasa de descomposición del complejo Miosina-ADP-P_i era igual a la de la hidrólisis en el estado estacionario. Por eso pudieron concluir que la disociación del complejo representaba el paso limitante de la reacción, pudiendo el mecanismo ser representado en primera aproximación por:

$$\mathbf{M + ATP \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} M \cdot ATP \xrightarrow{K_2} M \cdot ADP \cdot P \xrightarrow{K_3} M + ADP + 1}$$

Uniendo esta información, y con los datos estructurales obtenidos bajo condiciones en que utilizando análogos no hidrolizables de ATP algunos pasos del ciclo mecánico podían ser inmovilizados, fue posible unir el ciclo químico de Lymn y Taylor con el ciclo mecánico, llegando al esquema de la figura 4.11. En el esquema, el paso entre IV y I ocurre porque el ATP se une a la miosina causando la disociación del complejo actina-miosina (reacción 1). Entre el paso I y II, el ATP se hidroliza (reacción 2). Entre el paso II y III se libera el Pi, (reacción 3) y la cabeza de miosina se une a la actina, generándose el golpe de fuerza. Entre III y IV se despeja el ADP de la miosina (reacción IV).

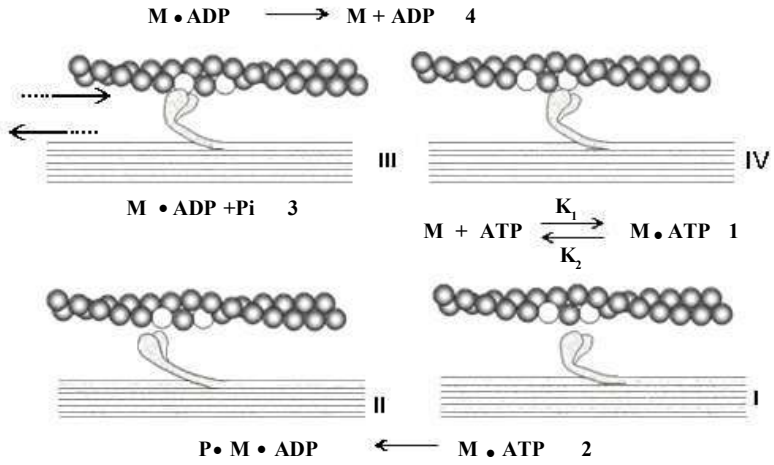


Figura 4.11. Ciclo mecano-químico de los puentes cruzados. En el esquema se muestra como la interacción ATP con la miosina permite la ruptura de la union actina-miosina (fase IV a fase I) y como el golpe de fuerza occurre al liberarse el fosfato del complejo miosina-ADP-fosfato (fase II a fase III). (*Modificado de Apkon, 2005 y Taylor et al., 1970*).

Mecánica contráctil de segmentos de fibras

Edman y colegas (1976) habían obtenido alguna evidencia que para niveles de carga mayores al 80 por ciento de la fuerza contráctil máxima, la relación hiperbólica entre la velocidad de acortamiento y la fuerza sufría un cambio, el cual posiblemente

podía deberse a una alteración en la cinética de los puentes cruzados. Estas observaciones impulsaron un estudio más detallado por parte de Edman (1988), utilizando el sistema experimental ilustrado en la figura 4.4. La posibilidad de realizar experimentos con segmentos de fibra le permitió eliminar el problema de la no uniformidad de los sarcómeros y al mismo tiempo evitar la contri-bución de elementos elásticos en serie no asociados a los sarcómeros mismos.

Relación carga-velocidad revisitada

La figura 4.12 muestra un ejemplo del registro obtenido cuando a una fibra muscular estimulada tetánicamente, y que llega a desarrollar su tensión máxima se le impone un cambio muy rápido (10-30 ms) en la carga por medio del jalador, o puller, electro-magnético. En la figura, los dos trazos superiores representan el movimiento del brazo del puller y el movimiento del segmento de fibra escogido, mientras que el tercer trazo representa el cambio en la fuerza impuesto por medio del jalador, cambiando de la moda-lidad de control de longitud a control de fuerza. Puede verse cómo en respuesta al cambio inicial de longitud, la fuerza cae aproxi-madamente en 10 ms, a un nuevo valor, que se mantiene constante mientras que tanto la fibra como el segmento se acortan a una velocidad constante, presentando los cambios en longitud de la fibra y del segmento las mismas características. Ambos muestran una primera fase de caída que coincide con el cambio en la carga, y que se debe a la respuesta de los elementos elásticos, que en el caso del segmento están confinados a nivel de los sar-cómeros. La segunda fase de acortamiento, empieza con una oscilación que depende del nivel de control del sistema de retro-alimentación y continúa a velocidad constante. Utilizando el procedimiento descrito para diferentes niveles de carga se pudo obtener la grafica de la figura 4.13 que muestra la velocidad de acortamiento del segmento de fibra en función de la carga. La gráfica muestra que la mayor parte de la curva es bien descrita por una función hiperbólica. Pero en la región cercana a la fuerza máxima, la hipérbola intercepta el eje de la fuerza a un nivel mayor que la fuerza máxima. La gráfica indica que los datos experimentales pueden ser descritos por una doble hipérbola. La presencia de este componente en el rango alto de fuerza ha sido interpretada en términos de cambios

de cinética en la función de los puentes cruzados en la cercanía del nivel de fuerza máxima.

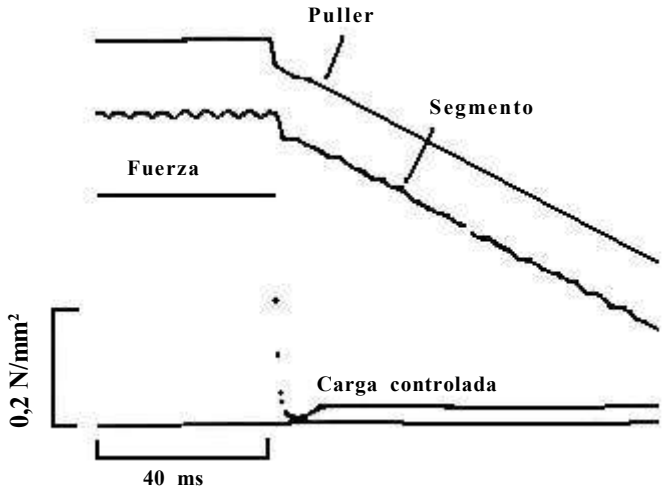


Figura 4.12. Los trazos superiores muestran transitorios de velocidad de una fibra entera y de un segmento corto, <1 μm, de fibra. El trazo inferior muestra el cambio en la carga, que fuerza el acortamiento de la fibra. Nótese la similitud de respuesta de la fibra y del segmento de fibra. (*Modificado de Edman, 1988, con permiso*).

Para determinar si la forma bifásica dependía del nivel de fuerza, Edman y colegas (1997) utilizaron Dantrolene para reducir la fuerza al 80 % de los valores normales, encontrando que la forma bifásica de la curva fuerza-velocidad se mantenía, lo cual indica que la transición entre las dos hipérbolas no es controlada por la fuerza, sino por la velocidad de acortamiento, que determina el valor de velocidad, (0,1 Vmax) en el cual la relación cambia su forma. Esto está en acuerdo pleno con la idea de que en el músculo estriado los puentes cruzados actúan como generadores de fuerza independientes bajo diferentes condiciones de carga.

Se considera que la relación fuerza velocidad refleja las propiedades cinéticas de los puentes cruzados, siendo el valor de Vmax la expresión de la velocidad máxima de unión y ruptura de los puentes cruzados. La demostración (Edman *et al.,* 1988) de que

Vmax está estrictamente relacionado con la actividad ATPasica de las cabezas de miosina refuerza esta idea. Ya se ha mencionado que Vmax es independiente de la longitud de los sarcómeros o sea del número de puentes cruzados que pueden formarse. La situación es equivalente a la de un coche cuya velocidad no depende del número de caballos que pueden jalarlo.

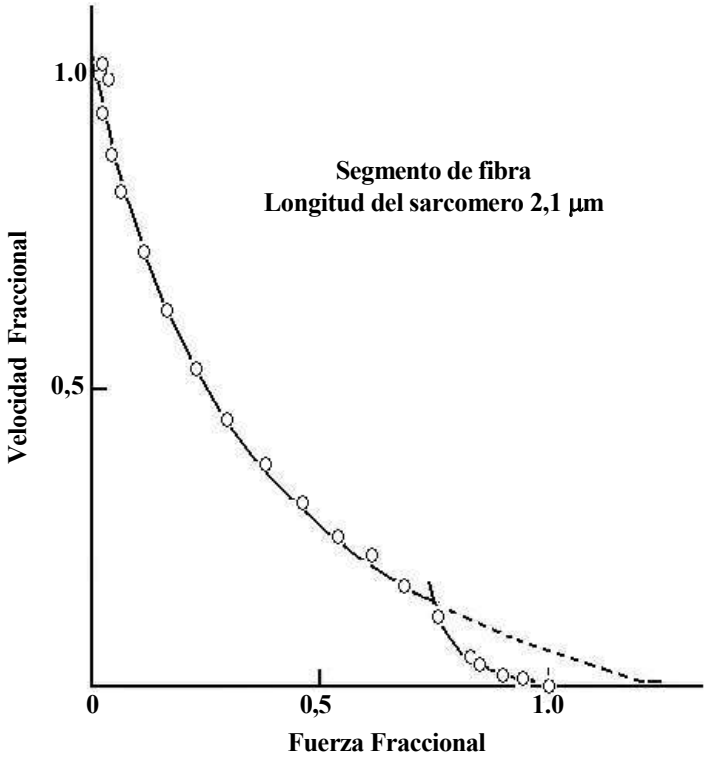


Figura 4.13. Relación fuerza-velocidad obtenida de un segmento de fibra muscular con el sistema experimental de la figura 4.4. A diferencia dela curva hiperbolica simple mostrada en la figura 4.10, en este caso la relación es descrita por una doble función hiperbólica, en la cual la segunda hipérbola comienza cuando la fuerza y la velocidad tienen valores aproximadamente iguales al 80 % de la fuerza isométrica y al 11 % de la velocidad máxima. (*Modificado de Edman, 1988, con permiso*).

La figura 4.14, muestra un aspecto poco divulgado de la relación fuerza-velocidad. Cuando la carga, en contra de la cual una fibra muscular se acorta, durante una contracción isotónica,

supera el valor de la fuerza isométrica que la fibra es capaz de generar. Esta se estira, pero solo después que la carga exceda, en un 20% aproximadamente, el valor de la fuerza isométrica. Por otra parte, la presencia de la segunda fase hiperbólica en la curva fuerza-velocidad, determina que antes de alcanzar el 90 % de la fuerza isométrica, la velocidad de acortamiento de la fibra es ya prácticamente nula. Esto le confiere una gran estabilidad al sistema contráctil ya que en la cercanía de la fuerza isométrica máxima y en un rango equivalente al 30% de ella, una fibra muscular puede soportar la carga sin mayores cambios de longitud. Esto tiene importancia para situaciones que ocurren en la vida diaria, durante contracciones excéntricas, por ejemplo al saltar o bajar una escalera, cuando una fibra comienza a estirarse solo cuando se llega a valores de cargas muy altos.

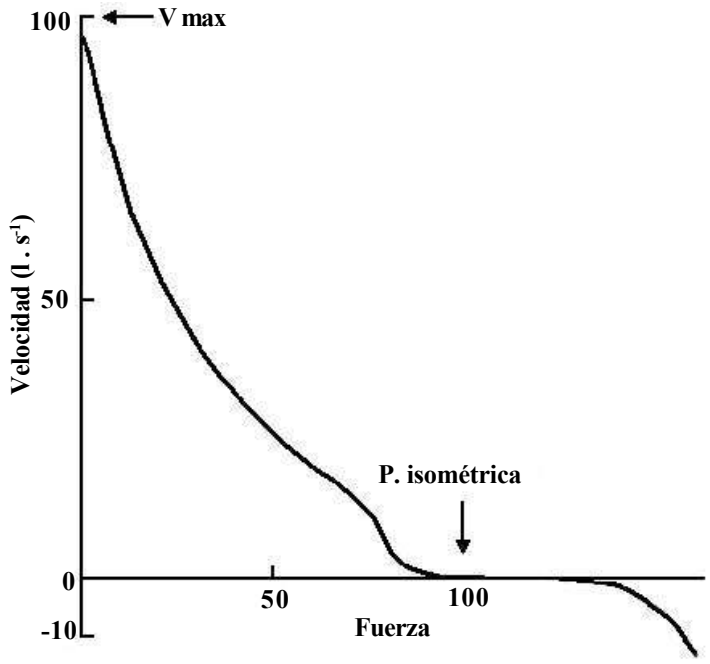


Figura 4.14. Velocidad negativa en la relación entre fuerza y velocidad. La gráfica muestra que cuando la carga es mayor que la fuerza isométrica máxima, la fibra se estira y la velocidad (de acortamiento) adquiere valores negativos. (*Modificado de Edman, 1988, con permiso*).

Cambios de longitud impuestos

Durante una contracción isométrica la fuerza desarrollada por una fibra muscular depende de la longitud de sus sarcómeros. Esto constituye una descripción de las propiedades contráctiles fundamentales de la función muscular. Sin embargo, hay situaciones experimentales relacionadas con la ocurrencia de movimiento, o sea cambios de longitud durante la contracción, en las cuales la fuerza desarrollada puede ser mayor o menor que la esperada de la respectiva longitud sarcomérica. Este es un aspecto menos conocido de la mecánica de la contracción muscular, que sin embargo tiene un gran importancia, ya que refleja situaciones que ocurren normalmente durante la función muscular en el organismo.

Efecto de estiramientos

Abbott y Aubert (1952) habían demostrado que cuando un músculo es estirado durante un tétano isométrico, responde aumentando su fuerza a un valor más alto que el esperado según su longitud final. Este aumento de fuerza tiene dos componentes: un aumento inicial que se desarrolla durante el estiramiento y se revierte pocos segundos después que cesa el movimiento, y un segundo componente que se mantiene por más tiempo. La figura 4.15 muestra un registro de un experimento (Edman *et al*, 1978) en el cual una fibra fue estirada a velocidad constante desde una longitud de sarcómero de 2,41 a 2,54 μm durante una contracción tetánica. Puede verse un primer componente denominado "aumento de fuerza durante el estiramiento", el cual depende de la velocidad pero no de la amplitud, del estiramiento (Edman, *et al* 1978). Probablemente este efecto está asociado a un aumento de la tensión en los puentes cruzados, que se desarrolla como consecuencia del estiramiento forzado de los sarcómeros y, posiblemente, también a un pequeño aumento en el número de los mismos. El segundo componente, conocido como "aumento de fuerza residual" depende de la amplitud del estiramiento, pero no de su velocidad. Así que el aumento de fuerza residual aumenta a medida que disminuye el solapamiento entre filamentos gruesos y delgados, y no sobrepasa el valor de fuerza isométrica que se alcanza a una

longitud de sarcómero óptima. Este hecho, junto al hecho de que no depende de la velocidad de estiramiento, sugiere que este componente no está relacionado con una de las propiedades de los **puentes cruzados** mismos (Edman, *et al*, 1978; Edman, 1999).

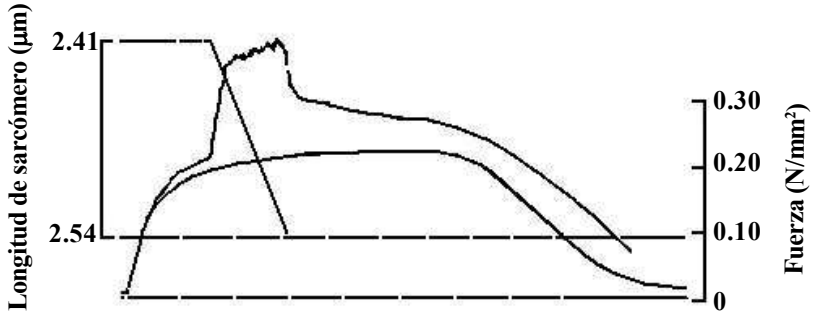


Figura 4.15. El estiramiento de una fibra durante un tétano isométrico causa un aumento en la fuerza con dos componentes. Uno asociado a la fase de estiramiento, y el otro que perdura después del estiramiento. (*Modificado de Edman et al., 1978 con permiso*).

Sin embargo este punto es objeto de investigación en este momento ya que hay reportes que indican que el aumento de fuerza residual puede exceder, aun cuando sea poco, el valor de la fuerza isométrica óptima, y también que algún aumento de fuerza ha sido observado en la rama ascendente de la curva fuerza-longitud sarcomérica (Peterson *et al*, 2004). Con base en estos resultados ha sido sugerido que algún filamento elástico en el sarcómero pueda participar en el aumento de fuerza, o alternativamente que de alguna manera los puentes cruzados puedan ejercer más fuerza (Rassier and Herzog, 2004).

Desactivación inducida por acortamiento

Un músculo, que se deja acortar sin carga, durante una contracción isométrica, pierde momentáneamente parte de su capacidad de desarrollar fuerza, recuperándola pocos segundos después de la fase de acortamiento.

La figura 4.16 muestra que cuando una fibra se deja acortar durante una sacudida isométrica simple, la tensión cae a 0 y luego se desarrolla de nuevo a niveles que dependen del acortamiento inicial. En este experimento los acortamientos fueron inducidos a diferentes tiempos durante la contracción, de manera que la reactivación de la tensión empezara al mismo tiempo. El efecto depende de la longitud de los sarcómeros siendo mayor a longitud normal, 2,1-2,2 μm, disminuyendo a longitudes mayores o menores. La magnitud de este efecto depende del grado de acortamiento y del nivel de activación de la maquinaria contráctil cuando ocurre el acortamiento (Jewell y Wilkie, 1960; Edman, 1976). Así la desactivación es mayor durante una sola sacudida o durante un tétano no fusionado que durante un tétano completamente fusionado. El efecto es también disminuido en presencia de cafeína que aumenta el Ca liberado por el RS en respuesta a un estímulo eléctrico. El mismo efecto pudo ser observado en experimentos realizados con fibras desmembranadas, encontrándose que la acción desactivadora del acortamiento podía ser disminuida aumentando la concentración de calcio del medio. Estos resultados sugieren que el efecto podría ser debido a un cambio en la afinidad de los miofilamentos hacia el calcio. Cambios de afinidad al calcio han sido involucrados en otros fenómenos en los cuales se observa una disminución de la fuerza contráctil, como ocurre durante el desarrollo de la fatiga por ejemplo.

Es importante no confundir este fenómeno con la depresión de la fuerza tetánica que ocurre cuando las fibras se dejan acortar en contra de una carga. En este caso la depresión de la fuerza parece estar ligada a la no-uniformidad de la longitud de los sarcómeros durante el acortamiento (Julian y Morgan, 1979; Edman *et al*, 1993).

Para finalizar, se puede concluir que a pesar de los avances logrados, aún no está completamente aclarado el mecanismo de generación de fuerza. Diferentes grupos de investigación están dedicados a esta tarea. Una alternativa al uso de las fibras musculares para resolver el problema de la generación de fuerza a nivel molecular la constituyen los motores moleculares. Trabajos realizados con filamentos de actina y segmentos S1 derivados de diferentes tipos de miosina, junto al uso de técnicas novedosas

como la microscopía de fuerza atómica y el uso de trampas y pinzas ópticas, han permitido reproducir en estos sistemas moleculares fenómenos característicos de las fibras musculares, como por ejemplo, la relación fuerza-velocidad.

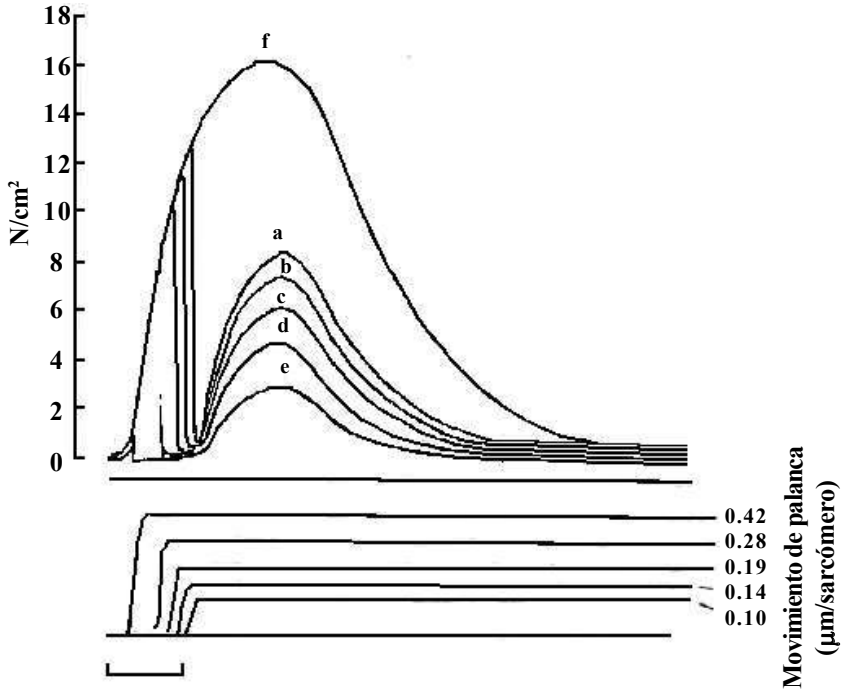


Figura 4.16. Efecto del acortamiento activo sobre el desarrollo de tensión durante un sacudida simple de una fibra muscular. En la figura se han sobre impuesto varios trazos, tanto de tensión como de longitud. El acortamiento se impuso a diferentes tiempos durante el desarrollo de tensión, para que la tensión se empezase a recuperar al mismo tiempo. Nótese como el efecto depende de la amplitud del acortamiento. (*Modificado de Edman, 1975*).

CAPÍTULO 5

PROPIEDADES ELÉCTRICAS PASIVAS

Potencial de reposo

Para principios del siglo XX, Bernstein (1902) había enunciado su hipótesis según la cual las propiedades de semipermeabilidad de las células excitables determinan la existencia de una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de las células que disminuye o desaparece cuando son excitadas. Basado en el trabajo de Nernst (1889), Bernstein sugirió que en condiciones de reposo la membrana de las células excitable era selectivamente permeable al ion potasio, y que por lo tanto el potencial de membrana estaba determinado por la concentración de este ion en los dos lados de la membrana celular. Al excitarse la membrana, esta perdía su selectividad y se hacía permeable a otros iones.

Una fibra muscular, como toda otra célula, mantiene una composición iónica interna diferente de la del plasma. Las diferentes características de permeabilidad de la membrana a ciertos iones, y la diferencia de concentración entre el interior y el exterior celular, determinan el establecimiento de una diferencia de potencial entre el exterior y el interior de la fibra muscular. Esta diferencia de potencial eléctrico, normalmente denominada **potencial de membrana en reposo**, puede ser medida experimentalmente con micropipetas de vidrio, perfeccionadas por Ling y Gerard en 1949. Estas pipetas, o microelectrodos, normalmente tienen puntas de 0,5 μm, y se rellenan con una solución concentrada (3 M) de KCl. Los microelectrodos de este tipo tienen una resistencia eléctrica de algunos megaohmios, lo cual exige el uso de amplificadores con características especiales (alta resistencia de entrada). Al introducir

uno de estos microelectrodos en una fibra muscular de rana en reposo y bañada en una solución fisiológica (generalmente Ringer), se detecta una diferencia de potencial de aproximadamente 95 mV con el interior negativo respecto al exterior. Este potencial se mantiene constante por mucho tiempo, decenas de minutos, si las condiciones experimentales no varían, pero puede cambiar si la fibra es estimulada eléctricamente o si se cambian las condiciones del medio externo. Un estímulo eléctrico de intensidad adecuada causa un cambio rápido y reversible en el potencial de membrana, que en una fracción de milisegundo llega a valores de aproximadamente +50 mV, regresando a su valor de reposo en una decena de milisegundos. Este cambio eléctrico, denominado potencial de acción, se propaga a lo largo de la fibra muscular e inicia el fenómeno de activación contráctil conocido como Acoplamiento Excitación-Contracción.

La evidencia experimental acumulada desde mediados del siglo XX indica que tanto el potencial de membrana en reposo como el potencial de acción se deben a la diferencia de las concentraciones de ciertos iones, potasio, cloro y sodio, y a la permeabilidad relativa de la membrana a estos iones.

La introducción de microelectrodos de vidrio ha permitido una gran cantidad de trabajos que han aclarado el papel de la permeabilidad de membrana a diferentes iones en la generación de los potenciales de reposo en una gran cantidad de tipos celulares, y de los potenciales de acción en el caso de tejido muscular y nervioso. Paradójica y erróneamente, uno de los inventores de los microelectrodos, Gilbert Ling llegó a sostener que:

> "*el potencial celular medido* (con microelectrodos) *no depende directamente de las concentraciones del* K^+ *o del* Na^+*, ni de las permeabilidades de la superficie* celular *a estos iones*".

Las concentraciones iónicas en el mioplasma de una fibra muscular de rana bañada en solución de Ringer se indican en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Concentraciones iónicas en el mioplasma

Iones	IntracelularmM	ExtracelularmM
K^+	140,0	2,5
Cl^-	3,6	120,0
Na^+	9,2	120,0
A^-	152,0 (mE)	—

Los 152 mE de A^- representan la carga negativa de ciertos ácidos orgánicos presentes en el mioplasma que balancean el exceso de carga positiva asociada al ion K^+.

Desde el trabajo de Bernstein en 1902, se había relacionado el gradiente de concentración del ion K con el establecimiento de una diferencia de potencial que se desarrollaba por corto tiempo en el extremo cortado de un nervio o de un músculo (potencial de daño). Bernstein supuso que la membrana celular era permeable al potasio y básicamente impermeable a los aniones y al sodio, y pudo explicar el potencial de daño considerándolo un caso límite de la ecuación derivada por Nernst para cuantificar el potencial que se desarrollaba en el sitio de encuentro de dos soluciones con diferentes concentraciones de un electrolito:

$$E = \frac{RT}{ZF}\left(\frac{u-v}{u+v}\right)\ln\frac{c_2}{c_1} \qquad \textbf{(5-1)}$$

en donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, Z la Valencia, F la constante de Faraday, u y v las movilidades de los cationes y aniones respectivamente, y c_2 y c_1 las dos concentraciones a ambos lados de la membrana. Si u y v son distintas, una pequeña diferencia de potencial se desarrolla en la interfase entre las dos soluciones. Bajo las condiciones asumidas

por Bernstein, la ecuación de Nernst, para el caso del K, se transforma en:

$$E_m = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[K]_e}{[K]_i} \qquad \textbf{(5-2)}$$

indicando que el potencial de membrana de fibras musculares estaba determinado por las concentraciones de K en el medio interno y el externo.

Sin embargo el trabajo de Boyle y Conway (1941), sugirió que la membrana de las fibras musculares era también permeable al Cl y que el potencial de reposo resultaba de un equilibrio de Donnan, según el cual no se esperaría un movimiento de KCl a través de la membrana de las fibras cuando las concentraciones de K y Cl son cambiadas manteniendo su producto constante. Bajo estas condiciones, si el K y Cl están en equilibrio, el potencial de membrana debería ser dado por la ecuación de Nernst para los dos iones:

$$E_m = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[K]_e}{[K]_i} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl]_i}{[Cl]_e} \qquad \textbf{(5-3)}$$

según la cual los potenciales de equilibrio del K y el Cl, calculados utilizando los valores de concentración de estos iones indicados previamente, son iguales y cercanos a los 100 mV, con el interior de la fibra negativo con respecto al exterior. De acuerdo a esta formulación, no debiera haber movimientos de KCl a través de la membrana si las concentraciones externas son cambiadas manteniendo el producto K por Cl constante.

Para el caso del ion sodio la situación es diferente, ya que el valor de su potencial de equilibrio es de 64 mV con el interior positivo con respecto al exterior. Esto significa que el sodio está lejos del equilibrio, y tanto el gradiente eléctrico como el gradiente químico promoverían su entrada a la fibra si fuese permeable. Debido a que la permeabilidad de la membrana al sodio es pequeña

pero finita, hay un flujo constante de este ion que con el tiempo disiparía estos gradientes. Sin embargo, el estado estacionario es mantenido gracias al funcionamiento de un mecanismo de transporte activo que utiliza energía para transportar al ion sodio en contra de su gradiente electroquímico.

Utilizando la técnica de microelectrodos intracelulares para medir el potencial de membrana, Adrian (1956, 1960) demostró que la ecuación de Nernst, aplicada al potasio, se cumplía con gran precisión para concentraciones de potasio mayores a 10 mM, pudiéndose utilizar para calcular el potencial de membrana cuando las concentraciones de K y Cl en el interior están en equilibrio con las del medio externo.

Para otras situaciones es necesario conocer las permeabilidades o conductancias relativas para los dos iones. Hodgkin y Horowicz (1959) realizaron una serie de experimentos utilizando fibras musculares únicas aisladas y un equipo que permitía el cambio rápido de soluciones externas para medir los cambios de potencial cuando se variaban las concentraciones de K y Cl en el medio externo. Con estos experimentos pudieron comprobar que la hipótesis de Boyle y Conway (1941) se cumplía.

De esta forma Hodgkin y Horowicz (1959) demostraron experimentalmente que la membrana de la fibra muscular podía comportarse, bajo condiciones adecuadas, como un electrodo de cloruro o de potasio. Además, cuando sustituyeron el Cl por el anión impermeable sulfato, comprobaron que la diferencia encontrada por Adrian (1956), entre los datos experimentales, y los teóricos predichos por la ecuación (5.2) podía ser disminuida notablemente si se tomaba en cuenta que la membrana tenía una pequeña permeabilidad al ion sodio, como se muestra en la gráfica de la figura 5.1. Los puntos experimentales representan los valores del potencial de membrana de una sola fibra muscular obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de K^+ en el medio externo preparado sin Cl^-. La línea recta fue calculada de acuerdo a la ecuación de Nernst para el K^+, mientras que la línea curva lo fue según la ecuación:

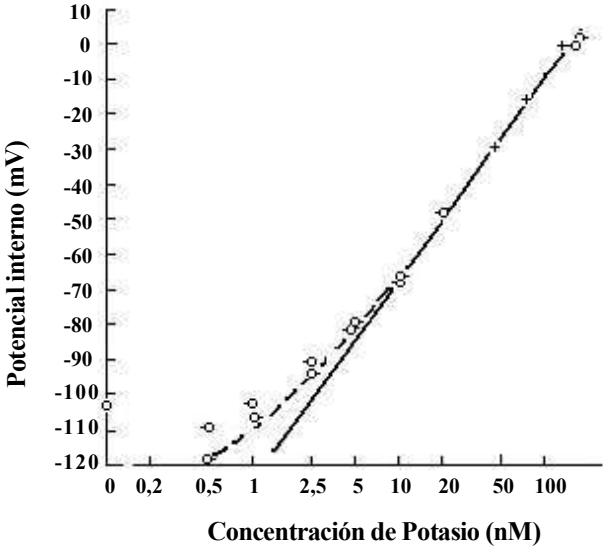


Figura 5.1. Relación entre la concentración externa de potasio y el potencial de membrana en fibras musculares. Los símbolos representan los valores experimentales obtenidos por Hodgkin y Horowicz(1959). La línea continua representa el valor teórico de la relación, calculado de acuerdo a la ecuación de Nernst para el ion potasio. La línea punteada ha sido obtenida considerando la contribución de la permeabilidad al sodio. (Ver el texto para mayores detalles). (*Modificado de Hodgkin y Horowicz, 1959*).

$$V_{K+Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_e + \alpha [Na]_e}{[K]_i + \alpha [Na]_i} \qquad \textbf{(5-4)}$$

en la cual la constante α representa la relación de permeabilidades P_{Na}/P_K y es igual a 0,01. Esta ecuación, puede ser derivada, utilizando la teoría de campo constante de Goldman (1943). Descartando la pequeña contribución del sodio al potencial de reposo, y alterando las condiciones de equilibrio del Cl o del K con cambios rápidos en la concentración de uno solo de los dos iones, Hodgkin y Horowicz pudieron determinar la cinética con la cual se restablecía el equilibrio y así calcularon las permeabilidades y conductancias de la membrana al potasio y al cloruro:

$$I_K = g_K (V - V_K) \quad \textbf{(5-5)}$$

$$I_{Cl} = g_{Cl} (V - V_{Cl}) \quad \textbf{(5-6)}$$

en los que I_K e I_{Cl} son las densidades de corrientes del cloro y del potasio hacia afuera; g_K y g_{Cl} son las conductancias respectivas por unidad de área, que se supone no son constantes, pudiendo variar de cualquier manera con la concentración o el potencial; V es el potencial de membrana de la fibra muscular y V_K y V_{Cl} son los potenciales de equilibrio de los dos iones, dados por la ecuación de Nernst:

$$V_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_e}{[K]_i} \quad \textbf{(5-3a)}$$

$$V_{Cl} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl]_i}{[Cl]_e} \quad \textbf{(5-3b)}$$

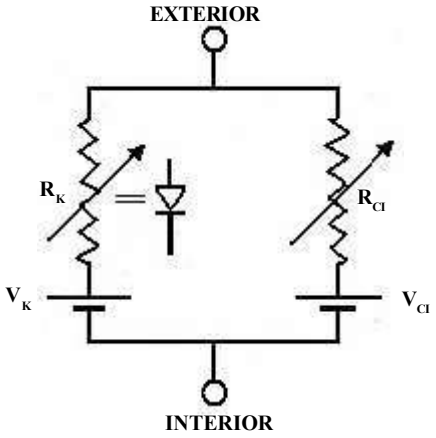


Figura 5.2. Circuito eléctrico equivalente de una membrana de fibra muscular con permeabilidades variables para los iones K y Cl.

Los efectos del K y del Cl sobre el potencial de reposo de la membrana de las fibras musculares son descritos por el circuito

equivalente de la figura 5.2. Las Resistencias R_K y R_{Cl} representan la resistencia de las vías de paso para el K y el Cl (canales de K y Cl según la terminología actual), y las baterías V_K y V_{Cl} representan la fuerza electromotriz que actúa sobre los dos iones respectivamente.

Si se considera que sólo puede haber corrientes de Cl y de K, entonces en ausencia de otra corriente externa:

$$I_K + I_{Cl} = 0 \qquad \textbf{(5-7)}$$

Hodgkin y Horowicz (1959) utilizando las ecuaciones anteriores (5-3, 5-4 y 5-7) demostraron que se podían obtener los valores de conductancia relativa de los dos iones:

$$V = t_K V_K + t_{Cl} V_{Cl} \qquad \textbf{(5-8)}$$

donde:

$$t_K = g_K / (g_K + g_{Cl}) \qquad \textbf{(5-9)}$$

y

$$t_{Cl} = 1 - t_K = g_{Cl} / (g_K + g_{Cl}) \qquad \textbf{(5-10)}$$

De la ecuación 5-8 se puede estimar la conductancia relativa de cada uno de los iones cambiando V_K manteniendo constante V_{Cl} y viceversa. Como ejemplo, consideraron que en el caso en que $g_K >> g_{Cl}$ el valor de t_K seria igual a 1 y el valor de t_{Cl} seria igual a 0. En este caso el valor del potencial de membrana seria sensible a cambios en V_K cuando [V][Cl] permanece constante e insensible a cambios en V_{Cl} cuando [V][Cl] se mantiene constante. Para demostrar experimentalmente estas conclusiones, Hodgkin y Horowicz utilizaron fibras musculares aisladas de rana y el sistema para cambios rápidos de soluciones mencionado anteriormente, para evitar cambios en las concentraciones internas de K y de Cl. Con una fibra expuesta a la solución normal (2,5 mM K, 120 mM Cl) V_{Cl} debería ser igual a V_m. La figura 5.3 muestra que al reducir el cloro externo de 120 a 30 mM, el valor de V_{Cl} cambia de -98

mV a –63 mV, mientras que el valor de V_K permanece invariado. En el experimento, la reducción rápida en la concentración de Cl externa causa una despolarización instantánea de alrededor de 20 mV, sin embargo, esta despolarización es transitoria ya que el potencial de membrana empieza a recuperar su valor inicial con una constante de tiempo de 4 minutos. La reducción en el valor de V_m causa la salida simultánea de K y Cl, que continúa hasta que el producto K por Cl se reduce a la cuarta parte del valor inicial, lo que es debido exclusivamente a la disminución de la concentración de Cl, ya que la concentración de K permanece prácticamente constante.

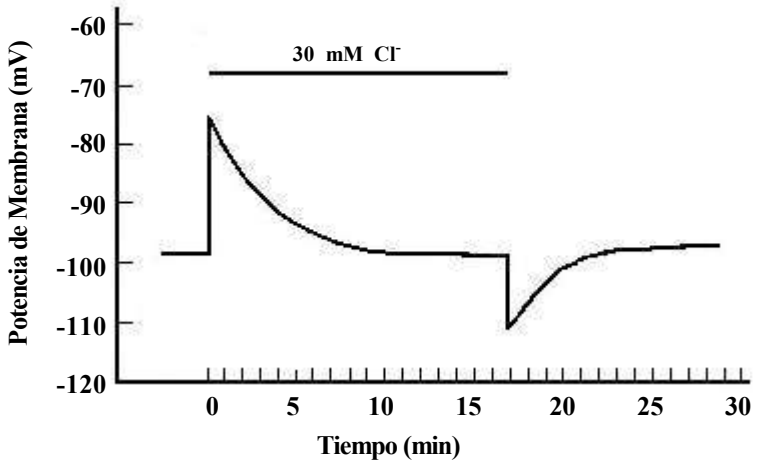


Figura 5.3. Efecto de la disminución de la concentración del Cl externo sobre el potencial de membrana de una fibra muscular de rana. (*Modificado de Hodgkin y Horowicz, 1959*).

Este movimiento de Cloruro es acompañado por la salida de agua para preservar el equilibrio osmótico. La figura 5.4 muestra un experimento en que se aumentó la concentración externa de K, de 2,5 a 10 mM manteniendo constante la de Cl. El gráfico muestra que en presencia de alto K la fibra se despolariza 20 mV a partir de un valor inicial de potencial de membrana de -94mV. Para exposiciones breves, entre 10 y 60 s, el efecto es satisfactoriamente reversible. Para la exposición mas larga, de 60 min, al regresar la fibra a la solución normal (2,5mM K) solo se observa

una repolarización inicial rápida, de unos 3 mV aproximadamente, seguida de una mas lenta que toma unos 40 minutos para regresar a un valor de -90 mV.

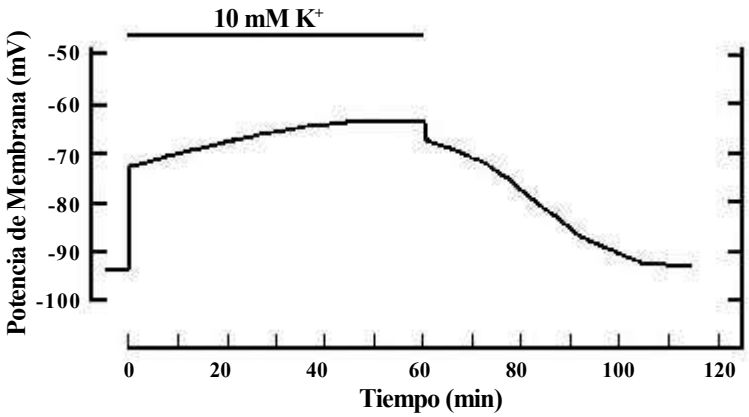


Figura 5.4. Efecto del aumento de la concentración de potasio externo, de 2,5 a 10 mM, sobre el potencial de membrana de una fibra de músculo de rana en presencia de 120mM de Cl externo. (*Modificado de Hodgkin y Horowicz, 1959*).

Cuando la fuerza motriz, para la entrada de K (o sea el parámetro $(V - V_K)$) es hacia adentro o sea cuando $(V < V_K)$ el sistema pasa mucha corriente, mientras que cuando $(V > V_K)$ pasa muy poca corriente. Como resultado del cambio de solución V_K cambia en 35 mV, lo cual causa un flujo de corriente y el valor de V se acerca al de V_K. El potencial de membrana se encuentra entre V_K y V_{Cl} de manera que KCl entra en la fibra, acompañado por agua para mantener el equilibrio osmótico, hasta establecer un nuevo equilibrio en donde $V = V_K = V_{Cl} = -65mV$. Al regresar a la solución con 2,5 mM K, V_K se revierte inmediatamente a su valor inicial de -95mV. Ahora la corriente de K es hacia fuera, la conductancia de K es baja, de manera que V es controlado por V_{Cl}. Bajo estas condiciones la fibra se repolariza sólo 2 o 3 mV, lo cual sin embargo es suficiente para que no esté en equilibrio con respecto al cloruro, y esto hace que KCl y agua salgan lentamente de la fibra hasta alcanzar de nuevo el equilibrio inicial.

Con experimentos de este tipo, Hodgkin y Horowicz pudieron concluir que en solución normal, la conductancia de cloruro en reposo es el doble de la de potasio.

Propiedades eléctricas pasivas

Circuitos RC

Ya en 1867 Hermann había intuido que el cambio de potencial asociado con las regiones excitadas podría causar el flujo de pequeñas corrientes a lo largo del eje del cilindro, que luego fluirían a través de la membrana, causando despolarizaciones locales que a su vez excitarían el segmento de membrana contiguo. Luego fue demostrado que, este mecanismo de propagación dependía de las propiedades eléctricas, y específicamente de los valores de la resistencia y capacitancia de la membrana. La membrana de las células excitables, y en particular de las fibras musculares, está compuesta básicamente por una capa de fosfolípidos y embebidas en ésta, se encuentran diversas proteínas que cumplen diferentes funciones: bien sea como canales iónicos, o como transportadores o receptores. Esta disposición le confiere a la membrana carac-terísticas eléctricas equivalentes a las de un circuito compuesto por una capacitancia y una resistencia dispuestas en paralelo como se muestra en la parte superior de la figura 5.5. Las características físico-químicas de los fosfolípidos y el grosor de la membrana, determinan que ésta se comporte eléctricamente como un condensador, con una capacidad específica que varía de 0,7 a 1 $\mu F/cm^2$ en casi todas las células. Si imaginamos una célula muy pequeña que ha sido empalada por un microelectrodo, siguiendo el análisis hecho por Fain (1999), tendremos que al pasar un pulso prolongado de corriente a través de la membrana, parte de la corriente fluirá hacia afuera a través de la resistencia R y parte cargará la capacitancia C:

$$i_r = V/R \qquad \textbf{(5-11)}$$

$$i_c = C\ dV/dt \qquad \textbf{(5-12)}$$

y la corriente total, i_t, a través de la resistencia y capacitancia será:

$$i_t = i_r + i_c = V/R + C\ dV/dt \qquad \textbf{(5-13)}$$

Al comienzo del pulso, la mayor parte de la corriente será capacitativa, y servirá para cargar el condensador y cambiar el voltaje a través de él y de la resistencia, ya que estos dos elementos están en paralelo. En la medida que cambia el voltaje a través de la resistencia, empezará a fluir corriente también a través de ésta, pero a tiempos más largos dV/dt se hace igual a cero, y ya no hay flujo de corriente capacitativa y toda la corriente fluye a través de la resistencia.

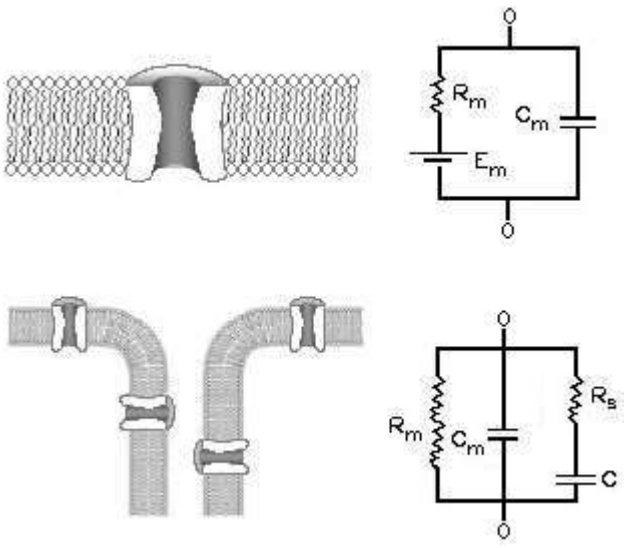


Figura 5.5. En la parte superior se muestra el esquema de la membrana superficial de una fibra muscular con su circuito equivalente. En la parte inferior el esquema y su correspondiente circuito incluyen la membrana de los túbulos transversales.

El voltaje a través de este elemento de membrana se calcula reordenando la ecuación (5-13) de manera que tendremos:

$$(V - i_t R) = - RC\ dV/dt \qquad \textbf{(5-14)}$$

donde:

$$dV/(V - i_t R) = - dt/RC \qquad \textbf{(5-15)}$$

Recordando que $\int \frac{dx}{(x+c)} = \ln(x+c)$, podemos integrar la (3-11) de t = 0 a t = t y de V = 0 a V = V y tendremos:

$$\ln (V - i_t R) - \ln(- i_t R) = - t/RC \qquad \textbf{(5-16)}$$

reordenando y resolviendo:

$$V = i_t R (1- e^{-t/\tau}) \quad \text{donde } \tau = RC \qquad \textbf{(5-17)}$$

lo cual indica que el curso temporal del aumento del voltaje es exponencial, con una constante de tiempo **t** igual al producto entre capacitancia y resistencia como se muestra en la figura 5.6A.

Al terminarse el pulso de corriente el voltaje decaerá de acuerdo a:

$$V = V_o(e^{-t/\tau}) \qquad \textbf{(5-18)}$$

donde V_0 es el voltaje en el estado estacionario e igual a $i_t R$, como se muestra en la figura 5.6B.

En el caso de las fibras musculares, la presencia de los túbulos transversales, que representan invaginaciones de la membrana superficial, complica un poco el esquema presentado en la parte superior de la Figura 5.5.

Fatt and Falk (1964) estudiaron la impedancia AC utilizando microelectrodos, y demostraron que el paso de corriente entre el exterior y el citoplasma consistía en una resistencia y una capacitancia en serie, además de la resistencia y capacitancia en paralelo que normalmente se usan para representar el circuito

equivalente eléctrico de todas las otras células. La parte inferior de la figura 5.5 muestra el esquema de la membrana superficial con un túbulo transversal, y el circuito equivalente propuesto por estos autores. El valor de la capacitancia en paralelo, correspondiente a la membrana superficial, era similar al encontrado en otras células, y los autores propusieron que los dos elementos adicionales correspondían al sistema de túbulos transversos que en efecto aumentan seis o siete veces la superficie de la membrana. Por lo tanto si ésta se calcula sin tomar en cuenta la presencia de los túbulos transversos, el valor de la capacitancia específica aparente es de aproximadamente 6 μF/cm^{2,} valor cercano al que se obtiene experimentalmente.

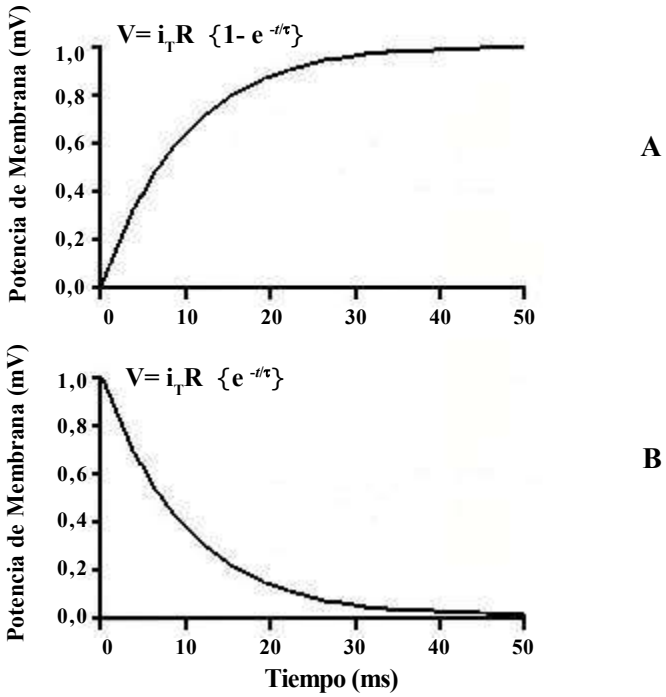


Figura 5.6. Cambios de potencial en respuesta a un pulso de corriente en la membrana superficial de una célula. El gráfico superior corresponde al inicio del pulso, mientras que el inferior corresponde a su fin. (*Modificado de Fain, 1999*)

Las propiedades eléctricas del sistema de túbulos transversales, han sido estudiadas por varios autores debido a la importancia de este sistema en el proceso de activación contráctil y al hecho que estas propiedades determinan la cantidad, y la velocidad de propagación de la corriente, hacia el interior de la fibra. En experimentos particularmente elegantes, insertando dos microelectrodos en una fibra y analizando las propiedades de cable a baja frecuencia, Hodgkin y Nakajima (1972a, 1972b) demostraron que tanto la capacidad, Cm, como la conductancia, Gm, de la membrana, aumentaban con el diámetro de las fibras. De hecho, en fibras de 50 μm de diámetro los valores de Cm y Gm eran de 4,5 μF/cm^2, y 0,21 mmho/cm^2, respectivamente, mientras que en fibras de 130 μm el valor de Cm subía a 8,5 μF/cm^2, y el de Gm subía a 0,37 mmho/ cm^2, confirmando de esta manera el hecho de que un componente importante de estos parámetros es de origen tubular.

Por otra parte la capacitancia efectiva, medida a frecuencias relativamente altas, determinando la velocidad de conducción y midiendo la constante de tiempo del cambio de potencial de membrana en la base del potencial de acción, tenía un valor de 2,6 μF/cm^2 que no cambiaba con el potencial de membrana, pero se reducía a 0,9 μF/cm^2 en fibras sometidas al tratamiento con glicerol, mediante el cual el sistema de túbulos transversales es desconectado de la membrana superficial de las fibras musculares (ver capítulo 6).

Teoría del cable

El comportamiento eléctrico del cable submarino extendido entre Inglaterra y la costa atlántica de EE UU había sido descrito matemáticamente por Lord Kelvin quien enunció y resolvió la ecuación del cable en 1850 para establecer teóricamente, como era el caso en aquella época, la posibilidad de comunicación transatlántica por medio de un cable coaxial, con un aislamiento no perfecto.

Considerando que la resistencia del conductor es $\mathbf{r_i}$ expresada en Ω/cm y la resistencia y capacitancia entre el interior y el

exterior para un metro de cable son $\mathbf{r_m}$ expresada igualmente en Ω/m y $\mathbf{c_m}$ en μF/m, Kelvin demostró que:

$$\frac{1}{r_i}\frac{\delta^2 V}{\delta X^2} = \frac{V}{r_m} + c_m \frac{\delta V}{\delta t} \qquad \textbf{(5-19)}$$

donde V(x,t) es el potencial en el conductor metálico (Fig. 5.7).

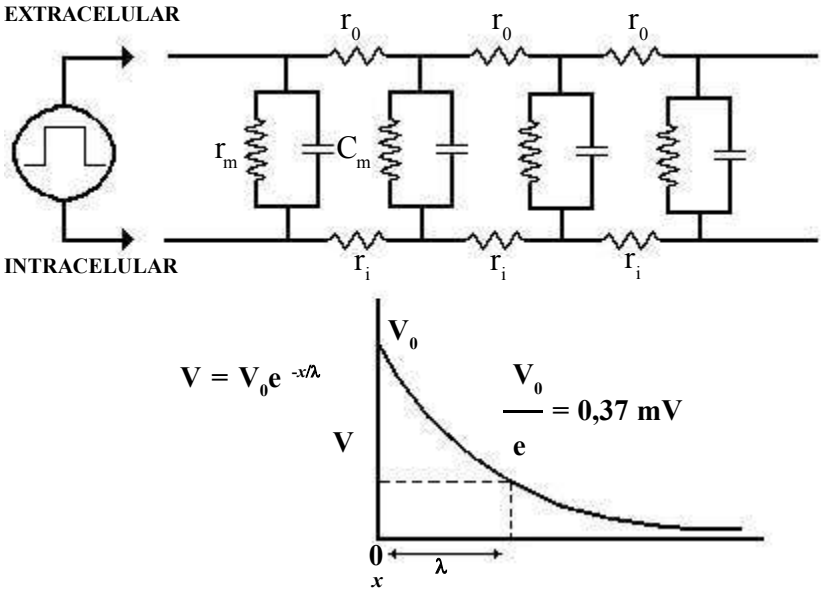


Figura 5.7. Circuito eléctrico equivalente de una célula cilíndrica. El gráfico inferior muestra la caída del potencial a lo largo de la célula, al inyectar corriente en el punto X=0 o sea en la mitad del cilindro, que se supone sea muy largo.

La aplicación de las ecuaciones del cable desarrolladas por Kelvin a un nervio de crustáceo de forma cilíndrica, que bien puede extenderse a fibras musculares, fue hecha por Hodgkin y Rushton en 1946. En los tres casos se trata de un elemento

conductor, es decir, el metal conductor del cable, el axoplasma del nervio o el mioplasma de la fibra muscular, separados del medio externo, el océano y el fluido extracelular respectivamente, por un aislante imperfecto o por la membrana celular.

El circuito de la figura 5.7 incluye la membrana superficial de un axon representada por una resistencia R_m y un condensador C_m . En el caso de una fibra muscular hay que considerar la adición de una resistencia y un condensador extra, como se muestra en la parte inferior de la figura 5.7. Una perturbación en las condiciones de reposo, efectuada por la inyección de un pulso de corriente en la fibra, por medio de un microelectrodo, causa una alteración del potencial de membrana que se propaga de manera pasiva a lo largo del cable. Las propiedades de cable imperfectamente aislado determinan que una fracción de la corriente pueda fluir longitudinalmente en el interior de éste, mientras que otra fracción fluya hacia afuera a través de la membrana, de manera que la señal va decreciendo con la distancia.

Derivación de la ecuación de cable (según G. Fain)

1) La corriente $\mathbf{I_0}$ se inyecta en el punto X = 0.
2) La resistencia del medio externo es $\mathbf{r_e}$.
3) La fibra es un cilindro de largo infinito.
4) La resistencia interna (en el mioplasma) es $\mathbf{r_{mio}}$.
5) La corriente $\mathbf{i_m}$ fluye a través de la impedancia de la membrana representada por una resistencia $\mathbf{r_m}$ (ohm/cm) y un condensador $\mathbf{c_m}$ (farads/cm).
6) La corriente que fluye hacia afuera es positiva.
7) El cambio del potencial de membrana debido a la inyección de corriente es **ΔV.**

V varía con la distancia según:

$$\Delta V = - i_{mio}\, r_{mio}\, \Delta X \qquad \textbf{(5-20)}$$

y:

$$dV/dX = - i_{mio} r_{mio} \quad \textbf{(5-21)}$$

A lo largo de una distancia ΔX la corriente decrece según:

$$\Delta i_{mio} = - i_m \Delta X \quad \textbf{(5-22)}$$

y:

$$di_{mio}/dX = -i_m \quad \textbf{(5-23)}$$

Combinando 3-17 y 3-19:

$$\frac{1}{r_{mio}} \frac{\delta^2 V}{\delta X^2} = i_m \quad \textbf{(5-24)}$$

En esta ecuación $\mathbf{i_m}$ aparece como función del voltaje y la distancia. De las propiedades pasivas tenemos que:

$$i_m = C_m \frac{\delta V}{\delta t} + \frac{V}{r_m} \quad \textbf{(5-25)}$$

En esta ecuación $\mathbf{i_m}$ es la corriente de membrana por unidad de longitud (cm) y $\mathbf{c_m}$ y $\mathbf{r_m}$–son la capacitancia y la resistencia de una unidad de longitud. Combinando 5-20 y 5-21 tendremos que:

$$\frac{1}{r_{mio}} \frac{\delta^2 V}{\delta X^2} = \frac{V}{r_m} + C_m \frac{\delta V}{\delta t} \quad \textbf{(5-26)}$$

que es igual a:

$$\lambda^2 \frac{\delta^2 V}{\delta X^2} - \tau_m \frac{\delta V}{\delta t} - V = 0 \quad \textbf{(5-27)}$$

que es la ecuación del cable en la que:

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{(r_{mio} + r_e)}} \quad \textbf{(5-28)}$$

representa la constante de espacio, y:

$$\tau_m = r_m\ C_m \qquad \textbf{(5-29)}$$

representa la constante de tiempo ya definida.

Para casos en los cuales la resistencia del medio externo es despreciable, la ecuación del cable es similar, pero el valor de ë viene dado por:

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_{mio}}} \qquad \textbf{(5-30)}$$

Las ecuaciones son ecuaciones diferenciales parciales en las cuales, según la derivación hecha, V es función de dos variables: tiempo y espacio. Es posible derivar la ecuación del cable de manera que V sea función de la corriente y del tiempo. En todo caso son ecuaciones difíciles de resolver analíticamente. Han sido obtenidas soluciones para casos particulares. Por ejemplo, para la condición en que dV/dt = 0, sea la respuesta a un pulso cuadrado de corriente en estado estacionario, la ecuación 5-27 se reduce a una ecuación diferencial ordinaria de segundo orden en X que puede ser resuelta fácilmente:

$$\frac{1}{r_{mio}}\frac{\delta^2 V}{\delta X^2} = \frac{V}{r_m} \qquad \textbf{(5-31)}$$

cuya solución es:

$$V = Ae^{-\left(\sqrt{\frac{r_{mio}}{r_m}}\right)X} + Be^{-\left(\sqrt{\frac{r_{mio}}{r_m}}\right)X} \qquad \textbf{(5-32)}$$

en donde A y B son constantes.

Para el caso de un cable infinito con la corriente inyectada en un extremo, las condiciones limitantes son:

V para x = 0 es V_0

V para x = ∞ es 0

Bajo estas condiciones entonces:

para x = 0 $\quad V_0 = A + B$

para x = ∞ $\quad A = V_0$ y B = 0

y la ecuación 3-27 será:

$$V = V_0 e^{-\left(\sqrt{\frac{r_{mio}}{r_m}}\right)X} \qquad \textbf{(5-33)}$$

y siendo: $\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_{mio}}}$ **(5-30)**

tendremos la ecuación: $V = V_0 e^{-x/\lambda}$ que es la misma que la (5-33)

Para el caso de un cable corto, en el cual el microelectrodo de inyección de corriente está en el centro de la fibra, Weidmann (1952) derivó la siguiente ecuación:

$$V = V_0 \frac{\left\{\cosh\left[\frac{(L-X)}{\lambda}\right]\right\}}{\cosh\left(\frac{L}{\lambda}\right)} \qquad \textbf{(5-34)}$$

en la que V_0 es el potencial a X = 0; X es la distancia entre el electrodo que pasa la corriente y el que mide el potencial; V es el potencial en X; L es la longitud de la fibra dividida entre 2 y:

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_{mio}}}$$

La figura 5.8 compara la caída electrotónica de voltaje que ocurre cuando se inyecta corriente en el centro de una fibra, para el caso de una fibra larga, como en la figura 5.7, y una fibra corta, de aproximadamente 1 mm de largo utilizando un valor para λ de 1,2 mm. Para el caso de una fibra de 1 mm la caída de potencial en sus extremos es de alrededor del 10 %. Experimentalmente esta condición puede ser mejorada utilizando soluciones preparadas con SO_4 para aumentar la resistencia de la membrana.

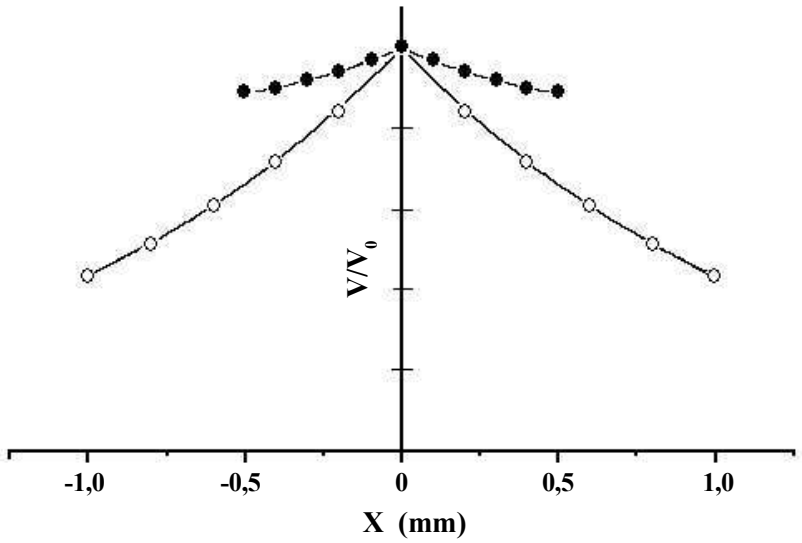


Figura 5.8. Caída electrotónica de potencial a lo largo de una fibra cilíndrica, en la cual se ha inyectado corriente en el centro. Los círculos vacíos corresponden a una fibra larga, mientras que los círculos negros corresponden a una fibra corta.

CAPÍTULO 6

EXCITABILIDAD. POTENCIAL DE ACCIÓN

El término irritabilidad se refiere a la capacidad de toda célula viva de responder a un estímulo externo. Para tejido nervioso y muscular se utiliza el término excitabilidad que define la capacidad de respuesta de estos tejidos a estímulos eléctricos o químicos.

Curvas amplitud-duración

Como se ha visto en el Capítulo anterior, el mecanismo de propagación electrotónica permite la transmisión de señales eléctricas a lo largo de distancias cortas, pocos milímetros, debido a la atenuación determinada por las propiedades eléctricas pasivas de las membranas. Para el caso de fibras nerviosas o musculares, sus dimensiones imponen la necesidad de un mecanismo de propagación que permita la transmisión de información a lo largo de distancias que pueden alcanzar decenas de centímetros, y hasta metros. El término excitabilidad abarca los mecanismos que permiten este tipo de transmisión en los tejidos justamente llamados excitables.

Desde principios y hasta casi la mitad del siglo pasado el estudio de la excitabilidad de nervios y músculos se basaba en obtener la relación entre la intensidad y la duración de un pulso de corriente suficiente para lograr una respuesta regenerativa característica de los tejidos excitables. Cuanto más débil era la corriente, más prolongado debía ser el estímulo. Como se muestra en figura 6.1, si la intensidad de la corriente de estimulación estaba por debajo de un valor mínimo, denominado reobase por Lapicque (1909), la corriente podía fluir indefinidamente sin alcanzar el umbral de excitación. Por otra parte, la duración de un estímulo

cuya intensidad de corriente era el doble de la reobase, llamada cronaxia por Lapicque, se utilizaba como medida de la excitabilidad de la preparación.

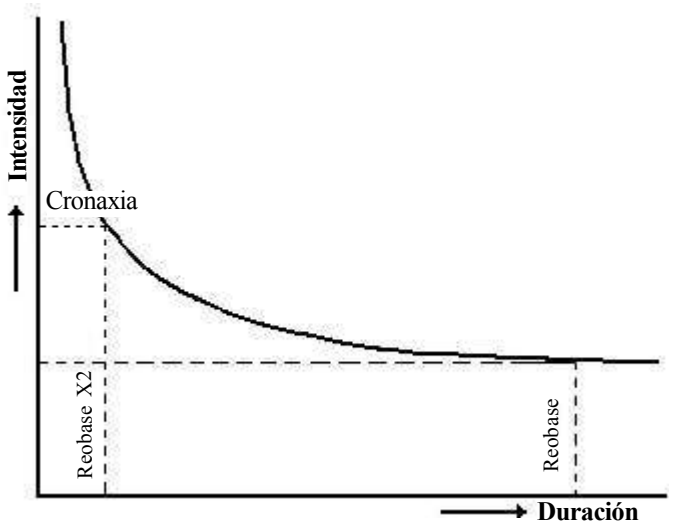


Figura 6.1. Curva Intensidad-duración, utilizada para determinar la excitabilidad de nervios y músculos. La gráfica muestra que para un estímulo de amplitud mayor de un valor mínimo necesario para excitar, llamado reobase, su duración puede ser disminuida si se aumenta su amplitud.

Los primeros registros de la actividad eléctrica asociada a potenciales de acción se hicieron en nervios periféricos utilizando electrodos externos, tanto para estimulación como para registrar corrientes de acción entre dos electrodos de registro. En este caso, al estimular la preparación, la zona estimulada se convierte en sumidero de corriente que fluye hacia ella de las zonas cercanas que a su vez se excitan si la corriente alcanza un determinado valor umbral, convirtiéndose ellas mismas en sumideros de corriente, contribuyendo de esta manera a la regeneración de la señal y a su propagación.

El análisis hecho en el capítulo anterior, referente a las propiedades eléctricas pasivas y a la teoría del cable, es válido cuando

el valor de la resistencia de una membrana excitable (R_m) es constante, o cuando la corriente inyectada es suficientemente pequeña como para no llevar la membrana a la cercanía del valor umbral de excitabilidad, o cuando se usan pulsos hiperpolarizantes. En el caso de pulsos despolarizantes, al aumentar la amplitud se llega a la zona umbral de excitabilidad que, una vez sobrepasada, produce cambios grandes y rápidos en el valor del potencial de membrana con respecto a la amplitud del estímulo, como se muestra en la figura 6.2, basada en un experimento de Hodgkin (1939). La figura muestra la respuesta eléctrica local de una fibra nerviosa de cangrejo montada en aceite y estimulada por medio de un electrodo externo. Los trazos representan potenciales registrados en la cercanía del electrodo de estimulación en respuesta a breves pulsos catódicos, o despolarizantes, de diferente amplitud. La ordenada representa el valor relativo del potencial con respecto a la amplitud de la respuesta propagada que fue de 40 mV. Puede verse como al aumentar la amplitud del estímulo, la duración de la respuesta va aumentando hasta convertirse en respuesta local y luego en potencial de acción, cuya fase de subida también depende de la amplitud del estímulo.

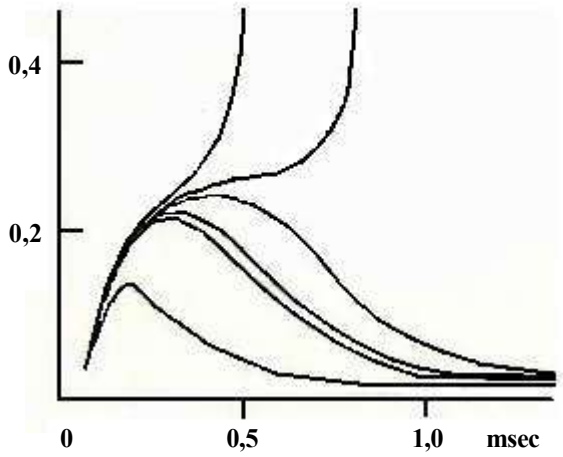


Figura 6.2. Efecto de la amplitud de un estímulo despolarizante en la generación de un potencial de acción de un nervio de cangrejo. Los trazos representan las respuestas del nervio a estímulos de amplitud creciente. (*Modificado de Hodgkin, 1939*).

Hipótesis de Bernstein

Utilizando la técnica de registro extracelular se lograron registros de potenciales de acción que podían ser bien explicados por la hipótesis de Bernstein, según la cual la diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de las células excitables se debía al hecho que, en condiciones de reposo, la membrana de una célula excitable era permeable al K y al Cl, e impermeable o muy poco permeable, al Na.

Según Bernstein (1902; 1912), al ser excitadas las células, la permeabilidad al potasio disminuye transitoriamente, causando a su vez la caída del potencial de la membrana, hasta llegar a valores cercanos a cero. Bajo esta óptica, el potencial de acción se consideraba como la disminución transitoria del potencial de reposo.

El primer resultado importante, que sirvió de base para entender el origen del potencial de acción fue hecho por Cole y Curtis (1939) quienes, estudiando los axones gigantes de calamar, demostraron que durante el potencial de acción ocurría un importante cambio en la impedancia de la membrana, que correspondía básicamente a un gran aumento, mayor de 40 veces, en la conductancia de la membrana del axón de calamar, con un aumento muy pequeño en su capacitancia. Como se muestra en la figura 6.3, el cambio de impedancia empieza con cierto retraso con respecto al potencial de acción registrado simultáneamente, indicando que los cambios de conductancia ocurrían después de haberse alcanzado una cierto nivel de despolarización de la membrana.

Potenciales de Acción

La figura 6.4. muestra dos de los primeros potenciales de acción registrados intracelularmente en axón gigante de calamar y en fibra muscular estriada. El registro a la izquierda fue obtenido por Hodgkin y Huxley (1939) utilizando como electrodo una cánula de vidrio insertada longitudinalmente en un axón, mientras que el registro a la derecha fue obtenido en una fibra muscular, por

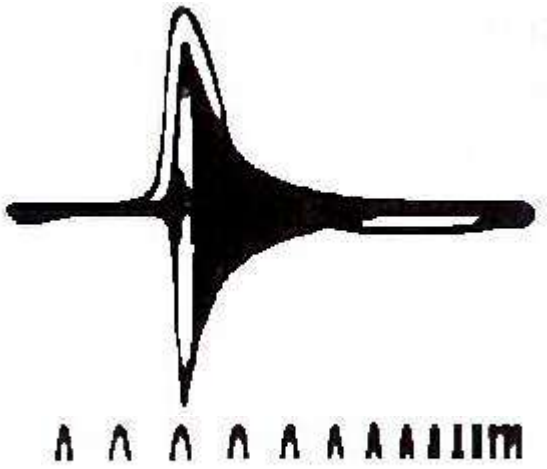


Figura 6.3. Cambio de impedancia causado por la generación de un potencial de acción en un axon de calamar. El cambio de impedancia, debido a un aumento en la conductancia de la membrana, comienza después del potencial de acción, representado por el trazo superior. (*Modificado de Cole, 1974*).

Nastuk y Hodgkin (1950), empleando un microelectrodo de vidrio, insertado transversalmente. El registro del axón demostró por primera vez, que durante un potencial de acción el potencial de membrana sobrepasaba la línea basal de 0 mV y se hacía positivo en casi 40 mV con respecto al exterior. La presencia de un sobretiro positivo había sido observada anteriormente por Cole, quien sin embargo la considero artefactual, y no la reportó ya que contradecía lo postulado por Bernstein (1902), según el cual, durante el fenómeno de excitación, un potencial de acción sólo podía llegar hasta el valor de 0 mV. Sin embargo, como lo relata Cole en su libro (1974), Hodgkin y Huxley caballerosamente reconocieron la prioridad de Cole, definiendo su propio resultado como confirmativo de los resultados previos de Cole. La figura 6.4 también muestra que, aparte del valor del potencial de reposo, una diferencia importante entre las dos preparaciones se encuentra en la fase de caída de la señal, donde para el caso del axón puede verse cómo el valor de potencial alcanza y sobrepasa transi-

toriamente el nivel de reposo, mientras que para el caso de la fibra muscular, la fase de caída se enlentece antes de regresar al valor de reposo.

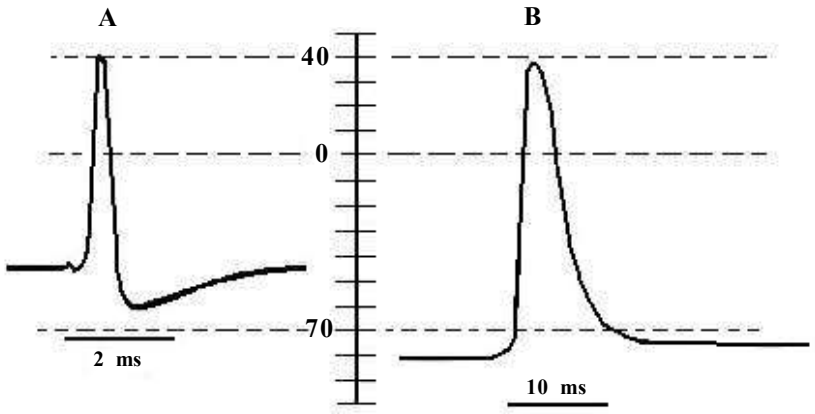


Figura 6.4. Primeros registros intracelulares de potenciales de acción en axon gigante de calamar (izquierda) y fibra muscular de rana (derecha), obtenidos por Hodgkin y Huxley (1939) y Hodgkin y Nastuk (1952) respectivamente.

Generación del Potencial de Acción

Un potencial de acción es un mensaje eléctrico que se propaga a lo largo de un axón o de una fibra muscular de manera regenerativa sin atenuación, y que consiste en un cambio de potencial de membrana causado por el flujo de iones a través de estructuras proteicas que constituyen los canales iónicos de las membranas.

En una fibra muscular, el potencial de acción se genera a nivel de una sinapsis especializada, la unión neuromuscular o placa motora, donde un neurotransmisor, la acetilcolina liberada del terminal nervioso, causa la activación de un canal iónico, receptor de acetilcolina, presente en la membrana post-sináptica de la fibra muscular.

La disponibilidad de una preparación como el axón gigante de calamar, abrió camino para numerosos estudios que mediante el uso de técnicas electrofisiológicas y de radioisótopos, permitieron aclarar numerosos fenómenos de la fisiología celular, incluyendo la generación y naturaleza del potencial de acción. Debido a que los conceptos básicos de la excitabilidad se aclararon con esta preparación, la utilizaremos como ejemplo para explicar la naturaleza de las corrientes iónicas subyacentes al potencial de acción. Luego se verá cómo, empleando otras técnicas, se demostró que estos principios básicos aplicaban también para el caso de las fibras musculares.

En 1902 Overton había demostrado que músculos de rana bañados en una solución fisiológica con menos de 10 por ciento del sodio normal no se excitaban al ser estimulados. Los experimentos de Hodgkin y Huxley de 1939 se interrumpieron, por la guerra mundial, hasta después de 1945. En 1949, Hodgkin y Katz publicaron un trabajo en el que demostraron que la amplitud del potencial de acción de axón de calamar, dependía de la concentración de Na en el medio externo.

El diagrama de la Figura 6.5 muestra cómo una despolarización de la membrana, causada por un estimulo eléctrico o por el frente de un potencial de acción que se está acercando, genera un aumento en la permeabilidad de la membrana a los iones Na, que

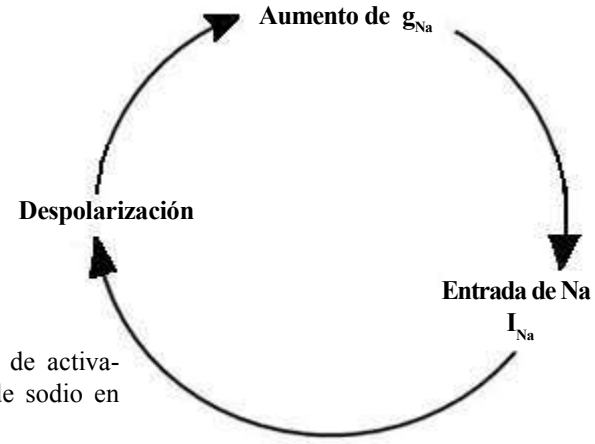


Figura 6.5. Esquema de activación de la corriente de sodio en una célula excitable.

de acuerdo a su gradiente electroquímico entran en la célula, causando una mayor despolarización que resulta en la generación de un potencial de acción que se propaga despolarizando la zona adyacente en la cual se repite el ciclo. En fracciones de milisegundos el potencial de membrana se hace menos negativo e incluso llega a ser positivo, cerca de 40 mV con respecto al exterior, como se muestra en la Figura 6.4.

Ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz

Para explicar sus resultados, Hodgkin y Katz (1949) propusieron que mientras en condiciones de reposo el valor del potencial de membrana depende o está cercano al potencial de equilibrio del ion potasio, al excitarse la membrana, los valores relativos de permeabilidades al K y al Na se revertían, y al hacerse la membrana permeable al Na, su potencial eléctrico se desplazaba hacia el valor del potencial de equilibrio de este ion, calculado según la ecuación de Nernst.

En la figura 6.6 se muestra el circuito equivalente de una membrana excitable, en el cual aparecen tres resistencias en paralelo, representando las vías de paso para el K, para el Na y para iones inespecíficos (R_L resistencia de fuga), conectada cada

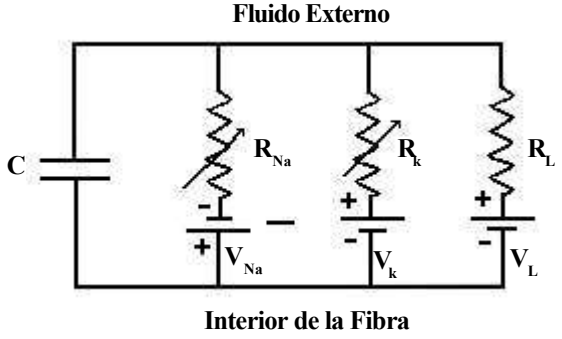


Figura 6.6. Circuito equivalente de la membrana de una célula excitable con conductancias de sodio, potasio y fuga.

una a una batería que representa la fuerza electromotriz del ion respectivo. En términos formales esta situación puede ser descrita por medio de la ecuación derivada por Goldman (1943), a partir de la ecuación de electrodifusión de Nernst-Planck y conocida como ecuación de campo constante:

$$E = \frac{RT}{F} \log_e \left[\frac{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_e}{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e + P_{Cl} [Cl]_i} \right] \qquad \textbf{(6.1)}$$

en la cual E representa la diferencia de potencial a través de la membrana en ausencia de corriente iónica neta. $[K]_i$, $[Na]_i$ y $[Cl]_i$ son las actividades de los iones dentro de la célula, y $[K]_e$, $[Na]_e$ y $[Cl]_e$ son las actividades en el medio extracelular. P_K, P_{Na} y P_{Cl} son las constantes de permeabilidad de estos iones, cuyas magnitudes relativas dependen de las respectivas movilidades y solubilidades dentro de la membrana:

$$P_K = RT/F \; u_K \; b_K; \qquad \textbf{(6.2)}$$

$$P_{Na} = RT/F \; u_{Na} \; b_{Na}; \qquad \textbf{(6.3)}$$

$$P_{Cl} = RT/F \; u_{Cl} \; b_{Cl} \qquad \textbf{(6.4)}$$

en la que las "**u**" representan las movilidades de los iones en la membrana y las "**b**" representan los coeficientes de partición de los iones entre la membrana y el medio acuoso.

En esta ecuación se asume que el gradiente de voltaje a través de la membrana es constante y que los iones, se mueven de acuerdo a su potencial electroquímico. También se presume que las concentraciones de iones en el borde de la membrana sean proporcionales a las concentraciones en la fase acuosa.

Interesantemente Hodgkin y Katz también demostraron que al elevar la concentración de K en el medio externo se producía una disminución en la amplitud, tanto del potencial de acción como del potencial de reposo, siendo mucho mayor la disminución del

primero. Esta observación es doblemente importante: primero porque sugiere el fenómeno de inactivación, y segundo porque permite explicar en términos de la teoría iónica, las observaciones precedentes hecha por diferentes investigadores, Schmitt (1930), Gerard (1936), Lorente de No (1947), relativas al efecto de la anoxia y de agentes inhibidores del metabolismo sobre la excitabilidad de los nervios. Estos agentes afectan el potencial de reposo, disminuyéndolo al igual que el potasio. Esto indica que su efecto no se debe a la participación directa de procesos metabólicos en la generación del potencial de acción, sino a sus efectos despolarizantes. Por supuesto hay que recordar que hay mecanismos dependientes directamente de energía metabólica que mantienen a largo plazo las condiciones necesarias para los fenómenos de excitabilidad, o sea, el mantenimiento de los gradientes iónicos gracias a la actividad de los transportadores de iones, ya que en condiciones fisiológicas la mayoría de los iones no están en equilibrio sino en estado estacionario.

Cuando un impulso se propaga a lo largo de un axón, el potencial interno cambia con el tiempo y con la distancia, acompañado, de acuerdo a los resultados de Curtis y Cole, por un importante cambio en la resistencia eléctrica de la membrana.

Experimentos de voltaje controlado en axones de calamar

Basados en sus resultados anteriores (Hodgkin and Huxley, 1949), Hodgkin, Huxley y Katz (1952) decidieron estudiar las corrientes de membrana que fluyen como consecuencia de los cambios de conductancia de la membrana del axón durante la conducción del impulso nervioso. Para ello tuvieron la genialidad de escoger la técnica y la preparación adecuada. La aplicación de la técnica de retroalimentación para el control del potencial, recién desarrollada por Marmont, les fue facilitada por las dimensiones de los axones gigantes de calamar que pueden superar el mm de diámetro y permiten la introducción longitudinal de electrodos compuestos para la medición del potencial de membrana y la inyección de corriente. El uso de electrodos compuestos, uno para pasar corriente y el otro para medir el potencial fue de extrema

importancia, ya que Marmont (1949) quien había usado un solo alambre para las dos tareas tuvo serios problemas artefactuales debido a la polarización del electrodo al pasar corrientes de alta intensidad, lo cual afectaba las lecturas del potencial.

Corrientes de Na y K

En una serie de trabajos clásicos, Hodgkin y Huxley (1952a, b, c, d) aclararon la naturaleza del potencial de acción, describiendo los cambios en las conductancias iónicas que ocurren cuando un axón gigante de calamar es despolarizado bajo condiciones de voltaje controlado. El trazo superior de la figura 6.7 muestra la corriente que fluye a través de la membrana en respuesta a un pulso despolarizante de 65 mV. El primer cambio en la línea de base es lo que queda de la corriente capacitativa, que casi desapareció en estos registros debido a la escala de tiempo.

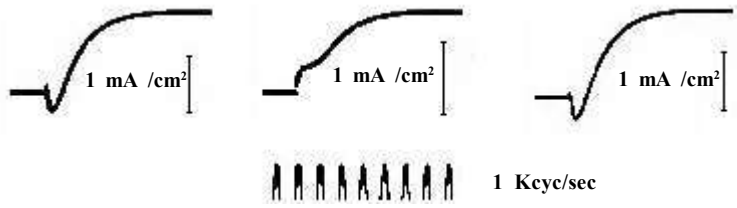


Figura 6.7. Corrientes iónicas de axon de calamar bajo control de potencial. Los trazos a la izquierda y derecha fueron obtenidos en agua de mar antes y después de registrar el trazo central en agua de mar preparada sustituyendo sodio por colina. Las barras verticales representan 1 mA/cm² (*Redibujado de Hodgkin y Huxley, 1952*).

Durante el pulso, con el potencial mantenido constante, la corriente iónica que fluye presenta un aspecto bifásico en el cual pueden distinguirse dos componentes, un primer componente transitorio de corriente hacia el interior del axón, seguido por una segunda fase sostenida de corriente positiva hacia afuera. En los experimentos de Hodgkin y Huxley, la identificación del primer componente se realizó utilizando una solución preparada sin Na, siendo este ion sustituido por colina. Así, en el trazo central, de la

figura 6.7, obtenido en ausencia de Na, se puede observar la ausencia del componente temprano de corriente entrante, que por lo tanto puede ser atribuido al Na, mientras que el componente de corriente hacia fuera que queda, no es afectado por la sustitución del Na por colina. Finalmente el trazo inferior muestra que el efecto de la sustitución de Na es plenamente reversible. La identificación del segundo componente como corriente de potasio, fue sugerida por el hecho de que este tipo de corriente era la que se esperaba que fluyera durante la fase de caída del potencial de acción (PA) y había cierta evidencia de que durante la fase de caída del PA ocurría una salida de K del axón, evidencia que fue luego confirmada estudiando el flujo de trazadores radioactivos en Sepia.

Explorando los trazos de corrientes en un rango muy amplio de potenciales, Hodgkin y Huxley obtuvieron una familia de curvas, reproducida en la figura 6.8 A, donde se nota que el segundo componente va siempre dirigido hacia afuera, mientras que el

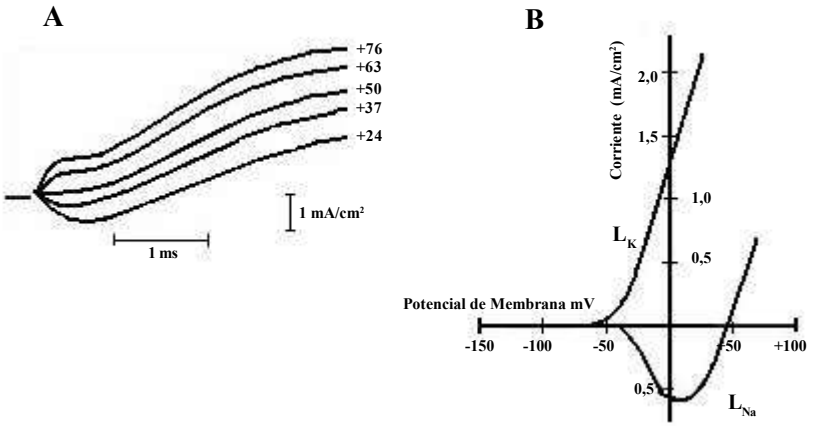


Figura 6.8. Dependencia del potencial de las corrientes iónicas en axon de calamar. Los trazos en **A**, muestran las corrientes que fluyen en respuesta a pulsos que despolarizan la membrana a diferentes valores (indicados al lado de los trazos), a partir de un potencial de man-tenimiento de -60 mV. El gráfico en **B** muestra la relación corriente-voltaje para el Na y potasio respectivamente. (*Modificado de Hodgkin y Huxley 1952*).

primer componente, correspondiente a la corriente de Na, primero está dirigido hacia adentro y luego hacia afuera. Se puede ver que el potencial donde ocurre esta transición está alrededor de +50 mV, que es identificado como el potencial de equilibrio para el ion Na. La figura 6.8B muestra la relación corriente-voltaje para los dos componentes de la corriente total, específicamente la corriente de Na, medida a tiempos cortos y la corriente de K medida al final del pulso cuando estaba en estado estacionario. De nuevo es posible determinar el valor de V_{Na} +47 mV por el punto de corte sobre el eje del voltaje en el cual la corriente es igual a cero. Como se ve en el gráfico es prácticamente imposible determinar el valor de V_K de esta manera.

Hoy en día, para la identificación de los componentes iónicos de las corrientes de membrana en diferentes preparaciones y circunstancias experimentales, se utilizan agentes bloqueadores específicos para las diferentes permeabilidades, así por ejemplo se utiliza la toxina marina tetrodotoxina, del pez tetrodon, que a concentraciones del orden de los nanomoles, bloquea la corriente de sodio, o el tetraetil-amonio, que bloquea la corriente de potasio. La figura 6.9 muestra cómo estos agentes permiten la disección farmacológica de los componentes de la corriente de membrana, lo cual permite estudiar con mucha más resolución una corriente en ausencia de la otra, sobre todo para la fase inicial de la corriente de K que en los experimentos anteriores era enmascarada por la corriente de Na.

Alternativamente, la posibilidad de introducir longitudinalmente una cánula a lo largo de los axones ha permitido perfundir los axones de calamar con soluciones de diferente composición. Así para el caso de soluciones preparadas sin potasio, ha sido posible obtener, bajo condiciones de voltaje controlado, trazos de corrientes debidas exclusivamente a la entrada de Na.

Conductancias de Na y K

A partir de los datos obtenidos en los experimentos anteriores se puede concluir que las corrientes iónicas que fluyen a través de

la membrana cuando ésta es despolarizada, son debidas respectivamente al Na y al K que se mueven de acuerdo a su fuerza motriz (potencial electroquímico), lo que determina de manera exclusiva la dirección de la corriente, mientras que la magnitud de la corriente está determinada no sólo por el potencial electroquímico, sino también por la facilidad con la cual los iones pueden pasar a través de la membrana. La fuerza motriz para un determinado ion es igual a cero cuando éste se encuentra en su potencial de equilibrio. La fuerza motriz que actúa sobre un ion puede medirse como la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del ion en cuestión. De esta manera la fuerza motriz para el Na es dada por $(E - E_{Na})$ y la permeabilidad de la membrana al sodio es dada por $I_{Na}/(E - E_{Na})$, este cociente es la conductancia para el Na, g_{Na} , así que:

$$I_{Na} = g_{Na}(E - E_{Na}), \qquad \textbf{(6.5)}$$

igualmente:

$$I_K = g_K(E - E_K) \qquad \textbf{(6.6)}$$

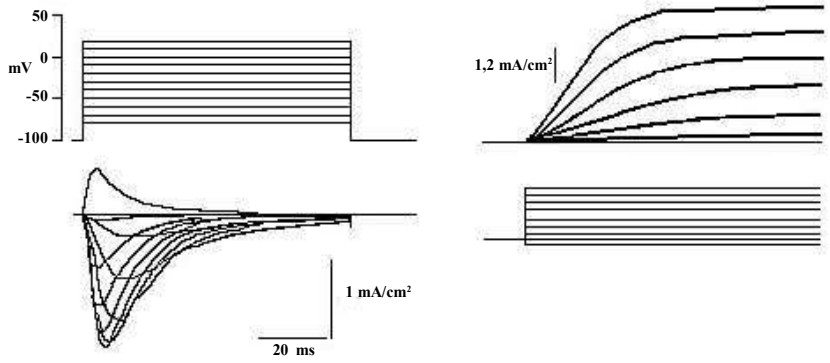


Figura 6.9. Dependencia del potencial de las corrientes de sodio, trazos a la izquierda, y potasio, trazos a la derecha. En estos experimentos las corrientes iónicas son disecadas farmacológicamente utilizando TTX para bloquear las corrientes de sodio, y TEA para bloquear las corrientes de potasio. (*Cortesía del Dr. Francisco Bezanilla*).

Para determinar el valor de las conductancias de Na y de K, Hodgkin y Huxley idearon un protocolo que permitía obtener la relación instantánea entre corriente y voltaje. Este consistía en pulsar la membrana a un potencial en el que hay una activación sustancial de corriente, por ejemplo 0 mV con un pulso condicionante, después de un cierto tiempo el valor del potencial se cambia a diferentes valores en un amplio rango, por ejemplo de -120 mV a + 60 mV con pulsos de prueba. La figura 6.10A muestra el procedimiento seguido para medir la corriente instantánea y la relación corriente-voltaje obtenida para el Na (parte B) y para el K (parte C). En A, las letras a y b indican los protocolos de pulsos usados para medir las corrientes máximas e instantáneas, respectivamente. En las gráficas de la figura, las x indican las medidas de corriente máxima y los círculos llenos indican las medidas de las corrientes instantáneas. Midiendo la corriente que fluye inmediatamente después de aplicar el segundo pulso, los valores obtenidos correspondían a un valor de conductancia constante, como si el sistema fuese de tipo Ohmico, ya que siendo la conductancia constante en el instante de las mediciones, sólo

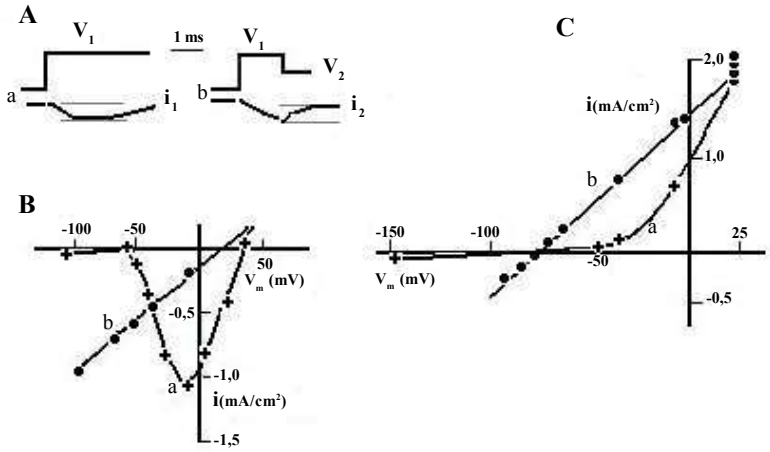


Figura 6.10. **A**. Protocolo de pulsos para obtener la corriente máxima y la corriente instantánea; **B**. Relación corriente voltaje para I_{Na} máxima a, e instantánea, b; **C**. Relación corriente–voltaje para Ik, máxima, a, e instantánea, b. (*re-graficado de Hodgkin y Huxley, 1952*).

dependían del término de voltaje (E – Ei) donde i representa la especie iónica, Na o K en este caso. Para obtener la dependencia del tiempo de las conductancias de Na y K, sólo tuvieron que aplicar la ecuación $I_i = g_{Ni}(E - E_i)$, donde i puede ser el Na o el K, y dividir los trazos de corriente por el valor $(E - E_i)$ para calcular los cambios de las dos conductancias con el tiempo.

En la figura 6.11 se muestran los resultados del procedimiento recién descrito para calcular los cambios de conductancia de Na y K durante un pulso que lleva la membrana de un valor de reposo de aproximadamente -55 mV a un valor de 0 mV. La g_K empieza con un valor pequeño pero finito, se activa con un retraso y sube de forma sigmoidea hasta llegar a un valor máximo de casi 20 mmho/cm^2 que se sostiene con el tiempo.

Si el pulso despolarizante se corta cuando las dos conductancias han llegado a su máximo valor, en ambos casos se revierten y regresan a su valor inicial de forma exponencial, con la g_{Na} decayendo diez veces más rápidamente que la de g_K.

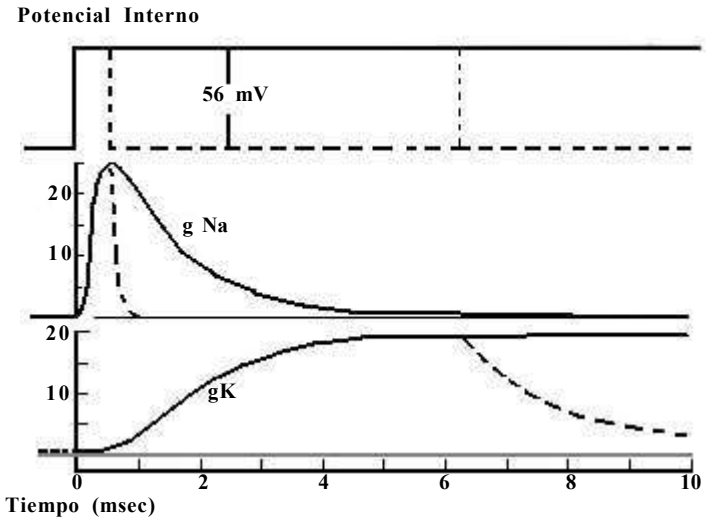


Figura 6.11. Curso temporal de las conductancias de sodio y de potasio en axon de calamar. (*Hodgkin y Huxley, 1952*).

El gráfico muestra que la conductancia de Na disminuye con distinta rapidez dependiendo de si lo hace porque se repolariza la membrana, en cuyo caso se tiene una desactivación de la conductancia, o si cae espontáneamente, en cuyo caso se habla de inactivación. En el primer caso, un segundo pulso aplicado inmediatamente después de cortar el primero, causa un segundo aumento, mientras que en el segundo caso, es necesario mantener repolarizada la membrana por unos pocos milisegundos antes de que un segundo pulso sea efectivo.

Si el mismo procedimiento utilizado para la figura 6.11 se repite para diferentes amplitudes de pulso, se pueden obtener los cursos temporales de las dos conductancias a diferentes valores de potencial de membrana, como se muestra en la figura 6.12.

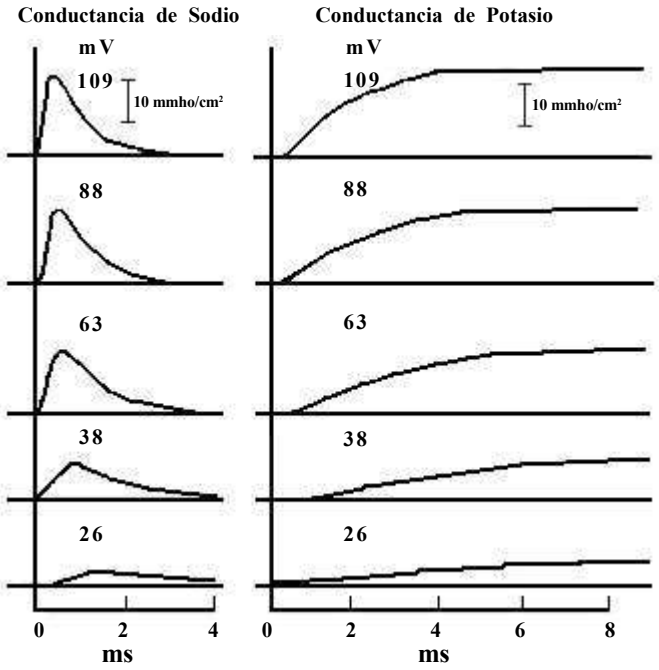


Figura 6.12. Dependencia del potencial de las conductancias de sodio y de potasio en axon de calamar. Ver texto para mayores detalles. (*Modificado de Hodgkin y Huxley, 1952*).

Inactivación de las corrientes de sodio

Para analizar más a fondo el fenómeno de la inactivación, Hodgkin y Huxley idearon un experimento en el cual un pulso de prueba suficiente para activar una corriente casi máxima, era precedido por un pulso condicionante que podía ser de una duración variable y amplitud fija o, como puede observarse en el ejemplo que se muestra en la figura 6.13, de amplitud variable y duración fija, para obtener información sobre la manera en que el mecanismo de inactivación depende del voltaje y del tiempo respectivamente.

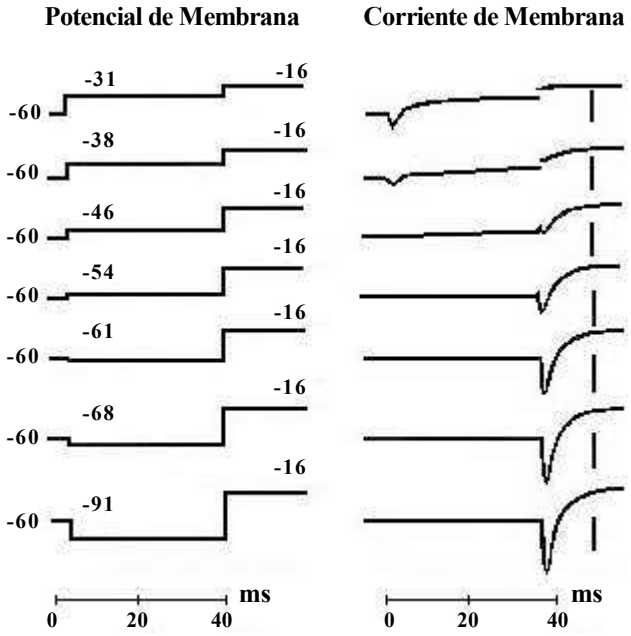


Figura 6.13. Inactivación de la corriente de sodio de axon de calamar por pulsos condicionantes. Puede verse como con un potencial de mantenimiento de -60 mV, pulsos condicionantes hiperpolarizantes causan un aumento de la corriente activada por un pulso de prueba que lleva la membrana a -16 mV, mientras que pulsos condicionantes despolarizantes disminuyen la corriente. (*Modificado de Hodgkin y Huxley, 1952*).

En este experimento la duración del pulso condicionante era suficientemente larga para que la inactivación llegase a su valor final a cada valor de potencial de membrana. Puede verse como la amplitud de la corriente de sodio (hacia adentro) varia dependiendo del valor del puso condicionante, mientras que la corriente de potasio (hacia fuera) no es afectada. La figura 6.14 muestra la relación entre el mecanismo de inactivación y el potencial de membrana. El parámetro h que aparece en la ordenada de la curva, representa la fracción de la corriente de sodio que no está inactivada. La curva indica que el mecanismo de conductancia de sodio está inactivado aproximadamente al 50 % a un potencial de membrana de -65 mV, que es el valor que normalmente se obtiene bajo condiciones fisiológicas. Por otra parte la inactivación es completa a un potencial de -40 mV.

El modelo de Hodgkin y Huxley

Con la información obtenida de estos experimentos, Hodgkin y Huxley pudieron construir un modelo cinético empírico para describir matemáticamente el curso temporal y la dependencia del voltaje de las dos conductancias g_{Na} y g_K para luego poder calcular la forma del potencial de acción.

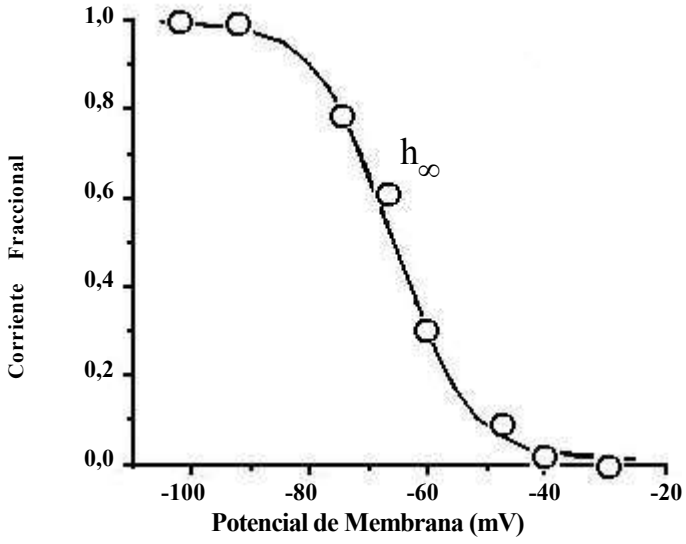


Figura 6.14. Curva de inactivación de la corriente de sodio.

Conductancia de K

Empezando con la conductancia de potasio, ya que era más simple por no presentar inactivación, trataron de buscar un modelo físico que pudiese explicar los resultados de la figura 6.12 que indicaban lo siguiente: a) cuanto mayor era la despolarización más grandes y rápidos ocurrían los cambios de conductancia; b) para despolarizaciones muy grandes había saturación de las conductancias; c) la conductancia se desarrollaba de forma sigmoidea, conllevando un cierto retardo en su activación; y d) el cierre de la conductancia al finalizar el pulso no mostraba retardo.

Empíricamente, el cierre de la conductancia podía ser descrito por una función exponencial simple del tipo $\exp(-t/\tau)$, mientras que para describir la activación en forma sigmoidea de la conductancia se necesitaba elevar la función exponencial a la cuarta potencia. Hodgkin y Huxley propusieron un modelo físico que podía explicar este comportamiento basado en lo siguiente: suponiendo que para activar la conductancia se necesita que cuatro partículas, idénticas e independientes entre sí, ocupen la misma posición, teniendo sólo dos alternativas: posición activa o posición de cierre.

Para cada partícula, la transición entre las dos posiciones viene dada por:

$$C \underset{\beta_n}{\overset{\alpha_n}{\rightleftarrows}} A$$

siendo α_n y β_n las constantes cinéticas para cada una de las partículas, dependientes del voltaje mas no del tiempo. Si n es la fracción de partículas en la posición A, que puede ser el lado interno de la membrana, y (1 – n) representa la fracción de partículas que está en la posición C, que sería el lado externo de la membrana; debido a que la conductancia se activa cuando las cuatro partículas están en la posición A, la conductancia g_K será proporcional a n^4 de manera que:

$$g_K(V,t) = \overline{g}_K n^4 \quad \textbf{(6.7)}$$

donde $\overline{g}_K$ es una constante igual a la máxima conductancia posible y n es una función del potencial V y del tiempo t. El cambio de n con el tiempo es dado por:

$$\frac{dn}{dt} = (1-n)\alpha_n - n\beta_n \quad \textbf{(6.8)}$$

En esta ecuación α_n determina la velocidad de transferencia de las partículas desde afuera hacia adentro, mientras que β_n determina la transferencia en el sentido opuesto. Haciendo referencia a la familia de curvas de activación de g_k en el estado de reposo, o sea cuando V = 0, tendremos que también n tiene un valor de reposo dado por:

$$n_0 = \frac{\alpha_{n0}}{(\alpha_{n0} + \beta_{n0})} \quad \textbf{(6.9)}$$

A partir de los registros experimentales ajustaron ecuaciones empíricas para obtener los valores de α_n y β_n como función del voltaje:

$$\alpha_n = 0{,}01(-50 - V)/ \exp[(-50-V)/10]-1 \quad \textbf{(6.10)}$$

y:

$$\beta_n = 0{,}125\exp[(-V-60)/80] \quad \textbf{(6.11)}$$

Estas dos ecuaciones indican que la constante α_n aumenta mientras que β_n disminuye con la despolarización.

Conductancia de Na

Para la conductancia de sodio se sigue el mismo procedimiento, excepto que se considera que la conductancia está determinada por dos variables, la m que se refiere a la activación y la h que se refiere a la inactivación. Los datos experimentales indican que m está elevada a la tercera potencia. Con estas consideraciones tendremos que:

$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$ **(6.12)**

$dm/dt = (1-m)\alpha_m - m\beta_m$ **(6.13)**

$dh/dt = (1-h)\alpha_h - h\beta h$ **(6.14)**

donde $\bar{g}_{Na}$ es una constante y las α y la β son función de V más no de t. La m representa la fracción de partículas activantes en el lado interno, y (1-m) la fracción de partículas en el lado externo, mientras que h y (1-h) representan las fracciones de partículas inactivantes en los dos lados respectivamente.

Las soluciones de las ecuaciones diferenciales, para las condiciones limitantes:

$m = m_0$ y $h = h_0$ para $t = t_0$ son las siguientes:

$$m = m_\infty - (m_\infty - m_0) e^{\left(-t/\tau_m\right)} \quad \textbf{(6.15)}$$

$$h = h_\infty - (h_\infty - h_0) e^{\left(-t/\tau_h\right)} \quad \textbf{(6.16)}$$

donde: $m_\infty = \alpha_m / (\alpha_m + \beta_m)$ y $tau_m = 1/ (\alpha_m + \beta_m)$

$h_\infty = \alpha_h / (\alpha_h + \beta_h)$ $tau_h = 1/ (\alpha_h + \beta_h)$

m_o es muy pequeño para despolarizaciones mayores de 30 mV, y la inactivación es casi completa si V >-30 mV así que m_o y h_∞ se pueden ignorar.

Conductancia de Fuga

Además de las corrientes de Na y K, normalmente en los experimentos de voltaje controlado se detecta una corriente pequeña (cuando la preparación biológica está en buenas condiciones) que se comporta de manera lineal con respecto al voltaje, ésta fue denominada corriente de fuga I_L y se atribuyó a la

presencia de una conductancia no específica llamada conductancia de fuga, g_L. La corriente de fuga viene dada por:

$$I_L = g_L(V - V_L) \qquad \textbf{(6.17)}$$

Incluyendo la corriente capacitativa, la combinación de las ecuaciones presentadas arriba constituye la descripción matemática de la relación entre la corriente y el potencial de membrana en axones gigantes de calamar:

$$I_M = C\frac{dV}{dt} + \overline{g}_K n^4 (V - V_K) + \overline{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + g_L (V - V_L) \qquad \textbf{(6.18)}$$

Esta es una ecuación altamente no lineal, ya que los parámetros m, n y h en ecuaciones diferenciales con coeficientes ("α" y "β") también son función del voltaje. Gracias a las facilidades que ofrecen las actuales computadoras para el procesamiento de datos, éstas pueden resolverse con métodos numéricos de manera relativamente fácil. En 1950 fue resuelta con una calculadora mecánica, un poco más sofisticada que una regla de cálculo.

El potencial de acción así calculado muestra un umbral claro, indicando que un estímulo cercano al valor umbral de corriente puede causar o no la generación del potencial de acción con cambios infinitesimalmente pequeños en su amplitud.

La ecuación define la relación entre corriente y voltaje en función del tiempo, y como tal, permite calcular la forma del potencial de acción en cualquier segmento del axón pero de manera estacionaria. Por otra parte la ecuación del cable permite conocer la relación entre corriente y voltaje en función de la distancia.

En la ecuación:

$$\frac{1}{r_i} = \frac{\delta^2 V}{\delta X^2} = i_m \qquad \textbf{(6.19)}$$

i_m aparece como corriente por unidad de longitud (cm), y r_i aparece como resistencia interna por unidad de longitud (cm). Para expresar la corriente en función del área de membrana es necesario sustituir:

$$i_m = I_m(2\Pi a) \text{ and } r_i = R_i / \Pi a^2$$

obteniéndose:

$$I_m = \frac{2r_i}{a}\frac{\delta^2 V}{\delta X^2} \qquad \textbf{(6.20)}$$

por sustitución tendremos:

$$\frac{a}{2R_i}\left(\frac{\delta^2 V}{\delta X^2}\right) + C\frac{dV}{dt} + \bar{g}_K n^4 (V - V_K) + \bar{g}_{Nd} m^3 h (V - V_{Na}) + g_L (V - V_L) = 0$$

(6.21)

Esta es una ecuación diferencial parcial, donde el potencial de membrana V es función de la distancia x, y del tiempo t, que puede resolverse numéricamente junto con las ecuaciones para obtener la forma del potencial de acción en cualquier punto del axón y en cualquier momento.

Potencial de acción en fibras musculares

Antes de que se desarrollara una técnica para controlar el potencial de membrana de las fibras musculares, y así poder caracterizar las corrientes de Na y de K asociadas al potencial de acción de esta preparación, Jenerick (1959) desarrolló un método mediante el cual al inyectar corriente en una fibra, podía determinar el valor de potencial de membrana al cual se activaba o se inactivaba la corriente de Na, y en el que se activaba la corriente de K.

Con el desarrollo de la técnica de control de potencial con tres microelectrodos, Adrian y colegas (1970) pudieron realizar ex-

perimentos para medir las propiedades eléctricas pasivas y activas de las membranas de fibras musculares y las corrientes iónicas que fluyen durante despolarizaciones de la membrana. La figura 6.15 muestra de manera esquemática el sistema experimental utilizado para controlar el potencial de membrana en fibras musculares. Los tres microelectrodos se insertan en un extremo de una fibra de músculo sartorio de rana. El microelectrodo marcado V1 sirve para medir el potencial de membrana y cambiarlo a los valores deseados, controlando la corriente que se inyecta en la fibra a través del microelectrodo I por retro-alimentación. Con el micro-electrodo V2 se mide el potencial en su punto de inyección. La diferencia de voltaje entre el electrodo V2 y el electrodo V1 es proporcional a la densidad de corriente que fluye a través de la membrana del segmento de fibra comprendido entre los electrodos V1 y V2 según la ecuación:

$$I_m = \frac{a(V_2 - V_1)}{3R_i l^2} \qquad \textbf{(6.22)}$$

donde a es el radio de la fibra, y R_i es la resistencia interna de la fibra.

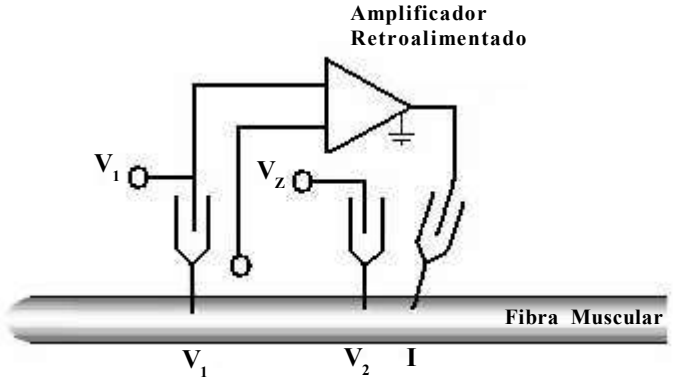


Figura 6.15. Disposición de los microelectrodos para controlar el potencial de membrana de una fibra muscular con la técnica de los tres microelectrodos. (*Modificado de Adrian y colegas, 1970*).

Para evitar que las fibras se contrajeran durante los pulsos despolarizantes, los experimentos se realizaron utilizando soluciones hipertónicas que bloquean la contracción.

La parte izquierda de la figura 6.16 muestra unos registros de la corriente de membrana que fluye durante pulsos despolarizantes. Al igual que en el caso de axón de calamar, puede verse que después del pulso y de un breve período en blanco correspondiente a las corrientes capacitativas que han sido eliminadas para simplificar el análisis, se origina una corriente hacia adentro seguida por una hacia afuera, correspondiente a los componentes de sodio y potasio.

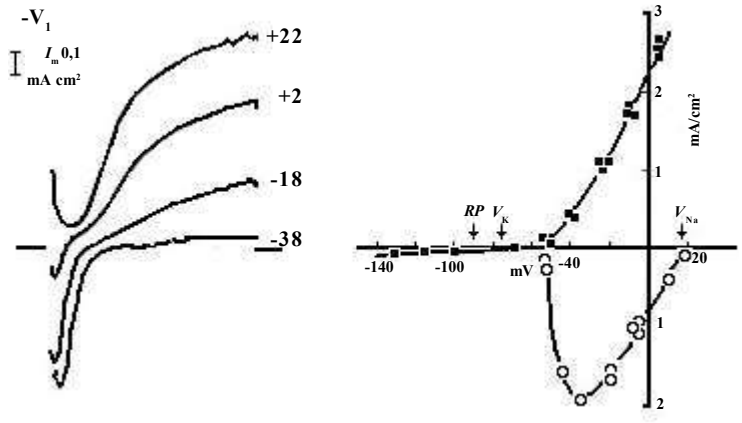


Figura 6.16. Registros de corrientes iónicas de una fibra muscular de Rana y curvas corriente-voltaje, para el sodio y el potasio. (*Modificado de Adrian et al., 1970*).

En la parte derecha de la figura, se ha graficado la dependencia de potencial de la corriente de sodio, identificada con círculos blancos, que muestra un componente hacia adentro y un componente hacia fuera, al igual que en el caso de los axones de calamar, y la corriente de potasio, identificada con círculos negros, que muestra solo un componente hacia fuera. El potencial de equilibrio de la primera corriente presenta un valor promedio de 20 mV a 3ºC. En otros experimentos en que se midió la amplitud del potencial de

acción bajo condiciones similares, el valor promedio máximo de potencial alcanzado por el pico del potencial de acción fue de 29 mV. Esta diferencia puede atribuirse entre otras causas a falta de control de potencial que puede apreciarse en la curva corriente-voltaje por la abrupta transición en el valor de la corriente en la región de potencial cercana a los -40 mV, que indica falta de control de potencial. Para la corriente de sodio, la curva intercepta el eje de las abscisas a un valor cercano a los +20 mV. La otra curva, representa la dependencia del potencial del componente de corriente correspondiente al K. Como en el caso de la corriente de K en axones de calamar, de esta relación no se puede obtener indicación del valor del potencial de equilibrio de este ion.

Los autores tambien registraron la corriente de membrana en presencia de TTX para bloquear la corriente de sodio, para estudiar con más detalles la corriente de potasio. Con pulsos más largos la corriente de potasio decae espontáneamente de manera exponencial, indicando un proceso de inactivación, que pudo ser caracterizado usando el mismo protocolo que había sido usado para los axones de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952). Los autores encontraron que el fenómeno de inactivación presenta una alta dependencia de la temperatura, teniendo la constante de tiempo de caída a + 10 mV un valor entre 1,5 y 3 segundos a 3ºC y entre 0,4 y 1,2 segundos a 20ºC. También encontraron que la inactivación de la corriente de potasio se removía con una constante de tiempo de 0,7 segundos a 20ºC y -100 mV.

Siguiendo los protocolos ya utilizados para los axones de calamar, los autores pudieron determinar la relación instantánea entre corriente y voltaje, y los parámetros de activación e inactivación tanto para el potasio, como para el sodio.

De esta manera les fue posible obtener los valores de los parámetros necesarios para el cálculo de las corrientes de Na y K y de fuga. Con esta formulación, los autores, utilizando el mismo procedimiento matemático que se había usado en el caso de los axones gigantes de calamar, pudieron reconstruir las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana de las fibras

musculares en términos de los parámetros m, n y h, y utilizando constantes que mostraban dependencia de voltaje similar a la de las constantes de axón. Además, presumiendo que el sistema de túbulos T se comporta de acuerdo al modelo de Falk y Fatt (1964), pudieron calcular potenciales de acción propagados muy similares a los registrados experimentalmente.

Una característica importante de los potenciales de acción de fibras musculares, es que durante la repolarización, al llegar aproximadamente a los –75 mV aparece una segunda fase de repolarización que prosigue mucho mas lentamente tardando unos 10 ms hasta alcanzar el valor del potencial de reposo, como se puede apreciar en la figura 6.4. Este componente, denominado post-potencial negativo, es aumentado por diferentes aniones que actúan como potenciadores contráctiles (ver Capítulo 8), e inhibido por venenos metabólicos, como el dinitrofenol, y bajas temperaturas (Falk, 1961).

Corrientes de Calcio en Fibras Musculares

Después de la publicación de los trabajos de Hodgkin y Huxley (1952) que precisaban las bases iónicas del potencial de acción en nervio de calamar, Fatt y Katz (1953) demostraron que en músculo de cangrejo podía haber potenciales de acción en ausencia de Na. Las fibras musculares de artrópodos son multi-inervadas, y responden a estímulos nerviosos con un potencial de acción que no es regenerativo "de tipo todo o nada" sino que se propaga pasivamente de acuerdo a las propiedades eléctricas de la membrana, de manera que la conducción longitudinal de la señal eléctrica ocurre por un sistema de relé basado en la presencia de inervaciones múltiples. Paradójicamente, al eliminar el Na del medio externo, sustituyéndolo por tetraetilamonio, observaron que la respuesta graduada no propagada aumentaba de tamaño y se hacía regenerativa. El mismo efecto ocurría en presencia de concentraciones milimolares de Ba, sin necesidad de sustituir al Na. Estos efectos no pudieron ser explicados por Fatt y Katz. Hoy en día se sabe, como lo explica Hille (2001), que tanto el TEA como el Ba son bloqueadores de los canales de K, y que bloqueando la

acción repolarizante de la corriente de K, facilitaban la acción despolarizante de los canales de Ca dependientes de voltaje.

La primera evidencia de corrientes de cationes divalentes, en músculo fue obtenida por Fatt y Ginsborg (1958), quienes trabajando con fibras musculares de langostinos, demostraron que en presencia de Sr (remplazando isotónicamente al Na) se generaban potenciales de acción propagados, cuya amplitud dependía de la concentración de Sr. El trabajo de Hagiwara y colaboradores (Hagiwara y Naka, 1964; Hagiwara y Nakajima, 1966) confirmaron sin lugar a dudas la presencia de potenciales de acción de Ca en crustáceos.

Por otra parte, numerosos trabajos, como por ejemplo los de Beeler y Reuter (1970) habían demostrado la presencia de corrientes de Ca en músculo cardíaco.

La primera evidencia de la presencia de corrientes de Ca en músculo esquelético fue obtenida por Beaty y Stefani (1976). Ellos demostraron que en fibras musculares bañadas en soluciones preparadas sin Cl y con 2,5 a 20 mM de sulfato de tetraetilamonio, se generaba un potencial de acción lento y prolongado que no ocurría en soluciones preparadas sin Ca, y era inhibido por agentes bloqueadores de los canales de Ca (Co o D-600). Las corrientes de Ca fueron registradas directamente utilizando la técnica de control de potencial con tres microelectrodos (Beaty and Stefani, 1976; Sánchez y Stefani, 1978). Estas corrientes fueron estudiadas en presencia de TTX, con SO_4TEA sustituyendo por el NaCl, para no tener corrientes de Na, K y Cl y 350 mM sacarosa para bloquear cualquier movimiento de los músculos. Bajo estas condiciones se obtuvieron registros de corriente como los que se muestran en la figura 6.17, en los cuales fueron sustraídos los transitorios capacitativos y las corrientes de fuga. Las corrientes registradas presentan varias características interesantes. Antes de todo se aprecia que la activación de la corriente ocurre a valores de potencial entre -40 y -30 con una cinética muy lenta, que las distingue muy netamente de las corrientes de Na registradas en músculos (Adrian, *et al*, 1970). También se ve que la corriente,

una vez activada, no se sostiene por la duración del pulso sino que decae espontáneamente, indicando la presencia de un mecanismo de inactivación. Experimentos realizados aplicando pre-pulsos condicionantes ante de un pulso de prueba, demostraron la presencia de un mecanismo voltaje dependiente que disminuya la amplitud de la corriente activada por el pulso de prueba, indicando de esta manera la presencia de un mecanismo de inactivación análogo al descrito para la corriente de sodio. Experimentos realizados con músculos tratados con glicerol, o sea con el sistema de túbulos-T casi totalmente desacoplado, demostraron que la mayor parte de los canales de Ca estaban localizados a nivel de los túbulos-T (Nicola-Siri, *et al*, 1980). En un trabajo posterior, utilizando fibras cortadas y la técnica de control de potencial con doble sello de vaselina, Almers y Palade (1981), confirmaron los resultados de Stefani y colegas, bajo diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, pudieron sustituir el medio interno normal por una solución con 80 mM $(TEA)_2$-EGTA que bloqueaba completamente las corrientes de K y el movimiento.

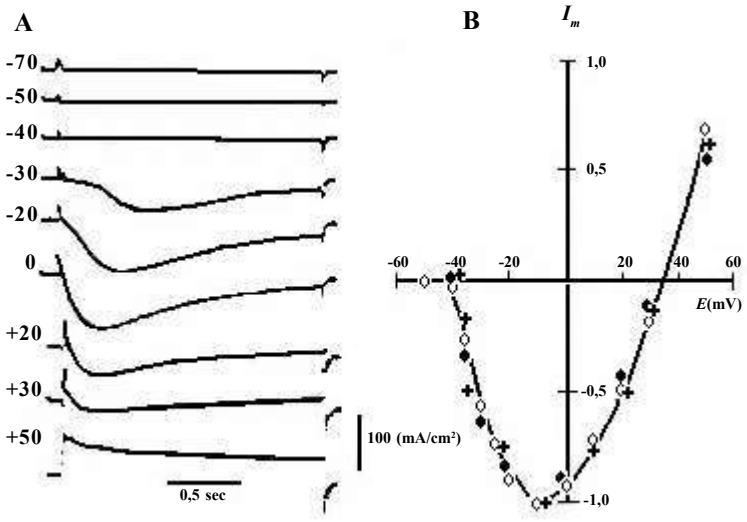


Figura 6.17. Registros de corriente y relación corriente-voltaje para el ion calcio en fibras musculares de *Rana*. (*Modificado de Sánchez y Stefani, 1974*).

En ese trabajo los autores estudiaron algunas de las propiedades de selectividad del canal, encontrando que el Ba, Sr, Ca, Mn y Mg pueden llevar corriente a través del canal, mientras que el Co y el Ni no pasaban por el canal. Además encontraron que el Mg tenía una pequeña actividad inhibitoria. En un segundo trabajo Almers y colegas (1981) estudiaron el mecanismo por el cual las corrientes, una vez activadas, declinaban con el tiempo. Bajo sus condiciones experimentales, y con Ca externo = 10 mM, encontraron que las corrientes de Ca decaían con una constante de tiempo entre 0,2 y 2 segundos. Disminuyendo la amplitud de las corrientes de Ca, haciendo el potencial de membrana más positivo, o bloqueando parcialmente la corriente con drogas (nifedipina o D600), o sustituyendo el Ca con Mn que es menos permeable, encontraron que la tasa de disminución de la corriente también decaía. Por el contrario, cuando aumentaban la amplitud de la corriente de Ca, sustituyéndolo por Ba o Sr que son más permeantes, encontraron que la tasa de caída de la corriente aumentaba proporcionalmente. En otros experimentos en que las fibras eran expuestas a alta concentración de Ca externo o a una solución en que la concentración de Ca era tamponada con maleato, encontraron que la tasa de caída de la corriente también disminuía apreciablemente.

Todos estos resultados indicaban que la amplitud de la corriente determinaba la tasa de caída y la explicación que se daba era que la caída de la corriente se debía al agotamiento del Ca en los túbulos-T. En 1983, Sánchez y Stefani abordaron el mismo problema, y considerando que la caída en la corriente de Ca podía ser artefactual y debida a un aumento en la corriente de K, pudieron descartar esta posibilidad con el experimento de la figura 6.18. En este experimento Sánchez y Stefani hicieron uso de la propiedad del D600, cuya capacidad de bloquear los canales depende de la frecuencia de estimulación, haciéndose más efectivo con el tiempo.

En los registros de corriente a la izquierda de la figura se ve cómo la corriente de Ca va disminuyendo en presencia de D600 (10^{-5} M). El trazo 1 representa la corriente control, los trazos 2 y 3 representan la corriente obtenida después de 4 pulsos aplicados a la

frecuencia de 1 ó 2 estímulos por minuto, respectivamente. El gráfico a la derecha muestra que la tasa de decaimiento de la corriente no está relacionada con la amplitud de la corriente en un gran rango de corrientes.

Basados en estos resultados, los autores concluyeron que un fenómeno de inactivación era la causa, por lo menos parcial, de la caída de la corriente.

En muchas preparaciones, la corriente de Ca presenta el fenómeno de inactivación, que frecuentemente depende de la concentración de Ca. Una posibilidad para explicar los resultados controversiales obtenidos por los dos grupos es que en el caso de los experimentos con fibra cortada, el medio interno contenía 80 mM de EGTA. Esto indicaría que la concentración de Ca libre es muy baja, lo cual pudiera disminuir el efecto de un mecanismo de inactivación dependiente del Ca.

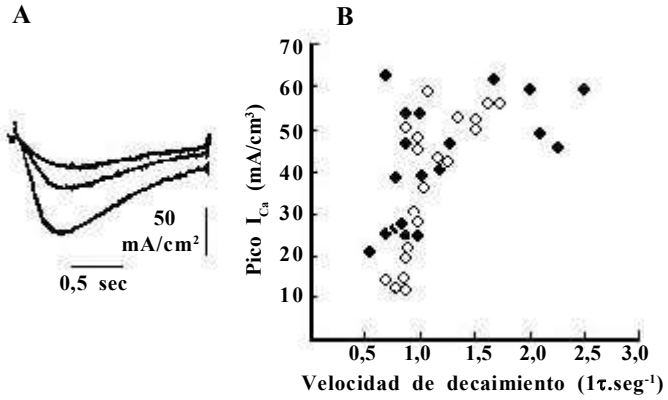


Figura 6.18. Experimento para demostrar que la disminución de corriente de Ca durante un pulso despolarizante, no se debe en mayor proporción a disminución del Ca en los túbulos transversos. El experimento demuestra que la disminución de la corriente no depende de su amplitud, indicando la presencia de un fenómeno de inactivación. (*Modificado de Sánchez y Stefani, 1983*).

CAPÍTULO 7

FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS INTRACELULARES

El Retículo Sarcoplasmático

Hacia 1960, el interés de algunos investigadores se centró en la capacidad del Ca de inducir la contracción de preparaciones de actomiosina aislada, en presencia de compuestos como ATP y Mg. Sin embargo, se encontró que una vez contraídas, estas preparaciones sólo se relajaban en presencia de diferentes factores, tales como EDTA o ATP en exceso sobre Mg. En 1951 Marsh describió la acción relajante de un factor extraído de homogenados de músculo. Este factor fue estudiado por Bozler (1952, 1955) y Bendall (1953) e identificado como un componente del RS por Kumagai y colegas (1955) y por Nagai, Makinose y Hasselbach (1961).

Factor relajante de Marsh y Bendall

Marsh (1951) descubrió que al homogeneizar un músculo esquelético en una solución salina de baja fuerza iónica, las miofibrillas suspendidas en el homogeneizado no se contraían al agregarle ATP y que la degradación de ATP por la ATPasa del sistema contráctil ocurría muy lentamente. Esta observación contrastaba con lo que ocurría cuando se usaban miofibrillas bien lavadas, en cuyo caso el ATP producía una violenta contracción de la preparación, con una tasa alta de hidrólisis del ATP. En presencia de pequeñas cantidades de Ca, la acción inhibitoria observada con las miofibrillas no lavadas desaparecía. Para explicar este comportamiento, Marsh postuló la presencia de un factor

relajante en el homogeneizado que inhibía la hidrólisis de ATP y la contracción. Este factor se quedaba en el sobrenadante cuando las miofibrillas se removían del homogeneizado por centrifugación de baja velocidad. Bendall (1953) demostró que el factor relajante en el sobrenadante inhibía el desarrollo de tensión de fibras musculares extraídas por glicerol (Bendall, 1953), mientras que Hasselbach y Weber (1953) demostraron la actividad inhibitoria del sobrenadante sobre la contracción e hidrólisis de ATP de miofibrillas bien lavadas. Marsh (1952) ya había demostrado que la actividad inhibitoria del sobrenadante desaparecía en presencia de pequeñas cantidades de calcio, cuando Bozler (1954) encontró que el quelante de Ca, EDTA, tenía un comportamiento parecido al del factor relajante de Marsh. Portzehel (1957), estudiando el efecto inhibitorio del factor en solución sobre la actividad ATPásica, encontró que después de centrifugación a alta velocidad, la actividad inhibitoria del sobrenadante se perdía y se encontraba en su totalidad en una fracción de partículas en el precipitado. Una fracción similar con la actividad del factor relajante, asociada con la ATPasa granular de Kielley-Meyerhof (1948) pudo ser aislada del homogeneizado, por precipitación con sulfato de amonio al 20 % (Kumagai, Ebashi y Takeda, 1955). Ebashi y colegas (Kumagai *et al.*, 1955) pudieron asociar el factor relajante de Marsh y Bendall con la fracción microsomal rica en lípidos, que años antes había sido aislada por Kielley y Meyerhof (1948 a,b) quienes también demostraron que tenía una actividad ATPásica, activada por Mg, mucho mayor que la actividad ATPásica de la miosina. En su " *Croonian lecture*" de 1979, Ebashi (1980) relata cómo, leyendo estos trabajos de Kielley y Meyerhof tuvo la impresión de que estos autores habían intuido la enorme importancia fisiológica de esta nueva enzima, importancia que fue entendida por otros investigadores años más tarde.

Inspirado en el trabajo de Bozler (1955), Ebashi (1959) estudió las propiedades relajantes de diferentes compuestos que secuestraban Ca incluyendo el EGTA que había sido introducido recientemente en el mercado. Ebashi no llegó a notar la estrecha relación cuantitativa que había entre la capacidad de unir calcio y la actividad relajante de estos compuestos, probablemente porque para

esa época no se conocía el papel del calcio como activador de la contracción, perdiéndose así de nuevo la oportunidad de reconocer el papel del Ca en este fenómeno (Ebashi, 1980).

Sin embargo, el año siguiente, trabajando en el laboratorio de Lipmann, demostró cómo el efecto de sustancias secuestradoras de calcio, como ATP a altas concentraciones, EDTA y EGTA, estaba estrictamente relacionado con su actividad relajante. Este descubrimiento abrió la posibilidad de entender el efecto relajante de las vesículas del RS bajo una óptica diferente, ya que al asociar su función con el Ca, fue evidente que éstas podían actuar como secuestradoras de este catión (Ebashi, 1960, 1961; Ebashi y Lipmann, 1962) Estos resultados fueron confirmados por varios investigadores utilizando diferentes músculos y con varias modificaciones en la técnica de preparación del factor relajante. De todos los resultados obtenidos se pudo concluir que las partículas con el factor relajante no pertenecían ni a la fracción mitocondrial ni a la fracción microsomal normal del precipitado sino a la fracción correspondiente al Retículo Sarcoplasmático.

Papel del Calcio

Estudios realizados utilizando microscopía electrónica, han demostrado que la fracción aislada está formada casi exclusivamente por estructuras vesiculares y tubulares cuyos diámetros varían entre 60 y 300 nM en el primer caso y 15 a 30 nm en el segundo (Nagai, Makinose, Hasselbach 1960; Muscatello, Andersson Cedergren y Azzone, 1962; Ebashi y Lipman, 1962). Las vesículas aparecían selladas al microscopio electrónico, lo cual fue confirmado por la determinación del espacio accesible a la inulina que era limitado al 30 por ciento de la preparación. Esta circunstancia permitió la caracterización experimental de las propiedades del Retículo Sarcoplasmático asociadas a la función del factor relajante.

Los primeros trabajos se dedicaron al estudio de los factores que afectaban la actividad inhibitoria de las vesículas sobre la actividad ATPásica de la actomiosina, que determinaba el fenómeno de súper-precipitación, y sobre la contracción de fibras

extraídas por glicerol y miofibrillas aisladas. Esto presentaba alguna dificultad, ya que tanto la ATPasa de la actomiosina como la de las vesículas mismas catalizaban la hidrólisis del ATP.

A pesar de esta circunstancia se pudo establecer que el Mg era indispensable para el efecto inhibitorio de las vesículas, y que la adición de oxalato a la suspensión de vesículas que contenía ATP y Mg aumentaba enormemente la actividad inhibitoria, a pesar de que por sí sólo no tenía efecto sobre la actividad ATPásica de la actomiosina. Este efecto del oxalato ahora es claramente explicado por su acción de fijar Ca en la luz del RS, disminuyendo el gradiente en contra del cual debe trabajar la respectiva bomba de Ca, de manera análoga a la función de la calsecuestrina. Otros agentes que afectaban la actividad inhibitoria eran la fuerza iónica, la temperatura y el pH. Sin embargo el más potente inhibidor reversible de la acción de las vesículas resultó ser el Ca mismo.

La disminución de la actividad ATPásica de la actomiosina en presencia del factor vesicular es acompañada por la desaparición de la resistencia estática al estiramiento de la preparación de fibras extraída con glicerol. Esto indica que las vesículas inhiben la interacción entre miosina y actina.

Entre tanto, A. Weber había estado estudiando el papel del calcio sobre la capacidad de la actomiosina para hidrolizar ATP y su papel en la súper-precipitación de la actomiosina (Weber, 1961; 1959). Al agregar el calcio, en presencia de Mg, ATP y de un factor relajante, la actomiosina se contraía, pudiendo esta contracción ser explicada por dos mecanismos: según el primero, el calcio se podía combinar con la actina y la miosina, siendo este complejo necesario para la contracción, pero normalmente impedido por la capacidad del factor relajante para secuestrar calcio, que podía ser neutralizada con la adición de más calcio; de acuerdo al segundo mecanismo, el Ca podía interferir en una reacción entre uno de los factores relajantes y la actomiosina; como consecuencia, la contracción sería inhibida por el factor relajante, ya que este se podía combinar directamente con la actomiosina. Perry y Grey (1956), habían demostrado que el EDTA, a baja concentración,

inhibía la actividad de la ATPasa estimulada por Mg de las miofibrillas naturales o de la actomiosina. En contraste, la actividad de la ATPasa de la actomiosina sintética no era afectada a baja concentración de EDTA. Estos resultados indicaban que un catión metálico podía explicar los efectos del EDTA sobre las miofibrillas o la actomiosina natural, pero no se pensó que el catión hubiera podido ser el Ca.

Basado en los resultados de Weber y Ebashi (ver capítulo 2) y en el hecho de que la inhibición de la ATPasa de actomiosina por EDTA, que correspondía a la relajación de fibras glicerinadas inducida por el mismo quelante, sólo podía ser explicada por la reducción en la concentración de Ca libre en el medio, se pudo concluir que el Ca era el activador fisiológico del sistema de actomiosina. Así, gracias al trabajo de un selecto grupo de investigadores entre los cuales cabe mencionar a Hasselbach, Ebashi y A. Weber, se llegó a la conclusión de que el Retículo Sarcoplasmático actuaba como un sumidero de Ca mediante un mecanismo de transporte activo mediado por ATP. La Figura 7.1 muestra cómo la capacidad de secuestrar Ca de las vesículas aisladas del Retículo Sarcoplasmático depende del ATP. Al mismo tiempo se aclaraba el papel del Ca como activador de la contracción. De esta manera se cerraba el ciclo abierto por la observación inicial de Kelley y Meyerhof (1948) sobre la presencia de una actividad ATPásica en homogeneizados de músculo, diferente de la actividad asociada a las proteínas contráctiles, y por la demostración por parte de Marsh (1951) de un factor con actividad relajante en estos homogeneizados.

ATPasa de Ca en el Retículo Sarcoplasmático

Una vez resuelto el problema de la identificación del factor relajante con la actividad de secuestro del Ca por parte del RS, el interés de los investigadores se dirigió hacia los mecanismos inherentes a la actividad ATPásica del RS.

La concentración de Ca libre en el mioplasma ha sido medida con diferentes técnicas y se estima estar entre 60 y 100 nM. Por otra parte la concentración de Ca en el RS parece depender de su

localización, estando entre el 50 y el 70 por ciento del calcio total del músculo concentrado en las cisternas terminales. El valor reportado por Somlyo y colegas (1981) es de 108 mM/kg peso seco. Si el peso seco es el 20 por ciento esto corresponde a 27 mM/l, y equivaldría a la presencia de un gradiente de casi 5 ordenes de magnitud.

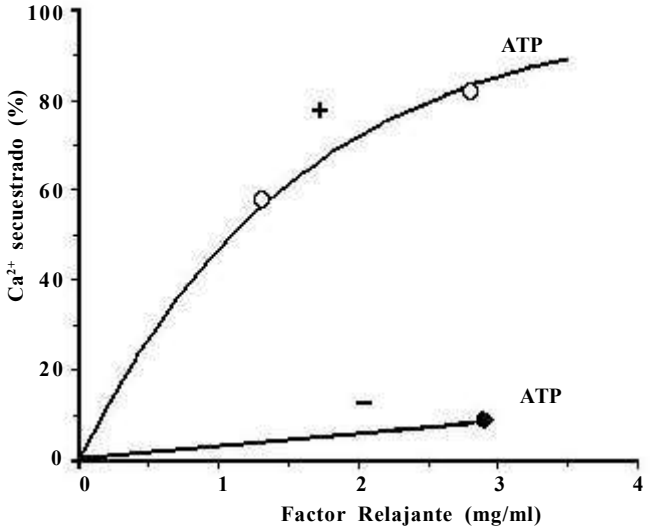


Figura 7.1. Captura de Calcio por el factor relajante formado por fragmentos del RS. El experimento demuestra que la captura de calcio depende de la actividad de una ATPasa. (*Modificado de Ebashi, 1980*).

Por lo tanto, es clara la necesidad de tener un sistema de transporte activo capacitado para mantener un gradiente de concentración tan alto, aun cuando ahora se sabe que en las cisternas terminales hay una proteína, la Calsecuestrina que secuestra calcio de manera que la concentración de Ca libre en este compartimiento es bastante más baja que 27 mM/l.

El sistema de transporte que mantiene este enorme gradiente ha sido identificado como una ATPasa dependiente de Mg y activada por Ca que, energizada por la hidrólisis del ATP, transporta iones Ca en contra de su gradiente electroquimico, con un contra-transporte de protones. Esta bomba de Ca está localizada en todos

los elementos del RS, y en especial en los sacos laterales, con la excepción de la zona de unión entre el RS y los túbulos transversos. La bomba de Ca del RS es una proteina constituida por un sólo polipéptido, tiene un peso molecular de 100-110 kD, y puede formar oligomeros que abarca numerosas isoformas (Martonosi, 2003).

La bomba de Ca del RS es una proteína constituida por un sólo polipéptido, que tiene un peso molecular de 100-110 kD, y puede formar oligomeros que abarcan numerosas isoformas (Martonosi, 2003), identificadas colectivamente con el nombre de SERCA (*Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*). Estas isoformas se derivan de genes diferentes y se encuentran en diferentes tipos de células, con diferentes grados de especificidad que se diferencian entre si por el número y el tipo de aminoácidos presentes en el terminal C. En fibras musculares rápidas (*fast twitch*) de mamíferos adultos, la isoforma expresada es la SERCA1a, mientras que en fibras lentas (*slow twitch*) de mamífero se encuentra la isoforma SERCA 2a, que también se puede encontrar en el músculo cardiaco y esquelético de neonato que tambien puede presentar la isoforma 1b (Martonosi y Picula, 2003; Wu *et al.*, 1995).

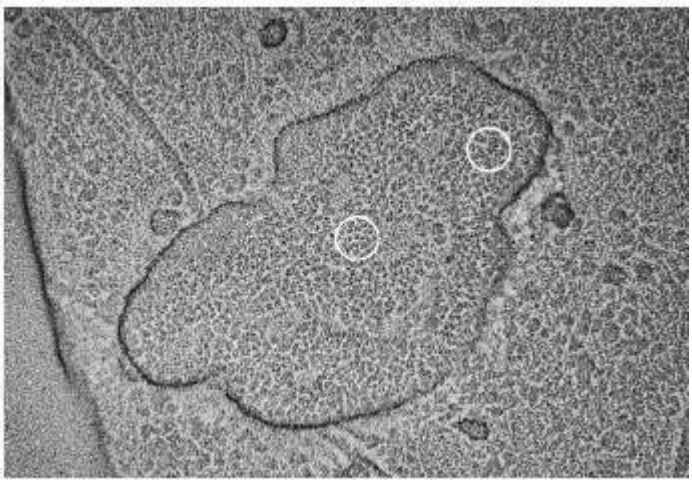


Figura 7.2. Hojuela de membrana del RS obtenida por criofractura de una preparación de vesículas del RS. Son visibles partículas de ATPasa de Ca o SERCA dispuestas desordenadamente, ver círculos blancos. (*Micrografía cortesía de la Dra. Clara Franzini-Armstrong*).

Esta proteína ha sido localizada, usando técnicas de imunocito-química, a nivel de todo el RS con excepción de la zona en la cual la membrana del RS se enfrenta directamente a la membrana del túbulo-T en las triadas (Jorgensen *et al.*, 1982). Por otra parte, utilizando técnicas de crío-fractura se han localizado partículas intramembranarias de 9 nm, que han sido identificadas como oligómeros de la ATPasa en todo el RS, menos en las zonas ya mencionadas. Estudios posteriores con músculo blanco de conejo, han indicado que la disposición de las partículas en la membrana del RS es desordenada, pero con la posibilidad de formación ocasional de oligómeros, y con una muy alta densidad (31.000-34.000/ μm^2) Franzini-Armstrong y Ferguson(1985) pudiendo casi alcanzar el 80% del contenido de proteínas de la zona longitudinal del RS (Martonosi y Picula, 2003). La figura 7.2 es una micro-fotografía de una vesícula del RS de rana, crío-fracturada mostrando la cara citoplasmática de la hojuela de membrana del RS. Se pueden ver partículas en disposición desordenada (ver círculos) que representan la parte de la molécula de ATPasa que sobresale de la membrana.

Un modelo hipotético de la estructura terciaria de la proteína, con claras implicaciones funcionales, fue propuesto por MacLennan et al. (1997), y confirmado en buena parte, por estudios de difracción de electrones y difracción de rayos X (Toyoshima, 2000; Toyoshima y Nomura, 2002). Las moléculas de la ATPasa de Ca están insertadas de manera asimétrica en la membrana del RS, encontrándose la región más grande, o cabeza de la molécula en el lado citoplasmático de la membrana, sobresaliendo unos 5 o 6 nm (Franzini-Armstrong, 1980; Taylor y Martonosi, 1986); una segunda región une la porción citoplasmática a la tercera parte de la molécula que atraviesa la membrana. En el lado luminal del RS sólo se encuentran segmentos cortos en forma de horquilla.

La molécula tiende a asociarse para formar oligómeros y en presencia de vanadato, lantánidos o del mismo Ca, tiende a formar cristales bi- o tri-dimensionales (Martonosi, 1995; Martonosi *et al.*, 1991; Hinsen, 2005). Usando cristales bidimensionales y difracción de electrones con una resolución de 2-2,5 nm, ha sido posible

obtener mapas de densidad electrónica que indican la presencia de dímeros (Taylor *et al*., 1986a), sugiriendo que la enzima funcional está constituida por dos moléculas de ATPasa. Esta proteína sufre cambios masivos en su configuración durante su ciclo catalítico (Green y MacLennan, 2002),

Utilizando estos mismos cristales, se ha demostrado que el Cr-ATP, que es un inhibidor de la ATPasa, forma complejos estables con los sitios de la enzima que normalmente ligan ATP, causando la oclusión de 2 Ca dentro de la enzima, y los cambios estructurales, que pueden ser resueltos por difracción de electrones, permitiendo de esta manera reconocer sitios específicos de unión del inhibidor que posiblemente puedan corresponder a los sitios de unión del ATP. (Yonekura *et al.*, 1997; Serpersu *et al*., 1982; Vilsen y Andersen 1992; Vilsen, 1995). Estos sitios están localizados en la región de la cabeza de la molécula a una distancia de 4,3 nm de la superficie de la membrana (Yonekura *et al*., 1997) consistente con la distancia de 4 a 6 nm determinada utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (Bigelow e Inesi, 1992). Finalmente, y siempre de acuerdo al modelo hipotético de Martonosi, utilizando cristales tri-dimensionales y rayos X con una resolución de 2,6 Å, ha sido posible reconocer, dentro de la molécula, cavidades que pueden corresponder a los sitios de entrada y salida del Ca y los posibles sitios de unión del Ca con la enzima (Andersen *et al.*, 2001).

La Serca 1 es responsable de acumular Ca^{2+} en el RS en contra de un enorme gradiente de concentración, 10^5, hidrolizando una molécula de ATP por cada 2 iones Ca transportados. La transferencia de las 4 cargas positivas es balanceada por un movimiento equivalente de protones, que impide el establecimiento de un potencial eléctrico a través de la membrana del RS (Yu *et al.,* 1993).

La SERCA 1a tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} (k_m aproximado de 0,1mM), suficiente para mantener los niveles basales de Ca mioplasmático entre 60 y 100nM. Su alta densidad en la membrana hace pensar que la SERCA debería ser suficiente para mantener la homeostasis de Ca durante una sacudida simple o

durante actividad repetitiva. Sin embargo se ha ido acumulando suficiente evidencia para pensar que hay otros factores, como la Parvalbumina, PV, que contribuyen al proceso de relajación, ayudando a disminuir la concentración de Ca después de la actividad contráctil.

Papel de la Parvalbumina (PV)

La PV es una clase de proteína soluble que se encuentra en algunos tipos de músculo estriado, y en otros tejidos. La actividad de esta proteína fue descrita por primera vez por Pechère y colegas (1971), quienes sugirieron que la misma podía tener la misma función bioquímica que la Tn ya que presentaban similitudes estructurales. Hitchcock y Kendrick-Jones (1975) fueron los primeros en sugerir que la PV podia secuestrar parte del Ca^{2+} que es liberado del RS, pudiendo de esta manera tener un rol importante en la relajación de las fibras de músculo de anfibios, como fue demostrado por Cannell y Allen (1984) y Hou y colegas (1990) siendo los músculos rápidos de los peces y anfibios los que la poseen en mayor concentración (entre 0,35 y 1,5 mM), mientras que en aves y mamíferos adultos la concentración es 10 a 20 veces menor (Gillis *et al.,* 1982), estando ausente en mamíferos neonatos (Leberer y Pette, 1986).

Una de las estrategias utilizadas para demostrar el papel de la PV se ha basado en el uso de compuestos inhibidores de la SERCA. Existen diversos inhibidores de la Ca ATPasa, entre los más usados se encuentran la 2,5-di-(terbutil)-1,4 benzohidroquinona (TBQ), el ácido ciclopiazónico (CPA), y la tapsigargina (TG), La figura 7.3 muestra un experimento en el que se estudió el efecto de envenenamiento parcial de la bomba de Ca con CPA (2 μM), sobre la fase de caída de los transitorios de Ca registrados con el colorante fluorescente Rhod-2. En este experimento, una fibra muscular de rana, fue sometida a breves periodos de estimulación repetitiva de 10 estímulos aplicados a una frecuencia de 0,5 Hz, antes (NR), y después de envenenar la fibra con CPA. Los registros a la izquierda, representan las primeras respuestas, mientras que los registros a la derecha representan las últimas

respuestas, de cada serie de 10. El experimento demuestra que durante la estimulación repetitiva hay un efecto progresivo que enlentece la fase de caída del transitorio de calcio, de manera que en el décimo es mucho más lenta la caída. Sin embargo, el primer registro de cada serie es casi igual al obtenido en ausencia de CPA (RN), indicando la presencia de otro mecanismo de captación de Ca, efectivo cuando la bomba está parcialmente envenenada, pero que se satura después de un número reducido de estímulos, y vuelve a ser funcional después de un periodo de reposo. En este tipo de experimento hay también un aumento del calcio basal (no mostrado), que se revierte durante el periodo de reposo entre las series de estimulaciones, así como se revierte el enlentecimiento de la fase de caída de los transitorios de cada serie, por acción de la bomba de calcio.

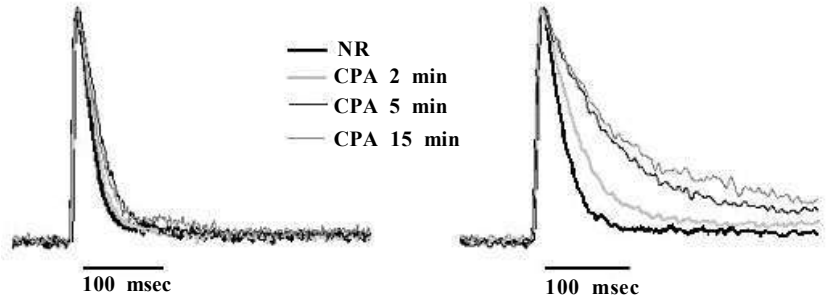


Figura 7.3. En fibras musculares, la SERCA no constituye el único mecanismo responsable de restaurar la baja [Ca] en el mioplasma. El experimento muestra el efecto de CPA, y de estimulación repetitiva, a 0.5 Hz, sobre la fase de caída de transitorios de Ca de una fibra única de rana. Se muestra el primero y el último transitorio de dos series de diez superpuestos y normalizados por amplitud para mejor visualización de su curso temporal.

Localización del Ca en las fibras musculares

Antes de que estuviesen disponibles métodos ópticos para la medición del Calcio intracelular, Winegrad utilizó técnicas autoradiográficas, con ^{45}Ca para determinar la localización de este catión dentro de los sarcómeros (Winegrad, 1965a). Cuando los músculos se fijaban durante una contractura de potasio, la mayoría

de los gránulos formados en la emulsión fotográfica por la exposición a la radiación beta del ^{45}Ca, se encontraban a nivel de la banda A, y su cantidad dependía de la tensión desarrollada durante la contractura, mientras que había muy pocos gránulos en la banda I. En condicione de reposo, la mayor parte del Ca localizado a nivel de la banda A se encontaba a nivel de las miofibrillas mientras que en la banda I, el Ca estaba preferencialmente entre las miofibrillas donde se encuentra el RS (Winegrad, 1965b), distribuyéndose preferencialmente en tres sitios: las cisternas terminales, las cisternas intermedias y el retículo longitudinal (Winegrad, 1968).

En músculos fijados inmediatamente después de un tétano o de una contractura de potasio la cantidad de Ca en las cisternas intermedias y en el retículo longitudinal disminuía, para luego aumentar en las cisternas terminales. Con estos resultados, Winegrad pudo proponer que la estimulación de una fibra causa liberación de Ca de las cisternas (Winegrad, 1968). Como anécdota interesante derivada de estos experimentos cabe mencionar que debido a la necesidad de utilizar placas fotográficas de muy alta resolución, sólo disponibles de la compañía Ilford, fue necesario importarlas de Inglaterra a EEUU, y para disminuir la exposición a rayos cósmicos, tuvieron que conseguir que un avión de la Fuerza aérea las transportara volando a baja altura.

Señales ópticas en la membrana del RS

Con la demostración de que el RS servía de almacén y fuente de Ca, y que el sistema de túbulos-T servía de conducto para la propagación radial de la señal eléctrica hacia el interior de las fibras, surgió la idea de que el mecanismo de liberación de Ca del RS durante una contracción podría depender de la propagación de una señal eléctrica desde los túbulos-T hacia la membrana del RS cuya despolarización, activando una hipotética conductancia de Ca, causaría la liberación masiva del Ca de este compartimiento. Las dimensiones de los componentes del RS hacían imposible el uso de microelectrodos, y sugerían el uso de técnicas ópticas para este fin.

Señales intrínsecas

Las primeras intentonas de estudiar las manifestaciones ópticas de la actividad eléctrica en tejidos excitables se centraron en propiedades ópticas intrínsecas de nervios, y no tuvieron éxito, debido a la desfavorable relación señal/ruido y a la falta de instrumentación adecuada (Schmitt y Schmitt, 1940).

Utilizando nervios de la pata de cangrejo, que contienen cientos de fibras nerviosas amielínicas, Hill y Keynes (1949) reportaron cambios en sus propiedades ópticas asociados con la generación de potenciales de acción durante periodos de estimulación repetitiva (50 Hz por 5 s). Esos cambios, consistentes en un aumento en la opacidad de la preparación, los cuales ocurrían en respuesta a la estimulación, y que disminuían al cesar los estímulos, fueron interpretados en términos de dispersión óptica (light scattering), sin que se pudiera determinar su origen. Después de casi dos décadas, la posibilidad de utilizar promediadores de señales, indujo a Larry Cohen y colegas (1968; 1969; 1970) a retomar el estudio de los cambios en las propiedades ópticas, y específicamente en la birrefringencia, asociados con el fenómeno de excitación en axones de calamar y nervios de cangrejos.

Un objeto es birrefringente cuando su índice de refracción para luz polarizada no es igual en todas las direcciones. La birrefringencia de un objeto se define como la diferencia entre dos índices de refracción, el $\mathbf{n_e}$, obtenido con luz polarizada paralela al eje óptico del objeto, plano longitudinal (0º) y el $\mathbf{n_0}$ para obtenido con luz polarizada perpendicular al eje óptico, plano transversal (90º) de manera que

$$\Delta n = n_e - n_0 \qquad (7.1)$$

La magnitud de Δn es una medida del grado de orden del objeto. Operacionalmente resulta más conveniente medir el retardo óptico de un objeto en vez de su birrefringencia.

El retardo óptico, referido a la velocidad de la luz, es una medida de la distancia entre el componente más rápido y el

componente más lento de la luz cuando ésta atraviesa el espesor del objeto. El cambio de fase ϕ_l representa el retardo óptico de la luz de una determinada longitud de onda λ, de manera que:

$$\phi_\lambda = 2\Pi\ R/\lambda \qquad (7.2)$$

Para un objeto homogéneo birrefringente, la intensidad de la luz **I** que pasa por un filtro polarizador antes de atravesar el objeto, y luego pasa por un filtro analizador antes de llegar a un foto-detector , depende del cambio de fase de acuerdo a:

$$I_\lambda = k\ (1- \cos\ \phi_\lambda) \qquad (7.3)$$

En donde **k** es una constante que depende de la intensidad de la luz y del área del objeto que es iluminada.

Cohen y colegas (1968; 1970) demostraron que el retardo óptico de un axon estimulado presentaba el mismo curso temporal del potencial de acción, y que se originaba en la periferia del axon. Estos trabajos, cuyos resultados fueron confirmados poco después por Tasaki y colegas (1969), indicaban claramente que el retardo óptico medía el cambio en alguna propiedad estructural de la membrana del axon, y sugerían que el efecto óptico era un fenómeno que estaba relacionado con el potencial de membrana. Sin embargo no se podía descartar que en el fenómeno óptico hubiese componentes dependientes de la corriente iónica que fluye durante un potencial de acción. Esta posibilidad fue explorada con experimentos realizados bajo condiciones de control de potencial, que permitieron concluir que había tres componentes mayores en el fenómeno de retardo óptico, los cuales diferían en su dependencia del potencial y en su cinética. Pequeñas contribuciones de componentes dependientes de la corriente o de la conductancia de la membrana no podían ser descartadas (Cohen *et al*., 1971).

Para el caso de las fibras musculares, en algunos trabajos pioneros se había comprobado la presencia de señales ópticas intrínsecas asociadas a la actividad contráctil (Buchtal, Knappeis y

Sjostrand, 1939; Hill, DK, 1949; Barry y Carnay, 1969). Siguiendo esta línea de pensamiento, Baylor y Oetliker (1977 a, b) reportaron mediciones de la birrefringencia de fibras musculares aisladas que indicaban la presencia de tres componentes en la señal óptica. El primer componente parecía reportar cambios asociados al potencial de acción a nivel de la membrana superficial, el tercer componente estaba claramente asociado al fenómeno contráctil. El segundo componente empezaba poco después de la fase de subida del potencial de acción, y precedía la contracción. Intervenciones farmacológicas diferenciales, que permitían atenuar el fenómeno contráctil y potenciar la señal que precedía a la contracción, proveyeron suficiente evidencia para pensar que esta señal pudiera estar relacionada con algún paso de la serie de eventos del AEC, precedente al desarrollo de tensión, posiblemente un cambio de potencial de la membrana del RS.

Señales ópticas extrínsecas

Además de las propiedades ópticas intrínsecas también se empezaron a usar colorantes fluorescentes como por ejemplo las merocianinas, que son impermeables o el azul de Nilo, que reportaban cambios en el potencial de membrana, en nervios primero (Tasaki *et al*, 1968, 1969: Cohen *et al*, 1970), y en músculos poco después (Bezanilla y Horowicz, 1975; Vergara *et al*, 1978). Debido a la solubilidad lipídica del azul de Nilo, las señales fluorescentes obtenidas con él, se pudieron relacionar con el RS al compararlas con señales obtenidas con colorantes no permeables. Mientras que estos últimos, sólo pueden reportar señales de la membrana superficial y de la membrana de los túbulos T, las señales obtenidas con un colorante permeable, incluyen también las membranas del RS. Debido a que en una fibra muscular de unos 100 μm de diámetro, la relación entre superficie:túbulos-T:RS es aproximadamente 1:7:90, se espera que la señal proveniente del RS predomine (Peachey, 1965: Mobley and Eisenberg, 1975). De manera que mientras colorantes fluorescentes no permeables, como la merocianina-540 o el Di-8-ANEPPS, pueden reportar cambios de potencial de membrana a nivel de la superficie y de los túbulos–T, con una alta fidelidad temporal, los colorantes permeables, como el

azul de Nilo y la *indocarbocianina* generan señales que no parecían depender de los potenciales de membrana de la superficie o de los túbulos-T (Bezanilla y Horowicz, 1975; Vergara *et al*, 1978). Trabajando con músculos enteros montados en una cámara con un electrodo triangular que permitía controlar la corriente y despolarizar las fibras de manera uniforme en el sentido longitudinal, Bezanilla y Horowicz (1975) demostraron que en respuesta a un estímulo eléctrico, había un cambio de fluorescencia que empezaba algo después del pico y terminaba durante la fase inicial de caída del potencial de acción. Aplicando pulsos de corriente, se obtenían señales de fluorescencia de magnitud graduable con la intensidad del pulso. La relación entre densidad de corriente y amplitud de la respuesta, era una empinada curva de forma sigmoidal parecida a la curva tensión contráctil *vs* potencial de membrana, que será discutida en el próximo capítulo. La señal fluorescente era inhibida o potenciada, respectivamente, por inhibidores, o potenciadores del fenómeno de AEC.

Resultados obtenidos con fibras cortadas bajo condiciones de control de potencial (Vergara *et al*, 1978) apoyaban la conclusión que la señal obtenida con azul de Nilo, reportaba cambios del potencial de membrana del Retículo Sarcoplasmático. Sin embargo quedaba por demostrar si este cambio del potencial era la causa o el efecto de la liberación de calcio del retículo Sarcoplasmático.

La importancia de este punto puede apreciarse en su justa dimensión considerando un modelo alternativo para el mecanismo de acople que fue propuesto por Mathias y colegas (1980). Ellos consideraron que la membrana del RS podía estar conectada eléctricamente a la membrana de los túbulos trasversos por medio de las estructuras llamadas pies o pilares, de manera que un potencial de acción pudiera propagarse desde los túbulos hacia la membrana de las cisternas terminales, a través de la unión triádica. Esta situación correspondería a lo que ocurre a nivel de las uniones de brecha (*gap junctions*) entre dos células acopladas eléctricamente. Así, una despolarización, transmitida desde los túbulos-T al RS, podría activar una conductancia de Ca que permitiría la liberación masiva de este ion.

Pero una objeción a esta hipótesis era que, de haber tal conexión eléctrica, las medidas de capacitancia hubieran tenido que reflejarla, arrojando valores muchos más grandes. Sin embargo el argumento de mayor peso utilizado para descartar esta hipótesis, fue la información derivada del análisis de la composición iónica en el interior del RS, por microanálisis con sonda de rayos X (Somlyo *et al.*, 1977; Shulman y Somlyo, 1976). Los resultados de este análisis indicaban que no había gradientes de Cl y K entre el citoplasma y el RS, de acuerdo con la alta permeabilidad de la membrana del RS a aniones y cationes (Duggan y Martonosi, 1970; Meissner y McKinley, 1976). Por lo tanto la existencia de un potencial de membrana de una cierta magnitud se hacía muy improbable. Trabajos posteriores de Beeler (1981) y Oetliker (1982), aportaron suficiente evidencia que indicaba que los potenciales de membrana registrados tiñendo la membrana del RS con colorantes fluorescentes, tales como el azul de Nilo, utilizando técnicas ópticas se debían más bien a la adsorción de Ca en la membrana. Esta circunstancia podría haber sido aprovechada para estudiar indirectamente la salida de Ca del Retículo Sarcoplasmático. Sin embargo, no hubo necesidad de ello ya que la disponibilidad de sondas específicas para la detección de este catión, como los colorantes métalo crómicos, tipo arsenazo, y los colorantes fluorescentes, tipo Fura-2 y Fluo-3 permitían la medición directa del Ca intracelular. Sin embargo, las técnicas ópticas utilizando estos colorantes potenciométricos, siguen siendo valiosas para la detección y medición de cambios de potencial en estructuras multicelulares complejas o inaccesibles.

Función de los túbulos-T

Antes de que se conociera la existencia de los túbulos-T, la necesidad de una estructura o mecanismo que permitiese la transmisión de señales entre la membrana superficial y el aparato contráctil había sido prevista por A.V. Hill en 1948 y demostrada por A.F. Huxley y sus colegas en 1958. El primero, tomando en cuenta la brevedad del período latente entre el estímulo eléctrico y el comienzo de la respuesta contráctil, la lentitud del proceso difusional, y las dimensiones de las fibras musculares, había

descartado la posibilidad de que la activación contráctil pudiese depender de la difusión de algún compuesto desde la superficie celular hacia el centro de la fibra. Sin embargo el redescubrimiento (Porter, 1957) de los túbulos transversos, y la demostración de que estaban abiertos al espacio extracelular, (Huxley, 1964) y extendidos radialmente hasta el centro, soslayó esta objeción debido a que las distancias difusionales entre el lumen de los túbulos-T y las miofibrillas adyacentes se reducían considerablemente.

Activación local

Por otra parte, entre 1955 y 1958, Huxley y Taylor (1955,1958) mediante unos experimentos de extrema elegancia, demostraron la presencia de regiones especificas con alta susceptibilidad a estímulos eléctricos a nivel de los sarcómeros de fibras musculares de diferentes especies. Trabajando con fibras musculares de rana, encontraron que estímulos despolarizantes, aplicados por medio de una micropipeta con una punta de aproximadamente 1 μm, eran efectivos en activar una contracción localizada, sólo cuando la pipeta se situaba en el centro de la banda I, donde se encuentra la línea Z, como se muestra en el esquema superior de la figura 7.4.

Inicialmente estos resultados se interpretaron asumiendo que la línea Z misma pudiese ser la estructura que llevaba la información hacia el centro de la fibra ya que no se había demostrado aun la presencia de los túbulos T en las fibras musculares. En su Croonian Lecture de 1967, el Prof Huxley relata que, al presentar sus experimentos con Taylor en una reunión de la Sociedad de Fisiología Inglesa (Huxley y Taylor, 1955), el Prof Robertson, notable microscopista electrónico, que se encontraba en la sala, sacó de un bolsillo y presentó a la audiencia una diapositiva que demostraba irrefutablemente la presencia de túbulos orientados transversalmente en una fibra muscular de lagartija. Si bien estos túbulos no se encontraban a nivel de la línea Z, sino a los dos lados de la banda I, claramente sugirieron la presencia de una estructura adecuada para llevar un mensaje eléctrico de la superficie de la fibra hacia su interior, lo cual estimuló experimentos con fibras musculares de otros animales.

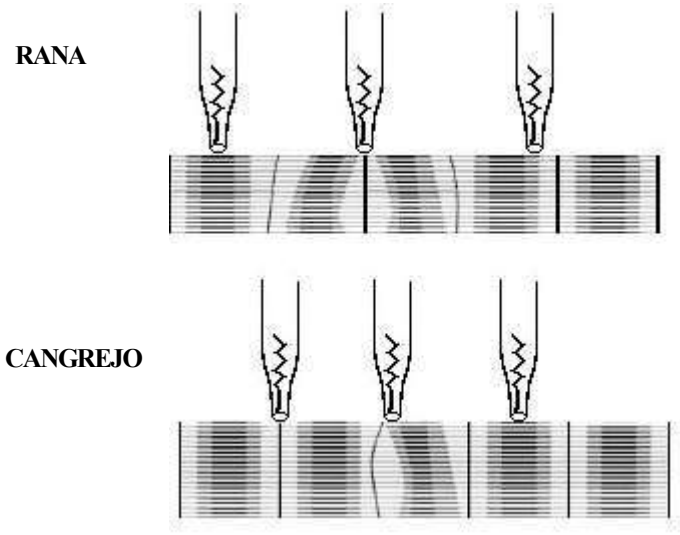


Figura 7.4. Esquema de los experimentos de activación local en una fibra de rana y otra de cangrejo. En el primer caso la activación contráctil ocurre solo cuando la pipeta utilizada para pasar corriente está localizada en el centro de la banda I, donde se encuentran los túbulos transversales a los lados de la línea Z; en el segundo caso la activación ocurre en el borde entre la Banda A y la I.

Por ejemplo, resultados obtenidos en experimentos realizados con fibras de cangrejo demostraron que la sensibilidad a los estímulos despolarizantes estaba localizada lejos de la línea Z (Huxley,1956), a nivel del borde entre banda A y banda I, como se muestra en el esquema de la figura 7.4. El redescubrimiento de los túbulos T y de su asociación con el RS formando las triadas a nivel de la línea Z, en fibras musculares de *Amblistoma* (Porter y Palade 1957), que presentan la misma disposición sarcomérica que las fibras de *Rana*, proveyó las bases estructurales para explicar los resultados de los experimentos de Huxley y Taylor. Finalmente, experimentos hechos con fibras musculares de lagartija (Huxley y Straub, 1958), indicaron que la sensibilidad a la despolarización estaba asociada a la localización de los túbulos T y que por lo tanto, estos constituían

la vía de transmisión de la señal eléctrica hacia el interior de las fibras musculares.

Desacople por tratamiento con glicerol

Howell y Jenden (1967, 1969) habían reportado que después de exponer un músculo a una solución Ringer hecha hipertónica por la adición de glicerol 400 mM, se perdía la capacidad de producir respuestas contráctiles, sacudidas o contracturas cuando se regresaba de nuevo a la solución isotónica. Dicho efecto era acompañado por la aparición de lesiones a nivel de los túbulos-T. Este fenómeno fue estudiado exhaustivamente por Gage y Eisenberg (1969 a, b) quienes demostraron que en las fibras así tratadas, la capacitancia de la membrana disminuía aproximadamente de unos 5 o 6 $\mu F/cm^2$ a 2 $\mu F/cm^2$, indicando que los túbulos-T se desacoplaban de la membrana superficial por un mecanismo de vesiculación o por cierre de su apertura a nivel de la membrana superficial. El desacople de los túbulos T estaba claramente asociado con la perdida de la capacidad contráctil, o desacople del fenómeno de AEC.

Mecanismo de propagación radial

La disposición de los túbulos transversos sugiere que una señal eléctrica que se propaga a lo largo de una fibra muscular puede propagarse también radialmente a lo largo de un túbulo transverso, el cual puede ser considerado como un cable. Sin embargo la naturaleza del mecanismo de transmisión, pasiva o regenerativa, no podía ser estudiada directamente utilizando microelectrodos, debido a las pequeñas dimensiones de los túbulos transversos cuyo diámetro es de aproximadamente 20 nm.

Con la introducción de la técnica de control de potencial (voltage clamp) con dos o tres microelectrodos, se hizo posible realizar experimentos en los cuales se podía cambiar y controlar el valor del potencial de membrana de las fibras a niveles predeterminados pasando la corriente necesaria para ello con un segundo microelectrodo. Adrian, Costantin y Peachey (1969) utilizaron la configuración de control de potencial de dos microlectrodos

en fibras tratadas con TTX para evitar la generación de potenciales de acción. Imponiendo pulsos cuadrados de voltaje pudieron estimar con precisión el valor del umbral contráctil, o sea, el potencial de membrana que se debía alcanzar para causar movimiento apenas detectable por observación de la fibra bajo microscopio óptico, a la altura de los sarcómeros adyacentes al microelectrodo de corriente. Determinando el valor de la despolarización apenas suficiente para que tanto las miofibrillas periféricas como las centrales se contrajesen, y asumiendo cierta topología para el sistema de túbulos-T, pudieron estimar, basándose en la teoría del cable, que para una fibra de 50 μm de radio la constante de espacio de los túbulos-T, λ_T era de 60 μm.

Utilizando la misma técnica pudieron demostrar que con una fibra de 100 μm de diámetro un pulso de voltaje equivalente a un potencial de acción, registrado previamente en otra fibra, era apenas suficiente para detectar movimiento a nivel de las miofibrillas situadas en el centro de la fibra. La conclusión de estos experimentos fue que no se necesitaba un mecanismo regenerativo, tipo potencial de acción a nivel de la membrana de los túbulos trasversales, ya que un potencial de acción que se propagaba longitudinalmente a lo largo de una fibra muscular por mecanismos regenerativos, podía también propagarse radialmente hacia el interior de la fibra por mecanismos pasivos electrotónicos. Sin embargo con este mecanismo de propagación electrotónica el factor de seguridad era muy bajo.

Este problema fue retomado por Hugo González-Serratos, quien en el laboratorio de Andrew Huxley pudo realizar unos experimentos muy elegantes que indicaban que el mecanismo de propagación radial de la señal activadora de la contracción tenía una alta dependencia de la temperatura, indicativa de un mecanismo regenerativo. Utilizando fibras musculares aisladas de rana embebidas en gelatina solidificada, Gonzalez-Serratos demostró que al comprimirse longitudinalmente el bloque de gelatina, las fibras se acortaban con éste, causando ondulaciones a nivel de las miofibrillas. Al estimular eléctricamente las fibras comprimidas, estas se contraían acortándose a expensas de las ondulaciones de las

miofibrillas que desaparecían progresivamente, empezando por las miofibrillas situadas en la periferia de la fibra y continuando hacia las miofibrillas centrales. De esta manera fue posible determinar la velocidad de propagación radial del mecanismo que activaba la contracción de las miofibrillas. Experimentos llevados a cabo a diferentes temperaturas permitieron calcular el coeficiente de temperatura del proceso de penetración radial, que resultó tener un Q_{10} alto, alrededor de 2,14, compatible con un proceso activo como es el caso de los cambios de conductancias subyacentes a la generación de los potenciales de acción.

Otra manera indirecta de comprobar la idea de que la propagación de la señal eléctrica a través de los túbulos-T fuese mediada por un potencial de acción, fue ideada por Bezanilla y colegas (1972). Ellos usaron fibras aisladas estimuladas tetánicamente en soluciones con concentraciones de sodio disminuidas, pero aún suficientes para la generación de potenciales de acción. La suposición era que, en caso de haber potenciales de acción, la entrada de sodio a nivel de los túbulos-T debería conducir a una disminución de su concentración en ellos. Si con esta disminución la concentración de sodio caía por debajo de los valores necesarios para generar los potenciales de acción, debía ocurrir una desactivación de las miofibrillas centrales, evidenciada por la disminución de la tensión desarrollada por la fibra. Esta suposición resultó ser cierta, y los resultados fueron confirmados con cinematografía de alta velocidad, ya que se demostró que las miofibrillas centrales se desactivaban mientras que las periféricas seguían contraídas, lo cual causaba ondulaciones en las miofibrillas más axiales. Los resultados obtenidos confirmaron la hipótesis de que había conductancia de sodio en los túbulos-T (Bezanilla *et al, 1972*).

Bases estructurales del Acoplamiento Excitación-Contracción

Los trabajos de diferentes autores, y en especial el de Lee Peachey y el de Clara Franzini-Armstrong han demostrado la estrecha relación morfológica entre el sistema de túbulos-T y las cisternas terminales del RS, proveyendo una serie de detalles

estructurales que no sólo han permitido aclarar la relaciones funcionales entre los dos tipos de membranas, sino que han suministrado las bases morfológicas para entender algunos de los pasos cruciales en la serie de eventos que participan en el Acoplamiento Excitación-Contracción (AEC).

La figura 7.5 muestra la disposición de las cisternas terminales del RS y de los túbulos-T para formar triadas. En las micro-fotografías superiores se ven las clásicas formas de triada, obtenidas con cortes trasversales. encuentran a nivel de la línea Z, mientras que en mamíferos hay dos triadas por sarcómero, localizadas a nivel del borde entre banda I y Zona H.

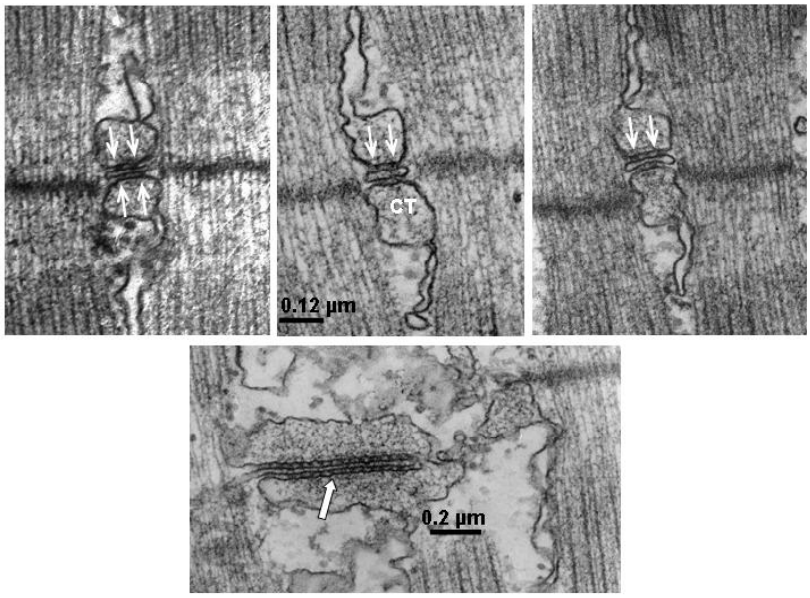


Figura 7.5. Localización y arquitectura de las triadas en músculo de Rana. En las tres fotos superiores los túbulos-T están cortados transversalmente. En la foto inferior un túbulo aparece cortado longitudinalmente. Las flechas indican la presencia de "pies" entre las membranas del RS y de los túbulos-T. (*Fotos cortesía de la Dra Clara Franzini Armstrong*).

Las triadas constituyen la estructura más frecuente de asociación entre RS y túbulos-T, consistente en dos cisternas laterales del RS con un túbulo-T central. Estructuras como las díadas, una cisterna del RS asociada a un túbulo-T y acoples periféricos, membrana del RS asociada a la membrana plasmática, también han sido descritas. En fibras de rana, las triadas se encuentran a nivel de la línea Z, mientras que en mamíferos hay dos triadas por sarcómero, localizadas a nivel del borde entre banda I y Zona H. Si bien las membranas de los túbulos y de las cisternas terminales están separadas, hay sitios de contacto entre ellas representados por puntos de mayor densidad electrónica, denominados puentes, pies o pilares que están señalados por las flechas, y que han sido ya mencionados anteriormente. La microfotografía de la parte inferior de la figura representa un corte realizado longitudinalmente a lo largo de un túbulo-T, y puede verse cómo la disposición de los pies se repite ordenadamente a lo largo de la zona de empalme entre las dos membranas (Franzini-Armstrong, 1970, 1980; Franzini-Armstrong y Protasi, 1997).

Los detalles estructurales revelados por microscopia electrónica, indicaban claramente que los túbulos-T constituían el medio físico de propagación radial de señales eléctricas, desde la superficie hacia el RS y que la presencia de los túbulos-T en las triadas era una clara indicación de la importancia de estas estructuras para el fenómeno de activación contráctil.

Los músculos de la vejiga natatoria del pez sapo (*Opsanus tao*) constituyen una excelente preparación para estudiar la arquitectura microscópica de las uniones entre túbulos-T y RS por la abundancia y perfecto arreglo de las membrana del RS. El 30 por ciento del volumen de estos músculos está ocupado por RS y hay dos triadas por sarcómero, lo cual facilita los estudios cuantitativos de los parámetros estructurales de las triadas o díadas (Franzini Armstrong y Nunzi, 1983).

En estos músculos, en la región de empalme entre RS y túbulos-T, las membranas se encuentran usualmente aplanadas y a menudo la región de empalme está preferencialmente orientada siguiendo el eje mayor de las fibras.

En el presente texto se sigue la nomenclatura propuesta por Franzini Armstrong y Nunzi, según la cual la porción de membrana del RS y la de los túbulos-T que se enfrentan cara a cara en las triadas, se denominan jRS y jT respectivamente, por junctional RS y junctional T, el resto de las membranas de estas estructuras se denomina RS libre y T libre. Las membranas del jRS y jT están separadas por una brecha de 10-20 nm. Periódicamente, dentro de la brecha, con un espaciamiento entre 25 y 30 nm, se encuentran las estructuras densas al microscopio electrónico que han sido denominadas pies. La disposición de los pies y el espesor de la brecha son bastante similares en diferentes tipos de músculos, indicando la importancia funcional de estas estructuras. La micro-fotografía de la figura 7.6 muestra la estructura y localización de los pies en la brecha entre jRS y jT. En esta imagen, el corte delgado trasversal de la fibra muscular, muestra las miofibrillas, y una sección longitudinal de una unión triádica. El corte ha pasado de manera tangencial sobre una unión triádica mostrando los pies, que tienen formas de rosquillas con la parte central menos densa, y aparecen dispuestos en una doble hilera que corre a lo largo del túbulo T.

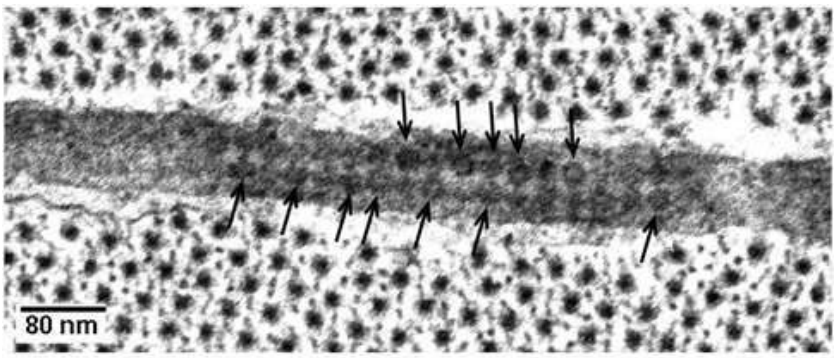


Figura 7.6. Microfotografía de un corte tangencial a un túbulo T que aparece en sección longitudinal, mostrando dos hileras de pies. Estos presentan forma circular con el centro menos denso. En los bordes aparecen los filamentos contráctiles. (*Foto cortesía de la Dra Clara Franzini Armstrong*).

Réplicas de crío-fracturas de la membrana del jT muestran una gran cantidad de partículas con cierta regularidad en su patrón de asociación entre ellas. A nivel de la hojuela citoplasmática de la membrana de los túbulos-T, en la región de empalme, frecuentemente se ven grupos de cuatro partículas ordenadas en dos filas que se extienden a lo largo de los túbulos-T. La figura 7.7 muestra dos imágenes de la hojuela citoplasmática de la jT obtenidas por crío-fractura. A nivel de la hojuela de membrana citoplasmática de los túbulos pueden verse agrupamientos de partículas en tétradas. En las dos zonas aumentadas se puede distinguir una tétrada completa y otras en las cuales falta una partícula.

La descripción del arreglo tetragonal de los pies en dos o más filas, y de la presencia de partículas intramembranarias en arreglo

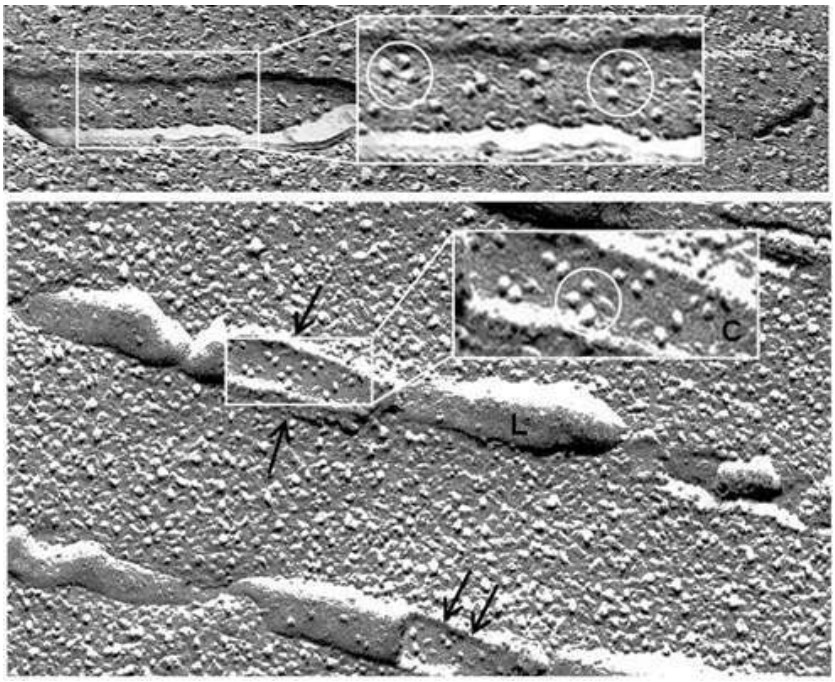


Figura 7.7. Hojuelas de membrana de túbulos-T de la zona triádica (jT) obtenidas por criofracturas de una preparación de músculo de la vejiga natatoria de pez-sapo (*Opsanus tau*). En la cara citoplasmática de la hojuela se ven agrupamientos de 4 partículas que constituyen las tétradas (ver zonas aumentadas). (*Fotos cortesía de la Dra Clara Franzini Armstrong*).

ordenado a nivel de la jT, que están en precisa correspondencia con los pies, (Franzini-Armstrong y Nunzi, 1983), ha permitido tener una visión del arreglo molecular de estructuras especializadas presentes en las membranas de los túbulos-T y del RS.

Receptores de dihidropiridinas en los túbulos T

La importancia de la demostración de la presencia de corrientes de Ca a nivel de los túbulos-T radica en sus implicaciones para los mecanismos de AEC. Una de ellas es la posibilidad de que el Ca que entra a la célula bajo esta forma, pueda tener un papel directo en la activación del fenómeno contráctil como activador, o indirecto como disparador del mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio. Otra implicación se refiere a la masiva presencia a la altura de la membrana de los túbulos-T, de canales de Ca identificados como receptores de dihidropiridinas. Estos canales también conocidos como canales de Ca tipo L por su gran conductancia (L por *large*), están presentes también en músculo liso y cardíaco, y, en células endocrinas, se caracterizan por su alta sensibilidad a drogas de la familia de las dihidropiridinas como la nifedipina, que es un antagonista y el BAY K 8644 que es un agonista del canal. Estas drogas tienen un mecanismo de acción muy peculiar ya que su efectividad depende del potencial de membrana. Por ejemplo, la nitrendipina, otro miembro del grupo, es 2.000 veces más efectiva a -15 mV que a -80 mV. Justamente, la nitrendipina, marcada con tritio, se utilizó para unirse de manera selectiva y con alta afinidad a un receptor para estos compuestos, en una preparación no purificada de membranas de corazón de cobayo (Belleman *et al*, 1981). Otros compuestos de la misma familia de las 1-4 dihidropiridinas tenían alta afinidad por los mismos sitios, por los cuales pasaron a ser conocidos como receptores de estas sustancias o DHPR. En 1982 se descubrió que los músculos esqueléticos de mamíferos constituían la fuente más rica de receptores de las dihidropiridinas, con una densidad de 50-80 pmol/mg de proteína, que en su gran mayoría estaban localizados en la membrana de los túbulos-T. El DHPR de músculo de conejo ha sido el primer canal de Ca operado por voltaje en ser purificado y caracterizado bioquímicamente (Curtis y Catterall, 1984; 1986; Borsotto *et al,*

1984). En los primeros trabajos se reportaron resultados que diferían tanto en el número de subunidades que constituían el canal como en su peso molecular.

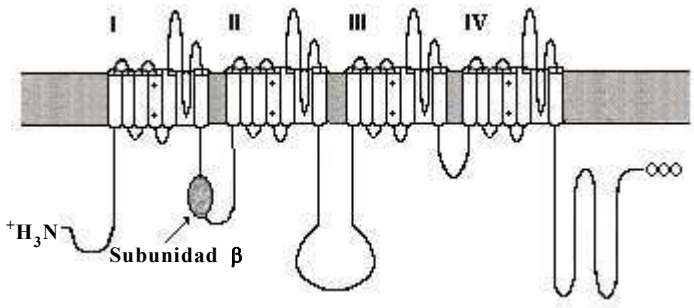


Figura 7.8. Esquema de la estructura de la subunidad a_1 del receptor de dihidropiridina. (*Modificado de Catterall, 1993*).

Inicialmente se reportó que el DHPR consistía de 3 sub-unidades, mientras que en trabajos posteriores en los cuales el receptor se purificó a partir de triadas, en presencia de inhibidores de proteasas para evitar el clivaje enzimático de las sub-unidades, se pudo establecer que el DHPR está constituido por 4 sub-unidades: α_1 (185kDA), α_2 (143kDa), β (54 kDa), γ (30 kDa) y δ (26kDa), α_2 pudiendo cambiar las cifras de peso molecular dependiendo de su estado reducido o no. De las subunidades, la α_1 presenta muchas de las propiedades que se esperarían de un canal de Ca sensible a las dihidropiridinas, ya que contiene el sitio de unión de las dihidropiridinas y de otros antagonistas de Ca, el poro de permeación y el sensor de voltaje del canal. Además, como se muestra en la figura 7.8, se parece en su estructura al canal de sodio con su 4 motivos repetidos, cada uno de los cuales tiene 6 segmentos hidrofóbicos que están embebidos en la membrana de los túbulos-T. De acuerdo con estas características, la sub-unidad α_1 funciona de manera autónoma como canal de Ca. La subunidad α_2, que es una proteína básicamente extracelular parece determinar la cinética lenta de las corrientes de Ca en músculo esquelético, sin afectar el papel de sensor de voltaje de los DHPR, (Obermair *et al*, 2004), tópico que será tratado en el capitulo 8. Este polipéptido

se caracteriza por disminuir su peso molecular bajo condiciones reductoras. La sub-unidad β se encuentra estrechamente unida a la subunidad α_1, es un substrato para protein-kinasas, que puede activar el canal de Ca reconstituido en bicapas lipídicas, lo cual sugiere que es un factor modulador de la actividad del canal de Ca. La subunidad γ es una glicoproteína altamente glicosilada, con dominios extracelulares e intramembranarios. Anticuerpos contra esta proteína inhiben la actividad del canal de Ca, sugiriendo que es una subunidad regulatoria del canal de Ca (Campbell, Leung y Sharp, 1988). Una quinta subunidad, la δ se forma a partir de la reducción de la subunidad α_2. La figura 7.9 muestra un esquema del receptor de dihidropiridina con todas sus unidades.

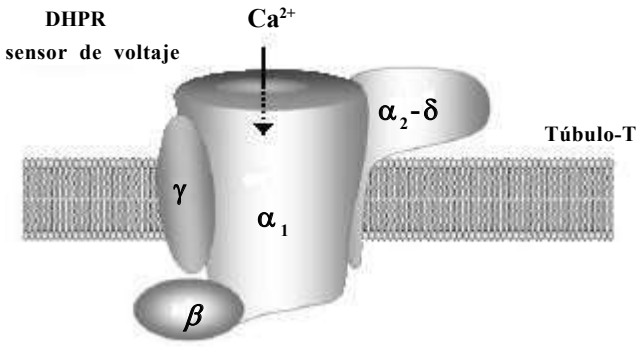


Figura 7.9. Esquema del receptor de dihidropiridina, o canal de calcio tipo L, con todas sus unidades.

Un gran avance se logró cuando Numa y colaboradores reportaron la clonación y la secuencia del receptor de DHPR de músculo esquelético, y poco después del cardiaco.

La determinación de la composición del DHPR llevó a la determinación de su estructura, en estudios en los cuales se usaba la técnica de sombreado rotatorio, con preparaciones purificadas del receptor sometidas al tratamiento de congelación y secado. Con esta técnica se pudo determinar que las moléculas tenían forma ovalada con dimensiones de 16 y 22 μm para el diámetro pequeño y grande respectivamente, y que estaban formadas por dos componentes de tamaño similar, en pleno acuerdo con los datos obtenidos

por métodos bioquímicos (Leung *et al,* 1988). La observación de la preparacion también indicaba la presencia de un 20 % de partículas de menor tamaño, probablemente sub-unidades disociadas.

La forma y el tamaño de las partículas enteras sugirieron su identidad con las partículas presentes en la membrana de los jT, que formaban las tétradas.

Con base en mediciones de la afinidad de ligandos, y de bloqueo de la actividad de los canales por las dihidropiridinas, Schwartz y colegas (1985) concluyeron que menos del 5% de los DHPR estaban funcionalmente activos como canales de Ca. Esta conclusión, confirmada por otros estudios, sirvió de base a la propuesta de que los receptores de DHPR tenían una doble función, actuando como canales de calcio y como sensores de voltaje para el AEC, ver capitulo 8 (Ríos y Brum, 1987).

En las membranas de los túbulos trasversos, en los sitios de aposición de éstos con la membrana de las cisternas terminales del RS los DHPR son visualizados como partículas intramembranarias arregladas en grupos de 4 o tétradas dispuestos en correspondencia con los receptores de Rianodina presentes en el RS. Esta disposición molecular provee la base morfológica para el mecanismo de liberación de Calcio a través de las unidades liberadoras de calcio (Leung *et al*, 1988).

Receptores de Rianodina en el RS

La rianodina es un alcaloide neutro extraído de un arbusto suramericano, *Ryania speciosa*, que a baja concentración (1mM), produce contracturas irreversibles en músculos de vertebrados. Las contracturas de rianodina no están necesariamente acompañadas por despolarización de la membrana, y pueden ocurrir en músculos despolarizados. En ésto, la rianodina se parece a la cafeína, sin embargo hay diferencias importantes entre las dos drogas. Por ejemplo, contrariamente a lo que se observa con la cafeína a baja temperatura, las fibras musculares se hacen menos sensibles a la rianodina. Otra diferencia estriba en que a baja concentración (1 μM),

la rianodina prolonga marcadamente la fase de relajación de una sacudida simple, lo cual provoca un aumento importante en la tensión basal cuando los músculos son estimulados de manera repetitiva. Por otra parte, la rianodina también disminuye progresivamente la fuerza de una sacudida. Finalmente, en presencia de rianodina las fibras musculares no se relajan al final de una contractura de potasio y quedan contraídas. Un punto de interés es el hecho de que la rianodina es menos efectiva en músculo cardíaco que en músculo esquelético. A concentraciones que en el último inducen contracturas irreversibles, en músculo cardíaco sólo producen una disminución en la tensión. La propuesta (Sutko *et al*, 1985) de que la rianodina era un bloqueador específico del canal de calcio del RS estimuló su uso para la identificación de la proteína del canal involucrada en el proceso.

Caracterización de los receptores de rianodina

Las vesículas aisladas del RS, que ya habían sido utilizadas para aclarar la participación y los mecanismos de acción de la ATPasa de Ca del RS durante el fenómeno de relajación contráctil, también fueron utilizadas primero para el estudio de la interacción de la proteína identificada como receptor de la rianodina y la rianodina misma y también para el estudio de los mecanismos que controlaban la liberación de Ca de las vesículas del RS hacia el mioplasma, vía los canales de liberación. La centrifugación en gradientes de densidad de la preparación de vesículas del SR había permitido obtener una fracción pesada del RS correspondiente a la región de las cisternas terminales, y una fracción liviana, correspondiente al RS longitudinal (Miyamoto y Racker,1982; Meissner, 1984). En los primeros estudios con las vesículas obtenidas de la fracción pesada del RS, la medición de los flujos unidireccionales de ^{45}Ca había permitido localizar y caracterizar la vía de salida del Ca del RS. Meissner y colegas (Meissner, 1984; Meissner *et al*., 1986) demostraron que un aumento del Ca en el lado citosólico de las vesículas, precargadas con Ca, causaba una salida masiva de este cation, indicando la presencia del mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca, en vesículas provenientes tanto de músculo cardiaco como esquelético. Los efectos potenciadores o inhibidores

de diferentes compuestos, como el rojo de Rutenio, neomicina, gentamicina etc, (Palade, 1987; Miyamoto y Racker; Chu *et al.*, 1986) permitieron caracterizar farmacológicamente el mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca, y establecer diferencias y semejanzas con el mecanismo del AEC. Entre los compuestos utilizados, se pudo demostrar que la rianodina, cuyo efecto sobre el AEC era bien conocido, podía potenciar o inhibir, dependiendo de la concentración, el mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca de las vesículas del RS pesado (Meissner, 1986; Lattanzio *et al*., 1987). La conclusión que se pudo derivar de estos trabajos fue que en las vesículas preparadas a partir de la fracción pesada del RS se encontraba incorporado el canal de liberación de calcio.

La unión, de gran afinidad, de la rianodina con los canales de liberación de Ca, llevó a la identificación de este compuesto como agonista altamente selectivo de los canales y de éstos como receptores de rianodina, y permitió una serie de trabajos en los cuales se utilizo la técnica de unión o "*binding*" para determinar las propiedades el receptor, y su modulación por numerosos agentes químicos. Finalmente la interacción de la rianodina con su receptor permitió el aislamiento y la purificación del mismo

Por otra parte, también se habían utilizado otras técnicas para la caracterización, fisiológica, bioquímica y morfológica de estos canales de calcio. Trabajos realizados con fibras desmembranadas (Preparación de Natori) (Endo, 1970; Volpe y Stephenson 1986; Lamb y Stephenson 1990; 1991) y con vesículas aisladas del RS habían indicado la presencia en el SR de canales de liberación de calcio que eran activados por ATP y Ca e inhibidos por Mg y rojo de rutenio, y estas características eran compartidas por los receptores de rianodina, ya que la unión de alta afinidad de rianodina con el receptor aumentaba en presencia de ATP y disminuía en presencia de rojo de rutenio.

Finalmente, la reconstitución de vesículas del RS pesado y su incorporación en bicapas lipídicas ha permitido determinar las propiedades eléctricas de estos canales y su caracterización farmacológica. En experimentos en que se han utilizado vesículas del RS incorporadas en bicapas lipídicas planas se ha encontrado que

los canales de Ca del RS son selectivos para cationes monovalentes y divalentes y se caracterizan por tener una muy alta conductancia, alrededor de 700 pS, para los cationes monovalentes y más de 100 pS para cationes divalentes, dependiendo en los dos casos de las condiciones iónicas. Después que lo canales de Ca o receptores de rianodina fueron purificados, e incorporados en membranas lipídicas fue posible obtener una descripción más precisas de sus características. Por ejemplo, además de confirmar la alta conductancia para cationes pequeños, se encontró que tenían una conductancia de poco más de 20 pS para la colina y el Tris que son cationes monovalentes muy grandes, indicando que el poro de conducción de los iones de estos canales tenía dimensiones muy grandes. Además se pudo confirmar que el ATP y la rianodina, y el Ca a baja concentración, aumentan la actividad de los canales mientras que el Mg y la rianodina, y el Ca a alta concentración la disminuyen. La molécula del receptor de rianodina aislada y purificada de músculo de conejo está constituida por homotetrámeros de un polipéptido de aproximadamente 560 kDa y tiene una alta afinidad por la rianodina y para la proteína FKBP12 (K_D=8 nM), propiedad que facilitó su aislamiento. El número total de sitios de unión para la rianodina resultó ser la cuarta parte de lo esperado, asumiendo que una molécula de rianodina se unía a una molécula del polipéptido, lo cual permitió deducir que la estructura cuaternaria del receptor era un tetrámero conformado por sub-unidades polipeptídicas de 450 kD.

Gracias al uso de técnicas de Biología molecular, y en especial mediante el clonaje molecular se han descrito tres isoformas de la molécula del receptor, RyR1, RyR2, y RyR3, que están codificadas por diferentes genes. Se ha encontrado que tienen una homología de alrededor 70% entre cualquiera de dos de los tres receptores. Esta tres diferentes isoformas se han encontrado en mamíferos, anfibios, peces y pájaros.

En mamíferos, RyR1 y RyR2 se encuentran principalmente en músculo esquelético y músculo cardiaco respectivamente; el RyR2 esta presente también en tejido nervioso. Por otra parte, el RyR3 esta presente en diferentes tejidos, incluyendo algunos músculos,

en los cuales se encuentra durante las primera fase del desarrollo postnatal, para luego disminuir y desaparecer. En músculos esqueléticos de anfibios se encuentran los tipos RyR1 y RyR3, que inicialmente habían sido definidos como αRyR y βRyR y luego se identificaron como RyR1 y RyR3. En músculos de anfibio receptores del tipo RyR3 se han encontrado fuera de la zona de unión entre túbulos-T y SR, y que no se encuentran en la cercanía con los DHPR. Se ha sugerido (Takeshima *et al.,* 1995), que a pesar que los RyR3, sean las isoformas menos sensibles a Ca, pueden responder específicamente a aumentos locales de Ca de gran amplitud, por lo cual, a pesar de no responder a despolarización, pueden participar en modular la liberación de Ca inducida por voltaje.

Identificación de los receptores de rianodina

Dos logros muy importantes para entender los mecanismos del AEC fueron la demostración de que el RyR funcionaba como un canal de Ca activado por Ca, y la demostración, por microscopia electrónica que los receptores de rianodina tenían una estructura idéntica a las estructuras conocidas como "pies", que cubren la brecha entre los jT y jRS.

En músculo liso de aorta porcina y de estómago de sapo, se encontró una proteína que funcionaba como canal de calcio activado por calcio que tenía las mismas propiedades de los receptores de rianodina cardíaco y esquelético (Campbell *et al.*, 1987), y que podía ser activado a baja concentración e inhibido a alta concentración de la droga (Meissner, 1986). Trabajos muy cuidadosos en el laboratorio de Meissner, incorporando el receptor purificado en bicapas planas de lípidos (Smith *et al.*, 1985, 1986, 1988), llevaron a la identificación del receptor de rianodina con el canal de liberación de Ca del RS. La figura 7.10 muestra un experimento de Smith y colegas en el cual registraron la corriente unitaria que fluía a través de un canal de liberación de Ca. En la figura, el trazo A fue obtenido en presencia de 10 nM de Ca, en el lado cis, sin que se registrara actividad. El trazo B, obtenido en presencia de 2 μM de Ca, muestra que el canal es mucho más ac-

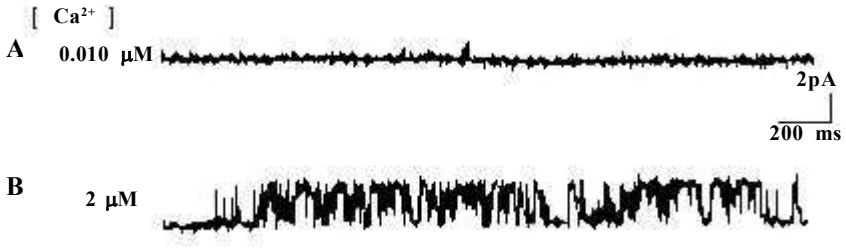


Figura 7.10. Efecto del. Ca en el lado cis sobre la actividad de un canal de Ca de vesícula de SR incorporada en una bicapa. (*Modificado con permiso de Smith et al., 1986*).

tivo con eventos de duración variable y con una probabilidad de apertura P_0 =0,4 a 0 mV. En la figura 7.11 se muestra que el Ca tiene un efecto bifásico activando el canal a concentraciones entre 0. 1 y 10 µM, e inhibiéndolo a concentraciones mayores. La figura 7.12 muestra el efecto de la rianodina sobre la actividad de un canal. El trazo A, obtenido en presencia de 2 µM Ca y 1,75 mM ATP, muestra que el canal permanece casi todo el tiempo en estado abierto con muy raros cierres. El trazo B muestra el efecto de 20 nM de rianodina sobre su receptor. Se puede ver que el canal permanece abierto en un estado de menor conductancia por largos periodos.

Utilizando diferentes técnicas, se pudo demostrar que el receptor purificado de músculo esquelético tenía forma de un cubo de 21 nm de arista, y que su aspecto general era idéntico a la estructura tetragonal de los pies o pilares que atraviesan la brecha entre la membrana de los túbulos-T y la membrana del RS. (Saito *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1988; Franzini-Armstrong, 1970, 1980). Con técnicas de tinción negativa y experimentos de cross-linking, se obtuvo evidencia que la forma de cuadrifolio de la molécula purificada correspondía a una estructura tetramérica. De hecho, en músculo esquelético los receptores de rianodina están localizados preferencialmente en la cara de la membrana del SR dirigida hacia el túbulo-T en la región del jSR, encontrándose en esta región con otras proteínas como la triadina y la junctina con la cual pueden interactuar funcionalmente.

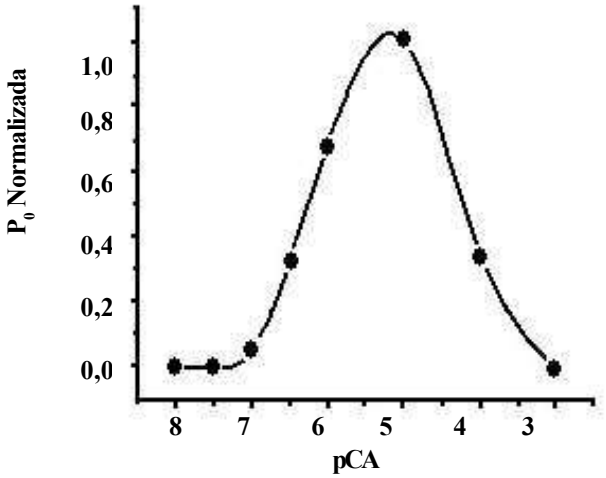


Figura 7.11. Efecto dual del Ca en el lado cis sobre la actividad de un canal de Ca de vesícula de SR incorporada en una bicapa. (*Modificado con permiso de Smith et al., 1986*).

La identificación de una gran porción de la molécula reconocida como receptor de rianodina, presente en la membrana del jRS, con las estructuras observadas al microscopio electrónico, llamadas pies, que cubrían la brecha entre las membranas del jT y la membrana del jRS proveyó la información estructural necesaria para aclarar el mecanismo del AEC, (Franzini-Armstrong, 1970, 1980) como se discutirá en los próximos capítulos. El uso de criomicroscopía, combinada con técnicas de tinción negativa, y procesamiento de imágenes aplicadas a una sola molécula, permitieron a Wagenknecht y colegas (1989;1992) obtener reconstrucciones tridimensionales de los receptores de rianodina, un ejemplo de la cuales se muestra en la figura 7.13. Las imágenes (B) y (C) permiten visualizar claramente la conformación homotetramérica de la molécula, en forma de cuadrifolio mientras que la vista lateral (A) permite distinguir la parte inferior que es la intramembranaria, de la parte superior que se localiza en la brecha entre las dos membranas, y que ha sido reconocida como la estructura que en microscopia electrónica se ha denominado el pie. La porción de la molécula que constituye el pie y se encuentra en el citoplasma está constituida por un grupo de estructuras tubulares interconectadas entre ellas, y que se unen a estructuras en forma de columna que

se extienden hacia la porción de la molécula que se encuentra en la membrana del RS. Esta última está formada al menos por 6 α-hélices por monómero y dos sets de 4 bastones que forman la estructura del poro (Samso *et al.,* 2005).

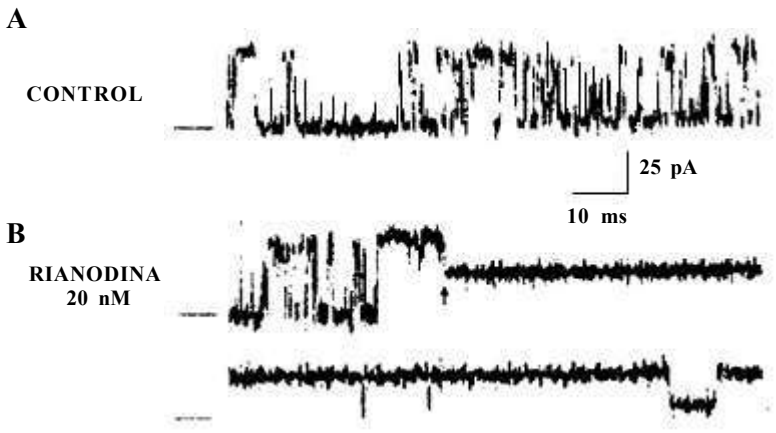


Figura 7.12. Efecto de la rianodina sobre la actividad de canal único de un RyR purificado e incorporado en una bicapa lipídica. La flecha en el trazo inferior indica el comienzo del efecto de la rianodina. (*Modificado con permiso de Smith et al., 1988*).

La afinidad del RyR1 para el Ca es modulada por la Calmodulina (CAM). En experimentos llevados a cabo midiendo la actividad de vesículas del RS incorporadas en bicapas lipídicas, se ha demostrado que en presencia de CAM a muy bajas concentraciones (nanomolares) la actividad del canal aumenta, mientras que a concentraciones mayores (micromolares) la actividad del canal es inhibida (Tripathy *et al.*, 1996).

Más recientemente se ha descrito la presencia de otra proteína, la S100A1 que modula la liberación de Ca en músculo tanto esquelético como cardiaco actuando a nivel del RyR1 y Ry2, respectivamente. Esta proteína compite con la CaM para unirse con el receptor en un sitio del canal donde también hay interacción con el segmento extremo del terminal C del sensor de voltaje para el AEC (Treves *et al*., 1977; Prosser *et al.,* 2008).

En las membranas de los túbulos trasversos, en los sitios de aposición de éstos con la membrana de las cisternas terminales del RS, los DHPR son visualizados como partículas intramembranarias arregladas en grupos de 4 o tétradas, dispuestos en correspondencia con los receptores de rianodina presentes en el RS. Debido a la naturaleza homotetramérica del receptor de rianodina se pudo concluir que 4 moléculas del DHPR se unían a un receptor de rianodina, RyR.

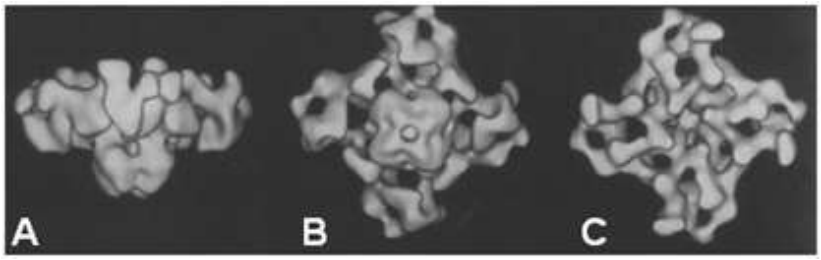


Figura 7.13. Reconstrucción tridimensional de la estructura de una molécula del receptor de rianodina, con resolución de 3.1 nm. **A**) vista lateral, mostrando la fracción intramembranaria y la fracción citoplasmática de la molécula. **B**) vista de la cara que se enfrenta al retículo sarcoplasmático. **C**) Vista de la cara citoplasmática de la molécula que se enfrenta a los túbulos T. (*Modificado con permiso de Radermacher et al., 1994*).

La figura 7.14 muestra de manera esquemática, la unión de una sola molécula de DHPr, con uno de los 4 monómeros que constituyen el receptor de RyR. Sin embargo cuidadosos estudios de microscopia electrónica habían revelado que no todos los RyR, estaban asociados con una tétrada en la región de empalme entre los túbulos-T y el RS, sino que estaban asociados de manera alterna (Block *et al.*, 1988). La disposición alterna entre los dos receptores sugirió un arreglo molecular del tipo que se muestra en la figura 7.15.

Esta disposición molecular provee la base estructural para el mecanismo de liberación de Calcio, a través de las unidades liberadoras de calcio, o ULC, presentes a nivel de las uniones de los jSR con los jT. Estas, sin embargo, pueden ocurrir bajo forma de triadas, diadas o acoples periféricos según como estén acopladas las cisternas terminales de la zona del jSR con los jT.

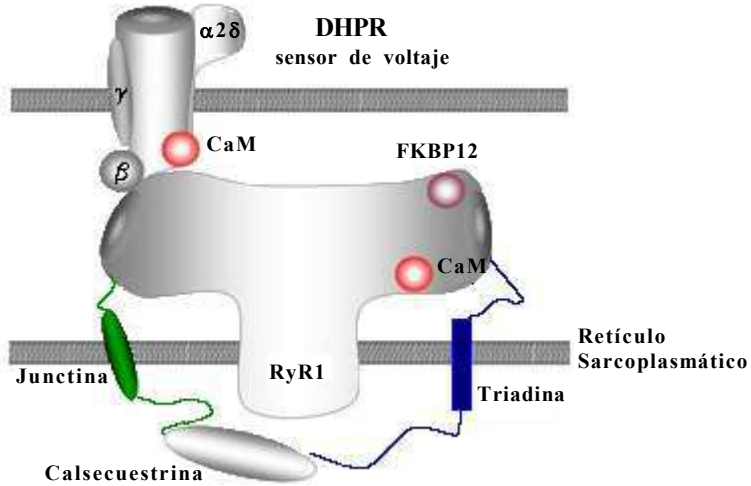


Figura 7.14. Esquema de la relación estructural entre una molécula de DHPR y un RyR. Para simplificar se muestra sólo uno de los 4 DHPR que forman una tétrada.

Independientemente de su morfología, las ULC son funcionalmente equivalentes y están separadas entre sí por regiones de membranas de RS y túbulos-T libres que no contienen ni RyR ni DHPR (Franzini-Armstrong y Jorgensen, 1994; Franzini-Armastrong 1996; Franzini-Armastrong *et al.,* 1999). De manera que las ULC contienen los dos tipos de canales de Ca, unos constituidos por el canal de liberación de Ca identificado como RyR, y situado en la membrana del jRS y los otros constituidos por el canal de Ca tipo L, identificado como DHPR, y situado en la membrana del jT. Inicialmente, utilizando microscopia electrónica, los pies sólo habían sido visualizados en las regiones de membrana del jRS o sea regiones situadas enfrente del jT. Sin embargo, utilizando técnicas de inmuno-marcaje, Dulhunty y colegas (1992) habían considerado la posibilidad de la existencia de RyRs situados fuera de la región de unión jRS-jT. Esta posibilidad fue confirmada por Felder y Franzini-Armstrong (2002) quienes describieron la presencia de la isoforma 3 del RyR en la zona adyacente a la región de unión.

Como se explicará en el capítulo 8, en el músculo esquelético, los DHPR funcionan como sensores de voltaje para el acopla-

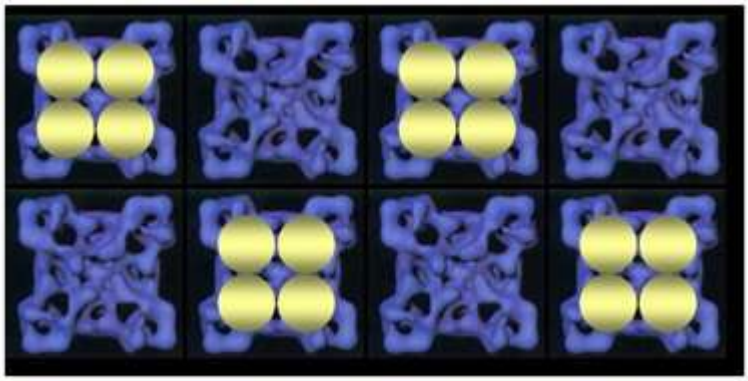


Figura 7.15. Esquema de la arquitectura de la región de unión de las membranas de túbulos T y RS. Disposición alternada de las tétradas de DHPR y de los y RyR.

miento Excitación-Contracción. En respuesta a un cambio en el potencial de membrana, los DHPRs interactúan físicamente con los RyRs por medio de una región definida de la molécula, específicamente el bucle citoplasmático ubicado entre las regiones II y III de la subunidad a del receptor, que hace contacto con el RyR (Tanabe *et al*., 1990; El-Hayek *et al*., 1995).

Por otra parte, en el músculo cardiaco, los DHPRs funcionan como canales de calcio, operados por voltaje, controlando la entrada del Ca que sirve como activador de los RyR2, cardiacos por un mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca. En este caso los RyR no están dispuestos ordenadamente en la cercanía de los DHPR ya que no interactúan con éstos durante el fenómeno de AEC.

Para definir las unidades morfológicas responsables de los eventos elementales de liberación de calcio, que serán considerados en el Capitulo 9, Ríos y colegas (Rios y Stern, 1997; Stern *et al.*, 1997) propusieron utilizar el término Couplon para definir un grupo de RyRs y DHPRs, que actúan sincrónicamente durante el AEC. De acuerdo con esto, las triadas estarían constituidas por dos couplones, o sea un túbulo y dos cisternas mientras que las diadas estarían constituidas por un sólo couplon, un túbulo y una cisterna (Franzini-Armstrong *et al*., 1999).

CAPÍTULO 8

ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

El término Acoplamiento Excitación-Contracción (AEC) fue usado por primera vez por Sandow (1952) para definir la cadena de eventos que empezando por la propagación de un potencial de acción a lo largo de una fibra muscular, termina con la activación de los filamentos contráctiles, y el desarrollo de fuerza o el acortamiento de la fibra y la subsiguiente relajación. El uso del término se ha extendido para abarcar también los fenómenos contráctiles no iniciados por un potencial de acción, como es el caso de las contracturas de potasio, de los experimentos con control electrónico de potencial, y el caso de contracciones inducidas por drogas.

La salida masiva de calcio, a través de los canales de liberación del Retículo Sarcoplasmático (RS), identificados como receptores de rianodina, o RyR, que ocurre en fibras musculares esqueléticas en respuesta a un estímulo fisiológico, causa un aumento en la concentración intracelular de este ion, la cual debe ser revertida rápidamente para permitir a una fibra responder a un segundo estímulo.

Diferentes mecanismos participan en la señalización de calcio en fibras musculares, incluyendo la apertura y el cierre de los canales de liberación de calcio, la acción de tampones intracelulares de calcio, y la retoma activa de calcio por el Retículo Sarcoplasmático, RS, mediante la acción de una ATPasa de calcio localizada a nivel de su membrana.

El potencial de acción, es el estímulo fisiológico que activa el proceso contráctil. Se propaga longitudinalmente a lo largo de la

membrana plasmática y radialmente a lo largo de los túbulos-T, y llega a nivel de los sensores de voltaje, identificados como receptores de dihidropiridinas (DHPR) o canales de calcio tipo L, que permiten la transducción de la señal eléctrica, que es el potencial de acción, a una señal química, que es el aumento en la concentración de Ca en el mioplasma. La interacción mecánica entre elementos de la molécula de dihidropiridina (DHPR) y el receptor de rianodina, (RyR), que es el canal de liberación de Ca del RS, causa un cambio conformacional de este, que lleva a la liberación masiva de calcio y a la activación de las proteínas contráctiles. Sin embargo, no todos los canales de liberación de calcio están bajo control del potencial de membrana. De hecho, existe otro tipo de canales, constituidos por una isoforma de los receptores de rianodina, los cuales son activados por el mismo ion Ca que se libera en respuesta a la despolarización de la membrana

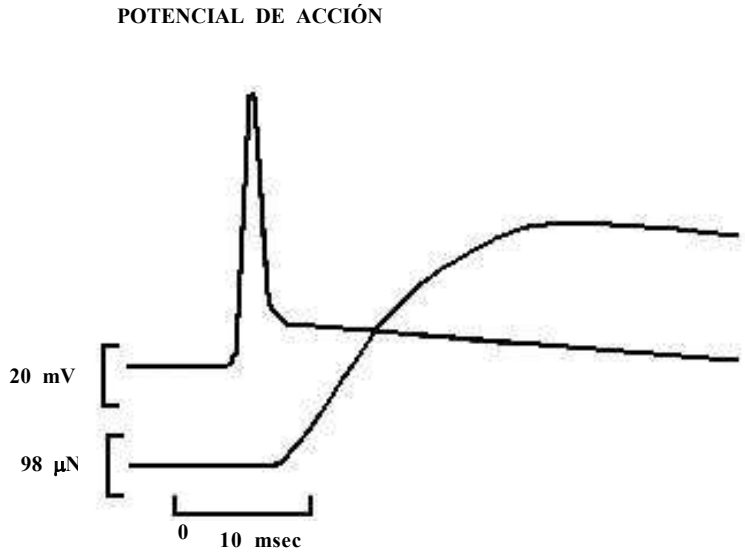


Figura 8.1 Registro simultáneo de un potencial de acción y de la tensión, en una sacudida simple de una fibra aislada de rana. (*Hodgkin y Horowicz, 1959*).

Dependencia del Potencial de Membrana

Bajo condiciones fisiológicas, el potencial de acción es el fenómeno eléctrico que dispara el mecanismo de liberación de Ca cuando el potencial de membrana llega a valores más positivos de -50 mV, que es el valor umbral para la contracción. La figura 8.1 muestra la relación temporal entre el potencial de acción y el desarrollo de tensión de una sola fibra muscular de rana. La relación cuantitativa entre el potencial de membrana y la tensión contráctil, no podía ser estudiada usando el potencial de acción debido a la naturaleza todo o nada de esta señal, que sólo podía ser modulada experimentalmente entre límites muy estrechos. El hecho de que el potencial de reposo de la membrana de las fibras musculares está determinado por la relación entre la concentración de potasio externa y la interna, permite despolarizar la membrana a valores entre -100 y 0 mV, cambiando la concentración externa del K. El estudio de las contracturas de potasio, iniciado por Kufler (1946), llevó al cuidadoso trabajo de Hodgkin y Horowicz, que produjo información importante sobre diferentes fenómenos involucrados en el AEC. Estos autores demostraron que una fibra muscular al ser expuesta a una solución con 190 mM K, se despolariza casi instantáneamente a +2 mV y desarrolla su máxima tensión más o menos equivalente a la tensión desarrollada en respuesta a una estimulación tetánica.

Como se muestra en la figura 8.2, esta tensión máxima no es sostenida, ya que después de una fase de meseta en que la tensión disminuye lentamente, sigue una fase rápida de relajación que lleva la fibra a la condición inicial. La figura 8.2 muestra también que concentraciones menores de K inducen respuestas contráctiles de menor amplitud, pero de curso temporal más prolongado. El valor del umbral contráctil determinado en estos experimentos fue de aproximadamente -54 mV a 16,5 °C. Hodgkin y Horowicz demostraron que tanto la amplitud como el curso temporal de las contracturas dependen del nivel del potencial de membrana. Este puede ser calculado utilizando la ecuación de Nernst para el ion K. Básicamente los mismos resultados, pueden obtenerse utilizando la técnica de control de potencial con dos microelectrodos y fibras

cortas, <1,5 mm, del músculo *Lumbricalis brevis*, midiendo al mismo tiempo la tensión desarrollada por las fibras en respuesta a pulsos despolarizantes (Caputo y Fernández de Bolaños, 1979). La Figura 8.3 muestra dos registros de tensión obtenidos despolarizando una fibra desde un potencial de mantenimiento de –100 mV a –8 y a –35 mV respectivamente. Puede verse cómo no solo la amplitud de la respuesta contráctil sino también la fase de meseta y la fase de relajación espontánea de las respuestas varían con el potencial de membrana. La tensión desarrollada por las fibras está relacionada con el valor del potencial de membrana mediante una curva sigmoidea como se muestra en la figura 8.4, obtenida en experimentos similares a los de la figura 8.3.

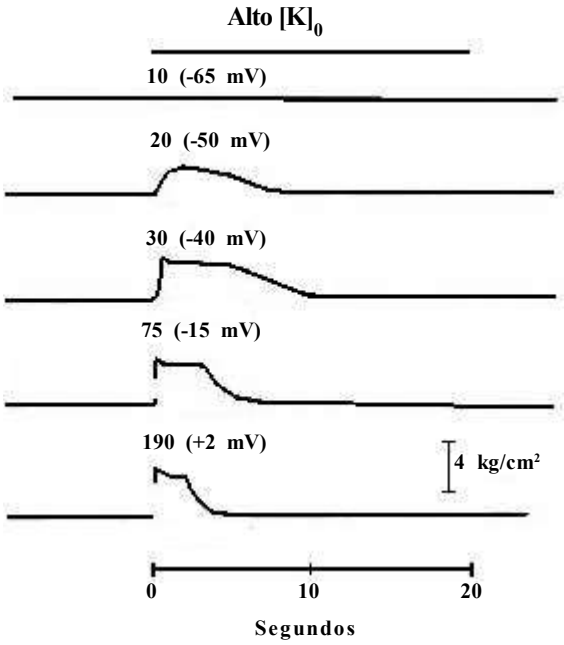


Figura 8.2 Contracturas de una fibra aislada de Rana, inducidas por concentraciones externas elevadas de potasio (10, 20, 30, 75, 190 mM). En este experimento el umbral contráctil esta entre -65 y -50 mV. La tensión máxima se obtiene a -15 mV, pero una despolarización mayor (+2mV) sigue teniendo efecto sobre el curso temporal de la contractura (*Modificado de Hodgkin y Horowicz, 1960*).

Al cuantificar la relación entre el valor del potencial de membrana y el nivel de activación contráctil se pudo descartar la idea de que el flujo de corrientes longitudinales a lo largo de la fibra era el fenómeno que activaba la contracción muscular.

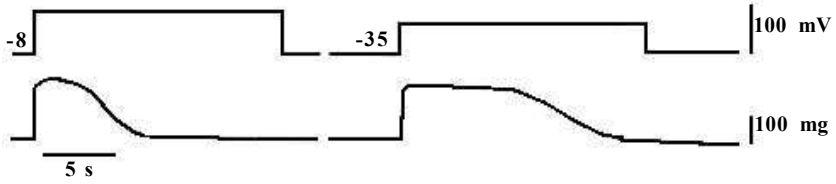


Figura 8.3. Contracturas obtenidas bajo condiciones de potencial controlado con pulsos despolarizantes a -8 y -35 mV respectivamente desde un potencial controlado -100 mV. Nótese cómo el curso temporal de las contracturas depende del potencial de membrana.

En el trabajo de Hodgkin y Horowicz, también se demostró que después de una contractura, era necesario repolarizar la fibra por encima de un cierto valor de potencial de membrana y por un cierto tiempo, para que pudiera contraerse de nuevo. La figura 8.5 muestra un experimento llevado a cabo con una fibra aislada, para determinar el tiempo de recuperación de la capacidad contráctil después de una contractura de potasio. Los resultados indican que a temperatura ambiente, 20-22 ºC, se necesita un periodo de recuperación de 40 segundos para ello. Por otra parte, la recuperación de la capacidad contráctil en el estado estacionario depende del potencial de membrana, como lo demuestra el experimento de la figura 8.6, en el cual después de una contractura máxima inducida con 190 mM K, la fibra se exponía a concentraciones variables de potasio por un minuto, antes de inducir una segunda contractura con 190 mM K. Puede verse como con 30 mM K la tensión de la segunda contractura, es solo una fracción mínima de la primera, mientras que con 40 mM K no hay una segunda respuesta. La relación entre la tensión fraccional de la segunda respuesta y el potencial de membrana durante el periodo de recuperación, se muestra en la curva a la izquierda, en la figura 8.7. Para que la segunda respuesta sea igual a la primera la fibra debe ser

repolarizada por encima de -50 mV mientras que por debajo de -30 mV no hay una segunda respuesta.

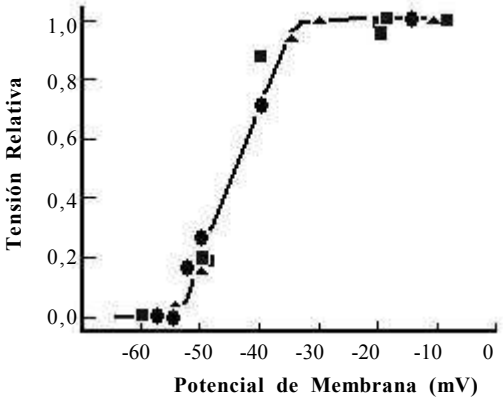


Figura 8.4. Relación tensión-potencial de membrana obtenida bajo condiciones de control de potencial utilizando la técnica de dos microelectrodos. En el gráfico, cada símbolo corresponde a una fibra diferente.

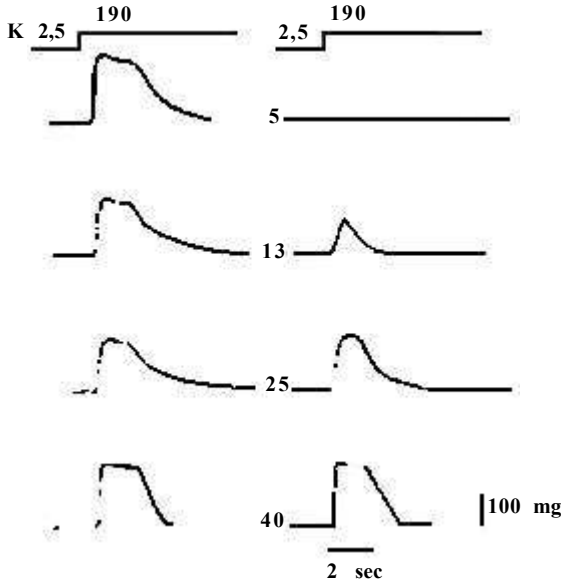


Figura 8.5. Efecto de la duración del periodo de recuperación sobre la capacidad de producir una segunda contractura después de una primera contractura de potasio. Los números al lado de la segunda respuesta en cada línea, indican el tiempo de recuperación, en segundos, en una solución normal con 2,5 mM de potasio.

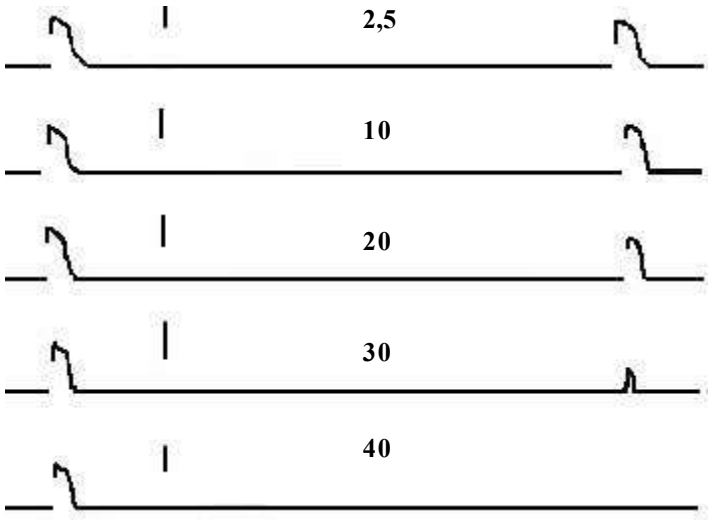


Figura 8.6. Efecto del potencial de membrana sobre la recuperación de la capacidad de contraerse después de una contractura de potasio. En este experimento la solución de recuperación contenía diferentes concentraciones de potasio (2.5, 10, 20, 30 y 40 mM). Con concentraciones de potasio de o por, encima de 40 mM no se produce una segunda contractura. (*Modificado de Hodgkin y Horowicz, 1960*).

La relación entre la recuperación y el potencial de membrana está representada por una curva tipo sigmoideo que parece una imagen especular de la curva de activación contráctil, que se muestra en la parte derecha de la figura. Este comportamiento indica que hay un proceso de inactivación dependiente del potencial de membrana. Diferentes autores han demostrado que la dependencia del potencial de membrana de los fenómenos de activación e inactivación contráctil puede ser modulada farmacológicamente por diferentes compuestos, como se discutirá luego.

Para explicar la dependencia de la amplitud y del curso temporal de las contracturas de potasio del potencial de membrana, Hodgkin y Horowicz propusieron el siguiente esquema:

$$P \xrightarrow{\alpha} A \xrightarrow{\beta} E$$

según el cual, P es un precursor que se convierte en un activador contráctil A, que ahora se sabe que es el Ca; luego, el activador se transforma en un producto final E, que no tiene actividad. La transformación de P a A y de A a E se rige por las constantes de reacción α y β respectivamente, que adquieren sus valores de manera instantánea con el potencial de membrana. Suponiendo que α y β no cambian con el tiempo, la relajación espontánea de las contracturas podría ser explicada en términos de consumo del precursor P. Como se verá posteriormente, una alternativa más probable se fundamenta en el desarrollo de un proceso de inactivación lenta.

Si bien una sacudida simple, es un fenómeno todo o nada, puede ser modulada, dentro de ciertos límites, por la acción de algunas sustancias, que pueden aumentar (potenciadores) o disminuir (inhibidores) la respuesta contráctil.

La acción potenciadora de los iones nitrato, y otros como el ioduro y el bromuro, fue descrita por Kahan y Sandow (1950) y Hill y MacPherson (1954). Hodgkin y Horowicz (1960b) demostraron que el efecto potenciador del nitrato, y de otros aniones liotrópicos, se podía explicar por su acción sobre el umbral contráctil que era desplazado hacia la izquierda, en aproximadamente 15 mV (figura 8.7). De hecho, en presencia de nitrato la concentración de K necesaria para producir una cierta tensión se reducía entre 2 y 2,5 veces. Otros aniones de la serie liotrópica producían el mismo efecto con una potencia creciente en el orden Cl, Br, NO_3, I, SCN. Otro anion, el perclorato, (ClO_4) tiene un efecto particularmente interesante sobre las fibras musculares, ya que desplaza el umbral mecánico y la curva de activación contráctil hasta en 40 mV, pero sin alterar la curva de inactivación contráctil (Gomolla *et al*., 1983). Este ion parece actuar a nivel del movimiento de carga, como se discutirá luego.

Lüttgau y Oetliker, (1968) demostraron que la cafeína, a bajas concentraciones producía un efecto similar, desplazando la curva de activación de las contracturas de K hacia la izquierda. Al mismo

tiempo, la curva de inactivación se desplazaba hacia la derecha indicando que en presencia de cafeína los fenómenos de activación e inactivación contráctil ocurrían en un rango mayor de potenciales de membrana. La cafeína tiene una importancia particular en la Fisiología, o mejor dicho en la Farmacología Muscular, por su doble acción: a baja concentración es potenciadora de las respuestas contráctiles a estímulos eléctricos, y a alta concentración actúa como agonista de los receptores de rianodina, causando liberación de Ca del RS y contracturas, sin despolarización de la membrana, como había sido demostrado por Axelsson y Thesleff (1958).

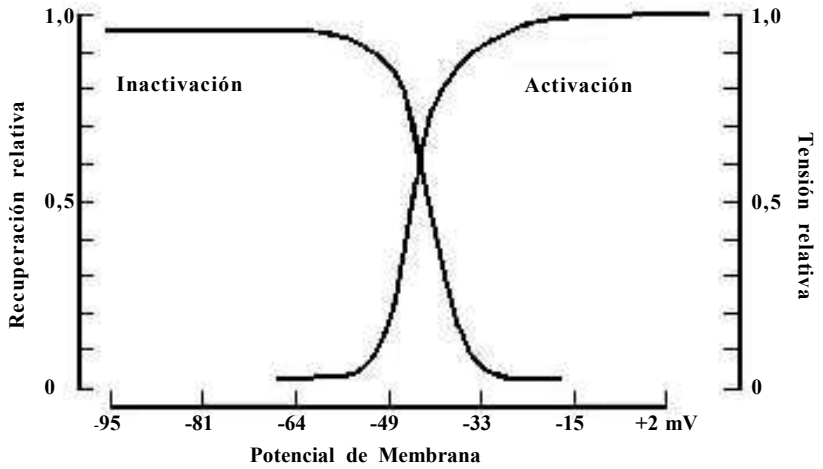


Figura 8.7. Curvas experimentales de activación e inactivación contráctil obtenidas con contracturas de potasio. La curva de inactivación muestra como el potencial de membrana afecta la capacidad de la fibra de producir una segunda contractura, después de un periodo de recuperación, como se ha mostrado en la figura 8.6.

Sandow y colegas, basándose en efectos de este tipo, propusieron que los compuestos conocidos como potenciadores contráctiles actuaban prolongando el período durante el cual el potencial de membrana tenía valores más positivos que el umbral mecánico, o período efectivo mecánicamente o PEM. El PEM podía prolongarse, o bien bajando el umbral contráctil, o bien haciéndolo menos positivo, o prolongando la duración del potencial de acción. Agentes como la cafeína, el NO_3 y otros aniones

liotrópicos, el perclorato, actuaban bajando el umbral mecánico, mientras que otros, Zn, UO_2, etc., actuaban disminuyendo la conductancia de potasio durante un potencial de acción y por lo tanto prolongando la duración del mismo. Un tercer grupo de compuestos, no considerados por Sandow, actúa como potenciador de las sacudidas de manera independiente del potencial, afectando la capacidad de retoma del calcio por el RS al envenenar la ATPasa de Ca.

Activación contráctil

Al hacerse disponible la técnica de control de potencial con dos microlectrodos, numerosos autores la empezaron a utilizar para el estudio de fenómenos que ocurrían en la región del potencial de membrana cercana al umbral contráctil. Luego gracias al desarrollo de electrodos flexibles esta técnica se extendió a estudios en que se registraba el desarrollo de tensión. Utilizando la técnica de dos microelectrodos, y mediante observación visual de movimiento de sarcómeros, Costantin (1968) pudo determinar el valor del umbral contráctil y el efecto de cationes divalentes sobre este parámetro, en presencia de tetrodotoxina para eliminar el potencial de acción. En presencia de 1,8 mM Ca, el umbral contráctil era -48 mV a 22 °C, mientras que en presencia de 0,2 y 10 mM Ca era -55 mV y -40 mV respectivamente. Adrian, Chandler y Hodgkin (1969) determinaron la curva fuerza amplitud para pulsos que apenas llegaban al umbral contráctil. Mientras que la reobase de esta curva era de -52 mV a 4 °C, la duración crítica del pulso era de 11 ms a -30 mV, 4 ms a 0 mV y 2 ms a +40 mV. Utilizando pulsos subumbrales de amplitud y duración variables pudieron determinar cuales combinaciones de dos pulsos, aplicados unidos o separados, eran efectivas para alcanzar el valor umbral. Con base en sus resultados propusieron un esquema, parecido al propuesto por Hodgkin y Horowicz (1960) con el cual podían calcular la cinética de aparición y desaparición de un supuesto activador contráctil.

Heistracher y Hunt (1969) aplicaron la técnica de control de potencial con dos microelectrodos en fibras cortas (1,2 mm) de los músculos intercostales de serpiente. Insertando los dos microelectrodos en el centro de las fibras, cuya constante de espacio era

de aproximadamente 1 mm, lograron un control de potencial satisfactorio a lo largo de la fibra, lo que les permitió el estudio de los fenómenos contráctiles, pudiendo registrar la tensión desarrollada en respuestas a cambios de potencial mediante el uso de un transductor mecano-electrónico.

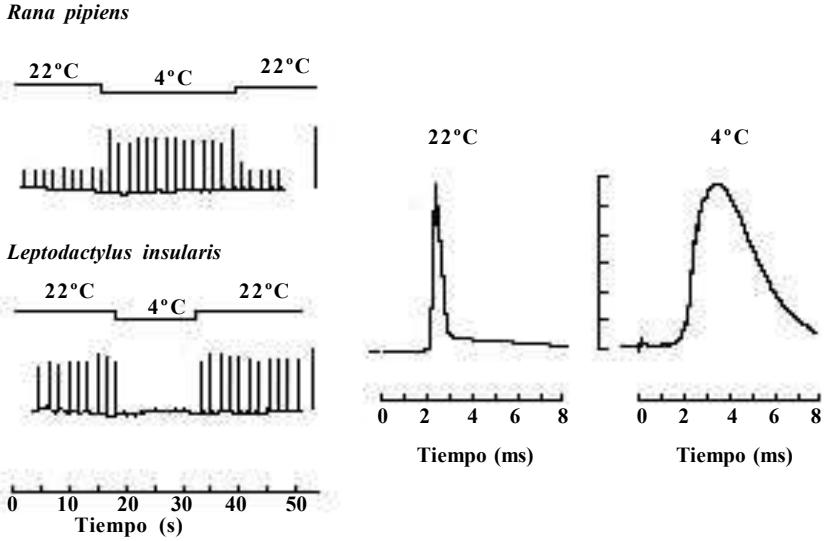


Figura 8.8. Los registros a la izquierda muestran el efecto de baja temperatura (4 °C) sobre las sacudidas simples, de fibras únicas de *Rana pipiens* y *Leptodacylus insularis*. Los registros a la derecha representan potenciales de acción registrados en una fibra de *Leptodactylus*.

Como ya se ha discutido, la misma técnica empleando fibras cortas (1,5 mm) de los músculos *Lumbricalis brevis* del IV dedo de la rana, fue utilizada por Caputo y colegas para estudiar las propiedades de activación e inactivación contráctil bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo el uso de diferentes agentes farmacológicos.

Efecto de la temperatura

Un aspecto interesante de la respuesta contráctil de las fibras musculares de rana es su marcada sensibilidad a la temperatura.

En ranas de la zona templada, como *Rana pipiens*, *Rana temporaria* y *Rana esculenta*, la baja temperatura (0 - 4°C) potencia la fuerza contráctil de sacudidas simples y prolonga la fase de relajación de las respuestas contráctiles y la duración del potencial de acción. En anfibios de la zona tropical (*Leptodactylus ocellatus* o *L. insularis*) la capacidad de desarrollar tensión es disminuida considerablemente, especialmente en el caso de sacudidas simples, sin que la capacidad de generar potenciales de acción sea afectada, como se muestra en la figura 8.8 (Caputo *et al.*, 1998).

La prolongación de la fase de relajación de las respuestas contráctiles inducidas a baja temperatura ocurre también, al menos cualitativamente, en los anfibios de zonas tropicales, cuando la temperatura es moderadamente baja (6 – 12 ºC).

La posibilidad de prolongar de esta manera, el curso temporal de las contracturas de potasio ha permitido efectuar cambios de soluciones durante su curso para estudiar el efecto de diferentes procedimientos o de drogas. La figura 8.9 muestra que una contractura de una sola fibra aislada de *Rana pipiens* inducida a 3 ºC (panel superior a la izquierda), puede ser interrumpida al repolarizar la membrana y luego reanudada despolarizándola de nuevo (panel inferior a la derecha). El experimento muestra claramente que el curso temporal total de esta contractura es similar al curso temporal de la contractura no interrumpida, en otras palabras, el área debajo de ésta, es igual a la suma de las áreas de los dos componentes separados. Puede verse cómo el curso temporal de la relajación que ocurre espontáneamente en presencia de alto K, es mucho más lento que la relajación rápida que ocurre al repolarizar la membrana. Como se ha mencionado arriba, esta relajación espontánea podría ser explicada en términos de un proceso de inactivación del mecanismo que controla la liberación de calcio, o en términos de vaciamiento de los depósitos de Ca del Retículo Sarcoplasmático. En el caso en que la repolarización pone un alto inmediato a la liberación de Ca, puede hablarse de un mecanismo de desactivación. Es posible terminar abruptamente una contractura exponiendo la fibra a soluciones de anestésicos locales como la tetracaína, a diferentes concentraciones y, con menor efectividad, también a soluciones externas preparadas con 0 Ca (Caputo, 1972b).

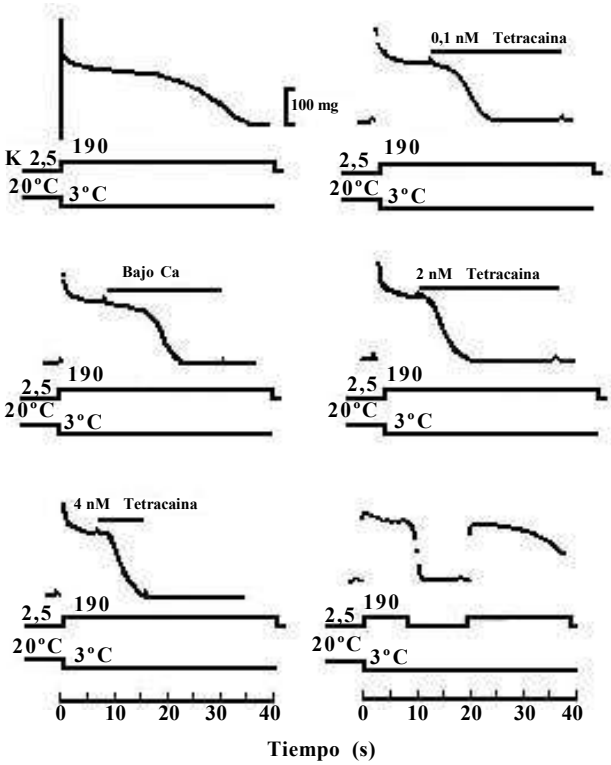


Figura 8.9. Las contracturas de potasio de fibra única de *Rana pipiens* obtenidas a baja temperatura muestran un curso temporal prolongado que permite realizar cambios de soluciones. En este caso se muestra el efecto de tetracaína a diferentes concentraciones y de una solución preparada sin calcio, aplicadas durante la fase de meseta de contracturas inducidas a baja temperatura. El último registro muestra cómo la contractura puede ser interrumpida y luego restablecida. (*Tomado de Caputo, 1972*).

La posibilidad de interrumpir una contractura de potasio, y después reanudarla, ha sido aprovechada para comprobar si la relajación espontánea de las contracturas de potasio se debía a vaciamiento de los depósitos de Ca del RS (Caputo, 1976). La figura 8.10 muestra en el panel superior el registro de una contractura de potasio (190 mM) de una fibra aislada de *Rana pipiens* a 4 ºC, interrumpida a los 13 segundos, al exponerla a la solución fisiológica normal y después de 13 segundos adicionales, al despolarizarla de nuevo con la solución de alto potasio. En el panel inferior se

muestra que después de interrumpir una contractura de potasio, se puede inducir una prolongada contractura de cafeína (2,5 mM) y después que la fibra se relaja al lavar la droga, se continúa la contractura de potasio interrumpida. El experimento demuestra claramente que los depósitos intracelulares de Ca son capaces de sostener una contractura de cafeína además de la contractura de potasio. Esta conclusión fue reforzada por resultados similares obtenidos en ausencia de Ca extracelular.

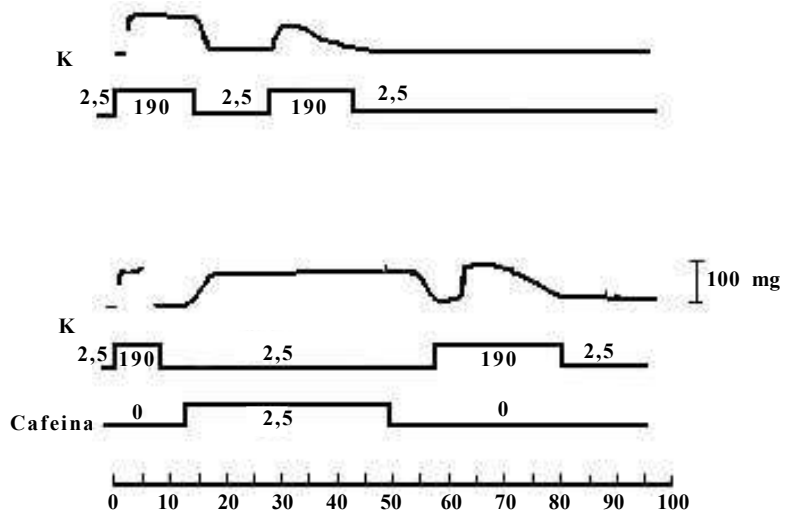


Figura 8.10. Intercalación de una contractura de cafeína durante el periodo de interrupción de una contractura de potasio, a baja temperatura. (*Modificado de Caputo, 1976*).

Efectos del Ca extracelular

El papel del Ca extracelular en el fenómeno de AEC ha sido objeto de numerosos trabajos y mucha controversia por largo tiempo. A partir de los trabajos de Heilbrunn (Heilbrunn,1943; Heilbrunn y Wiercinsky, 1947) demostrando que el Ca era el único de todos los iones fisiológicos que al ser inyectado en una fibra muscular producía contracción, se empezó a reforzar la idea de que el Ca podría funcionar como enlace entre la despolarización de la

membrana y el acortamiento de las miofibrillas en músculos esqueléticos. La evidencia directa para ello se basaba en los experimentos de Heilbrunn, y la evidencia indirecta, en el hecho de que el influjo de Ca aumentaba durante la actividad eléctrica y las despolarizaciones por potasio en axón de calamar (Keynes y Lewis, 1956), y por la importancia de la presencia del Ca externo en contracciones y contracturas, especialmente a nivel del músculo cardíaco.

La demostración de la capacidad de acumulación de Ca por parte del RS (ver Cap. 3), indicaba que esta estructura pudiera tener importancia en la liberación de calcio para el fenómeno de activación contráctil. Los trabajos de Winegrad, ya discutidos, utilizando técnicas auto-radiográficas para estudiar la movilización del Ca en los compartimientos intracelulares, confirmaron que durante la actividad contráctil había traslocación de Ca en las diferentes regiones del RS.

Anteriormente, Heilbrunn (1943) había propuesto que diferentes tipos de estimulación podían causar liberación de Ca de la superficie o de regiones externas de las fibras musculares, y que este Ca, entrando en la célula, producía la contracción. Sin embargo Hill (1949), basado en el retraso de unos pocos ms con el que se desarrolla la tensión después de un potencial de acción, y en el cálculo teórico de los tiempos de difusión, de aproximadamente un segundo, demostró que la difusión de cualquier sustancia desde la superficie de una fibra hacia su interior era demasiado lenta para ser compatible con la activación contráctil. Con admirable perspicacia, Hill concluyó que la penetración radial de una señal desde la superficie de una fibra, tenía que ocurrir por un mecanismo diferente a la difusión. En 1952, en su famoso artículo de revisión en el cual se utilizó el término AEC por primera vez, Sandow retomó los argumentos de Heilbrunn proponiendo que un mecanismo de difusión de intercambio (*exchange diffusion*), facilitado por atracción electrostática entre el Ca y las miofibrillas, pudiera acelerar la difusión del calcio desde la superficie hacia el centro de la fibra. Esta idea fue reforzada con la demostración por Huxley y Taylor, de la activación local a nivel de la línea Z en fibras de

rana, que indicaba una especialización estructural que favorecía la penetración de la información hacia el centro de la fibra. El redescubrimiento del sistema de túbulos-T y la demostración de que los túbulos estaban abiertos hacia el medio extracelular, revitalizaron la idea de que el Ca extracelular podía activar las miofibrillas, puesto que los argumentos de Hill ya no valían debido a la reducción de las distancias difusionales.

Bianchi y Shanes (1959) utilizando ^{45}Ca demostraron que en músculos sartorios estimulados eléctricamente había una entrada extra de Ca de 0,2 pM/cm^2 por impulso. Al reemplazar el Cl por NO_3 como el anión principal en el medio externo, obtuvieron un aumento en la entrada extra por impulso equivalente al 60%, sin efectos sobre el flujo de reposo. El efecto potenciador del NO_3 también causaba un aumento en el área debajo del trazo de la tensión de un 60%, sugiriendo una relación directa entre tensión de la sacudida y entrada de Ca. La entrada de Ca también aumentaba durante las contracturas de potasio. Curtis en 1966 demostró que la entrada de Ca en fibras aisladas estimuladas era de 0,34, 0,73 y 1 pM/cm^2 en soluciones con 0,5, 1 y 1,8 mM de Ca.

La hipótesis de que la entrada de Ca era el enlace entre excitación y contracción fue reforzada aun más cuando se demostró que eliminando el Ca externo se eliminaban también las contracturas de potasio, pero no las de cafeína (Frank, 1960, 1962). Diferentes cationes divalentes, algunos de los cuales no producen una respuesta contráctil al ser inyectados en una fibra muscular, podían sustituir al Ca en el mantenimiento del AEC (Frank, 1980). Alternativamente, estos resultados podían indicar que el Ca externo era necesario para mantener funcionales a los mecanismos de acople, actuando o a nivel de la membrana o en un sitio cercano. Jenden y Reger (1963) y Edman y Grieve (1965) demostraron que la pérdida de la capacidad de contraerse en respuesta a estimulación eléctrica en ausencia de Ca extracelular, se debía a la alteración de las propiedades eléctricas de la membrana de las fibras musculares, ya que la membrana celular se despolarizaba paulatinamente, llegando así a una pérdida de la excitabilidad o a la inactivación del mecanismo de acople.

La importancia de la disminución del potencial de membrana en la pérdida de la respuesta contráctil en ausencia del Ca externo fue demostrada por Curtis (1963) quien pudo restablecer la contractilidad pasando una corriente hiperpolarizante que restauraba el potencial de membrana a valores normales. Sin embargo, en condiciones en las cuales las fibras no se despolarizan apreciablemente, en una solución preparada sin agregar Ca externo, la actividad contráctil en respuesta a estimulación eléctrica se mantiene por mucho tiempo, como se muestra en la figura 8.11 (Caputo y Giménez, 1967). Bajo estas condiciones la tensión máxima de las contracturas de potasio no es afectada, pero el curso temporal de las contracturas de potasio se hace mas rápido, perdiéndose la característica fase de meseta. Este fenómeno ha sido explicado en términos de un mecanismo de inactivación que se acelera en ausencia de Ca extracelular (Caputo y Giménez, 1967; Caputo, 1972). No ocurre cuando el Ca es sustituido por otros cationes divalentes como Zn o Sr. Una explicación plausible para el efecto del 0 Ca será comentada al final del capítulo.

La capacidad de diferentes cationes divalentes para mantener la actividad contráctil de las fibras musculares había sido relacionada con sitios específicos que hoy en día se identifican como sensores de potencial. Estos constituyen parte de la especie molecular conocida como Receptor de Dihidropiridina (DHPR) y su mani-festación eléctrica es el movimiento intramembranario de carga, tema que será tratado más adelante.

Un aumento en la concentración de Ca extracelular produce un corrimiento hacia potenciales más positivos tanto de la curva de activación como de la curva de inactivación contráctil en el estado estacionario (Lüttgau, 1963). Por otra parte una disminución de Ca produce el efecto contrario (Curtis, 1963; Caputo, 1967; Frankenhaeuser y Lannergreen, 1967). El corrimiento de la curva de inactivación, hacia potenciales más negativos, unido a una disminución del potencial de reposo, hace entrar a las fibras más susceptibles en un estado de inactivación, pudiéndose así explicar (Melzer, Herrmann-Frank y Lüttgau, 1995) la pérdida de la capacidad contráctil en ausencia del calcio externo.

La demostración de la presencia de corrientes de entrada de calcio en músculo esquelético por Stefani y colegas (Beaty y Stefani, 1976; Sanchez y Stefani, 1978; 1983) abría la posibilidad de que las corrientes de Ca pudieran contribuir a mantener la fase de meseta en una contractura bajo condiciones de Ca externo normal. Esto explicaría los cambios en el curso temporal de estas respuestas contráctiles. Sin embargo, se ha demostrado que al sustituir el Ca externo por Ni , el curso temporal de las contracturas no cambia (Caputo, 1981).

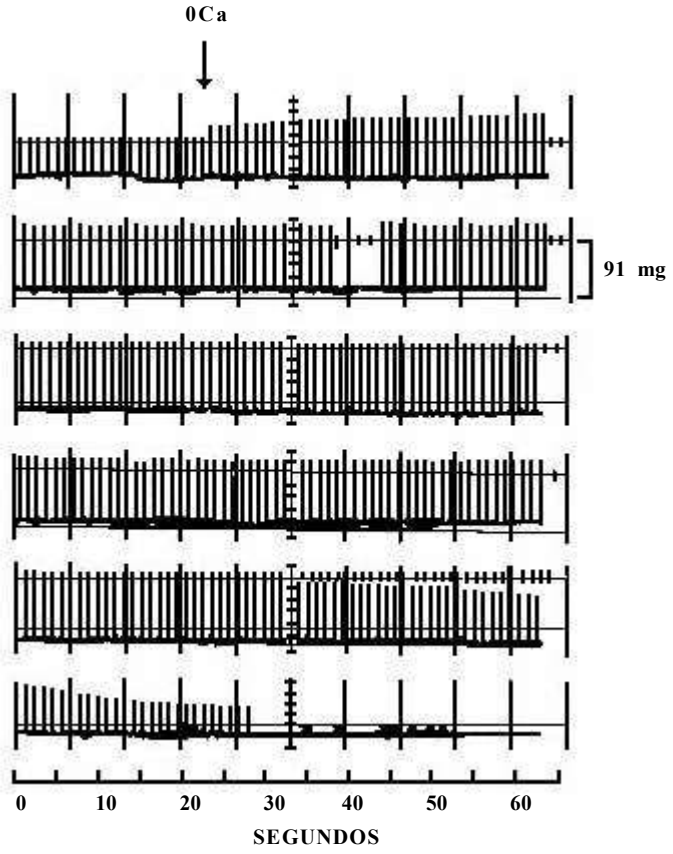


Figura 8.11. Efecto del calcio extracelular sobre las sacudidas simples de una fibra aislada de *Rana pipiens*. La flecha indica el momento en que la solución externa fue cambiada por una solución preparada sin Ca. En esta solución la concentración de Ca libre debida a contaminación fue de 6 μM. (*Tomado de Caputo y Gimenez, 1976*).

Es necesario remarcar, que el Ni bloquea los canales de Ca, y no sustituye al Ca como activador de los filamentos contráctiles. En un trabajo de particular importancia se demostró que el D600, un derivado del verapamil, conocido bloqueador de los canales de Calcio tipo L, de la familia de las fenilalquilaminas, causa parálisis en una fibra muscular después de una contractura de potasio máxima, probablemente mediante un mecanismo de inactivación (Eisenberg *et al.,* 1983).

Los experimentos realizados con soluciones preparadas sin añadir Ca, y con los cuales se demostraba que las fibras aisladas seguían generando tensión normal en respuesta a estimulación eléctrica o a un aumento del K extracelular, claramente indicaban que el Ca extracelular no era necesario para la activación de las proteínas contráctiles. Sin embargo, la demostración de un mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca, (mecanismo que será discutido luego), en fibras musculares desmembranadas (Ford y Podolsky, 1970; Endo, 1970) reabría la posibilidad de que el Ca de contaminación presente en soluciones preparadas sin añadir Ca, estimado en unos pocos μM, pudiese disparar la liberación de Ca adicional del RS. Esta posibilidad fue descartada por experimentos (Armstrong *et al*., 1972) en los cuales se mantenía la capacidad contráctil de fibras bañadas en soluciones preparadas sin Ca y con 1 mM de EGTA, en las que la concentración estimada de Ca extracelular libre era de aproximadamente 10^{-9} M. Con esta cantidad de Ca externo la posible entrada de Ca asociada a un potencial de acción sería ínfima y sin posibilidad de ejercer una acción disparadora para la liberación ulterior de Ca.

La posibilidad de que esta baja concentración de EGTA no fuese suficiente para remover todo el Ca de los túbulos-T fue explorada por Barrett y Barrett, (1978), quienes utilizaron 80 mM EGTA. En esta condición las fibras se despolarizaban y se hacían inexcitables. Mediante pulsos hiperpolarizantes se podía restablecer un valor de potencial de reposo, que hacía posible la generación de potenciales de acción disminuidos en magnitud, 80 mV vs los 140 mV que usualmente se obtienen bajo condiciones normales. Estos potenciales de acción disminuidos, no eran capaces de evocar una

respuesta contráctil. Este punto fue retomado por Lüttgau y colegas (1979) quienes aun en presencia de 80 mM EGTA, pero protegiendo la membrana de las fibras con Mg, demostraron que las fibras desarrollaban tensión en respuesta a estímulos eléctricos. Una posible explicación para los resultados negativos de Barrett y Barrett (1978) pudiera encontrarse en el hecho de que como consecuencia de la despolarización prolongada de la membrana, no sólo se inactiva la conductancia de sodio responsable de la generación del potencial de acción, sino también el mecanismo que provee sensibilidad al voltaje al fenómeno de AEC, como se verá luego. El tiempo de recuperación de este mecanismo es bastante más prolongado que el de recuperación del potencial de acción.

Los resultados discutidos arriba prueban claramente que el Ca extracelular, esté libre en solución, o adsorbido en el lado externo de la membrana, no participa de manera directa en la activación de las proteínas contráctiles, y que este papel es ejercido por el Ca que proviene de depósitos intracelulares, como lo venían indicando otros investigadores que estudiaban los mecanismos de acumulación y liberación de Ca, ya sea en vesículas aisladas del RS o en fibras intactas, (Weber y Herz, 1968). Sin embargo, la importancia del Ca extracelular para el funcionamiento de las fibras musculares, parece estar avalado por los diferentes mecanismos de entrada que han sido descritos.

En los trabajos comentados arriba, el término inactivación se ha utilizado refiriéndose a algún fenómeno, no identificado, en la serie de eventos del AEC. Con el descubrimiento del movimiento de carga intramembranario, y su identificación como manifestación eléctrica de la operación de los sensores de voltaje para el AEC, se hizo claro que el término inactivación, como fue anteriormente usado, se refería a la inmovilización de carga que ocurre cuando la membrana de las fibras musculares es despolarizada, como se verá luego.

Fibras Desmembranadas; Preparación de Natori

El uso de fibras aisladas se hizo muy común a partir de los trabajos de Hodgkin y Horowicz (1959-1960), ya que permitía

disminuir los retrasos difusionales inherentes a músculos enteros, además de permitir registrar la actividad contráctil, especialmente de contracturas de potasio y de cafeína de fibras únicas. Sin embargo, se empezaron a usar otras preparaciones que ofrecían ventajas particulares, como las fibras desmembranadas, y las fibras cortadas montadas en cámaras con sellos de vaselina, como se verá a continuación.

La preparación de fibras desmembranadas químicamente, tiene su origen en la de las fibras musculares tratadas con glicerol, introducida por Szent-Gyorgyi en 1949 que había permitido demostrar la importancia del ATP para las interacciones entre miosina y actina. En este caso, el tratamiento utilizado por Szent-Gyorgyi, eliminaba las membranas celulares de los músculos. Mas recientemente el glicerol ha sido desplazado por detergentes no-iónicos, como el lubrol-WX, para eliminar el sistema de membranas de las fibras musculares, y permitir que el medio extracelular tenga acceso directo a las proteínas contráctiles, pudiéndose así estudiar directamente el comportamiento de la maquinaria contráctil bajo diferentes condiciones experimentales, sin las complicaciones del sistema de membranas intracelulares (Julian 1971). La figura 8.12 muestra la relación entre la tensión desarrollada por las fibras musculares y la concentración de Ca, obtenida con esta misma preparación por Podolsky y Teicholz (1970) que de esta manera confirmaron los resultados de trabajos previos en los cuales se había determinado la afinidad de las miofibrillas por el Ca.

Como ya se ha mencionado, una variante de esta técnica, introducida por Natori (1954), consiste en eliminar manualmente porciones de la membrana superficial, abriendo el interior celular al medio externo, con la fibra bañada en aceite mineral, y luego pasarla a una solución que simula el medio intracelular. En este caso, el sistema de membranas intracelulares, correspondiente al segmento de fibra desnudada, puede quedar parcialmente intacto y funcional, dependiendo de la habilidad y de las necesidades del experimentador. Se ha visto como Ford y Podolsky (1970), y Endo (1970), utilizando esta preparación, pudieron demostrar el fenómeno de liberación de calcio inducida por Calcio (Civan y Podolsky,1966;

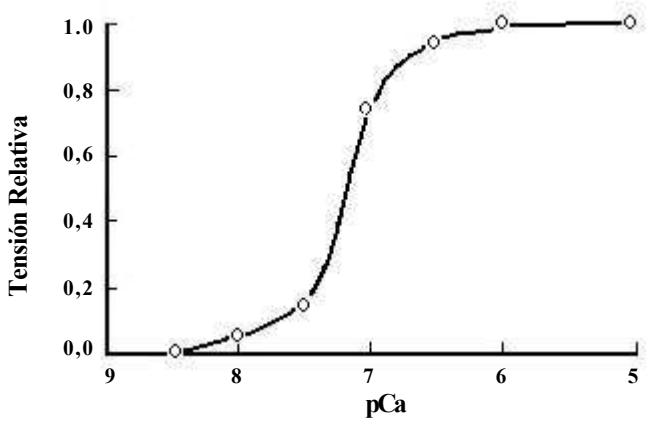


Figura 8.12. Relación entre la fuerza contráctil desarrollada por un segmento de fibra sin membrana, preparación de Natori, y la concentración de calcio. La curva fue obtenida en presencia de deoxicolato, inhibidor de la ATPasa de Ca del RS, para evitar que la actividad de la bomba de Ca afectara la concentración de Ca en las soluciones experimentales. (*Modificado de Podolsky y Teicholz 1969*).

Costantin y Podolsky (1967) Podolsky y Teicholz, 1970). Hellam y Podolsky (1969) demostraron que estas fibras podían contraerse en respuesta a estimulación eléctrica, de manera gradual o de manera todo o nada, indicando que los túbulos T se podían resellar, facilitando el restablecimiento de un gradiente eléctrico a nivel de las membranas intracelulares, debido a una redistribución de los iones Na y K. Presumiblemente la actividad de la bomba Na/K promovía esta redistribución iónica, ya que en presencia de glicósidos cardiacos, que inhiben la bomba de Na/K, las fibras no respondían a la estimulación eléctrica. Lamb y Stephenson (1990a y b), estandarizaron la técnica de Natori, y establecieron las condiciones óptimas para que los túbulos transversos de fibras musculares de sapo se resellaran, y se estableciera una diferencia de potencial entre la luz de los túbulos y el medio externo. La figura 8.13 muestra un esquema de como quitar la membrana plasmática en un segmento de fibra, y la configuración de los compartimientos celulares en un segmento de fibra intacto, y en uno desmembranado, después que

los túbulos T se han resellado. La solución en la cual se baña la fibra después de quitar la membrana plasmática contiene 117 mM K, un anion divalente impermeable y ATP. Bajo estas condiciones la bomba de Na/K transporta Na del mioplasma hacia la luz de los túbulos, intercambiándolo por K. De esta manera la concentración de K en la luz de los túbulos disminuye, creándose un gradiente de concentración que establece una diferencia de potencial entre los túbulos sellados y el mioplasma, que está abierto al medio extracelular. Al sustituir el K del medio por Na, la membrana de los túbulos se despolariza, lo cual lleva a la liberación masiva de Ca del RS, lo cual causa una respuesta contráctil análoga a una contractura de K.

En una extensa serie de trabajos, Stephenson y colegas demostraron que en esta preparación, que permitía el acceso directo al medio intracelular, se mantenía el control del potencial de membrana sobre los mecanismos de liberación de calcio del RS. Esto permitió estudiar el efecto de diferentes compuestos, no permeables en fibras musculares intactas, tanto sobre los mecanismos de AEC, como sobre la maquinaria contráctil. Así, Lamb y Stephenson (1991) reportaron que las fibras se contraían espontáneamente cuando el Mg se bajaba de 1mM a 0,05 mM, debido a una liberación masiva de Ca que vaciaba los depósitos de este catión del RS. Esta respuesta no era afectada por despolarización de la membrana. Por otra parte, en ausencia de ATP la eliminación del Mg no tenía efecto. En presencia de 10 mM Mg, la despolarización no inducía respuesta contráctil. Estos efectos confirmaban la acción inhibitoria del Mg sobre la activación de canales de Ca incorporados en bicapas (Smith *et al.*, 1086; Meissner *et al*., 1988). Además, Lamb y colegas también reportaron el efecto inhibitorio, dependiente del uso, de la heparina sobre el mecanismo de ECC, y un efecto directo sobre las proteínas contráctiles, aumentando su sensibilidad al Ca (Lamb, Posterino y Stephenson, 1994). En otro trabajo se demostró que el pH ligeramente alcalino, 7,6 a 8 potenciaba la respuesta contráctil, mientras que el pH ligeramente ácido, 6,5, lo inhibía (Lamb, Recupero y Stephenson, 1992). Recientemente, el mismo grupo extendió el uso de la técnica a fibras musculares de mamífero (Owen *et al*., 1997).

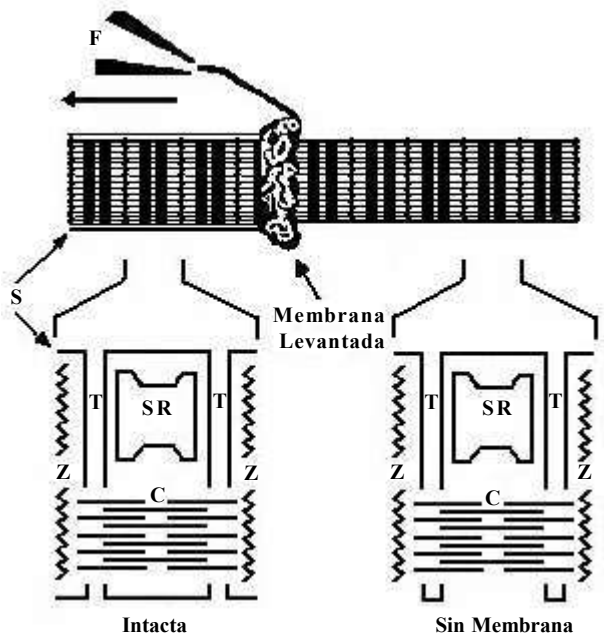


Figura 8.13. Preparación de Natori. El esquema superior muestra el procedimiento para eliminar la membrana plasmática de un segmento de fibra. Los esquemas inferiores muestran los diferentes compartimientos en los segmentos intactos y desmembranados. En este caso los túbulos T se resellan formando un compartimiento separado. (*Dibujo cortesía del Prof. Graham Lamb*).

Liberación de Ca inducida por Ca (*Calcium Induced Calcium Release*)

Los resultados obtenidos con las contracturas de potasio y con la aplicación de las técnicas de control de potencial, habían indicado claramente que el desarrollo de tensión en las fibras musculares está bajo control del potencial de membrana. Adicionalmente, se había demostrado que el fenómeno de contracción ocurría en la virtual o total ausencia de calcio del medio externo, indicando la importancia de los depósitos intracelulares de calcio para la activación contráctil.

La disponibilidad de compuestos quelantes de calcio que permitían el control de la concentración de este ion en soluciones experimentales, por debajo del rango micromolar, estimuló estudios para medir cuantitativamente la relación existente entre el desarrollo de fuerza y la concentración de calcio. Para ello, se recurrió al uso de preparaciones de fibras musculares en las cuales por medios mecánicos o químicos se eliminaba el sarcolema para dejar los filamentos contráctiles expuestos al medio externo, cuya composición podía ser cambiada según las necesidades experimentales. La preparación de Natori, mencionada en la sección anterior, en la cual se quita el sarcolema en un segmento de una fibra muscular bajo aceite, fue una de las preferidas para estos fines (Figura 8.13).

Esta preparación ofrece la ventaja que la mayor parte del RS queda intacta y funcional, por lo cual es posible inducir la liberación de Ca bajo condiciones en que los otros componentes iónicos del mioplasma pueden estar bajo control del experimentador.

En 1969 Hellam y Podolsky, utilizando fibras de anfibio desnudadas del sarcolema por procedimiento mecánico demostraron que la tensión desarrollada era función del pCa, pero la tasa de desarrollo de tensión era mucho menor de lo que se hubiera esperado considerando la difusión del Ca hacia las miofibrillas. El retraso se minimizaba al tratar las fibras con deoxycolato, un detergente que destruía el sistema de membranas internas. Esto indicaba que la actividad secuestradora de Ca del RS, energizada por ATP, era la causa del retraso en el desarrollo de tensión. En un trabajo posterior, Ford y Podolsky (1970) encontraron que en fibras que habían acumulado suficiente Ca, la exposición a una concentración relativamente baja de este ion, disparaba la liberación masiva del Ca acumulado en el Retículo Sarcoplasmático.

De manera independiente y casi simultánea, Endo (1970) había hecho el mismo descubrimiento. La figura 8.14 muestra los resultados obtenidos en los dos laboratorios. El trazo superior (Ford y Podolsky) muestra que después que el RS de una fibra se había cargado en una solución tamponada de Ca, al pasar a una solución con una concentración de Ca libre de 0,01 mM, se produce una

contracción casi máxima debida a la liberación masiva de Ca del RS estimulada por el mismo Ca. El trazo inferior muestra un experimento muy similar (Endo) en el cual, en presencia de cafeína, al pasar de una solución con 10^{-8} M a una con 10^{-6} M de Ca, se dispara la contracción. Esta modalidad de liberación de calcio, conocida como liberación de calcio inducida por calcio, CICR, había sido propuesta años antes por Bianchi y colegas, (Weiss y Bianchi, 1965; Bianchi y Bolton, 1967) quienes, en un intento de asignarle una función fisiológica a la pequeña entrada de calcio asociada a un potencial de acción de las fibras musculares, habían postulado la posibilidad de que esta pequeña cantidad de calcio podía disparar la liberación de más calcio del RS.

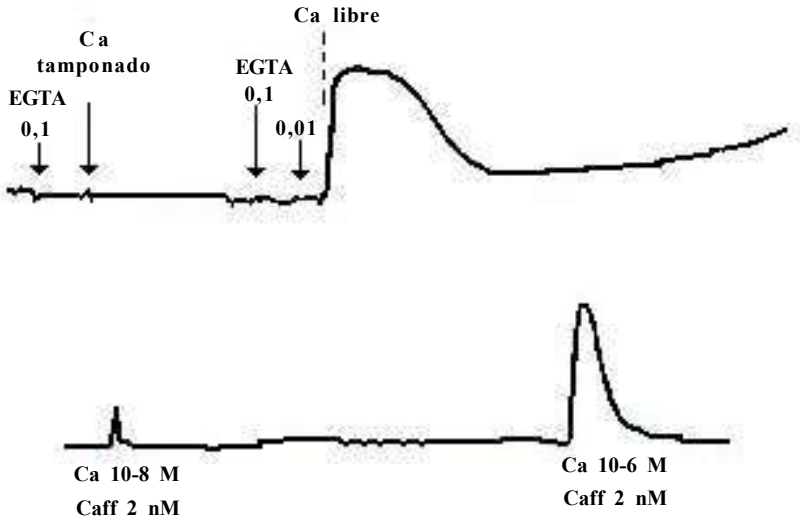


Figura 8.14. Liberación de Ca inducida por calcio en preparaciones de Natori. En los dos casos, después de un periodo durante el cual el RS se carga de Ca, al ser expuesta la fibra a una concentración mayor de Ca, pasando de 0,1 a 0,01 mM EGTA, trazo superior, y de 10^{-8} a 10^{-6} M, trazo inferior, se produce una liberación masiva y espontánea de calcio. (*Modificado de Ford y Podolsky, 1972 y Endo 1972*).

La demostración de que bajo ciertas condiciones los iones Ca desde el lado mioplasmático pueden activar la apertura de canales de liberación de Ca incorporados en membranas lipídicas (Smith y col. 1986), sustenta la presencia del fenómeno de liberación de Ca inducida por Ca.

En su importante revisión bibliográfica sobre los mecanismos de liberación de calcio, Endo ha analizado varios aspectos para poder decidir si el mecanismo de CICR, tiene un papel fisiológico en la activación del mecanismo contráctil. La primera conclusión a la que llegó fue que la concentración de Ca que se tenía que alcanzar para inducir el CICR era 3×10^{-4} M, valor que él consideró muy alto para ser alcanzado en el espacio entre túbulo-T y RS, bajo condiciones fisiológicas.

Un segundo aspecto considerado fue que el efecto inhibitorio de la procaína sobre el CICR no era acompañado por un efecto similar sobre la liberación de Ca inducida bajo condiciones fisiológicas. Un trabajo de Heistracher y Hunt (1969b) había demostrado que la procaína no inhibía la contracción de fibras musculares de culebra despolarizadas bajo condiciones de voltaje controlado, resultado confirmado para el caso de las contracturas de potasio. Sin embargo, un trabajo posterior, (Caputo *et al*, 1979) demostró que la procaína inhibía la respuesta contráctil en fibras cortadas de rana, bajo condiciones de control de potencial. Luego se demostró que en fibras intactas de Rana, la procaína era inefectiva por ser impermeable a pH neutro, mientras que a un pH alcalino, cercano a su pK de disociación es permeable y efectivamente inhibe las contracturas de potasio (Sánchez y Caputo, 1987). En el caso de las fibras desnudas la permeabilidad de la membrana plasmática a la procaína no es relevante.

Posiblemente la razón real para concluir que el CICR (dependiente de la entrada de Ca del medio externo como factor disparador del fenómeno) no tiene un papel fisiológico, es la demostración de que las fibras musculares se pueden seguir contrayendo por mucho tiempo en condiciones de bajas o muy bajas concentraciones de Ca extracelular, como ya se ha discutido.

Además, se ha demostrado que bajo condiciones de control de potencial, una repolarización rápida durante una contracción, causa una relajación inmediata, indicando que el mecanismo de liberación de calcio está bajo estricto control del potencial de membrana. Sin embargo el fenómeno de CICR, que tiene una importancia fundamental para el músculo cardíaco, también parece tener importancia fisiológica en músculos esqueléticos, pero bajo otro contexto como se verá luego.

Control de potencial con fibras cortadas con uno, dos o tres sellos de vaselina

Después que se aclarara la naturaleza de las corrientes iónicas asociadas al potencial de acción en axones gigantes de calamar, la técnica de dos o tres microelectrodos, aplicada a las fibras musculares permitió estudiar los cambios de conductancia asociados al potencial de acción en esta preparación, y algunos de los fenómenos asociados a la activación contráctil. A partir del estudio de los potenciales de reposo y de acción, se pudieron derivar conclusiones importantes sobre el funcionamiento de los tejidos excitables, y también cómo estos parámetros podían cambiar dependiendo de las concentraciones iónicas en el medio externo (Jenerick, 1959). En el caso de las fibras nerviosas mielínicas, debido a que es imposible usar los microelectrodos, Huxley y Stampfli (1951) idearon un método potenciométrico para la determinación precisa del potencial de reposo y de acción en esta preparación. El método consistía en generar una corriente longitudinal (de daño) que fluía a través de una barrera que separaba eléctricamente un nodo (de Ranvier), mantenido en solución fisiológica, del nodo contiguo que se exponía a una solución de alto potasio, aplicando al mismo tiempo un potencial suficiente para llevar la corriente a cero, de manera que el potencial aplicado era igual al potencial de membrana. Esta técnica fue primero mejorada por Frankenhaeuser (1957), quien la automatizó incluyendo un sistema de retro-alimentación, y luego fue modificada por Dodge y Frankenhaeuser (1958) quienes la adap-taron para experimentos de control de potencial, con lo cual pudieron demostrar que las bases iónicas de los potenciales de acción de nervios mielínicos de mamífero eran las mismas que las

descritas por Hodgkin y Huxley en los axones de calamar. Hacemos esta digresión, porque Frankenhaeuser y colegas (1966) demostraron que la misma técnica podía ser utilizada para el estudio de las corrientes iónicas de fibras musculares. Moore (1972) fue de los primeros en usarla para este fin, sin embargo, de su articulo se desprende que cortaba las fibras de un solo lado en el extremo distal al segmento montado en la cámara, con los tres sellos de vaselina, lo cual tiene que haber dificultado el paso de corriente hacia el interior de las fibras. En 1976, Hille y Campbell utilizaron amplificadores que permitían compensar por la resistencia en serie externa y por la impedancia asociada al paso de corriente hacia el interior de las fibras, pudiendo mejorar la respuesta de frecuencia. Para mejorar el control del potencial de membrana utilizaron segmentos de fibras, que después de montadas en la cámara eran cortadas de nuevo. En versiones posteriores de la técnica, diferentes autores emplearon saponina o cortes de tijeras en las porciones distales de las fibras, para facilitar aun mas el paso de corriente. La técnica con tres sellos de vaselina, desarrollada por Hille y Campbell (1976), ha sido utilizada exitosamente no sólo para el estudio de corrientes de sodio (Campbell y Hille, 1976), sino también para estudiar el movimiento de carga (Caputo y Bolaños, 1989) y caracterizar un movimiento de carga rápido en fibras musculares, que pudiera estar relacionado con la activación de los canales de sodio, que están en alrededor del 95% situados en la membrana superficial de las fibras musculares, (Collins *et al.*, 1982).

La figura 8.15 muestra esquemáticamente una variante de la técnica de Hille y Campbell, utilizada en nuestro laboratorio. Los tres sellos de vaselina, 1, 2, y 3 separan las fibras en 4 segmentos, dispuestos en los compartimientos E, A, B y C que por medio de electrodos de Ag-AgCl están conectados al circuito de control de potencial, modificado por F. Bezanilla.

Modificaciones de esta técnica, empleando uno y dos sellos de vaselina, han permitido registrar simultáneamente fenómenos eléctricos, como el movimiento de cargas y señales de calcio utilizando indicadores metalocrómicos de Ca como el arsenazoIV o el antipirilazoIII, o los indicadores fluorescentes de Ca como el Fluo-3

o el Rhod-2, como se verá en el capítulo 9. Este desarrollo ha permitido un avance fantástico en nuestro entendimiento del fenómeno de AEC.

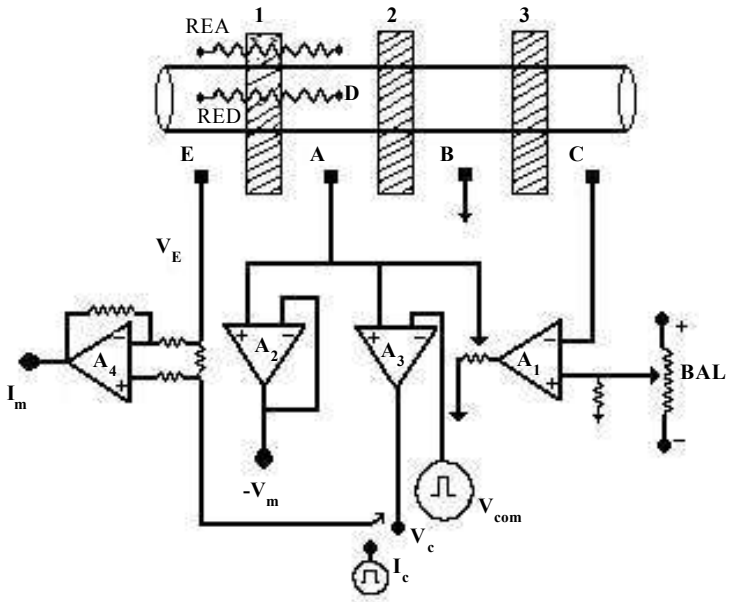


Figura 8.15. Diagrama esquemático del control de potencial con un fibra cortada y montada en una cámara con triple sello de vaselina. Los tres sellos de vaselina 1, 2 y 3 separan los pozos E, A, B y C los cuales están conectados con electrodos de Ag-AgCl al circuito de control de potencial que se muestra en la parte inferior.

Corrientes intramembranarias no lineales

Una característica particular de los fenómenos biológicos que son activados por el potencial de membrana, es la empinada dependencia del potencial y el estrecho rango de potencial en el cual se manifiestan.

Hemos visto cómo para el caso de una fibra muscular (de rana) el potencial de membrana es alrededor de -100 mV, mientras que

el pico del potencial de acción llega a los + 40 mV, con un rango máximo de operación de ~150 mV. En condiciones normales, el desarrollo de tensión contráctil empieza a un valor umbral de -50 mV y llega a la saturación a -30 mV, o sea, el fenómeno contráctil opera en un rango de 20 mV.

Para el caso de la membrana celular de un axon, el potencial de acción tiene un rango de unos 110 mV. La permeabilidad del sodio y del potasio, durante un potencial de acción cambia por un factor de, 2,18, para un cambio de potencial de 4 a 6 mV, mientras que, como lo ha comentado Wolf Almers (1978), la conductancia de un diodo de estado sólido requiere de 25 mV para cambiar por el mismo factor. La posibilidad de este tipo de respuesta está dada por el movimiento de carga no lineal dentro de las membranas de las células.

Ya en 1952 Hodgkin y Huxley habían postulado que la empinada relación entre las permeabilidades del Na y del K y el potencial de membrana de axones de calamar (ver capítulo 6), pudiese estar asociada con la presencia, dentro de la membrana de moléculas de gran momento dipolar permanente, cuyo movimiento, dentro de la membrana, pudiera controlar estas permeabilidades. El movimiento de estas moléculas en respuesta a cambios de potencial pudiera entonces, estar involucrado en la activación de fenómenos no lineales y ser, en principio, medido bajo forma de corrientes de desplazamiento intramembranarias.

Hay que recordar que al imponer un campo eléctrico se produce una acumulación de cargas eléctricas, de signo contrario, a los dos lados de una bicapa, estas cargas provienen del medio en el cual se encuentra la bicapa y dan origen a las corrientes capacitativas. En el caso de haber especies cargadas dentro de la bicapa, en la presencia de un campo eléctrico como sería el caso de una molécula o una fracción de molécula de proteína embebida en la bicapa, al haber un cambio en el campo eléctrico estas cargas se pueden desplazar dentro de la membrana, pudiéndose registrar este movimiento de carga como una corriente intramembranaria.

Movimiento de carga

En 1973 Schneider y Chandler trabajando con fibras musculares, y Bezanilla y Armstrong, trabajando con axones gigantes de calamar, reportaron de manera independiente y casi simultánea la presencia de corrientes capacitativas no lineales que pudieran ser el resultado de dichos movimientos de cargas intramembranarias. En el caso del axón de calamar se empleó la técnica de control de potencial con un electrodo compuesto e introducido longitudinalmente en el axon (ver capítulo 6), mientras que para el caso del músculo se utilizó la técnica de control de potencial con tres microelectrodos. En los dos casos para el registro de las corrientes respectivas, además de promediar señales, fue necesario sustraer la corriente capacitativa y bloquear todas las corrientes iónicas, con TTX para la del Na, con TEA para la del K y con aniones impermeables para la de cloruro. Además en el caso del músculo fue necesario bloquear la contracción con soluciones hipertónicas y utilizar una solución externa que contenía 5 mM Rb para reducir al máximo la contribución de la capacidad de membrana, por el progresivo reclutamiento radial de túbulos transversales.

En los dos casos, uno de los requisitos para que estas corrientes fuesen consideradas candidatas a un rol fisiológico, era que se debían activar en una región del potencial de membrana fisiológicamente relevante, o sea, en la cercanía del potencial que activa la contracción muscular, la activación de la conductancia de sodio, etc. Otro requisito absoluto para que se pudiesen considerar como movimiento de carga intramembranaria era que la carga que se movía en respuesta a la fase de subida del pulso de voltaje, fase ON, debía ser igual a la carga que se movía al finalizar el pulso, fase OFF.

Con la técnica de control de potencial con tres microelectrodos Schneider y Chandler (1976) pudieron demostrar un aumento de poco mas del 10% en la capacidad específica que empezaba a aparecer en la cercanía del umbral contráctil, como se muestra en la figura 8.16.

La figura 8.17 muestra ejemplos de los protocolos de pulsos que se han utilizado para medir el componente no lineal de las corrientes intramembranarias, sustrayendo el componente lineal. Los

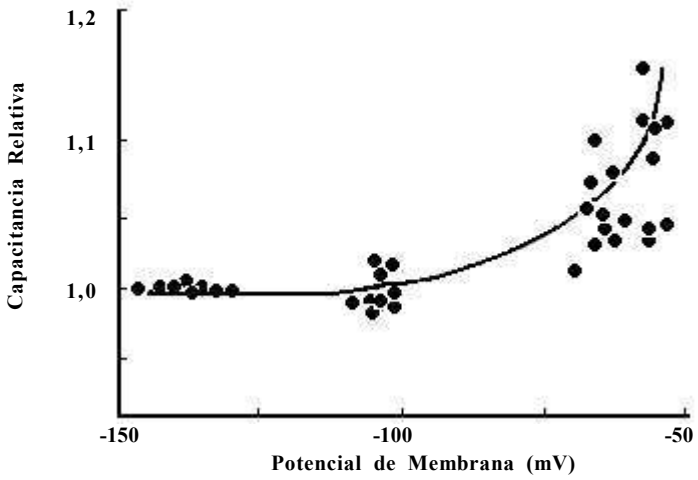


Figura 8.16. Variación de la capacitancia con el potencial de membrana de varias fibras. La capacitancia de la membrana de las fibras ha sido medida aplicando un pulso de voltaje e integrando el trazo de corriente. El valor de las capacitancias ha sido normalizado por los valores obtenidos a potenciales entre -130 y -150 mV. (*Modificado de Schneider y Chandler, 1976*).

dos trazos superiores muestran dos pulsos de voltaje, de igual amplitud pero de signo contrario, con las respectivas corrientes que son principalmente capacitativas. El primer pulso de voltaje, que es despolarizante, cambia el potencial de membrana de un valor VH a un valor Vm, mientras que el segundo pulso que es hiperpolarizante lleva el potencial de membrana del mismo valor VH al valor -Vm. Al sumarse, los dos pulsos de voltaje de igual amplitud y sentido contrario, se cancelan. Al sumar las dos respuestas de corriente, desaparece el componente lineal de la corriente capacitativa, y queda el componente no lineal, que representa el movimiento de carga en respuesta al pulso despolarizante. A este lo denominamos Protocolo I. El trazo que se muestra en la figura 8.18, fue obtenido con este protocolo y muestra claramente que se cumple estrictamente el requisito de que la carga en el ON del pulso debe ser igual a la carga en el OFF. En la parte inferior de la Figura 8.17 se muestra otro protocolo de pulsos, llamado Protocolo 2, ideado por Bezanilla y Armstrong, para disminuir al máximo la posibilidad de incluir en sus medidas de las corrientes no lineales, alguna corriente iónica activable a potenciales más negativos que el po-

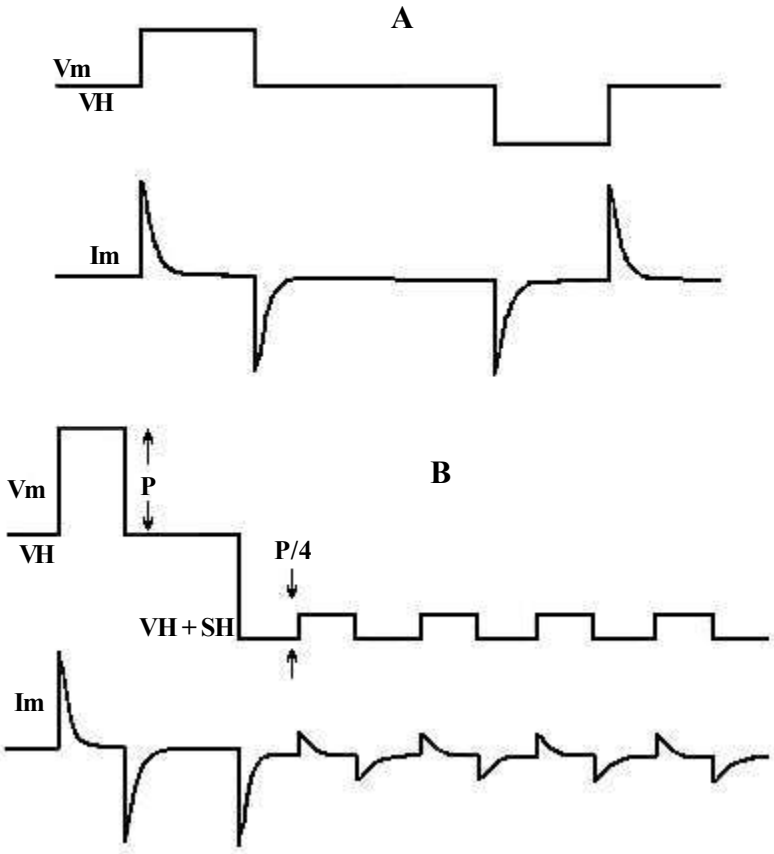


Figura 8.17. Protocolos de pulsos utilizados para medidas del movimento intramebranario de carga. En **A** el trazo de voltaje, Vm, muestra dos pulsos de igual magnitud pero de signo contrario, aplicados desde un potencial de mantenimiento VH; el trazo Im representa la corriente. La corriente intramembranaria se obtiene sumando las corrientes asociadas a los dos pulsos. En **B**, el pulso de prueba **P** viene aplicado desde el potencial de mantenimiento VH. En este caso, se restan las corrientes asociadas a 4 pulsos de amplitud P/4 aplicados desde un potencial VH+SH que es un potencial muy negativo, en el cual no se activa ninguna corriente. (*Modificado de Bezanilla y Vergara, 1980*).

tencial de reposo. Para sustraer los pulsos, en vez de usar un pulso de igual amplitud y de signo contrario, como en el caso del protocolo 1, se usaba un número n de pulsos de amplitud P/n.

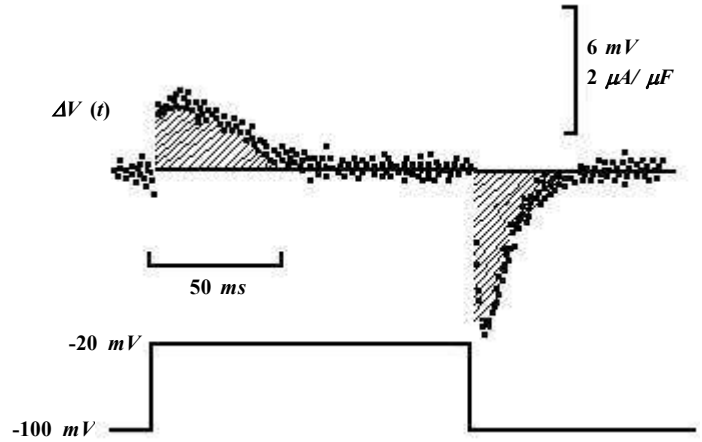


Figura 8.18. Registro idealizado de la corriente intramebranaria no lineal, obtenido, con un pulso de 80 mV, después de sustraer la corriente capacitativa lineal utilizando el protocolo de pulsos mostrado en la parte superior de la figura 8.17. La integral con respecto al tiempo de la corriente asociada al principio del pulso, Qon, es igual a la integral de la corriente asociada al final del pulso, Qoff (*Modificado de Almers, 1978*).

Chandler y colegas (1976), encontraron que una despolarización prolongada eliminaba o inmovilizaba la carga que normalmente se mueve en una fibra polarizada como se muestra en la figura 8.19. Este experimento ilustra cómo al despolarizar una fibra de -100 mV a 0 mV, la capacitancia no lineal de una fibra disminuye hasta desaparecer, para reaparecer luego, al repolarizar la fibra a su valor inicial. Esta disminución ha sido interpretada en términos de inmovilización de cargas o inactivación (Chandler *et al.*,1976; Adrian y Almers, 1976), por lo cual propusieron el esquema que se muestra en la figura 8.20, en el cual la carga que se encuentra en estado de reposo, Qreposo, se activa en respuesta a una despolarización, Qactiva, y en caso que la despolarización es prolongada, pasa al estado inactivado, Qinactiva, del cual sólo puede ser rescatada repolarizando la membrana.

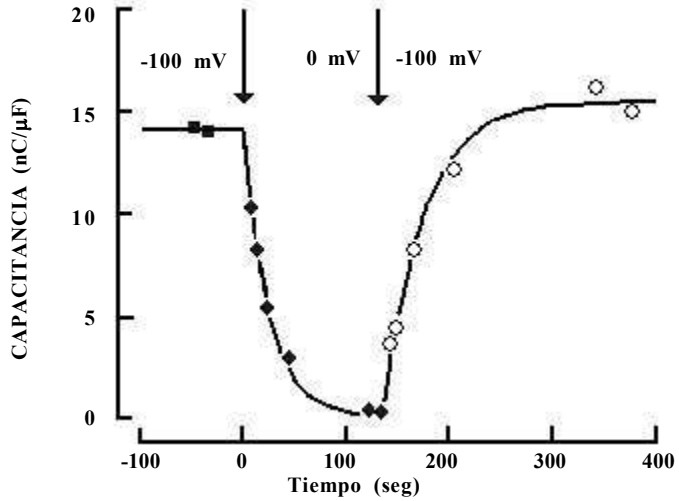


Figura 8.19. Dependencia de la capacitancia de una fibra del potencial de membrana. En este caso se mide la capacitancia en respuesta a un pulso de prueba aplicado desde -100 mV o 0 mV. La gráfica muestra cómo en la fibra despolarizada a 0 mV, el movimiento de carga disminuye hasta desaparecer. (*Modificado de Chandler et al., 1976*).

La inactivación del movimiento de carga, incluida en el esquema inferior en la figura 8.20 es parecida a la inactivación contráctil descrita por Hodgkin y Horowicz (1960), sugiriendo una relación entre los dos fenómenos.

La figura 8.21 muestra tres grupos de registros de movimiento de carga obtenidos, utilizando el Protocolo 2, antes, durante y después de someter una fibra, montada en una cámara de tres sellos de vaselina, a una despolarización a 0 mV. Las dos series de registros a la izquierda y a la derecha de la figura, fueron obtenidas manteniendo la fibra a un potencial de -100 mV, y aplicando los pulsos despolarizantes de prueba, P, desde este potencial a los valores indicados a la derecha, mientras que los pulsos de sustracción se aplicaban desde un potencial de -180 mV.

La dependencia de la carga Q del potencial de membrana puede ser descrita por una distribución entre dos estados tipo Boltzmann:

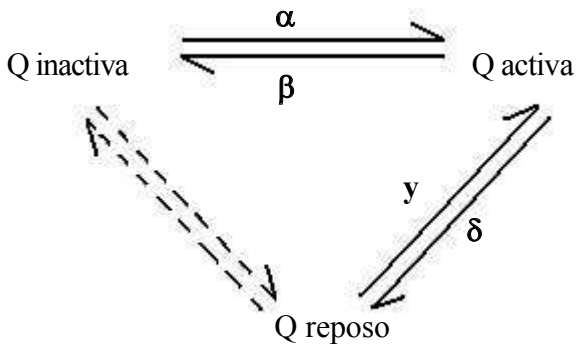


Figura 8.20. Posible diagrama de estado del movimiento de carga.

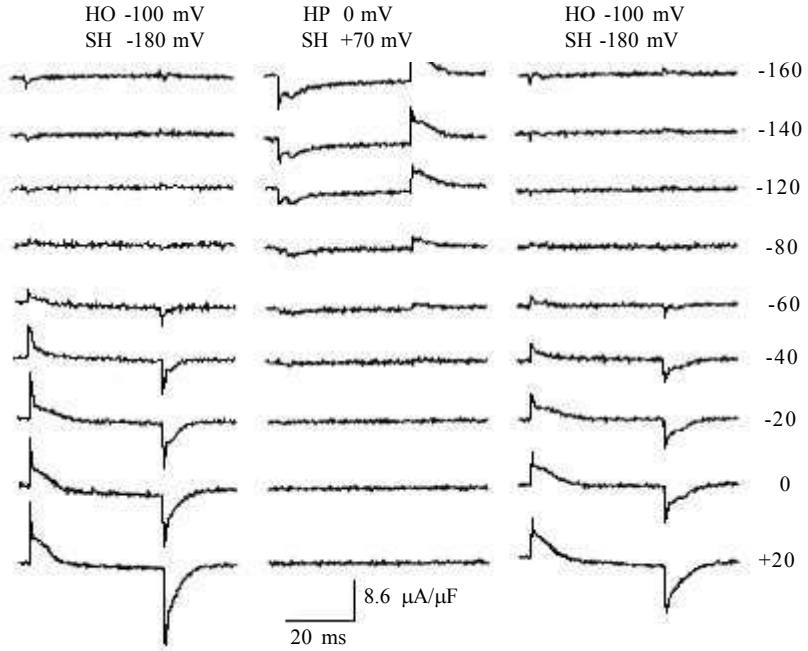


Figura 8.21. Registros de corriente intramembranaria no lineal obte-nidos a diferentes valores de potencial de membrana. Los registros a la izquierda y a la derecha fueron obtenidos manteniendo una fibra a un potencial de -100 mV, y aplicando los pulsos de sustracción desde un potencial de -180 mV para minimizar la activación de corrientes iónicas espurias. Los registros en el centro fueron obtenidos manteniendo la fibra a un potencial de 0 mV,y los pulsos de sustracción aplicados desde un potencial de +70 mV. (*Redibujado de Caputo y Bolaños, 1989*)..

$$Q(V) = \frac{Q_{max}}{1 + \exp(\bar{V} - V)/k}$$

en la cual Q_{max} es la cantidad máxima de carga movible, $\bar{V}$ es el punto medio del voltaje, o sea el punto en que Q = 0.5 Q_{max} y 1/k representa la pendiente de la relación Q-V, con k =RT/AZF donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, F es la constante de Faraday, Z es la valencia de la molécula cargada y A es el espesor de la membrana en el cual se mueve la molécula.

La relación entre carga y potencial para la fibra polarizada a -100 mV, está representada por la curva central en la figura 8.22, identificable por los símbolos llenos y vacíos. En este caso, el valor de Q ha sido normalizado por la capacidad de la membrana, para tener una medida del número de cargas por área de membrana. Si se considera que el valor de la carga máxima es 30 nC/μF, y se toma en cuenta el hecho que 1 cm^2 de membrana tiene una capacitancia de 0.9 μF/cm^2, la carga máxima corresponde aproximadamente a 2000 cargas electrónicas por μm^2. El número de posibles sitios de interacción entre los sensores de voltaje y los canales de liberación de Ca, identificados como pies en las triadas, ha sido estimado en 700/ μm^2 (Franzini-Armstrong, 1970) la valencia de la molécula que actúa como sensor de potencial sería igual a 3.

La curva que aparece en la parte inferior del gráfico, fue obtenida con la fibra despolarizada y los cuadrados, representan los valores negativos obtenidos experimentalmente. La curva así obtenida fue subida arbitrariamente, según lo muestra la flecha, hasta alcanzar la línea de base de la primera curva. Los resultados indican que el movimiento de carga puede redistribuirse entre dos estados de acuerdo al valor del potencial de reposo. En el estado en que se encuentra la fibra despolarizada, el valor de Qmax prácticamente no cambia, mientras que el parámetro $\bar{V}$bar cambia de – 50 mV a -110 mV y el valor de k cambia de 18 mV a 45 mV, indicando que el principal resultado de la despolarización es un cambio importante en la sensibilidad al potencial de membrana.

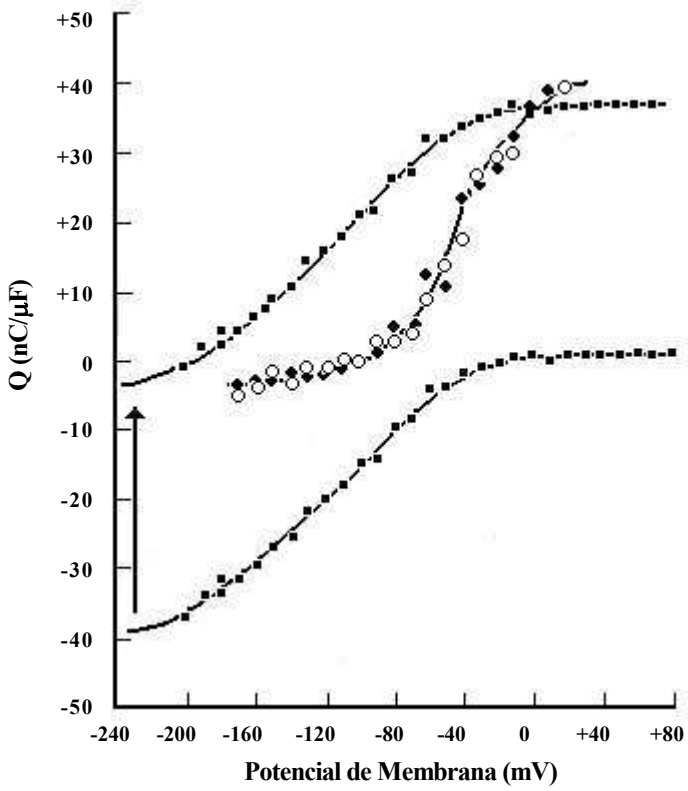


Figura 8.22. Curvas que describen la relación corriente-voltaje en una fibra mantenida a -100 mV o a 0 mV. (*Redibujado de Caputo y Bolaños, 1989*).

Inactivación del movimiento de carga

De acuerdo a la definición dada por Adrian y Almers (1976), y Schneider y Chandler (1976), la carga que se mueve con una fibra polarizada se denomina Carga 1 o Q_1. Cuando la membrana es despolarizada a valores cercanos a 0 mV por un cierto tiempo, la distribución cambia como se desprende de los registros presentados en la figura 8.21. En este caso, la carga empieza a moverse a un potencial cercano a los -70 mV, la mitad de la carga máxima se

mueve a -100 mV, y el valor de k es de 30, y la carga máxima, es alcanzada a un potencial de 170 mV. Esta carga se ha denominado Carga 2 o Q_2, y corresponde al estado de inactivación.

Con respecto a este punto es importante aclarar que los términos Carga 1 y Carga 2 son más bien operacionales y no indican necesariamente que se trata de dos entidades moleculares diferentes, aun cuando esta posibilidad haya sido considerada por diferentes autores. De hecho, Adrian y colegas (1976) exploraron la posibilidad de interconversión entre Q_1 y Q_2. Sin embargo, debido a que al repolarizar una fibra despolarizada, el curso temporal de la disminución de Q_2 era más lento que el de la reaparición de Q_1, descartaron esta posibilidad, concluyendo que la Q_1 estaba asociada al fenómeno de AEC mientras que la Q_2 se debía a otra molécula no relacionada con AEC. Sin embargo Brum y Rios (1988), en un experimento muy elegante, ilustrado en la figura 8.23, en el cual midieron simultáneamente Q1 y Q2 en la misma fibra, demostraron que al repolarizar la membrana desde 0 mV a -100 mV, la desaparición de la Q_2 ocurría al mismo tiempo que la reaparición de la Q_1, y que también la desaparición de Q_1, al despolarizar de nuevo la membrana, ocurría al mismo tiempo que la aparición de la Q_2.

Este resultado indica que es muy posible que se trate de la misma especie molecular que dependiendo del potencial de membrana, puede sufrir cambios conformacionales que le permiten responder de manera diferente a cambios en el potencial de membrana. En el caso de los axones, las corrientes intramembranarias, llamadas corrientes de compuerta (del inglés *gating currents*), fueron inmediatamente asociadas con la apertura de la conductancia de Na dependiente del potencial. Para el caso del movimiento de carga Q, registrado en fibras musculares de rana, debido a su lentitud, dos órdenes de magnitud más lento que las corrientes registradas en axón, después de haber descartado un posible papel activador de la conductancia retardada de potasio, se sugirió tentativamente que pudieran servir como sensores de voltaje para el AEC. El trabajo de Schneider y Chandler (1973) permitió postular un mecanismo de acople entre el fenómeno eléctrico a nivel de los túbulos y la liberación de Ca del RS, sin que hubiese

una demostración directa a su favor. Desde entonces, se ha recolectado un abundante cuerpo de evidencias circunstanciales a favor, y no se ha encontrado ninguna evidencia en contra de la hipótesis de acople.

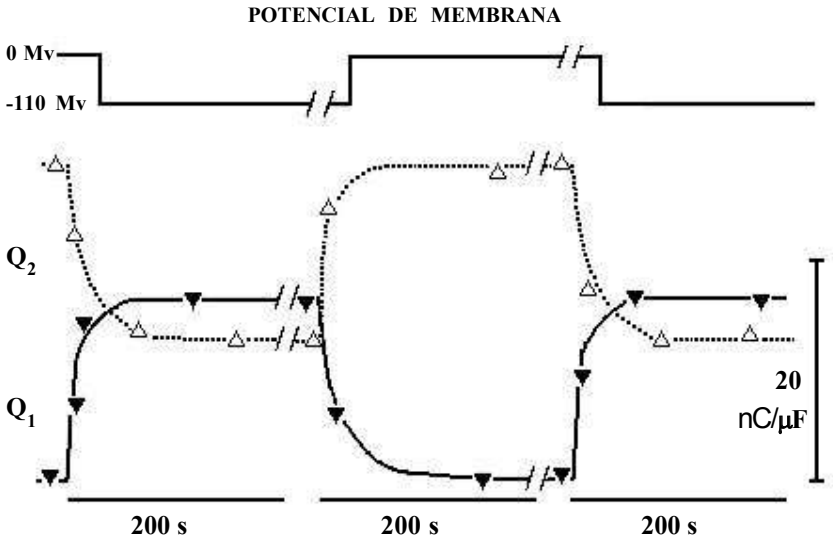


Figura 8.23. Experimento de Brum y Ríos demostrando que en fibras despolarizadas, el movimiento de carga no desaparece, sino que hay interconversión reversible de Carga 1, medida a -100 mV, a carga 2, medida a 0 mV. (*Modificada de Brum y Ríos*).

El rango de potencial en que se mueve la carga, como se muestra en las figuras 8.16 y 8.22, es compatible con la hipótesis de que el movimiento de carga participa en el fenómeno de activación contráctil. De acuerdo con ella, Chandler y colegas (1976a) demostraron:

1. Que el movimiento de carga es afectado apreciablemente por el tratamiento de glicerol, indicando que, por los menos en parte, está localizado a nivel de la membrana de los túbulos transversales. Si por el contrario, no hubiese sido afectado en absoluto, indicando su localización en la membrana superficial, se hubiera descartado esa hipótesis;

2. Que no está asociado a la activación de la conductancia de potasio y;

3. Que al despolarizar una fibra desde un potencial de reposo de -80 mV a uno de -21 mV, el movimiento de carga disminuía exponencialmente, con una constante de tiempo de 24 s hasta casi desaparecer, y se recuperaba también de manera exponencial, con una constante de tiempo de 38s al repolarizar la membrana a – 80 mV, como se ha mostrado en las Figuras 8.21 y 8.23. El curso temporal de la disminución y reaparición de la carga era compatible con los resultados obtenidos estudiando el fenómeno de inactivación y reactivación contráctil (Caputo, 1972a).

La inactivación del movimiento de carga sugirió la posibilidad de estudiar con mas detalle la relación entre la reactivación contráctil y la recuperación del movimiento de carga en fibras despolarizadas. Para estudiar la reactivación contráctil, Adrian, Chandler y Rakowski (1976) determinaron la duración necesaria de un pulso hiperpolarizante para que la fibra, observada bajo microscopio, apenas se contrajera, en respuesta a diferentes post pulsos despolarizantes. La relación entre carga reactivada y potencial de membrana resultó ser una función sigmoidea, parecida a la obtenida en las medidas de reactivación contráctil. Esta observación sugería que la fracción del movimiento de carga que se inactivaba en fibras despolarizadas y se reactivaba en fibras repolarizadas, podía ser la fracción asociada al fenómeno de activación contráctil.

Con base en estos resultados, Chandler y colegas (1976 a y b) propusieron un modelo de acople mecánico entre la membrana del sistema T y la de JRS. De acuerdo al modelo que se muestra en la figura 8.24, y que se conoce como Modelo Mecánico. El movimiento de carga en la membrana del túbulo-T, mueve un elemento rígido conectado a la membrana del jRS permitiendo la liberación de calcio.

Como posibilidad alternativa los autores consideraron que el movimiento de carga podía dar inicio a la formación de algún

compuesto activador de la liberación de Ca, en un mecanismo que pudiera ser denominado de transmisión química. Este tópico será tratado mas adelante.

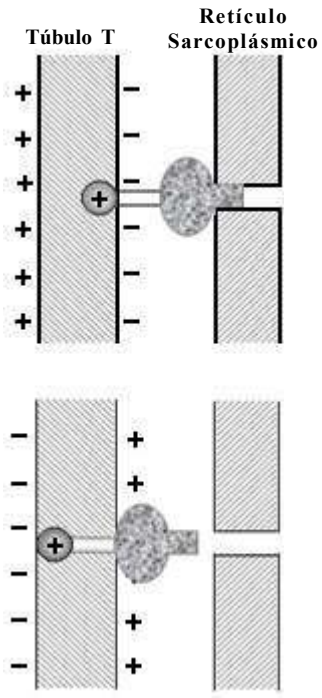


Figura 8.24. Esquema del acoplamiento mecánico de los sensores de voltaje, receptores de dihidropiridinas, con los canales de liberación de calcio.

La dificultad de la técnica de los tres microelectrodos, y la imposibilidad de utilizarla para experimentos en que la fibra podía contraerse, impulsaron a diferentes autores, que deseaban estudiar el movimiento de carga, a emplear técnicas derivadas de la descrita por Hille y Campbell (1976) en diferentes versiones, con una, dos y tres brechas de vaselina que además facilitaban el uso de colorantes para medir simultáneamente los transitorios de calcio.

La relación entre carga movilizada y la duración umbral de un pulso de voltaje suficiente para producir una contracción apenas visible al microscopio, fue estudiada en detalle por Horowicz y

Schneider (1981) usando el método de control de potencial con fibras cortadas y un solo sello de vaselina (Kovács y Schneider, 1978). De hecho, ellos determinaron el valor reobase de la curva fuerza-duración de estímulos subumbrales, o sea que no producían signos de contracción, y luego aplicando pulsos supra-umbrales pudieron demostrar que la cantidad de carga necesaria para la recuperación de una contracción era independiente del potencial de membrana, para valores de potencial que estaban encima del valor de la reobase. Estos resultados eran consistentes con la hipótesis de que el movimiento de carga estaba relacionado con el fenómeno de activación contráctil.

Para reforzar la hipótesis de que el movimiento de carga, o sea las corrientes intramembranarias no lineales descritas arriba, constituían la manifestación eléctrica de la operación de los sensores de voltaje del AEC, se empezaron a establecer paralelismos entre los efectos sobre el movimiento de carga de numerosos agentes farmacológicos, como el dantrolene, (Hui *et al.*, 1984); anestésicos locales (Huang, 1982; Hui, 1983; Vergara y Caputo, 1983) y aniones liotrópicos (González y Ríos, 1993) y los efectos de estos compuestos sobre los fenómenos contráctiles. El efecto del perclorato merece una particular atención ya que todos los resultados fueron consistentes con la idea que el movimiento de carga cumple la función de sensor de voltaje para el Acoplamiento Excitación-Contracción.

La idea, expresada por diferente autores, según la cual el Ca extracelular actúa sobre algún sitio de la membrana que controla el fenómeno de inactivación contráctil (Luttgau, 1963; Frank, 1960; 1961; 1980; Graf y Schatzmann, 1984; Caputo, 1967; 1972), indujo a Ríos y colegas (Brum *et al.,* 1988; Pizarro *et al.,* 1989), a enfocar el problema desde el punto de vista de los sensores de potencial. En una interesante serie de trabajos, utilizando fibras cortadas y un sistema de control de potencial con dos sellos de vaselina, Ríos y colegas (Brum *et al*., 1988a; Brum *et al.*, 1998b; Pizarro *et al*., 1989), demostraron que en ausencia de Ca, el sensor de voltaje se inactiva de manera uso dependiente, lo cual inhibe la liberación de Ca y causa la parálisis contráctil. También demos-

traron que no sólo el Ca y algún otro catión divalente son capaces de mantener el sensor en el estado activable y evitar el proceso de inactivación, sino que también algunos cationes monovalentes pueden hacerlo, aunque con diferente efectividad. Tanto los cationes divalentes como los monovalentes, que interactúan con el sensor de voltaje, pertenecen a los grupos I y II de la tabla periódica.

Con base en estos resultados propusieron la presencia de un sitio 'activable', el cual normalmente está ocupado, por Ca u otro catión metálico, para que el sensor mantenga su capacidad de activarse.

La ausencia de cationes metálicos en el medio externo inhibe el movimiento tanto de Carga 1 como de Carga 2, y causa la inactivación del AEC, medida en términos de los transitorios de Ca reportados por el colorante antipirilazo III (Ver capítulo 9). El nivel de recuperación de esta inactivación, en presencia de los diferentes cationes, indica su efectividad, interpretada en términos de afinidad para el sitio activable del sensor de voltaje.

Tabla 8.1. Afinidad relativa del sitio activable del sensor para los diferentes cationes (*modificada de Pizarro et al., 1989*).

CATION	Sitio "activable" Afinidad Relativa	Canal Ca tipo L Cardiaco Permeabilidad relativa
Ca	6.800	
Sr	4.050	2.800
Mg	3.300	0
Ba	1.200	1.700
Li	6,8	9,9
Na	4,8	3,6
K	2,5	1,4
Rb	1,4	—
Cs*	1,0	1,0

(*)Tanto los valores de la Afinidad como de la Permeabilidad de los cationes han sido normalizados con respecto al Cs, el ion de más baja afinidad.

La Tabla 1, muestra la afinidad relativa del sitio activable del sensor para los diferentes cationes, y con objeto de comparación también muestra los valores de permeabilidad para diferentes iones, del canal de Ca tipo L cardiaco (Tsien, 1987). Puede apreciarse el alto grado de similitud, tanto cualitativa como cuantitativa, que existe en el comportamiento de los cationes con respecto a los dos parámetros. Para el caso del canal de Ca, la secuencia de permeabilidades ha sido interpretada en términos de la unión del catión con un sitio dentro del poro. Esto ha tenido dos consecuencias: primero, permitió concluir que el sitio activable del sensor era un sitio con afinidad para cationes metálicos, y al no estar ocupado el sensor se inactivaba, mientras que las drogas antagonistas de Ca estabilizaban el estado inactivado del sensor, compitiendo con los cationes metálicos; y segundo, sugirió la identidad entre el sitio activable del sensor y el sitio dentro del poro del canal de Ca, permitiendo concluir que las interacciones entre los cationes metálicos y la inactivación del sensor de voltaje pueden ocurrir también en los canales de Ca, y de otros iones. Según esta hipótesis la presencia de Ca y otros iones metálicos debiera antagonizar la inactivación voltaje dependiente de los canales iónicos. Para permitir la inactivación, el catión permeable dentro del canal debiera ser desalojado del poro. Como corolario de estos experimentos del grupo de Ríos, puede mencionarse que estas conclusiones anticiparon, sin reconocimiento, la demostración posterior que, para el caso del canal de potasio Shaker, los iones potasio antagonizan la inactivación "tipo-C" dependiente del voltaje.

Componentes del movimiento de carga Q_γ

Adrian y colegas (Almers *et al.*, 1975; Adrian y Almers, 1976; Adrian y Peres 1978) habían demostrado que la Carga 1 estaba compuesta por lo menos de dos componentes, separables por su cinética, su dependencia del potencial de membrana y su sensibilidad a ciertas drogas como la tetracaína. El segundo componente, denominado Q_γ que enlentecía la caída exponencial del primer componente Q_β, fue inicialmente asociado a la conductancia retardada de potasio (Adrian y Peres, 1978). Sin embargo, esta interpretación fue rápidamente descartada, siendo sustituida por dos

otras, originándose de esta manera un debate que ha dado origen a numerosos trabajos. Utilizando fibras cortadas y la técnica con un solo sello de vaselina Horowicz y Schneider (1981a) confirmaron la presencia de un componente en la carga ON identificable con Q_γ, y tentativamente lo explicaron como resultante del proceso de liberación de Ca, proponiendo que un aumento de Ca en el espacio entre los túbulos-T y el SR, podía producir un cambio de potencial de superficie en los túbulos T, lo cual podía ser la causa de Q_γ, según sugerencia de Knox Chandler. Sin embargo, por primera vez, citando una comunicación personal de Adrian y Caputo, Horowicz y Schneider, (1981b) mencionaron que concentraciones de tetracaína que bloqueaban la contracción, también eliminaban este componente. De esta manera se presentaban dos posibilidades, de acuerdo a las cuales el componente Q_γ, podía ser la consecuencia o la causa de la liberación de Ca del RS. A favor de la segunda posibilidad, aparecieron numerosos trabajos en los cuales se demostraba que la tetracaína, el dantrolene y el Gallopamil o D600, que afectaban la liberación de Ca o la actividad contráctil de las fibras musculares, eliminaban también el componente Q_γ, (Huang, 1982; Hui, 1983; Hui *et al*., 1984; Vergara y Caputo, 1983). En la figura 8.25 se muestra cómo en presencia de tetracaína (0,5 mM), la joroba visible en la fase de caída de la corriente intramembranaria, que corresponde al componente Q_γ, desaparece junto con la señal de Ca. Estos resultados fueron interpretados presumiendo la presencia de dos tipos de cargas, Q_β y Q_γ, de las cuales esta última era la que actuaba como sensor de voltaje del AEC.

Esta conclusión fue refutada por Ríos y colegas (Csernoch *et al.*, 1991; García *et al*., 1991; Szucs *et al.*, 1991a,b; Pizarro *et al.*, 1991), quienes utilizaron diferentes protocolos experimentales para reducir el Ca en el RS, y de esta manera reducir y casi eliminar la liberación de Ca. De esta manera pudieron demostrar que al reducir la liberación de Ca el componente Q_γ desaparecía. Por lo tanto este resultado indicaba que Q_γ era un efecto y no la causa de la salida de Ca del RS.

Sin embargo, este resultado no concluyó el debate, ya que Jong y colegas (1995) utilizando un drástico protocolo de vaciamiento

que permitía bajar el contenido de Ca en el RS hasta unos 10 μM, lograron registrar los dos componentes Q_β y Q_γ, y demostrar que este último componente no dependía del Ca dentro o fuera del RS ni de los flujos de Ca desde el RS. Sin embargo, el Ca si afectaba la cinética del componente Q_γ, de manera que si bien estos resultados concordaban con la idea de Ríos y colegas de que el movimiento de carga podía ser afectado por la cantidad de Ca en el RS, o por su liberación del RS, contradecían la conclusión de que el componente Q_γ era un efecto de esta liberación de Ca. Trabajos posteriores de Hui y Chen (1992) y Pape y colegas (1996) confirmaron los resultados de Jong y colegas (1995).

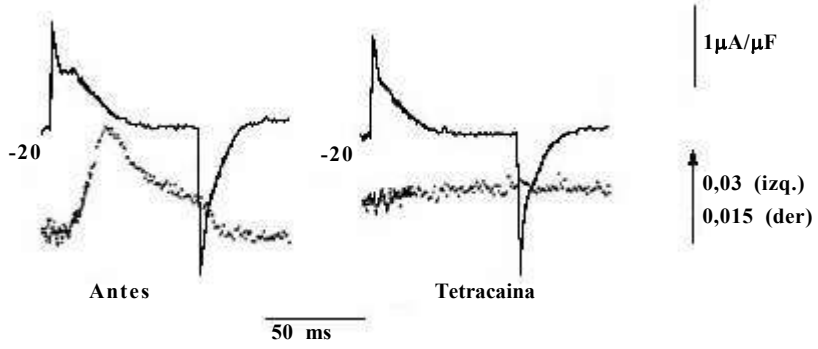


Figura 8.25. Efecto de la tetracaína sobre el componente Qγ del movimiento de carga y la señal de calcio de una fibra cortada y montada en una cámara con triple sello de vaselina. La fibra mantenida a un potencial de -100 mV es despolarizada a -20Mv con un pulsode 100 ms. (*Modificado de Vergara y Caputo, 1983*).

Mas recientemente, utilizando la técnica de "*Patch Clamp*" en la modalidad de célula entera, ha sido posible registrar, por primera vez en mamífero, y específicamente en músculo FDB de ratón, corrientes intramembranarias con un claro componente Q_γ, (Prosser *et al.*, 2009) que no había sido posible detectar anteriormente en esta preparación (Wang *et al.,* 1999; Royer *et al.,* 2008). Interesantemente Prosser y colegas (2009) reportan que el componente Q_γ, desaparece en animales en los cuales se ha eliminado la proteína S100A1 por manipulación genética, (ratones S100A1-KO) sin efectos sobre el componente Q_β, ni sobre la expresión de

los canales de Ca tipo L o la activación de las corrientes de Ca. La S100A1 es una proteína pequeña, altamente expresada en tejido muscular, esquelético y cardiaco y localizada en la cercanía de las unidades liberadoras de Ca (Prosser *et al*., 2007). Esta proteina potencia la liberación de Ca, compitiendo con la calmodulina en un sitio específico de los RyR1 que también liga y estabiliza el terminal C del DHPR contribuyendo de esta manera, a la comunicación bi-direccional entre DHPR y RyR1 (Nakai *et al.,* 1966; Avila y Dirksen, 2000) que será discutida posteriormente. Prosser y colegas (2009) han reportado también que al inhibir la liberación de Calcio con Dantrolene, ocurre una disminución del componente Q_γ del movimiento de carga. Por otra parte, usando 4-chloro-m-cresol (4-CMC), se ha encontrado (Prosser *et al.,* 2009b) una restauración parcial y paralela tanto en la liberación de Ca como en el componente Q_γ. La evidencia presentada en estos trabajos recientes, claramente refuerza la idea de que el componente Q_γ es una consecuencia y no la causa de la liberación de Ca.

Hipótesis de transmisión química IP3

En el trabajo en que se propuso por primera vez la hipótesis mecánica para el AEC (Chandler *et al.,* 1976), también se asomó la posibilidad de un mecanismo de transmisión química. Evidencias directas a favor de esta posibilidad fueron obtenidas, pocos años después, por Vergara y colegas (1985) y Volpe y colegas (1985), quienes presentaron, de manera casi simultánea, evidencia de que el inositol 1,4,5-trifosfato, o IP3, podía cumplir la función de segundo mensajero, para el AEC. Vergara y colegas demostraron que: 1) la estimulación eléctrica de un músculo causaba un aumento de la concentración de inositol-fosfatos, incluyendo el IP3, en el mioplasma; 2) fibras desmembranadas mecánicamente, se contraían en presencia de IP3; y 3) la respuesta contráctil inducida por IP3 era bloqueada por Neomicina, un agente bloqueador de la liberación de Ca de los receptores de IP3. Basados en estas evidencias, sugirieron que el IP3, liberado de membrana de los túbulos-T en respuesta a la despolarización de la fibra, podía difundir hacia la membrana del RS y actuar a nivel de los receptores homónimos liberando Ca. Por otra parte Volpe y

colegas (1985) demostraron que el IP3 era efectivo en activar la salida de Ca de vesículas del RS. En analogía con los trasmisores sinápticos se demostró que en las fibras musculares estaba presente toda la maquinaria enzimática para la síntesis y la destrucción del IP3. En particular los precursores y las enzimas para la síntesis de este mensajero estaban presentes en la membrana de los túbulos-T.

En contra de la hipótesis del IP3, hubo numerosos trabajos indicando que tanto la cantidad como la tasa de formación del IP3, no eran suficientes para ser compatibles con un rol del IP3 como activador contráctil, como tampoco lo era la lentitud de la respuesta contráctil al IP3, inyectado o liberado por fotólisis (Vergara *et al*, 1985; Walker *et al.*, 1987). La demostración que el efecto del IP3 dependía del potencial de membrana y del estado de los sensores voltaje (Donaldson *et al.*, 1988), parecía indicar que bajo condiciones fisiológicas, el IP3 podría participar en algún fenómeno posterior a la activación contráctil. Con los resultados divergentes de numerosos trabajos comenzó un interesante, y a veces acalorado, debate sobre la naturaleza del mecanismo de acople para la activación contráctil. El debate duró mientras no hubo evidencias claras a favor de la hipótesis de acople mecánico, y prácticamente terminó con la demostración de la importancia del receptor de dihidropiridina en el fenómeno de AEC, como se verá más adelante. Interesantemente, en trabajos más recientes se ha propuesto que el IP3 puede tener un papel modulador de programas de transcripción para los fenotipos rápido y lento de las fibras musculares de mamífero (ver Casas *et al.,* 2010).

Identificación de los sensores de potencial

Anteriormente se ha mencionado el efecto del D600 sobre la capacidad contráctil de las fibras musculares (Eisenberg *et al.*, 1983) y sobre el movimiento de carga (Hui *et al.*, 1984). Otro bloqueador de los canales de Ca, la nifedipina, de las familia de las dihidropiridinas, DHP, también bloquea el movimiento de carga en fibras musculares de anfibios (Brum y Ríos, 1978) y mamíferos (Lamb, 1986). Estos resultados indican claramente que algunos

conocidos bloqueadores del Canal de Ca tipo L, también bloquean el movimiento de carga.

Con respecto a este efecto se planteó una situación algo paradójica, ya que se había comprobado que el número de canales de Ca funcionales, presentes en una fibra muscular, constituía sólo una pequeña fracción de los sitios que ligaban DHP, o sea que el número de receptores de DHP que ligaban este compuesto era muy grande en las membranas de músculo esquelético, y en especial en la membrana de los túbulos-T, mientras que la expresión de la funcionalidad de estos receptores, o sea la corriente de Ca, no tenía mayor importancia en esta preparación (Schwartz *et al*., 1985).

Receptores de dihidropiridina y movimiento de carga

Ríos y Brum (1987) obtuvieron un resultado de particular importancia estudiando el efecto de la nifedipina, un compuesto de la familia de las DHP, conocidos bloqueadores de los canales de Ca tipo L, justamente identificados como receptores de esta sustancia y denominados DHPRs. Estos autores demostraron que el movimiento de carga también era bloqueado por esta droga, llegando a la conclusión de que la molécula responsable de este fenómeno era la misma molécula del Canal de Ca o sea el DHPR. En el experimento de la figura 8.26, se demuestra que la nifedipina afecta simultáneamente, el transitorio de Ca y el flujo de liberación de Ca del RS y el movimiento de carga en una fibra polarizada a -70 mV y despolarizada a 0 mV con un pulso de voltaje. Puede verse cómo en presencia de DHP, los parámetros disminuyen notablemente. Con la fibra mantenida a -100 mV la nifedipina sólo tiene un pequeño efecto (datos no mostrados), como se esperaría por la propiedad dependiente de uso de la nifedipina. Al demostrar que el movimiento de carga era bloqueado por una droga conocida como bloqueadora de los DHPRs, llegaron a la conclusión de que la molécula responsable del movimiento de carga era la misma molécula del Canal de Ca, o sea, el DHPR, por lo que esta proteína podía tener dos funciones como canal de Ca y/o sensor de voltaje.

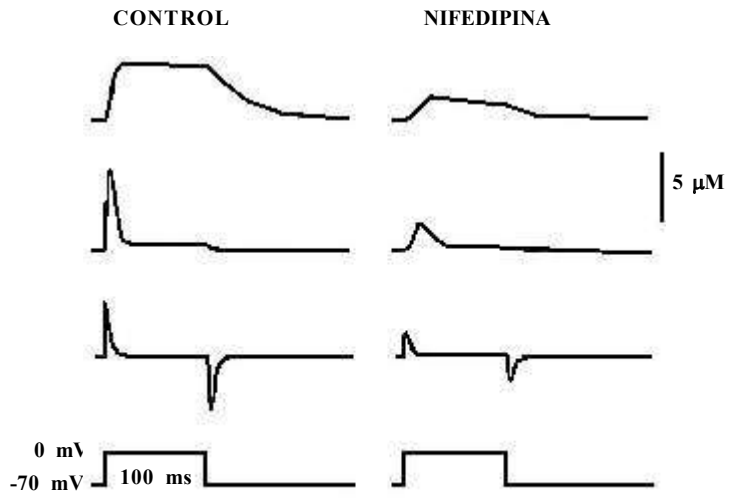


Figura 8.26 Demostración que la la Nifedipina, conocido bloqueador del canal de Ca tipo L, Cav 1.1, tambien afecta el movimiento de carga y los transitorios de Ca. Este hallazgo permitió concluir que las moleculas que funcionan como canales de Calcio, tambien actúan como sensores de voltaje para el AEC. (*Redibujado de Rios y Brum, 1987*).

Casi simultáneamente Tanabe y colegas (1987) desarrollaron una novedosa estrategia experimental basada en la diferente sensibilidad a la ausencia de Ca externo entre músculo cardíaco y músculo esquelético. Mientras las fibras musculares esqueléticas se siguen contrayendo en la ausencia del Ca externo o en presencia de inhibidores de la corriente de calcio, como por ejemplo el Cd, las células cardíacas dejan de contraerse. Utilizando esta sensibilidad diferencial al calcio como característica del fenotipo muscular, los autores inyectaron tipos de cDNA que codificaban respectivamente el DHPR de músculo cardíaco o esquelético de conejo, en miotubos derivados de ratones disgénicos, que por padecer de un defecto genético no pueden expresar DHPR en sus músculos. El primer resultado importante que obtuvieron fue la demostración de que los miotubos así inyectados podían recuperar la capacidad de desarrollar tensión bajo la modalidad característica de músculo cardíaco o esquelético de acuerdo al tipo de cDNA que había sido inyectado.

La figura 8.27 muestra que la capacidad contráctil de los miotubos inyectados con cDNA que codificaba el DHPR de músculo esquelético no dependía de la presencia de Ca externo y era insensible al Cd. Por otra parte, los miotubos inyectados con cDNA de DHPR cardíaco, no se contraían en ausencia de Ca o en presencia de Cd. De esta manera los autores pudieron demostrar la importancia de los DHPR en el fenómeno de activación contráctil. Experimentos ulteriores utilizando quimeras de DHPR preparadas con diferentes segmentos de DHPR esquelético y cardíaco, demostraron que la región del receptor responsable por las diferencias funcionales entre los dos tipos de músculo era la región en forma de horquilla entre los segmentos intramembranarios II y III del DHPR (Nakai *et al*., 1998; Tanabe *et al*., 1987; El-Hayek *et al.*, 1995).

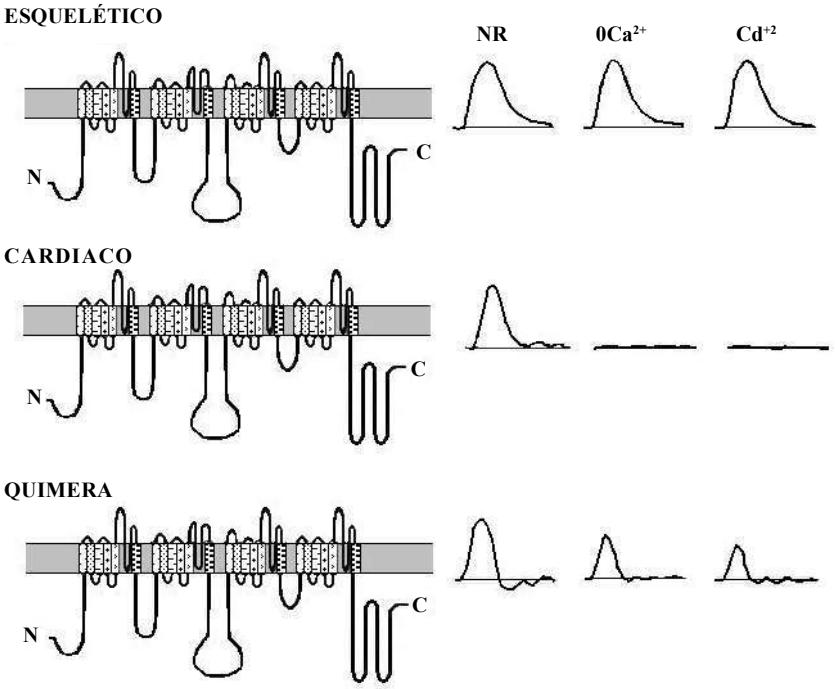


Figura 8.27. Identificación del segmento del receptor de dihidropiridina que interactúa con el receptor de rianodina en músculo esquelético. (*Modificado de Tanabe et al.,* 1987).

Por otra parte, la disponibilidad de músculos de ratones genéticamente modificados para que no expresen receptores de rianodina tipo 1 y 3, ha permitido demostrar su importancia no sólo para la contracción sino también para la formación de las estructuras complejas entre RyR y DHPr necesarias para obtener unidades de liberación de Ca.

La demostración de la importancia de un elemento específico del DHPR para el AEC, indicaba la posibilidad de que este elemento hiciese contacto físico con el receptor de rianodina correspondiente. Esta posibilidad estimuló diferentes trabajos que indicaron la existencia de una comunicación bidireccional entre DHPR y RyR en el músculo esquelético. Marty y colegas (1994) fueron los primeros en demostrar la posibilidad de una interacción física entre los dos receptores. Después de obtener preparaciones de las dos proteínas a partir de vesículas tríadicas, enriquecidas con los dos receptores, ellos pudieron purificarlas y solubilizarlas, para luego immunoprecipitarlas con anticuerpos dirigidos en su contra. Al utilizar anticuerpos dirigidos en contra de diferentes subunidades del DHPR obtuvieron un precipitado que contenía los dos receptores, mientras que al utilizar un anticuerpo en contra del RyR este precipitaban junto a las subunidades del DHPR pero no junto al DHPR purificado. Otros autores han demostrado el efecto de fragmentos peptídicos de la horquilla entre los segmentos II y III del DHPR, sobre la actividad de canal de RyR (Ávila y Dirksen, 2000; Meissner 1994; Dulhunty *et al*., 1999; Gurrola *et al*., 1999). Evidencia fisiológica indirecta de la interacción entre las dos proteínas ha sido obtenida estudiando el efecto de la rianodina sobre la reactivación del movimiento de carga en músculo esquelético y cardiaco La rianodina que no afecta significativamente el movimiento de carga en fibras normalmente polarizadas en las dos preparaciones, enlentece y disminuye significativamente la reactivación del movimiento de carga en fibras esqueléticas pero no en la cardiacas, previamente despolarizadas, en las cuales el movimiento de carga había sido inactivado. Estos resultados sugieren que los RyR esqueléticos, modificados por la rianodina afectan el proceso de reactivación a nivel de los DHPR de fibras musculares esqueléticas (Gonzalez y Caputo, 1996) pero no en células car-

diacas, en las cuales los dos receptores no están en estrecho contacto (LaCampagne *et al.*, 1996). Una estrategia similar ha sido utilizada estudiando la función del canal de calcio tipo L, o sea el DHPR en miotubos de ratones normales y dispédicos, o sea ratones modificados genéticamente en los cual ha sido eliminado el receptor de rianodina (Ávila y Dirksen, 2000), o modificando farmacológicamente el RyR (Ávila y Dirksen, 2005).

Los resultados recientes del laboratorio de Martin Schneider (Prosser *et al.*, 2009a y b) refuerzan la idea de la comunicación bidireccional o conversación cruzada entre DHPRs y RyR1s.

En el músculo cardíaco, la ausencia de un contacto cercano entre DHPR y RyR apoya el rol primario de la liberación de calcio inducida por calcio, LCIC, en el AEC cardiaco (Fabiato, 1985), lo cual es consistente con un mecanismo totalmente dependiente de Ca^{2+} externo (Ringer y Buxton, 1887; Wier, 1991; Stern y Lakatta, 1992).

Se puede concluir que en el músculo esquelético, la asociación de los RyR con las tétradas de DHPR provee las bases estructurales para una interacción directa entre ambos canales (Ríos *et al.,* 1991; Schneider, 1994) de acuerdo con la hipótesis de acople mecánico de Chandler y colegas.

CAPÍTULO 9

SEÑALES DE CALCIO

Aequorina

La primera señal de calcio asociada a una sacudida de músculo fue reportada por Jobsis y O´Connor (1966) quienes utilizaron el colorante sensible a Ca murexida. Sin embargo, las dificultades de cargar las fibras con este colorante y su dependencia del pH, no permitieron su ulterior uso. De manera que la más confiable y completa evidencia del aumento de la concentración de Ca durante el fenómeno de activación contráctil se obtuvo por primera vez utilizando la fotoproteína sensible a Ca aequorina inyectada primero en la fibra muscular gigante de *Balanus nubilus* y *Maia squinado*, (Ashley, 1967; Ashley y Ridgway, 1970) y después en fibras musculares de rana (Rudel y Taylor, 1973; Blinks Rudel y Taylor, 1978). En el trabajo con fibras gigantes de *Balanus nubilus*, fue posible introducir longitudinalmente en la fibra un electrodo dual, del tipo usado para el control de voltaje en axon de calamar, para pasar corriente y medir el cambio de potencial de membrana, y además por medio de un transductor de tensión y un fotomultiplicador se pudo registrar la fuerza contráctil y la luz emitida por la aequorina. Los resultados de estos experimentos indicaban que la tasa de desarrollo de tensión era proporcional a la intensidad de la luz emitida. De acuerdo con esto, los autores pudieron demostrar que la relación entre la fuerza desarrollada y el área debajo de los transitorios de calcio era lineal.

Blinks y colegas (1978) extendieron el uso de la aequorina a fibras musculares de rana empleando una técnica de inyección intracelular de la proteína. Con esta técnica pudieron caracterizar el efecto de la temperatura, de la frecuencia de estimulación y de la

longitud de sarcómero sobre la respuesta luminosa. Al mismo tiempo, pudieron obtener alguna evidencia del fenómeno de inactivación de la liberación de calcio al demostrar que, durante un periodo de estimulación repetitiva, la amplitud de los transitorios de Ca disminuía progresivamente. Sin embargo, debido a que la reacción de la aequorina con el calcio es lenta y su estequiometría variable, y debido también a la dificultad de la técnica, otros investigadores prefirieron utilizar nuevos tipos de colorantes sensibles a calcio que empezaban a estar disponibles.

Colorantes metalocrómicos

Los compuestos metalo-crómicos como el Arsenazo III y el antipirilazo III, cuyas características de absorción cambian en presencia del ion Ca, y más recientemente los colorantes fluorescentes, han permitido cuantificar la liberación de Ca bajo diferentes condiciones. Los colorantes metalo-crómicos cambian sus propiedades de absorción de luz en presencia de Ca, pero las medidas de absorbancia pueden ser complicadas por cambios en las propiedades ópticas de las fibras musculares. El Arsenazo y el antipirilazo fueron los primeros colorantes que se utilizaron consistentemente para mediciones de las señales de Ca en fibras musculares.

Utilizando arsenazo III, Miledi y colegas (Miledi, Parker y Schalow, 1977) pudieron registrar transitorios de Ca evocados por potenciales de acción o por pulsos despolarizantes bajo condiciones de control de potencial. Estos autores estimaron que durante un transitorio en respuesta a un potencial de acción el cambio de concentración de Ca alcanza el valor de 8 μM, mientras que el valor basal del Mg llega a unos cuantos centenares de micromoles, valores que se aproximan a los que se aceptan hoy en día. Uno de los temas investigados por el grupo de Miledi (Miledi *et al.*, 1983a,b) fue el efecto de un primer estímulo sobre la respuesta a un segundo estímulo (ver figura 9.18). Así pudieron demostrar que después de un transitorio de Ca evocado por un potencial de acción, un segundo potencial de acción genera un transitorio más pequeño, para separaciones entre los dos transitorios de hasta

varios segundos (Miledi *et al.,* 1983a). De esta manera pudieron obtener el curso temporal de la recuperación de la amplitud del segundo transitorio de Ca, y los factores que podían afectarla. Además, utilizando la técnica de voltaje controlado, determinaron los efectos de pulsos condicionantes sobre los transitorios evocados por pulsos de prueba despolarizantes (Miledi *et al.*, 1983b), anticipando varios años los trabajos sobre el fenómeno de inactivación de los canales de liberación de Ca del RS, que serán comentados posteriormente.

Algunas de las propiedades del arsenazo III, como la estequiometría variable, dependiente de la concentración del colorante (Palade y Vergara, 1983), y la respuesta cinética compleja, debida a la presencia de un componente dicroico en la señal (Baylor *et al.,* 1982), hizo abandonar su uso en favor de otro colorante metalocrómico, el antipirilazo III.

Para el caso del antipirilazo III (Kóvacs *et al*, 1983), las calibraciones *in vitro* indicaban que el producto de la reacción Ca colorante era el complejo CaD_2 lo cual, asumiendo que lo mismo ocurría en la célula, permitió relacionar los cambios de absorbancia ΔA con el complejo CaD_2 según la siguiente relación:

$$\Delta A = [CaD_2]\, \Delta\varepsilon\ 0.7p \qquad \textbf{(9.1)}$$

donde $\Delta\varepsilon$ es el cambio en el coeficiente de extinción del colorante, y p es el espesor óptico de la fibra. La proporcionalidad entre ΔA y CaD_2 permite una rápida interconversión entre los dos parámetros que, presuponiendo un equilibrio instantáneo en la reacción entre Ca y colorante y una estequiometría de 2:1 para colorante:Ca lleva a

$$[Ca] = K_D\, [CaD_2] / [D^{2}] \qquad \textbf{(9.2)}$$

en donde Ca y D son las concentraciones del Ca y del colorante libres respectivamente, y K_D es la constante disociación de la reacción. La concentración total del colorante D_T viene dada por:

$$[D]_T = [D] + 2\, [CaD]^2 \qquad \textbf{(9.3)}$$

de manera que:

$$[Ca] = K_D [CaD_2]/ ([D]_T - 2 [CaD_2])^2 \quad \textbf{(9.4)}$$

que para el caso en que $[CaD_2] << [D]_T$ puede aproximarse a:

$$[Ca] = K_D [CaD_2]/ ([D]_T)^2 \quad \textbf{(9.5)}$$

De esta manera fue posible estudiar de forma cuantitativa las propiedades del mecanismo de liberación de Ca de RS utilizando el colorante metalocrómico de baja afinidad, antipirilazo III. Para ello, se utilizaron fibras musculares intactas disecadas del músculo e inyectadas con una cierta cantidad de colorante, o fibras musculares cortadas, y montadas en una cámara con sellos de vaselina para controlar el potencial. En este caso, el colorante difunde desde los extremos cortados de la fibra. Debido a que colorantes como el antipirilazo, en presencia de Ca cambian sus propiedades de absorción de luz, la medida de los transitorios de Ca consiste en medir el cambio fraccional en la intensidad de luz de una cierta longitud de onda, transmitida a través de la fibra. Este cambio se refiere luego al complejo Ca-colorante, $[CAD_2]$. Sin embargo, y en especial para el caso de las fibras enteras en las que se inyecta el colorante, es necesario conocer la cantidad total del colorante, $[D]_T$ que puede ser estimada de acuerdo a la relación:

$$[D]_T = [A_{550} - (790/550)\ A_{790}]/(0.7p\varepsilon_{550})$$

donde A_{550} y A_{790} representan las absorbancias de la fibra en reposo a 550 y 790 nm respectivamente; ε_{550} es el coeficiente de extinción molar del colorante a 550nm, y p es un factor fraccional de corrección del volumen de agua accesible al colorante. El término (790/550) A_{790} es una medida aproximada de la pequeña fracción de absorbancia intrínseca de la fibra a 550 nm y que no está relacionada con el colorante. El punto isosbéstico del colorante es 790 nm, en el cual no absorbe luz.

La figura 9.1 muestra un experimento realizado por Kóvacs y colegas (1979) en el cual, utilizando la preparación de fibra cortada, montada en una cámara de doble brecha de vaselina, y estirada a una longitud de sarcómero mayor que 3 μm, registraron simultáneamente el movimiento de carga y los cambios de absorbancia,

ΔA, del antipirilazo III, en este caso a 720 nm, para diferentes potenciales de membrana. Hay que notar que éste es uno de los resultados más claros a favor de la idea de que el movimiento de carga constituye la manifestación eléctrica de la operación de los sensores de voltaje para el AEC. La figura 9.2 muestra cómo, siguiendo el procedimiento descrito arriba, los cambios de absorbancia ΔA se transforman en valores de [Ca] (Kóvacs *et al.*, 1983). En la figura, los cambios de absorbancia fueron obtenidos en respuesta a pulsos de 100 ms de duración y de amplitud variable como se indica en los trazos de [Ca].

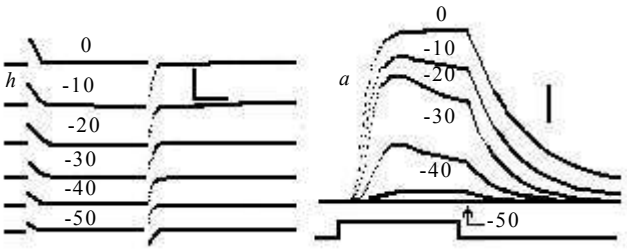


Figura 9.1. Corrientes intra-membranarias no lineales y transitorios de Ca registrados, en respuesta a pulsos despolarizantes, de 100 ms duracion y amplitud variable, en una fibra bajo condición de voltaje controlado con la técnica de doble brecha de vaselina. Los transitorios de Ca han sido obtenidos utilizando la relación entre los cambios de absorbancia del colorante antipirilazo III a dos longitudes de onda, 720 y 550 nm, respectivamente. Las barras verticales epresentan 3,2 μA/μF y 0,014 ΔA720/ΔA550, respectivamente (*Modificado de Kóvacs et al., 1974, con permiso*).

La figura 9.3 muestra la relación existente entre el valor porcentual de la carga intramembranaria no lineal, curva con símbolos llenos, y la amplitud de la señal de calcio, curva con símbolos vacíos, y el potencial de membrana (Melzer *et al.*, 1986). Puede verse cómo, antes de que se alcance el valor del potencial umbral para la liberación de Ca, hay un movimiento de carga sustancial, como fue luego demostrado cuantitativamente por Horowicz y Schneider (1981).

Debido a que había una fracción apreciable de carga que se movía a potenciales donde no había liberación de calcio, se utilizó un protocolo de pulsos escalonados con un prepulso relativamente

largo (50 ms) que llevaba la membrana a un potencial muy cercano al valor umbral para la liberación de calcio, y un pulso de prueba que podía ser tan corto como 2 ms. El movimiento de carga asociado a este pulso estaba linealmente relacionado con la tasa máxima de liberación de Ca como se muestra en la figura 9.4 (Melzer *et al*, 1986, que muestra la relación lineal entre la velocidad maxima de liberación de Ca del RS y la carga supra-umbral, obtenida restando la carga sub-umbral a la carga OFF, ya que la carga ON estaba afectada por el pulso condicionante sub-umbral). La presencia de una carga pre-umbral que debe moverse antes de que haya liberación de calcio es compatible con un modelo secuencial de transiciones dependientes del potencial que

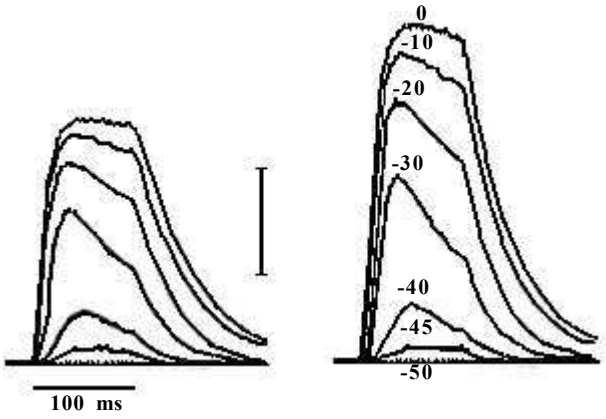


Figura 9.2. En el panel a la izquierda se presentan los registros de los cambios de Absorbancia del colorante antipirilazo III, obtenidos en una fibra cortada montada en una cámara con doble sello de vaselina. En el panel a la derecha se presentan las señales de Ca correspondientes. Para los trazos a la derecha, la barra vertical corresponde a 1 μM Ca. (*Modificado de Kovacs et al., 1983; con permiso*).

pueden ocurrir durante el prepulso condicionante, y en el cual la liberación de Ca se activa en la última transición. De esta manera fue posible encontrar una clara relación lineal entre los valores supraumbrales del movimiento de carga y la tasa máxima de liberación de Ca.

Una manera precisa y elegante de medir los cambios en la concentración de Ca ha sido utilizada por Pape y colegas (1995), valiéndose de fibras cortadas bañadas en una solución intracelular que contenía 20 mM EGTA y 0,63 mM de rojo fenol. Bajo estas condiciones el Ca liberado del RS es quelado por el EGTA, el cual libera dos protones por cada Ca. El cambio en el pH del medio es determinado por el cambio de absorbancia experimentado por el rojo fenol. De esta manera la medición del flujo de liberación de Ca es directa ya que prácticamente todo el Ca liberado es secuestrado por el EGTA y reportado como cambio de pH. De manera que la señal de Ca presenta un curso temporal parecido al del flujo de liberación, lo cual es muy ventajoso por las razones discutidas arriba.

Colorantes fluorescentes

La introducción por Roger Tsien de colorantes fluorescentes sensibles al Ca, ha permitido un enorme progreso en el entendimiento de los fenómenos asociados a la homeostasis de Ca en células

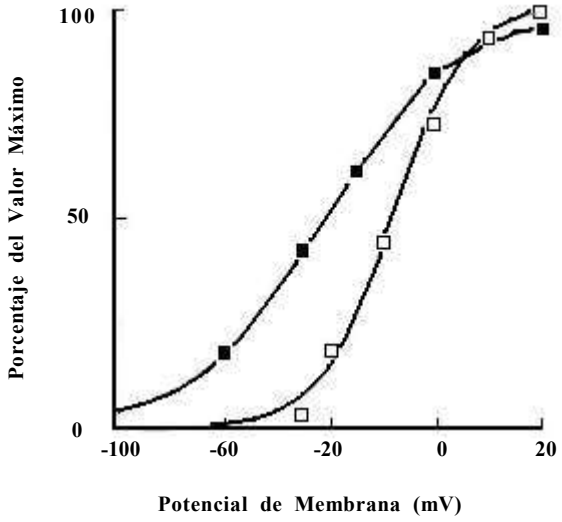


Figura 9.3. Dependencia del potencial de membrana del movimiento de carga, curva con símbolos llenos, y de las señales de calcio, símbolos vacíos, reportadas por el colorante metalocrómico antipirilazo III. (*Modificado de Melzer et al., 1986, con permiso*).

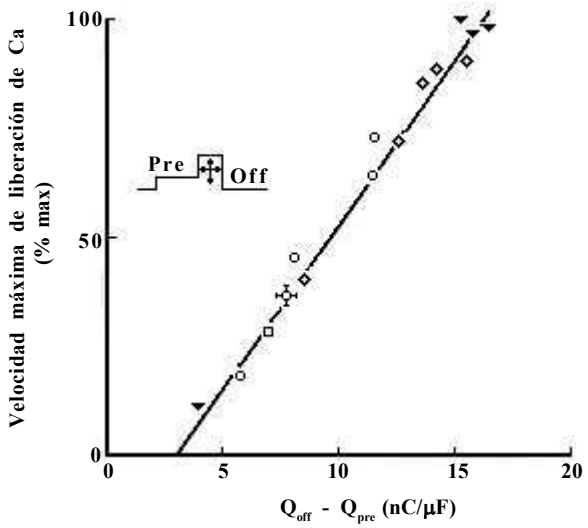


Figura 9.4. Relación entre la tasa máxima de liberación de Ca del Retículo Sarcoplasmático (RS) y la carga supraumbral obtenida con el protocolo de pulsos mostrado en el gráfico. (*Modificado de Melzer et al., 1986, con permiso*).

excitables y no excitables. Esto se debe no sólo a la posibilidad de medir la amplitud y curso temporal de señales macroscópicas y microscópicas de Ca, sino también y sobre todo por la posibilidad de localizar, principalmente mediante el uso de la microscopía confocal, el sitio de génesis de estas señales a nivel de las estructuras microscópicas subcelulares donde se produce la liberación de Ca.

Entre los primeros colorantes fluorescentes, cuya síntesis fue lograda en 1985 por Grynkiewicz, Poenie y Tsien, se encuentra el Fura-2 que probablemente es el colorante de mayor uso en la actualidad. El Fura-2 se distingue por tener un sólo sitio de unión para el Ca, y una estequiometría simple. La molécula de Fura está compuesta por una molécula de Bapta, que es un quelante de Ca muy rápido a la cual se le ha agregado un cromóforo que le confiere fluorescencia a la molécula. Las propiedades de fluorescencia de esta molécula dependen de la concentración de Ca.

Al unir Ca, el Fura-2 presenta un corrimiento en sus propiedades de absorción que se observa favorablemente excitando entre

300 y 400 nm y midiendo la fluorescencia de emisión a 510 nm aproximadamente. La figura 9.5 muestra los espectros de excitación y de emisión del Fura-2. Cuando el compuesto es excitado a 360 nm, la cantidad de luz emitida y medida a 510 nm, no cambia con el Ca, siendo 360 nm el punto isobéstico del colorante. Para excitación con longitudes de onda menores que 360 nm la fluorescencia emitida (y medida) a 510 nm aumenta, mientras que por excitaciones a longitudes mayores de 360 la fluorescencia disminuye. Este corrimiento hacia el azul en el espectro de excitación es aprovechado para excitar el compuesto de manera alterna con dos longitudes de onda, usualmente 340 y 380, y obtener la relación entre las cantidades de luz emitida a las dos longitudes de onda. Este método, denominado *ratiometric* en inglés, y en castellano pudiera llamarse *relaciométrico o fraccional*, permite obtener señales de Ca que son independientes de la cantidad de colorante y de las propiedades ópticas pasivas de la preparación, lo cual facilita las calibraciones de las señales en término de concentración de Ca. El método fraccional usado para cambios pequeños y lentos fue propuesto originalmente por Grynkievicz y colaboradores (1985), de acuerdo a la ecuación (9.6)

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \qquad \textbf{(9.6)}$$

donde K_d es la constante de disociación ente Ca y Fura; $R = \lambda_1 F_1 / \lambda_2 F_2$; R_{min} es R cuando [Ca]= 0 ; R_{max} es R cuando [Ca]>>>K_d; $S_{f2} = F_2$ cuando no hay Ca unido al Fura; $S_{b2} = F_2$ cuando Ca satura al Fura. Esta relación se trasforma en lineal cuando $R_{max} = 0$.

El Fura-2 es un colorante de alta afinidad para el Ca (K_d = 140 nM,) y por lo tanto muy útil en detectar y reportar cambios pequeños en un rango bajo (< 1 μM) de concentraciones de calcio. El valor de 140 nM es el valor nominal calculado mediante calibraciones *in vitro*.

Aparte del Fura-2 otros colorantes fluorescentes muy utilizados han sido el Fluo-3 y el Rhod-2. Una desventaja que presentan estos últimos dos colorantes es que en respuesta a cambios en la concentración de Ca no cambian sus propiedades espectrales, ni de

excitación ni de emisión, y sólo cambia la cantidad de fluorescencia. El hecho de que no pueden hacerse medidas de fluorescencia fraccional complica la posibilidad de calibrar las señales, que sin embargo pueden ser expresadas en valores de ΔF/F. La figura 9.6 muestra un sistema microfluorimétrico utilizado para medir cambios de fluorescencia globales en diferentes tipos de células. El sistema está compuesto básicamente de un microscopio invertido que permite colocar elementos ópticos adicionales en el recorrido de la luz, la cual normalmente proviene de una lámpara de arco, que puede ser sustituida por un láser. En el primer caso se utiliza un filtro que dependiendo del colorante, por ejemplo el fluo-3 o el rhod-2, puede dejar pasar luz azul o roja. Este filtro no es necesario en caso de utilizar un láser que emita a la longitud de onda determinada por el espectro de excitación del colorante. Un espejo dicroico, especialmente seleccionado para los colorantes fluo-3 o rhod-2, permite cambiar la dirección de la luz para iluminar el objeto y excitar el fluoróforo que se encuentra en él. El espejo deja pasar la fluorescencia emitida por el colorante, mientras que un filtro de barrera solo deja pasar la fluorescencia del colorante usado, bloqueando el paso de la fluorescencia alterna.

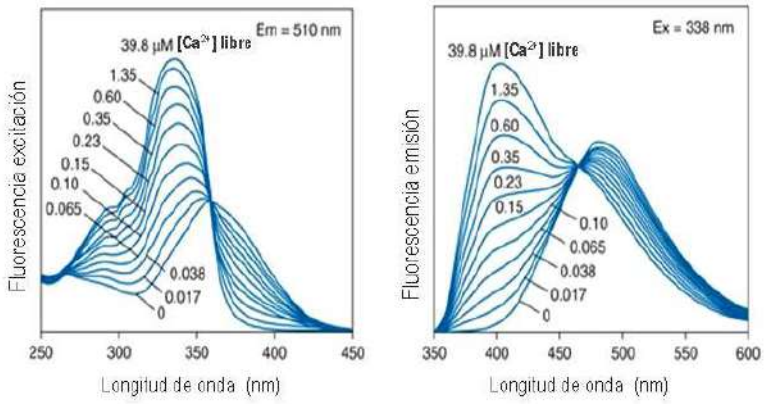


Figura 9.5. Espectros de Excitación y de Emisión del colorante Fura -2 Para los experimentos con fibras musculares normalmente se usa la relación entre los valores de fluorescencia obtenidos con excitación a 358 y 380 nm registrando la fluorescencia de emisión a 510 nm. Copyright © 2011 Life Technologies Corporation. (*Used under permission*).

Para calcular la concentración de Ca libre a partir de las señales de fluorescencia, se utiliza la constante de afinidad del colorante, Kd, para el calcio, que viene dada por la relación:

$$\text{Calcio} + \text{D} \longleftrightarrow \text{Calcio-D} \qquad \textbf{(9.7)}$$

Recordando que $Kd = k_{off}/k_{on}$, donde k_{off} y k_{on} son las constantes de velocidad de desunión y unión respectivamente entre el Ca y el colorante, en condiciones de equilibrio la concentración de Ca libre en el mioplasma, $[Ca]_m$ puede ser estimada de la señal de fluorescencia (F) usando la relación:

$$[Ca]_{m} = ((F - F_{min})\, k_{off})/\, ((F_{max} - F)\, k_{on}) \qquad \textbf{(9.8)}$$

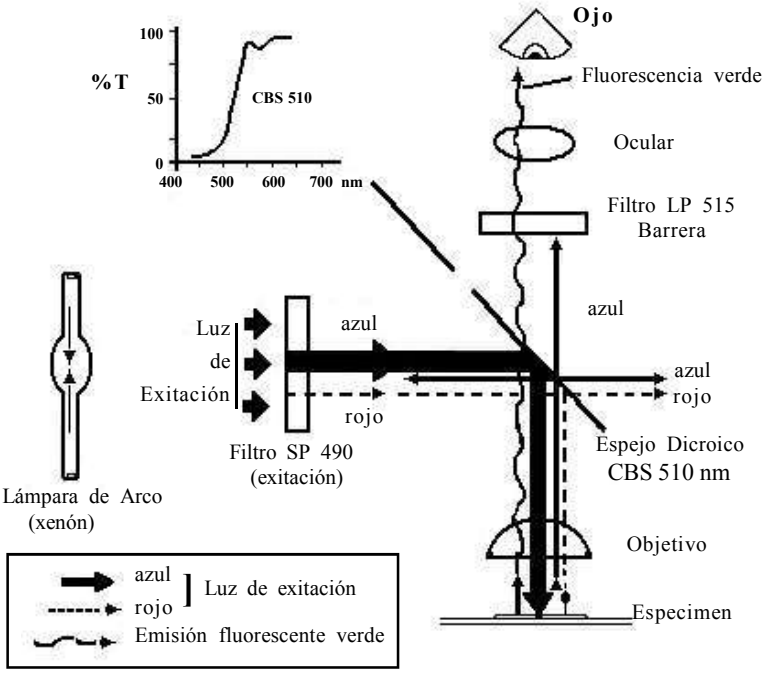


Figura 9.6. Sistema microfluorimétrico para mediciones de las señales fluorescentes.

Donde F_{max} es la máxima señal de fluorescencia; F_{min} es la fluorescencia del colorante solo en ausencia de Ca.

En respuesta a un estímulo, al activarse el mecanismo de liberación de Ca, la fluorescencia empieza a cambiar de manera que:

$$dF/dt = [Ca]_m(F_{max}–F)\ k_{on} - (F-F_{min})k_{off} \quad \textbf{(9.9)}$$

donde el término F comprende tanto la fluorescencia de reposo, F_{rep} como el cambio de fluorescencia, ΔF, que se suma a F_{rep} de manera que:

$$[Ca]_m=((\Delta F + F_{rep} - F_{min})k_{off}+dF/dt) / (F_{max} - F_{rep} –\Delta F)\ k_{on} \quad \textbf{(9.10)}$$

en reposo:

$$[Ca]_{mr} = (F_{rep} - F_{min})\ k_{off}/(F_{max}-F_{rep})\ k_{on} \quad \textbf{(9.11)}$$

sustituyendo $(F_{rep} – F_{min})$ de la (9.11) en la (9.10)

$$[Ca]_m= [Ca]_{rep}–(F_{max}– F_{rep})k_{on}+\Delta F\ k_{off}+dF/dt/(F_{max}–F_{rep}–\Delta F)k_{on} \quad \textbf{(9.12)}$$

Para el caso del Fluo-3, la constante K_d en agua ha sido estimada en 0.40 μM, pero probablemente tiene un valor 10 veces mayor en el mioplasma. Por lo tanto es necesario conocer el valor real de la constante Kd en el mioplasma. En caso contrario, se prefiere el uso de $\Delta F/F$, para expresar los cambios de fluorescencia que ocurren cuando cambian los nivele del Ca intracelular. Para cambios en la concentración de Ca, como los que ocurren durante una sacudida simple de una fibra muscular, que llegan a 15-20 μM, es necesario utilizar colorantes de baja afinidad, que además permiten seguir los cambios rápidos de concentración con mayor resolución temporal. Los colorantes fluorescentes más indicados para reportar señales de Ca en respuesta a potenciales de acción o pulsos despolarizantes en fibras musculares son los colorantes de baja afinidad Furaptra y el MagFluo-4. El cromatóforo del MagFluo-4 es el mismo que el del Fluo-3, cuyo espectro de emisión se presenta en la figura 9.7 pudiéndose utilizar los mismos filtros para las medidas experimentales.

Una gran ventaja de los colorantes fluorescentes es que aunque son impermeables a las membranas celulares, en la forma de acetoximetil ester se vuelven permeantes, y como tales pueden atravesar las membranas y ser cargados en las células. Una vez adentro, las esterasas endógenas cortan el enlace estérico y dejan

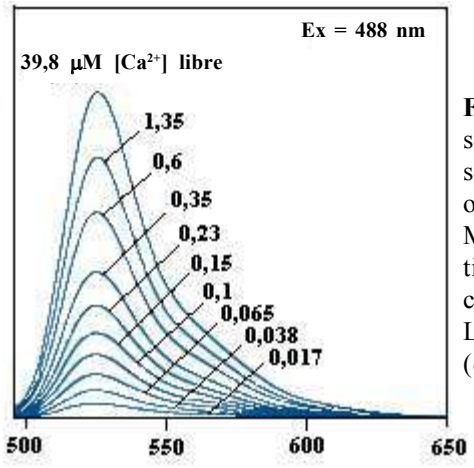


Figura 9.7. Espectro de emisión del Fluo-3. El espectro sirve de referencia para los otros colorantes, como el MagFluo-4 que también tienen la fluoresceína como cromatóforo. Copyright © 2011 Life Technologies Corporation. (*Used under permission*)

al colorante libre de interactuar con el Ca. Los registros en la parte A de la figura 9.8 corresponden a transitorios de Ca evocados por un potencial de acción en fibras cargadas con MagFluo-4, K_d 25 µM, trazo a; Rhod-2, Kd 0,57 µM trazo b; y Fluo-3 Kd 0,39 µM trazo c (*Molecular Probes*). La figura muestra cómo el MagFluo-4 que tiene la menor afinidad para el Ca es mucho más rápido que los otros dos colorantes.

En la parte B de la figura se muestran las relaciones temporales entre un potencial de acción, trazo d, registrado con el colorante potenciométrico di-8-ANEPPS, el transitorio de Ca, trazo a, registrado con el MagFluo-4, y la tensión isométrica, trazo t, registrada con un transductor de fuerza. Los trazos a y t han sido registrados simultáneamente en la misma fibra. Puede verse cómo la señal de Ca tiene un breve retraso de menos de 2 ms con respecto al potencial de acción. La rapidez del colorante puede ser utilizada

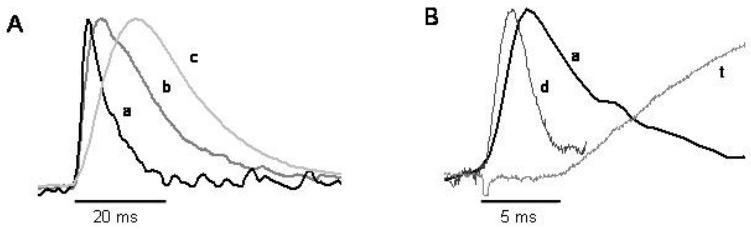


Figura 9.8. (**A**) Curso temporal de transitorios de Ca, en respuesta a un potencial de acción, registrados con tres colorantes fluorescentes diferentes, sensibles al Ca, MagFluo-4 (a), Rhod-2 (b), y Fluo-3 (c). (**B**) Relación temporal entre un potencial de acción registrado con el colorante potenciométrico di-8-Anepps (d), un transitorio de Ca registrado con MagFluo-4 (a) y la tensión isométrica de una sola fibra (t), registrada con un transductor mecano-electrónico (*Modificado de Caputo et al., 1999*).

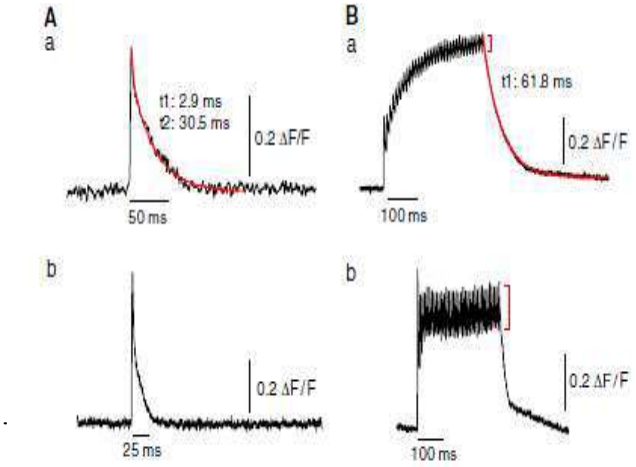


Figura 9.9. Transitorios de Ca reportados por el MagFluo-4, en respuesta a un solo estimulo (A), o a estimulación tetánica (B). Los trazos superiores (a) provienen de una fibra de músculo *soleus*, mientras que los inferiores (b) de una fibra de músculo *edl*. (*Modificado de Calderón et al., 2010*)

La forma de los transitorios corresponde a la identificación bioquímica de las fibras como se muestra en la figura 9.10 donde, en la parte superior aparece un transitorio simple de Ca, marcado a, de una fibra disecada de músculo Soleus, e identificada como tipo I según la banda de miosina pesada obtenida de la misma fibra y comparada con las bandas obtenidas de músculo soleus entero. En la parte inferior se muestra el transitorio de Ca de una fibra aislada del músculo edl e identificada como tipo IIb.

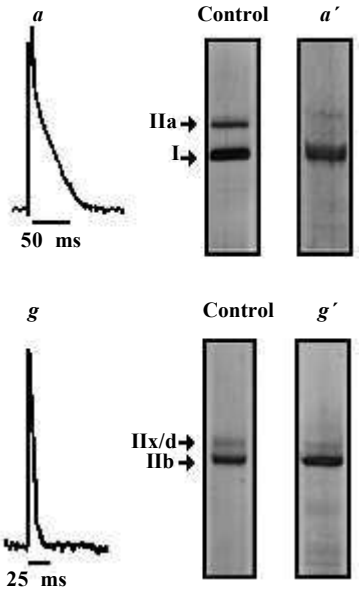


Figura 9.10. Caracterización fisiológica y bioquímica de fibras lentas y rápidas. El trazo marcado (***a)*** corresponde a un transitorio de Ca, reportado con el colorante MagFluo-4, de una fibra única disociada enzimáticamente del músculo *soleus*. La banda de miosina pesada obtenida de la misma fibra aparece marcada como (***a***') a la derecha del control que muestra bandas de miosina pesada obtenida del músculo *soleus* entero, indicando que la fibra pertenece al tipo I. En la parte inferior se muestra un transitorio de Ca (***g***) obtenido de una fibra disociada del músculo *edl*, junto a la banda de miosina pesada obtenida a partir de la misma fibra (***g'***), indicando que la fibra corresponde al tipo IIb. (*Modificado de Calderón et al., 2010*).

Flujos de liberación de Ca

Para entender los mecanismos que regulan la liberación de Ca es más conveniente utilizar el flujo de salida de Ca que los cambios en la concentración de Ca en el mioplasma.

Esto se debe a que el cambio de concentración de Ca que se mide en el mioplasma depende tanto del Ca liberado del RS, como del Ca captado por los sistemas de remoción de Ca, constituidos por la ATPasa de Ca del RS, y por proteínas que ligan Ca como la Parvalbúmina y la troponina. De manera que la situación puede ser descrita por:

$$d[Ca]/dt = \text{flujo de salida del RS} - \text{flujos de remoción} \qquad \textbf{(9.13)}$$

como se ilustra en el esquema de la figura 9.11.

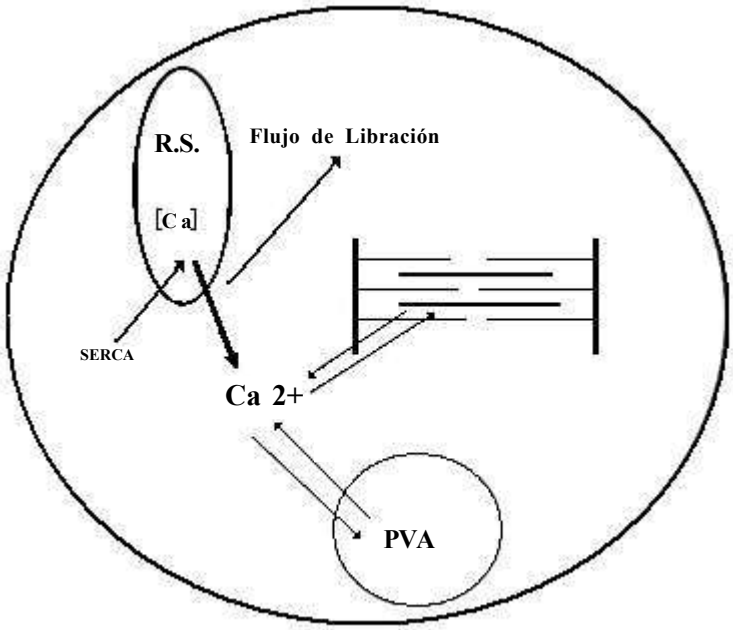


Figura 9.11. Distribución esquemática en el citoplasma, del Ca que sale del Retículo Sarcoplasmático y puede ligarse a la troponina, parvalbúmina o a la SERCA del RS.

Debido a que el flujo de salida del Calcio del RS depende de los mecanismos de liberación de Ca, ha sido objeto de numerosos trabajos y básicamente se han seguido dos estrategias para determinarlo. Diferentes autores (Baylor y Hollingworth. 1983; Caputo *et al.,* 1999) lo han calculado asumiendo que los valores publicados en la literatura, y normalmente obtenidos por estudios *in vitro*, de diferentes parámetros referentes a concentraciones y constantes de asociación del Ca con diferentes proteínas importantes para los procesos de remoción, se pueden utilizar para el estudio de las señales de Ca en células funcionales (Ashley y Moisescu, 1972; Robertson *et al.*, 1981; Gillis *et al.*, 1982; Cannel y Allen, 1984).

Un estudio exhaustivo de los transitorios de Ca, evocados por potenciales de acción o por pulsos despolarizantes bajo condiciones de control de potencial, fue llevado a cabo por Baylor, Chandler y Marshall (1983). Estos autores utilizaron fibras muy cargadas con el colorante arsenazo III, 1,5-2,2 mM, y encontraron que aproximadamente 0,1 mM de Ca se unía al colorante después de un potencial de acción. Tomando en consideración todos los sitios en el mioplasma a los cuales se podía unir el Ca y tomando el valor de la derivada con respecto al tiempo de la concentración de Ca total (d/dt ($[Ca]_{total}$) como flujo neto de Ca (Ca liberado - Ca unido) pudieron obtener valores estimados entre 0,2 y 0,3 mM para la cantidad de Ca que salía del RS. Estos valores indicaban que el vaciamiento de los depósitos de Ca del RS podía ser un factor determinante en los mecanismos de liberación de Ca.

Por otra parte, Melzer y colegas (1984; 1987) han utilizado un método denominado de remoción, con el cual medían la cinética de remoción del Ca, cuando la liberación había cesado, o sea después de la repolarización de la membrana. De esta manera pudieron determinar matemáticamente un componente cinético para cada uno de los mecanismos de remoción. Usando los valores cinéticos así obtenidos podían construir un modelo de remoción para cada fibra, y luego por un método de ajuste escoger los parámetros más compatibles con el modelo, para calcular así los flujos de liberación para cada señal de Ca.

Inactivación de la liberación de Calcio

Como se muestra en la figura 9.12, en respuesta a pulsos despolarizantes prolongados, los flujos de salida de Ca muestran una primera fase transitoria, que después de haber alcanzado rápidamente un valor máximo, decae a un nuevo valor que disminuye lentamente hasta el final del pulso, cuando cesa la salida de Ca.

Diferentes autores, utilizando diferentes marcadores de Ca (Blinks *et al.,* 1978; Miledi *et al.*, 1983) habían demostrado que durante un tétano, la amplitud de los transitorios de Ca individuales, empezaba a disminuir después del primero, indicando una disminución progresiva del Ca liberado del RS. Inicialmente, y de acuerdo con la información disponible, se pensó que este efecto podía ser debido a vaciamiento de los depósitos de Ca del RS o a un fenómeno de inactivación, posiblemente a nivel del movimiento intramembranario de carga (Miledi *et al.,* 1983).

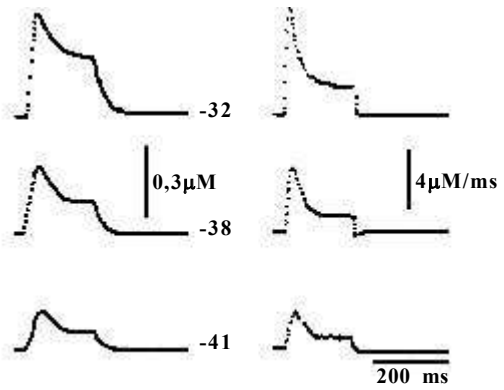


Figura 9.12 Transformación de señales de Ca obtenidas a diferentes potenciales de membrana, -32, -38,- 41, en flujos de liberación de Ca, (*Modificado de Schneider y Simon, 1988, con permiso,*).

Baylor y colegas (1983) confirmaron que durante episodios de estimulación repetitiva, el flujo de liberación de Ca del segundo transitorio era solo una fracción, 0,2-0,3 del flujo del primero. En experimentos de voltaje controlado encontraron que el flujo de

liberación de Ca presentaba un pico transitorio inicial seguido por una fase de decaimiento a un nivel basal más bajo. A pesar de no presentar evidencias directas, los autores consideraron que la inactivación de los canales de liberación de Ca podía estar implicada en este fenómeno.

Utilizando fibras cortadas y montadas en una cámara de doble sello de vaselina Schneider y Simon (1988) estudiaron el mecanismo de liberación de Ca del RS registrando transitorios de Ca reportados con el colorante antipirilazo III. Los registros en la parte izquierda de la figura 9.12 representan transitorios de Ca evocados por pulsos despolarizantes En la parte derecha se muestran los respectivos flujos de liberación de Ca del RS, calculados por el método de remoción, antes mencionado. En los dos tipos de señales, pero más claramente en el segundo, se observa cómo su amplitud alcanza casi de inmediato un valor máximo y luego empieza a decaer rápidamente hasta alcanzar un valor casi estacionario, pero con un ligero declive.

La caída de la señal de Ca durante un transitorio, ilustrada en la figura 9.12 fué interpretada en términos de un mecanismo de inactivación, a nivel de los canales de liberación de Ca del RS. Apoyando esta idea los autores demostraron que despolarizaciones condicionantes, bajo condiciones de control de potencial, eliminaban la primera fase, sin afectar la segunda, o fase de meseta, de los registros de liberación de Ca, como se ilustra en la figura 9.13.

Los registros de esta figura representan los flujos de liberación de Ca obtenidos con un pulso de prueba de 200 ms y 68 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Sobrepuestos a estos registros, estan los flujos de liberación de Ca obtenidos en presencia de pulsos condicionantes de 20 ms y amplitud de 60, 70, 80 y 90 mV respectivamente. En la figura no se muestran los pulsos condicionantes ni los de prueba. Entre los dos pulsos hay una separación de 20 ms, para permitir que la carga intramembranaria, movida con el pulso condicionante, regrese a su distribución de reposo. Los registros muestran que a medida que aumenta la amplitud del pulso condicionante, disminuye de manera

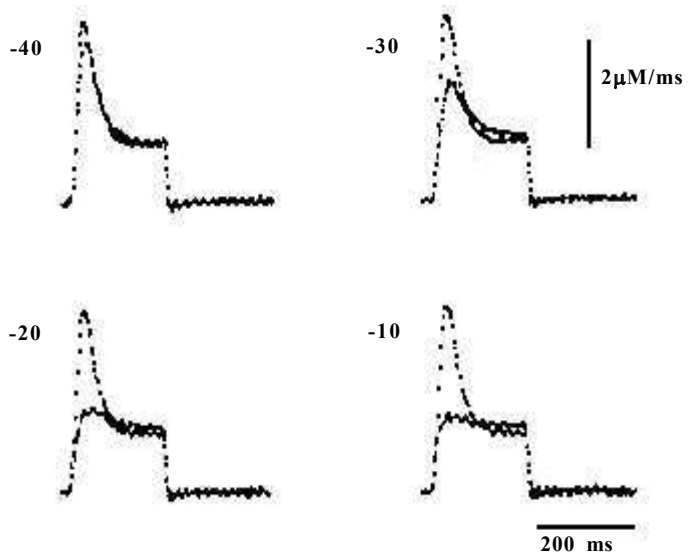


Figura 9.13. Efecto de prepulsos condicionantes breves (20 ms), sobre los flujos de liberación de Ca evocados por un pulso de prueba de 62 mV. Los pulsos condicionantes llevaban la membrana a los valores indicados. Potencial de mantenimiento = -100 mV. (*Modificado de Schneider y Simon, 1988, con permiso*).

selectiva la fase inicial transitoria del flujo de liberación, sin que haya efecto alguno sobre la fase de meseta. Estos resultados sugerían que aumentos relativamente pequeños en la [Ca] basal, debido a la acción del pulso condicionante despolarizante, podían causar la inactivación del mecanismo de liberación de calcio. Schneider y Simon, también reportaron que mientras el Ca permanecía por encima de los valores basales, la inactivación continuaba desarrollándose, indicando su dependencia de este catión. Simon y colegas (1991) continuaron el estudio del mecanismo de inactivación con un trabajo en el que aplicaron prepulsos condicionantes de diferentes amplitudes y 200 ms duración, y utilizaron dos indicadores, uno de alta afinidad (fura-2), para determinar los niveles basales de Ca, y otro de baja afinidad (anti-pirilazo), para medir el Ca durante el proceso de liberación. Los resultados permitieron confirmar que la caída del flujo de liberación no se

debía al mecanismo de inactivación del movimiento de carga, ni al vaciamiento de los depósitos de Ca del RS, más se debía a un mecanismo de inactivación rápida del proceso de liberación de Ca mismo, o sea a la inactivación del canal de liberación de Ca del RS, el cual es controlado de manera muy estricta por la cantidad de Ca misma en la cara citoplasmática del canal. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados obtenidos estudiando la actividad de canal único de los receptores de rianodina incorporados en bicapas lipídicas (ver figura 7.11). Los resultados de Simon y colegas indicaban que se necesitaba más de un ion Ca para inactivar un canal, y que a pesar de que la mitad de la inactivación máxima del canal se obtenía a una $[Ca^{2+}]_i$ de aproximadamente 0,3 μM, la inactivación no se completaba ni siquiera a concentración saturante de Ca. Con base en estos resultados se pudo proponer un modelo en el cual más de un Ca, posiblemente 2, se unen primero a un sitio de alta afinidad del canal de liberación, lo cual causa un lento cambio de conformación de la molécula del canal, que finalmente lleva a la inactivación de canal mismo (Simon *et al.*, 1991). Los experimentos de Schneider y colegas demostraron claramente que en fibras musculares esqueléticas, el mecanismo de liberación de Ca se inactiva y que el mecanismo de inactivación depende del Ca.

El fenómeno de inactivación dependiente de Ca es una característica común para diferente tipos de canales de Ca (Brehm y Eckert, 1978: Tillotson, 1979: Gera y Byerly, 1999), que ha sido descrito también en fibras musculares desmembranadas mecánicamente (Kwok y Best, 1987) y en células cardíacas (Fabiato y Fabiato, 1978). También ha sido demostrado en RyRs incorporados en vesículas del R.S. de músculo cardíaco o esquelético, (Meissner *et al*, 1986) o RyRs reconstituidos en bicapas lipídicas (Tripathy y Meissner, 1996).

La inactivación de la liberación de Ca se ha visualizado no sólo durante la aplicación de pulsos despolarizantes largos (> 50 ms), sino también en respuesta a un solo potencial de acción o pulsos de corta duración, <10 ms. (Blinks *et al*., 1978; Miledi *et al.,* 1983; Baylor *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 1991; Jong *et al.*, 1995). La

cantidad de inactivación alcanzada durante un sólo potencial de acción ha sido estudiada en experimentos de doble pulso, en los cuales el efecto inactivador de un primer pulso es determinado midiendo la cantidad de Ca liberado en respuesta a un segundo pulso aplicado a diferentes intervalos de tiempo después del primero (ver figura 9.18) Jong y colegas (1993), demostraron que después de un sólo potencial de acción la capacidad de liberar Ca con un segundo pulso era disminuida entre el 80 y 90 por ciento, y que la tasa de recuperación después de un pulso de 10-20 ms era dos veces más lenta que en el caso de un potencial de acción. Esto les permitió concluir que sólo una pequeña fracción de canales de Ca se activaba durante un potencial de acción, y que la liberación de Ca termina no sólo porque la membrana se repolariza después del potencial de acción sino también por la inactivación del canal.

Se ha visto cómo los RyR, bien sea en vesículas del RS o aislados e incorporados en bicapas lipídicas (ver capítulo 7), pueden ser afectados por el Ca de dos maneras diferentes: a bajas concentraciones el Ca activa los RyR y causa la salida de más Ca, mientras que a altas concentraciones el Ca inactiva los RyR. Los experimentos de Schneider y colegas (Schneider y Simon, 1988; Simon *et al.*, 1988), habían demostrado que este último mecanismo de retroalimentación negativa tenía un papel fisiológico en el funcionamiento de las fibras.

En 1988, Baylor y Hollingworth, para comprobar los efectos de tampones de Ca exógenos en alta concentración, sobre los mecanismos de liberación de Ca inyectaron una gran cantidad de Fura-2, en fibras musculares intactas de rana. El uso de Fura-2 como tampón de Ca se debió a su estequiometría 1:1, y a su alta afinidad con el Ca, Kd = 140 nM. Al mismo tiempo inyectaron antipirilazo III para medir los transitorios de Ca.

Los resultados obtenidos indicaron que, si bien la amplitud y el curso temporal de los transitorios de Ca, en respuesta a potenciales de acción disminuían, tanto el Ca total liberado como la tasa máxima de liberación de Ca del RS aumentaban en función de la cantidad del tampón exógeno inyectado (ver figura 9.15). Estos resultados tenían claras implicaciones para la hipótesis que el

mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca, tuviese participación en el fenómeno de AEC. De acuerdo con esta hipótesis, si el Ca actuaba como mensajero químico, aumentando su concentración en el espacio entre las membranas de los jT y los RS, una alta capacidad tamponadora exógena hubiera tenido que disminuir la concentración de Ca en este espacio, reduciendo de esta manera la cantidad de Ca liberado del RS. Los resultados obtenidos contradecían la idea de la importancia del mecanismo de CICR, y al mismo tiempo apoyaban la idea de que la inactivación de la liberación de Ca dependía del Ca, ya que al disminuir el Ca mioplasmático y más específicamente el Ca en el espacio restringido en la zona de aposición entre los jT y los jSR, por acción de los tampones exógenos de Ca, aumentaba el nivel de liberación de Ca. De manera que mientras los experimentos de Baylor y colaboradores indicaban que la disminución del Ca mioplasmático, por efecto del Fura-2, aumentaba la liberación de Ca del RS, los resultados de Schneider y Simon indicaban que un aumento del Ca causado por pulsos condicionantes la disminuía.

Con el mismo propósito de obtener más evidencia sobre el mecanismo de activación dependiente de Ca, Jacquemond y colegas (1991) realizaron experimentos, similares a los reportados por Baylor y Hollingworth (1988), e inyectando altas concentraciones de Fura-2 y de Bapta, lograron eliminar el componente rápido y transitorio de los registros de flujo de Ca, como se muestra en la figura 9.14. En la figura los dos trazos superiores muestran el efecto del Bapta (aproximadamente 4 mM), mientras que los dos trazos inferiores muestran el efecto del Fura-2 (aproximadamente 2,5 mM). En los dos casos se aprecia la desaparición del componente rápido, indicando que este componente depende del Ca en el mioplasma para su activación. El resultado de este experimento contradice las conclusiones previas de Baylor y Hollingworth (1988). Para comprobar si la diferencia de resultados entre los dos grupos se podía explicar en términos de las diferentes preparaciones (fibras intactas *vs* fibras cortadas) y condiciones experimentales (potenciales de acción *vs* pulsos bajo control de potencial). Chandler y colegas (Jong *et al.,* 1993 y Pape *et al.,* 1993) retomaron el problema, repitiendo los experimentos bajo diferentes

condiciones, utilizando fibras musculares cortadas de *Rana temporaria* y tambien de *Rana pipiens*, como en los experimentos de Jacquemond y colegas (Pape *et al.*, 1993), para comprobar los efectos del Fura sobre la liberación de Ca en fibras cortadas bajo condiciones de control de potencial, y confirmaron que 2 - 3 mM de Fura-2, aumentaban el nivel de la fase tardía y sostenida del flujo de liberación de Ca por un factor de 6,6 en el caso de fibras de *R. temporaria* y un factor de 3,8 para el caso de fibras de *R. pipiens*. El nivel de la fase inicial y no sostenida del registro del flujo de Ca, también dismimuya pero en menor proporción que la fase sostenida, en las fibras de las dos especies. Por otra parte utilizando fibras intactas, Hollingworth y colegas (1992) compararon las señales de Ca en respuesta a un potencial de acción, en dos regiones de la misma fibra, cargadas con 0 mM o con 0,9 mM de Fura-2. La figura 9.15 muestra que en presencia de Fura, la amplitud y el ancho medio del transitorios de Ca (trazo inferior) inducido por un potencial de acción disminuía mientras que la tasa máxima de liberación (trazo superior) y la cantidad de calcio total liberado, (trazo intermedio) aumentaba.

La diferencia, no solo cuantitativa sino también cualitativa, en los resultados obtenidos por los dos grupos con concentraciones de Fura-2 entre 0,5 a 2 mM en el caso de Chandler y colegas, y 2,2 a 2,8 mM en el caso de Jacquemond y colegas, no pudo ser explicada considerando diferentes factores como el contenido de Ca del RS, la amplitud del flujo de Ca transitorio y en estado estacionario, etc. Después de una larga serie de detallados experimentos la conclusión fue que la condición fisiológica de las fibras usadas por los dos grupos era diferente, con la posibilidad de que la diferencia pudiese radicar en la duración del periodo en que las fibras quedaban despolarizadas durante el procedimiento de su montaje experimental. Sin embargo, al utilizar concentraciones mayores de Fura (>3 mM), el grupo de Chandler también observó una dis-minución en la liberación de Ca consistente con los resultados de Jacquemond, pero también con la posibilidad de que el Fura-2 tuviese un efecto diferente al de su acción tamponadora, por ejemplo cambiando la fuerza iónica de las soluciones, o un efecto de tipo farmacológico.

Control dual de la liberación de Ca

Independientemente de la discrepancia entre los resultados de Baylor, Chandler y colegas y los de Jacquemond y colegas, los experimentos que acabamos de reportar coincidían en que la liberación de Ca del RS de fibras musculares de rana presentaba el fenómeno de inactivación, y que ésta no era completa. La característica de los flujos de liberación de Ca, con una primera fase rápida y transitoria seguida de una segunda fase de meseta con un pequeño declive, indujo a Ríos y Pizarro (1988) a proponer que el Ca, inicialmente liberado de canales del RS, RyR tipo V, controlados por los DHPr, en respuesta a la despolarización de la membrana, y de manera no dependiente del Ca, pudiera promover una liberación adicional de Ca, o actuando ulteriormente sobre los mismos canales o, liberando Ca de un segundo grupo de canales, RyR tipo C, no asociados a los DHPr. La disposición alterna de los pies del jRS y las tétradas del jT (Block *et al.*, 1988) servía de

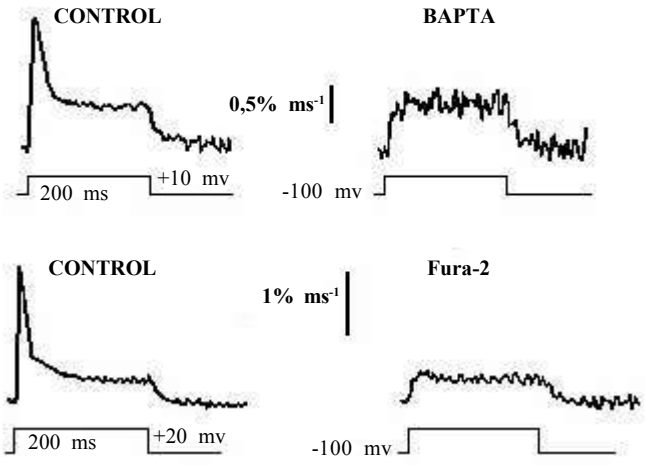


Figura 9.14. Eliminación del componente temprano y transitorio del flujo de Ca por altas concentraciones de Bapta o de Fura-2. (*Modificado de Jacquemond et al., 1991, con permiso*).

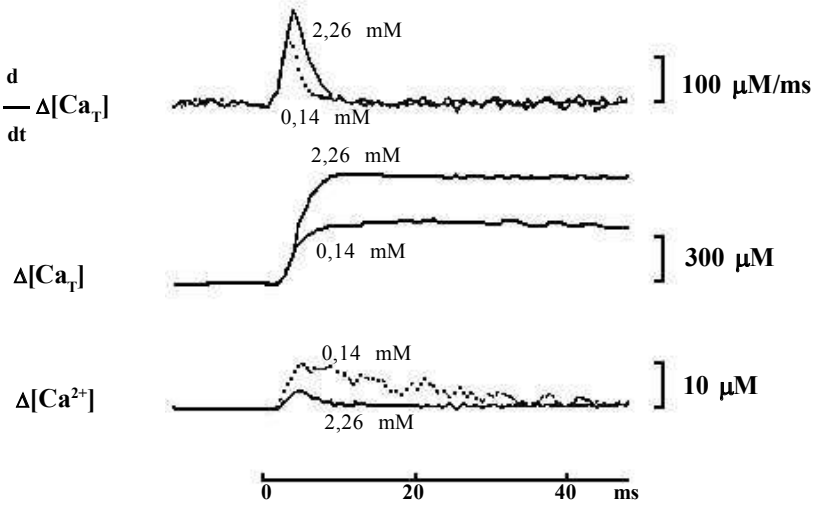


Figura 9.15. Efecto de una concentración alta de Fura-2 (0,9 mM) sobre el flujo de liberación de Ca, el Ca total y la concentración de Ca libre en el mioplasma. (*Modificado con permiso de Hollingworth et al., 1992*).

base estructural para la propuesta de Ríos y Pizarro (1988), ya que el arreglo de los pies y las tétradas indicaba que no todos los RyRs estaban acoplados a DHPRs, y por lo tanto no podían ser controlados por los sensores de potencial. La propuesta además tenía el apoyo de trabajos que demostraban la presencia en fibras musculares de rana, de dos isoforma de RyR, el RyR1 y el RyR3, en los sitios de union entre jT y jSR (Fleischer *et al.,* 1985; Imagawa *et al.,* 1987; Lai *et al.,* 1988). Posteriormente la demostración de la presencia de RyR3 en zonas extra-unionales (Felder y Franzini-Armstrong, 2002) sirvió de evidencia adicional para la propuesta.

La figura 9.16 muestra un esquema que refleja la propuesta de O'Brien y colegas (1988), basada en la demostración de dos tipos de RyR en la misma unidad de liberación de Ca.

Finalmente otra evidencia, de tipo farmacológico esta vez, a favor del mecanismo dual de liberación de Ca fue la demostración que la tetracaína, 20 μM, eliminaba el primer componente rápido y

transitorio de la señal de flujo sin afectar el segundo componente sostenido (Pizarro *et al.*, 1992). Este efecto diferencial de la tetracaína claramente indicaba que había dos componentes cinéticamente diferentes en el flujo de liberación de Ca, de los cuales el que era activado por el mecanismo de liberación de Ca inducida por calcio era sensible a la tetracaína.

También se ha demostrado que la cafeína prolonga el curso temporal de la liberación de Ca más allá de la duración de un pulso despolarizante, indicando que hay liberación de Ca independiente del potencial, de acuerdo con la propuesta de control dual. La distribución diferencial de los RyR en fibras musculares de mamíferos y anfibios ha servido para comprobar el posible papel de las diferentes isoformas de los RyR en la señalización de Ca. Mientras que en músculos de anfibio (*Rana*) se encuentran dos

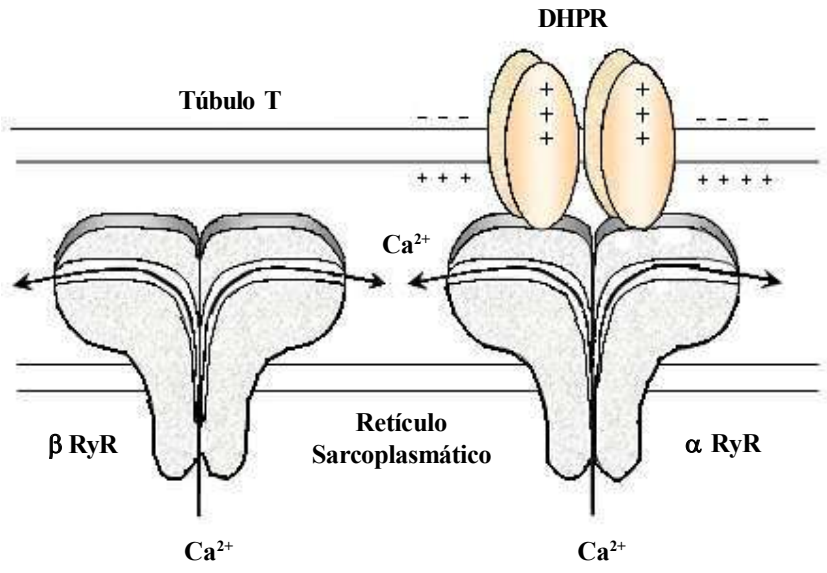


Figura 9.16. Mecanismo dual de liberación de Ca del RS. A la izquierda Se muestra un RyR, no acoplado a un DHPR y activado por Ca, mientras que a la derecha se muestra un receptor acoplado a un DHPR y activado por interacción mecánica con éste.

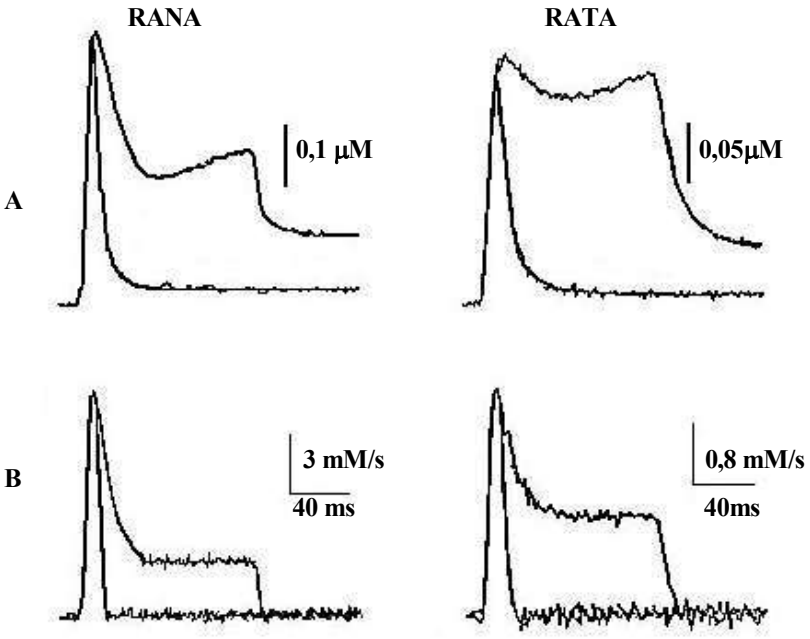


Figura 9.17. Señales (A) y flujos de liberación de Ca (B) en fibras de anfibio y mamífero, en respuesta a pulsos despolarizantes cortos y largos. (*Modificado de Shirokova et al., 1996*).

tipos de receptores, RyR1 y RyR3, en la mayoría de los músculos de mamíferos adultos solo se encuentra el tipo RyR1. Basados en esta diferencia, Shirokova y colegas (1996) compararon la señalización del Ca en fibras musculares de anfibio (rana) y mamífero (rata).

La figura 9.17 muestra en su parte superior, las señales de Ca, en respuesta a un pulso despolarizante corto y otro largo, de fibras musculares de rana y rata; los registros inferiores muestran los flujos de liberación de Ca respectivos. La amplitud del primer componente del flujo de liberación de Ca, o sea la fase inicial transitoria que se inactiva es claramente mayor en la fibra de rana mientras que la segunda fase sostenida, de meseta que no se inactiva es claramente mayor en la fibra de rata (Shirokova *et al*.,1996). Estos resultados son compatibles con las diferencias en la

composición y localización de los receptores de rianodina en las dos clases de animales (Rios y Pizarro, 1991; Ogawa *et al*, 2000; Murayama y Ogawa, 2002). De hecho se ha demostrado la presencia de dos isoformas del canal de liberación de Ca, RyR1 y RyR3 en músculo esquelético de anfibios (y en algunos músculos adultos de mamífero), y la localización extraunional de algunos receptores RyR3 en músculos de anfibio, pero no en músculos de mamífero adulto. Los experimentos de Shirokova y colegas (1996) fueron realizados en fibras cortadas bajo condiciones de control de potencial.

La figura 9.18 muestra los resultados de un experimento realizado para determinar las características del fenómeno de inactivación con fibras intactas de rana y de ratón utilizando la técnica de doble pulso. En este experimento la separación entre pulsos variaba desde 10ms (trazos inferiores) hasta 170 ms (trazos

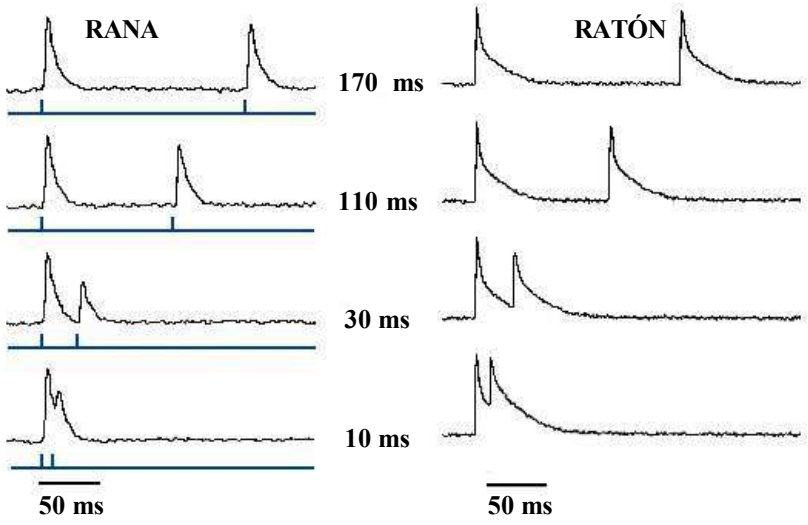
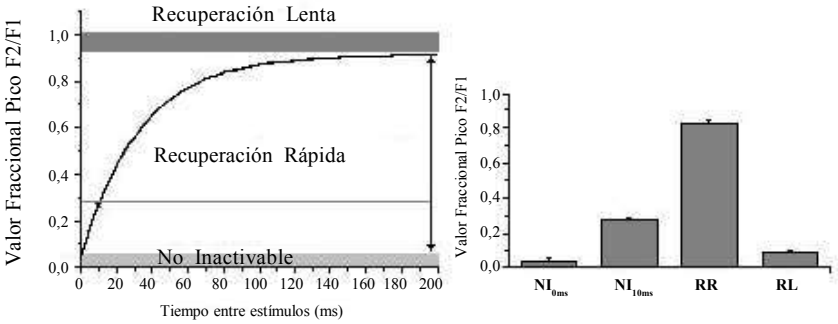


Figura 9.18. Experimentos de doble pulso para caracterizar los procesos de inactivación y de recuperación de la inactivación, de fibras aisladas de anfibio, registro a la izquierda, o de mamífero, registro a la derecha. El experimento muestra que, para separaciones breves entre los dos pulsos, el primer transitorio afecta la amplitud del segundo. Este efecto disminuye al aumentar la separacion entre pulsos.

AMFIBIO



MAMÍFERO

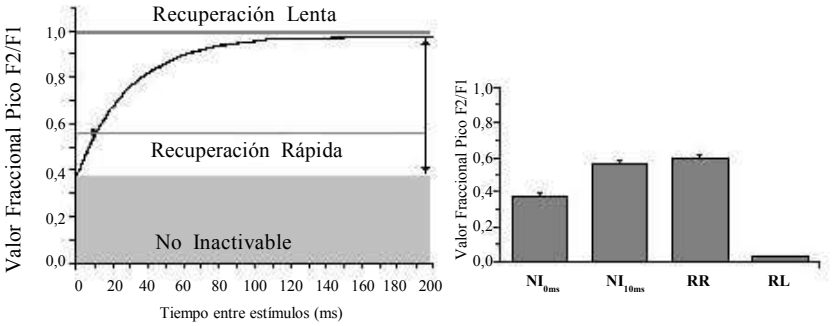


Figura 9.19. Diferencia de los procesos de inactivación y recuperación de la inactivación entre un anfibio (rana) y mamífero (ratón). (*Modificado de Caputo et al., 2004*).

superiores). El análisis de los registros de la figura indica que para tiempos breves de separación entre pulsos, la fibra de mamífero presenta un menor nivel de inactivación. La figura 9.19 sumariza los resultados de varios experimentos de este tipo. Puede verse claramente cómo la fracción no inactivable de los transitorios de Ca es considerablemente mayor en las fibras de mamífero (ratón) que en las de anfibio (rana), confirmando los resultados de Shirokova y colegas con procedimientos y preparaciones experimentales diferentes.

Chispas de Calcio

Las señales globales de Ca representan la actividad sincronizada de miles de canales de liberación de calcio localizados en cada

sarcómero a nivel de las uniones triádicas de músculo esquelético. La aplicación de técnicas de microscopía confocal ha permitido registrar señales microscópicas de Ca altamente localizadas denominadas chispas de Ca, que se ha pensado representan eventos elementales de liberación causados por la apertura de unos pocos canales de liberación de Ca en las Unidades de Liberación de Ca (ULC). Las chispas de calcio fueron observadas por primera vez como eventos espontáneos a nivel de la unión entre túbulos y RS en miocitos cardíacos polarizados (Cheng *et al.* 1993).

La parte superior de la figura 9.20 muestra una imagen de un miocito cardíaco con aumentos de la concentración de Ca muy puntuales localizados en diferentes regiones de la célula. La parte inferior muestra una imagen confocal de una chispa obtenida con la técnica de barrido, junto al registro del curso temporal de la fluorescencia asociada a la chispa izquierda. En esta preparación la suma espacio-temporal de muchas chispas daría lugar a los transitorios globales de calcio. Chispas evocadas por pulsos despolarizantes bajo condiciones de voltaje controlado, tenían las mismas características espacio-temporales de las espontáneas. Poco después de haber sido observadas en músculo cardíaco las chispas de

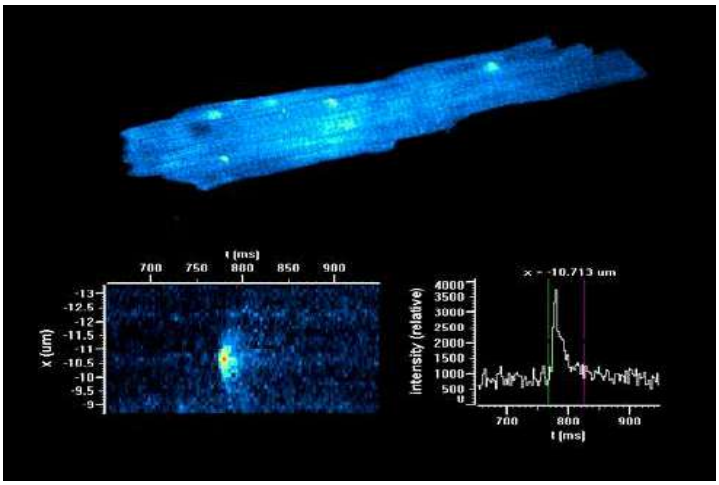


Figura 9.20. Chispas de Ca en un cardiomiocito ventricular, visualizadas con Fluo3 y microscopia confocal.

Ca fueron registradas también en fibras musculares esqueléticas de rana. Como para el caso de las cardíacas, las chispas esqueléticas también pueden ocurrir espontáneamente en células polarizadas o despo-larizadas indicando que no siempre están bajo control de los sensores de voltaje. Uno de los factores que regula la generación de chispas es el Mg que a concentraciones menores de 2 mM, las inhibe totalmente (Lacampagne *et al.*, 1998).

Inicialmente, en músculo esquelético, las chispas fueron visualizadas solamente en fibras de rana. La figura 9.21 muestra unos registros de chispas en músculo esquelético, junto con los correspondientes registros de intensidad de fluorescencia. En fibras musculares de anfibio, las chispas de calcio, espontaneas o estimuladas, tienden a tener la misma forma, como se ve en los trazos de fluorescencia de la figura 9.21

El primer reporte describiendo generación de chispas en fibras musculares de mamíferos (Kirsch *et al*., 2001) fue fuertemente contestado, sin embargo la presencia de chispas en músculo de mamíferos ha sido confirmada. La figura 9.22 muestra un ejemplo

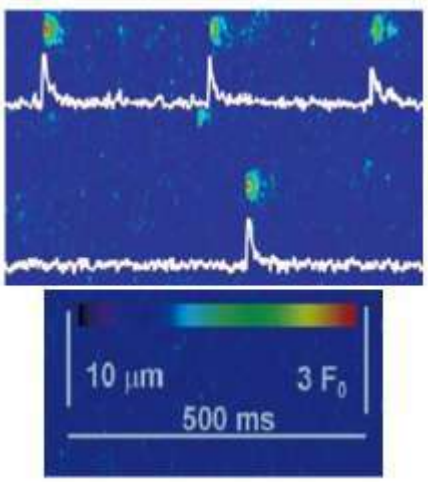


Figura 9.21. Imágenes de chispas de Ca espontaneas, obtenidas con microscopía confocal y barrido de línea, en una fibra muscular esquelética de rana, bañada en una solución con glutamato. Notar la naturaleza estereotipada de las chispas en esta preparación. (*Cortesía Prof. Eduardo Ríos*).

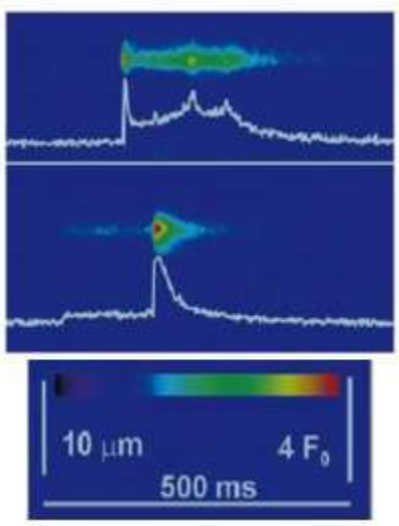


Figura 9.22. Chispas y tizones (ember) de Ca en una fibra muscular de rata, bañada en solución con glutamato. Nótese el aspecto polimórfico de las chispas en esta preparación. (*Cortesía Prof. Eduardo Ríos*).

de chispas en una preparación de músculo esquelético de mamífero. Las caracteristicas espacio-temporales de las chispas de Ca de músculos de mamífero no solo difieren de las chispas de músculo esquelético, sino también entre ellas mismas. En general las chispas de fibras musculares de mamifero son mas pequeñas, 33 % de las de rana y tienen la fase de subida mas lenta. En la solucion glutamato uitilizada por Zhou *et al* (2003) las chispas de mamífero frecuentemente aparecen mas prolongadas en el tiempo, presentando el aspecto de tizon (ember), o mostrando actividad repetitiva. Bajo estas condiciones no aparecen los tizones en las fibras de anfibio, donde habian sido originalmente descritos.

En fibras de rana la despolarización de la membrana aumenta enormemente la frecuencia de generación de chispas, lo que dificulta el estudio de la dependencia de potencial y de las características físicas de las mismas.

Como se muestra en la figura 9.23, este problema fue resuelto despolarizando primero la fibra, de manera de inactivar los sensores de voltaje y eliminar la generación de chispas, y luego repolarizar la fibra por un cierto periodo de tiempo a valores de potencial que reactivaran los sensores de voltaje de manera parcial, de manera que el número de chispas fuese reducido. (LaCampagne *et al.*,

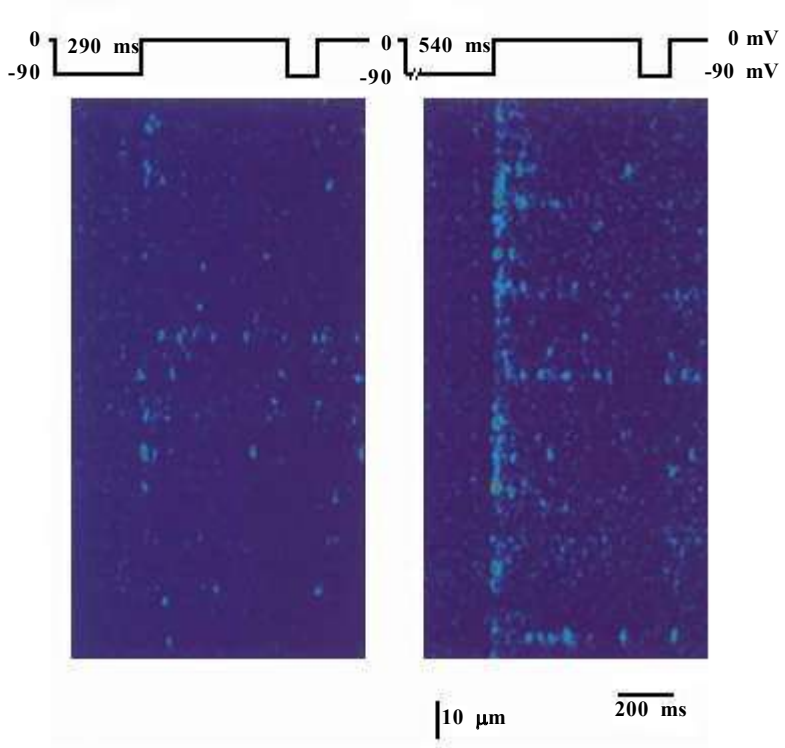


Figura 9.23 Chispas de Ca en una fibra muscular de rana bajo condiciones de control de potencial con la técnica de doble brecha de vaselina con fibra cortada. En el panel de la izquierda la fibra ha estado despolarizada a 0 mV, y se encuentra en estado inactivado. Después de ser repolarizada a-90 mV por 290 ms es despolarizada de nuevo a 0 mV, lo cual causa reactivación parcial de la capacidad de producir chispas. El panel a la derecha muestra una corrida similar, pero con un periodo de reactivación de mayor duración, 540 ms, lo cual causa activación de un mayor número de chispas al despolarizar de nuevo (*Modificado de Lacampagne et al., 1996, con permiso*).

1996). En el caso del experimento de la figura 9.23, el primer panel muestra que después de mantener la fibra por un periodo prolongado a un potencial de 0 mV, la fibra fue repolarizada a -90 mV por un periodo de 290 ms y luego llevada a 0 mV nuevamente, causando la generación de algunas chispas. Al aumentar la duración del período de recuperación a 540 ms, se produjo un mayor número de chispas, como se muestra en el segundo panel.

La figura 9.24 muestra la dependencia del potencial del fenómeno de recuperación de la capacidad de generar chispas. En el panel derecho se muestra cómo después de un periodo de recuperación de 190 ms a 90 mV una despolarización a 0 mV induce la aparición de numerosas chispas. En el panel a la izquierda, después de un periodo de recuperación más largo, 2040 ms, una despolarización a -40 mV no es suficiente para generar chispas, que aparecen al despolarizar la fibra a 0 mV después de un breve periodo a -90mV. Aplicando estos protocolos los autores demostraron que las características espacio temporales de las chispas

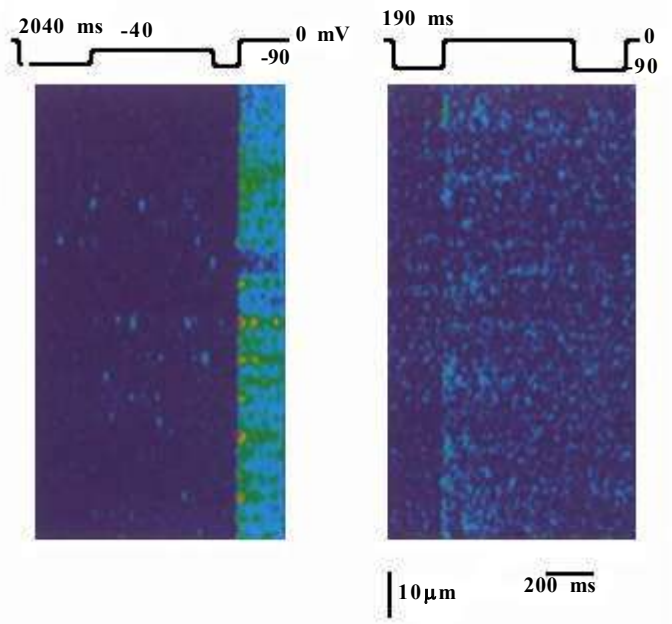


Figura 9. 24. Dependencia de la activación de la chispas del potencial de membrana. En el panel izquierdo la fibra, despues de haber estado despolarizada a 0 mV por un periodo largo, es repolarizada a -90 mV por 2 s, periodo suficiente para reactivar completamente su capacidad de generar chispas. Una despolarizacion a -40 mV solamente activa pocas chispas, mientras que una despolarizacion a 0 mV, despues de un periodo corto de reactivacion (190 ms a -90 mV), activa numerosas chispas. En el panel derecho de nuevo se muestra como una despolarización a 0 mV causa una robusta activación de chispas. (*Modificado de Lacampagne et al., 1996, con permiso*).

eran independientes del valor de potencial de membrana entre -80 y + 40 mV y del período de recuperación.

Los resultados de estos experimentos indican claramente que los mecanismos que controlan la generación de chispas son los mismos que participan en el fenómeno de AEC para la generación de señales de Ca globales. Usando la misma estrategia experimental los autores (Lacampagne *et al.*, 1998) también pudieron demostrar que disminuyendo la concentración de Mg intracelular aumentaba la frecuencia de las chispas sin cambios en sus características físicas. Este efecto del Mg es similar a los resultados previos de Endo (1977), y Lamb y Stephenson (1991; 1994) obtenidos con fibras desmembranadas.

Recientemente se ha demostrado que la calmodulina, CAM, puede modular el mecanismo de generacion de chispas en fibras musculares de rana, causando un aumento en la frecuencia de las chispas de Ca, de hasta 17 veces, sin que cambien las caracteristicas espacio-temporales de las chispas. Este efecto es dosis dependiente y altamente cooperativo, con un K_d = 1 μM y un coeficiente de Hill n= 4,2. (Rodney y Schneider, 2003). En fibras permeabilizadas se ha encontrado que una CAM, marcada con fluorescencia, se localiza a nivel de las triadas.

En analogía con lo que se ha postulado para el caso de los eventos globales, pudiera haber dos mecanismos de control también para las chispas, uno controlado por los sensores de voltaje y el otro dependiente de la liberación de Ca inducida por Ca. La presencia de dos isoformas de RyR en músculo esquelético de anfibio pudiera servir de base molecular para este mecanismo doble de control. Así se pudiera pensar que los RyR1 están preferencialmente bajo control de los sensores de voltaje y estarían asociados a las chispas evocadas mientras que los RyR3 estarían más bien asociados a los eventos espontáneos derivados por fluctuaciones de Ca. Sin embargo una dificultad para esta interpretación se deriva del hecho de que la morfología de las chispas espontáneas o evocadas es la misma. Una observación interesante se refiere a la presencia de una fluorescencia difusa no asociada

con chispas bien definidas evocada por pulsos despolarizantes pequeños. Esta fluorescencia parece estar asociada a las bandas sarcoméricas, mostrando niveles mayores en las regiones triádicas.

La señal de Ca promediada espacialmente tiene una forma monofásica coincidente con, y sostenida durante, el pulso. En raras oportunidades se observaron chispas a nivel de la zona triádica, montadas encima de la fluorescencia difusa. En respuesta a pulsos de mayor amplitud, por ejemplo a -58 mV, la generación de varias chispas, al comienzo del pulso resulta en generación de un pico de fluorescencia montado encima de un componente basal sostenido. Al igual que ocurre con las señales de Ca globales (Pizarro *et al*, 1992), tanto el pico como el componente sostenido de fluorescencia aumentan de amplitud con pulsos más grandes. En presencia de tetracaína las chispas y el primer pico de fluorescencia desaparecen mientras que el componente sostenido permanece.

Estos resultados pudieran indicar que los sensores de voltaje activan la liberación de eventos más pequeños que las chispas y que estos sirven para activar más liberación de canales cercanos, por un mecanismo de liberación de Ca inducida por Ca.

Visualización de la actividad de las unidades liberadoras de Ca

En un trabajo pionero, Vergara y colaboradores (Vergara *et al*, 1991) habían podido obtener imágenes de la distribución del Ca a varios tiempos durante un episodio de liberación de Ca inducido por estímulo eléctrico, utilizando los colorantes fluorescentes Fluo-3 y Rhod 2, un sistema de iluminación basado en lámparas de halógeno o mercurio de 100 W y una cámara de video CCD. En un trabajo posterior (Monck *et al.*, 1994) superaron la limitación de la baja frecuencia de adquisición de imágenes con la cámara de video (30 imágenes por s), utilizando un láser pulsado (300 ns) de alta intensidad y una cámara CCD. Con este sistema lograron registrar imágenes de los gradientes de Ca intrasarcoméricos con alta resolución espacial y temporal.

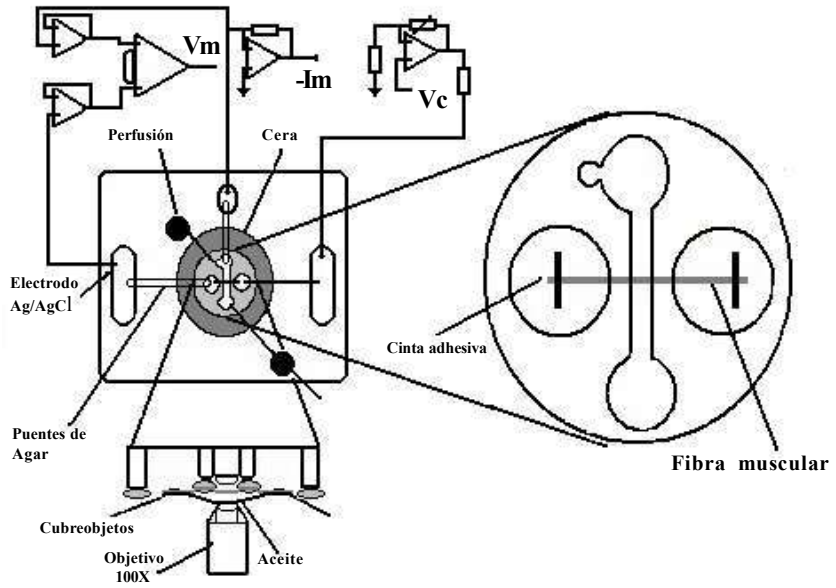


Figura 9.25. Cámara experimental invertida, cuyo fondo es un cubre-objeto que permite utilizar un objetivo de inmersión de aceite 100x para visualizar los sitios intrasarcomerico de liberación de calcio. La fibra muscular cortada esta bajo condiciones de control de potencial con la técnica de dos sellos de Vaselina. (*Cortesia del Dr Ariel Escobar*).

En los paneles A y C el punto confocal esta posicionado a nivel de la línea Z, mientras que en el panel B esta posicionado en el centro del sarcómero. Los registros en la parte inferior muestran los transitorios de Ca correspondientes a los puntos a, b y c. Nótese cómo el curso temporal del registro b, es más lento, especialmente en la fase de ascenso, indicando un retraso difusional del Ca, cuyos sitios de liberación se encuentran a nivel de la línea Z.

Un avance técnico importante fue logrado por Escobar y colegas (1994) con el diseño de una nueva cámara experimental invertida cuyo diagrama se muestra en la figura 9.25, que permitía colocar los sellos de vaselina directamente sobre el fondo de la cámara constituido por un cubre-objeto, disminuyendo de esta manera

la distancia entre la fibra y el objetivo, permitiendo así el uso de un objetivo de inmersión de gran aumento (100X). Escobar y colegas (1994) lograron iluminar una pequeña área, de 0,5 μm de radio, en un sarcómero, pudiendo registrar transitorios de Ca en el punto en que el colorante deentro de la fibra era exitado por la luz. El punto de luz podía ser posicionado en diferentes regiones del sarcómero, como se muestra en la figura 9.26.

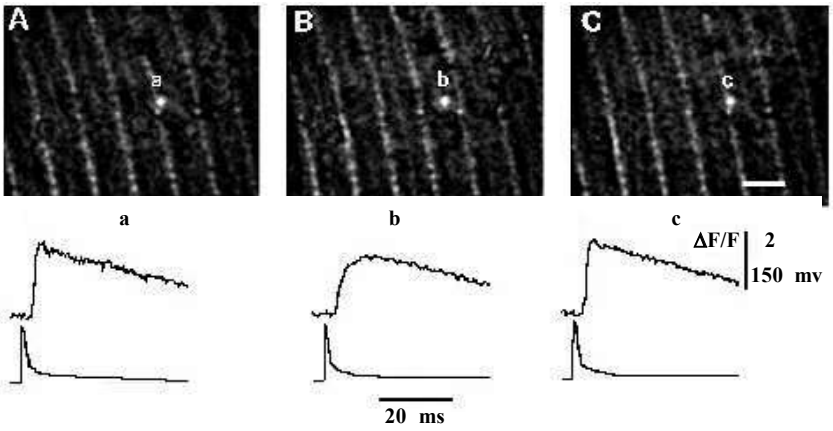


Figura 9. 26. Registro de transitorios de Ca intrasarcomericos utilizando la técnica de punto confocal, en una fibra cuyos túbulos T están teñidos con di-8-Anepps. En los paneles A y C el punto confocal esta posicionado a nivel de la línea Z, mientras que en el panel B esta posicionado en el centro del sarcómero. Los registros en la parte inferior muestran los transitorios de Ca correspondientes a los puntos a, b y c. Nótese cómo el curso temporal del registro b, es mas lento, especialmente en la fase de subida, indicando un retraso difusional del Ca, cuyos sitios de liberación se encuentran a nivel de la línea Z. (*Cortesía del Dr Ariel Escobar*).

De esta manera pudieron determinar las diferencias en las características espacio-temporales de las señales de Ca obtenidas a nivel de la línea Z y de la línea M.

Como se ve en la figura la fase de subida de la señal registrada a nivel de la línea Z es más rápida de aquella registrada a nivel de la línea M, demostrando que los sitios de liberación estan próximos a la línea Z, y que la señal en M presenta un retardo difusional, que origina la formación de gradientes de Ca intrasarcoméricos.

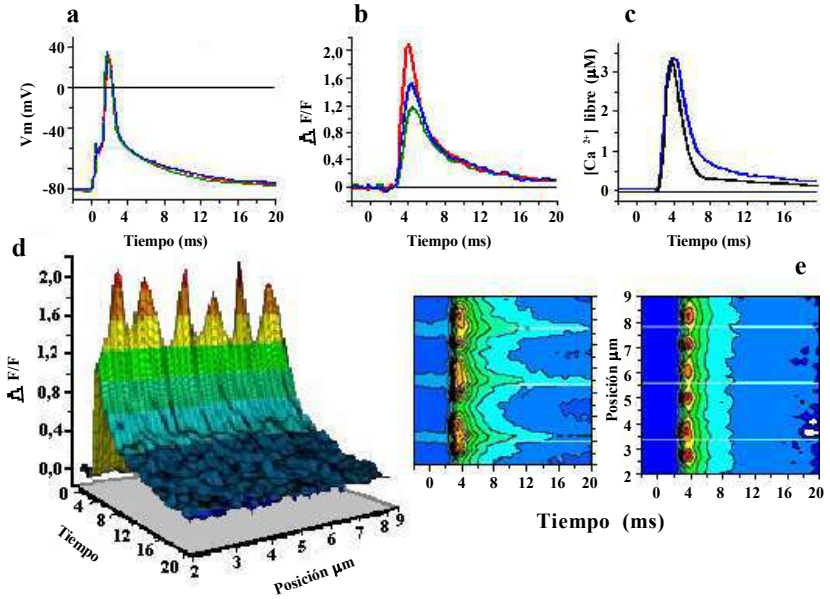


Figura 9.27. Transitorios de Ca localizados y microdominios de Ca en una fibra muscular de ratón. El panel a) muestra una sobreposición de 3 potenciales de acción registrados con un microelectrodo intracelular, El panel b)muestra tres transitorios de Ca en respuesta a los potenciales de acción en a) registrados en distintas regiones sarcoméricas. En c) se muestran los flujos de liberación de Ca correspondientes. En los paneles Inferiores se muestran: en d) la reconstrucción en tres dimensiones de los microdominios de Ca asociados a los transitorios de Ca mostrados en b), y en e y f mapas de contorno. (*Cortesía Prof. Julio Vergara*).

Imágenes obtenidas con pulsos de iluminación laser de 300 ns, aplicados a diferentes tiempos después de estimular una fibra, confirmaron la formación y disipación de gradientes intrasarcoméricos de Ca. Esta fué la primera demostración directa de que la liberación de Ca, en fibras musculares de rana ocurre a nivel de la zona en que se encuentran las cisternas terminales del RS.

En un trabajo más reciente del laboratorio de Julio Vergara, DiFranco y colegas (2008), utilizando una técnica mejorada para la detección de punto confocal, han logrado registrar el aumento de la [Ca], inducido por un potencial de acción, a nivel subsarcomérico,

en fibras musculares de mamífero (ratón), como se ilustra en los registros superiores de la figura 9.27.

En el panel a) se muestran tres potenciales de acción sobrepuestos, que corresponden a las tres señales (DF/F) de fluorescencia del indicador OGB-5N (Oregon-Green 488 - BAPTA - 5N, mostradas en el panel b), y registradas respectivamente a nivel de las triadas (trazo rojo), de la línea Z (trazo azul), y de la línea M (trazo verde). El panel c) muestra el transitorio de Ca y el correspondiente flujo de liberación de Ca correspondientes a la señal registrada a nivel de las triadas. En el panel d) de la figura 9.27, la reconstrucción tridimensional de los microdominios de Ca obtenidos en el segmento de la fibra bajo análisis, muestra tres pares de dominios estrechos de muy alta fluorescencia, un par por cada sarcómero, que alcanzan el valor máximo de DF/F, panel d, en aproximadamente 4 ms, y se disipan igualmente de rápido.

La distribución espacial y la dependencia temporal de los microdominios de Ca se visualizan mejor utilizando los mapas de contorno de la senal cruda de fluorescencia, panel e), o de la señal (ΔF/F), panel d. En estas últimas imágenes se ha marcado la posición de la línea Z, con líneas horizontales blancas, para indicar que los dominios de Ca se encuentran a los dos lados de la línea Z y tienen sus máximos en posiciones que coinciden con la localización de los tubulos T.

La figura 9.28 muestra claramente la coincidencia espacial de los tubulos-T con los microdominios de liberación de Ca, confrontando un mapa de contorno de la señal (DF/F), panel a, con la localización de la triadas obtenida utilizando microscopia de 2 fotones para identificación de los túbulos-T teñidos con di-8-ANEPPS, panel b.

Estos resultados muestran directamente que, en músculos de mamíferos, los microdominios de Ca están espaciados a intervalos iguales, se encuentran a los lados de las líneas Z, presentan una amplitud similar en sus picos y que su valor máximo se encuentra centrado en la localización de los túbulos-T, mientras que su valor mínimo se encuentra a nivel de la línea M, y que a nivel de las

líneas Z los microdominios presentan una amplitud intermedia. Es importante notar que la caracterización funcional de los micro-dominios de Ca están en clara coincidencia con la información obtenida en estudios estructurales sobre la localización en los sarcómeros de las unidades liberadoras de Ca.

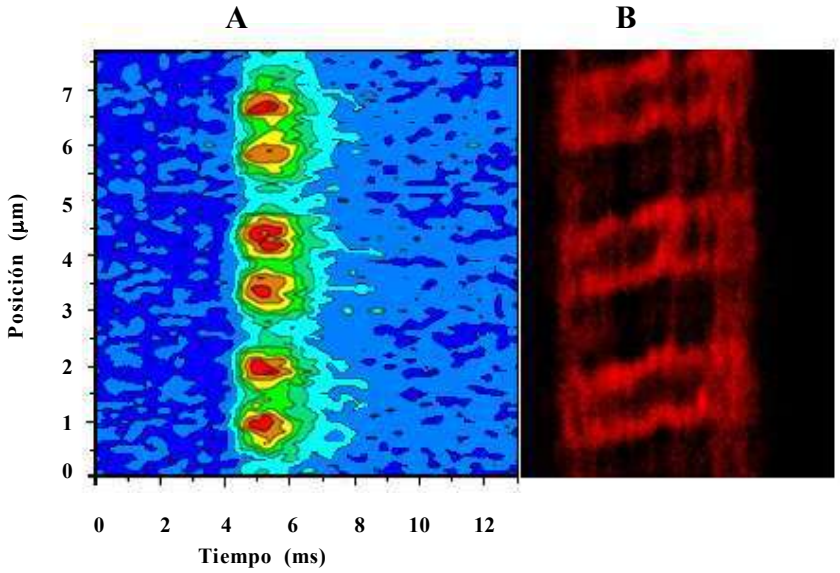


Figura 9.28. El panel a la izquierda muestra un mapa de contorno de una región de una fibra, mientras que en el panel a la derecha se muestra una imagen de la misma región, obtenida con un microscopio confocal de dos fotones de los túbulos-T, teñidos con di-8-anepps. (*Cortesía del Prof. Julio Vergara*).

LECTURAS RECOMENDADAS

AIDLEY, DAVID, J.

1991. *The Physiology of excitable cells*. 3d Edition. Cambridge University Press. Cambridge.

BOURNE, GEOFFREY H.

1973. *The structure and function of Muscle* 2nd Edition. Volume I.II, y III. Academic Press. New York

DAWSON, H.

1970. *A textbook of General Physiology*. 4th Edition. JandA Churchill. London,

FAIN, GORDON L.

1999. *Molecular and Cellular Physiology of Neurons*. Harvard University Press. Cambridge, Mass.

HILL, A. V.

1965. *Trails and Trials in Physiology*. Edward Arnold Ed. London.

HILLE, B.

2001. *Ion Channels of Excitable Membranes.* 3d Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Mass.

HUXLEY, A. F.

1971. Neeedham Dorothy M. *Machina Carnis*. Cambridge University Press.

PEACHEY, LEE D.

1983. *Handbook of Physiology. Section 10. Skeletal Muscle.* American Physiological Society. Bethesda, Maryland.

SZENT-GYÖRGYI, A.

1948. *Nature of Life. A study on muscle*. Academic Press. New York.

BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT, B. C. AND X. M. AUBERT

1952. Changes of energy in a muscle during very slow stretches. *Proc. Roy. Soc.,* B. 139:104.

ABBOTT, B. C. AND R. J. BASKIN

1962. Volume changes in frog muscle during contraction. *J. Physiol*., 161:379.

ADRIAN, R. H.

1956. The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. *J. Physiol*., 133(3): 631.

1960. Potassium chloride movement and the membrane potential of frog muscle. *J. Physiol*., 151: 154.

ADRIAN, R. H. AND W. ALMERS

1976a. The voltage dependence of membrane capacity. *J Physiol.,* 254: 317.

1976b. Charge movement in the membrane of striated muscle. *J. Physiol.,* 254: 339.

ADRIAN, R. H., W. K. CHANDLER, AND A. L. HODGKIN

Voltage clamp experiments in striated muscle fibers. *J Physiol.,* 208: 607.1970.

ADRIAN, R. H., W. K. CHANDLER, , AND R. F. RAKOWSKI

1976. Charge movement and mechanical repriming in skeletal muscle. *J Physiol.,* 254:361.

ADRIAN, R. H., L. L. COSTANTIN, AND L. D. PEACHEY

1969. Radial spread of contraction in frog uscle fibers. *J Physiol.,* 204: 231.

ADRIAN, R. H. AND A. PERES

1979. Charge movement and membrane capacity in frog muscle. *J Physiol.,* 289: 83.

ALMERS W.

1978.Gating currents y charge movements in excitable membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 82: 96-189.

ALMERS W. AND P. T. PALADE

1981. Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurementswith a Vaseline gap technique. *J. Physiol.,* 312:159-176.

ALMERS, W., R. FINK AND P. T. PALADE

1981. Calcium depletion in frog muscle tubules: the decline of calcium current under maintained depolarization. *J. Physiol.,* 312: 177-207.

ANDERSEN, J. P.

1995. Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase by site directed mutagenesis. *Biosci Rep*., 15: 243.

ANDERSEN J. P., T. L. SORENSEN, K. POVLSEN AND B. VILSEN

2001. Importance of transmembrane segment M3 of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase for control of the gateway to the Ca^{2+} sites. *J Biol Chem*., 276: 23312–21.

ANDERSSON-CEDERGREN, E.

1959. Ultrastructure of motor endplate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastr. Res. Suppl*. I: 1-191.

APKON, M.

2003. Cellular Physiology of skeletal, cardias and smooth muscle. Chapter 9. (230-254). En: Boron y Boulpaep. *Medical Physiology.* Elsevier.

ARMSTRONG C. M. AND F. BEZANILLA

1973. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*, 242: 459-61.

ARMSTRONG C. M., P. M. BEZANILLA AND P. HOROWICZ

1972. Twitches in the presence of ehtylene glycol bis (β-aminoehtyl ether)-N,N' -tetraacetic acid. *Biochem Biophys Acta,* 267: 605-08.

ASHLEY, C. C.

1967. The role of cell calcium in the contraction of single cannulated muscle fibers. *Am. Zool.,* 7(3): 647-59.

ASHLEY C. C AND D. G. MOISESCU

1972. Model for the action of calcium in muscle. *Nat New Biol.,* 14. 237(76):208-211.

ASHLEY, C. C. AND E. B. RIDGWAY

1970. On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in single barnacle muscle fibers. *J. Physiol.,* 209(1): 105-130.

ASTBURY, W. T.

1947. On the structure of biological fibers and the problem of muscle. Croonian Lecture. *Proc. Roy. Soc.,* B. 134: 303-328.

AUBERT, X.

1952. The heat of muscular contraction in relation to the tension developed. *J. Physiol.,* (Paris). 44:206-208.

1956. Structure and physiology of the striated muscle. I. Contractile mechanism in vivo; mechanical and thermal aspects. *J. Physiol.,* (Paris). 48:105-153.

AVILA, G. AND R. T. DIRKSEN

2000. Functional impact of the ryanodine receptor on the skeletal muscle L-type $Ca^{(2+)}$ channel. *J. Gen. Physiol.*, 115(4): 467-80.

2005. Rapamycin and FK506 reduce skeletal muscle voltage sensor expression and function. *Cell Calcium,* 38(1): 35-44.

AXELSSON, J. AND S. THESLEFF

1958. Activation of the contractile mechanism in striated muscle. *Acta Physiol. Scan.,* 44: 55-66.

BAILEY, K.

1942. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Biochem. Journ*., 36, 121.

1948. Tropomyosin: a new asymmetrical protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.*, 43: 271.

BANGA, I.

1943. The phosphatase activity of myosin. Studies from the Institute of medical chemistry, University of Szeged, 1: 27.

BANGA, I. AND A. SZENT-GYÖRGYI

1943. Preparation and properties of myosin A and B. Studies from the Institute of Medical Chemistry, University of Szeged, 1:5.

BARRETT, N. AND E. F. BARRETT

1978. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: blockade by high extracellular concentrations of calcium buffers. *Science,* 200 (4347): 1270-1272.

BARRY W. H. AND L. D. CARNAY

1969.Changes in light scattered by striated muscle during excitation-contraction coupling. *Am. J. Physiol.,* 217: 1425.

BAYLOR S. M. , W. K. CHANDLER AND M. W. MARSHALL

1982. Dichroic components of Arsenazo III and Dichlorophosphonazo III signals in skeletal muscle fibers. *J. Physiol.,* 331, 179-210.

BAYLOR S. M. , W. K. CHANDLER AND M. W. MARSHALL

1983. Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibers estimated from Arsenazo III calcium transients. *J. Physiol.,* 344: 625-666.

BAYLOR SM AND HOLLINGWORTH S.

1988. Fura-2 calcium transients in frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol.*, 403: 151-192.

BAYLOR SM AND OETLIKER H.

1977a. A large birefringence signal preceding contraction in single twitch fibres of the frog. *J. Physiol.,* (Lond). ; 264: 141-62.

1977b. The optical properties of birefringence signals from single muscle fibres. *J. Physiol.,* (Lond).; 264: 163-98.

BEATY G.N. AND E. STEFANI

1976. Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibres of the frog. Proc. R. Soc. London B 194: 141.

BEELER, G. W., JR. AND H. REUTER

1970. Membrane calcium current in ventricular myocardialfibers. *J. Physiol.*, 207, 191-209.

BEELER, T.J., R. H. FARMEN AND A. M. MARTONOSI

1981. The mechanism of voltage sensitive dye responses on Sarcoplasmic Reticulum. J. Membrane Biol. 62: 113.

BELLEMANN P., D. FERRY, F. LÜBBECKE AND H. GLOSSMAN

1981. 3H]-Nitrendipine, a potent calcium antagonist, binds with high affinity to cardiac membranes. *Arzneimittelforschung*. 31(12):2064-2067.

BENDALL, J. R.

1953. Further observations on a factor (the 'Marsh' factor) effecting relaxation of ATP-shortened muscle-fibre models, and the effect of Ca and Mg ions upon it. *J. Physiol.*, 121: 232

BENNETT, H.S. AND K.R. PORTER

1955. An electron microscope study of the sectioned breast muscle of the domestic fowl. *Am. J. Anat*., 93: 61

**BERNSTEIN, J.*

1902. Untersuchungen der Thermodynamik der bioelektrishen Ströme. *Pflügers Arch. f.d.ges. Physiol.,* 92:521.1902.

**BERNSTEIN, J.*

1912. Elektrobiologie. Braunschweig, Vieweg und Sohn.

1915. Experimentelles und kritischen Theorie des Muskelkontraktion. *Arch. f. ges. Physiol.,* 162:1

**BERZELIUS, J.*

1848. Jahres-Bericht ubre die Fortschritte der Chemie und mineralogie. Vol 27.

BEZANILLA, F., C. CAPUTO, H. GONZÁLEZ-SERRATOS AND R. A. VENOSA

1972. Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibres of the frog. *J Physiol.,* (Lond). 223: 507-23.

BEZANILLA, F. AND P. HOROWICZ

1975. Fluorescence intensity changes associates with contractile activation in frog muscle staines with nile blue *A. J. Physiol.*, 246: 709-735.

BEZANILLA, F., J. VERGARA AND R. E. TAYLOR

1982. Voltage clamping of excitable membranes. *Methods Exp. Physics,* 20: 445-511.

BIANCHI, C. P. AND T. C. BOLTON

1967. Action of local anesthetics on coupling systems in muscle. *J Pharmacol Exp Ther.,*157: 388-405.

BIANCHI, C. P. AND A. M. SHANES

1959. Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contracture. *J. Gen. Physio*., 42: 803.

BIGELOW D.J. AND G. INESI

1992. Contributions of chemical derivatization and spectroscopic studies to the characterization of the Ca^{2+} transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta,* 1113: 323–338.

BLINKS J. R., R. RUDEL AND S. R.TAYLOR

1978. Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibers: detection with aequorin. *J Physiol.,* 277: 291-323.

BLOCK, B. A., T. IMAGAWA, K. P. CAMPBELL AND C. FRANZINI-ARMSTRONG

1988. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol.,* 107: 2587-2600.

**BOIS-REYMOND, E.*

1848. du. Untersuchungen über tierische Elektricität. Berlin, G. Reimer.

BOLAÑOS, P.,C. CAPUTO AND E. VELAZ

1986. Effects of calcium, barium and lanthanum on depolarization-contraction coupling in skeletal muscle fibers of *Rana pipiens*. *J. Physiol,*. 370: 39-60.

BOLAÑOS, P., A. GUILLEN, ET AL.

2008. The use of Calcium Orange-5N as a specific marker of mitochondrial Ca^{2+} in mouse skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch* 455(4): 721.

BORELLI, A. DE MOTU

1681. Animalium. Roma

BORSOTTO, M., J. BARHANIN, R. I. NORMAN AND M. LAZDUNSKI

1984. Purification of the dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca^{2+} channel from skeletal muscle transverse tubules using (+) [3H]PN 200-110. *Biochem Biophys Res Commun.,* 16;122(3):1357-1366.

BORSOTTO, M., R. I. NORMAN, M. FOSSET AND M. LAZDUNSKI

1984. Solubilization of the nitrendipine receptor from skeletal muscle transverse tubule membranes. Interactions with specific inhibitors of the voltage-dependent Ca^{2+} channel. *Eur J Biochem*., 142(3):449-455.

**BOWMAN, W.*

1840. On the minute structure and movements of voluntary muscle. *Phil. Trans. Roy. Soc.,* Lond., p. 457

BOYLE, P. J. AND E. J. CONWAY

1941. Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J Physiol,* 100, 1-63.

BOZLER, E.

1952. Evidence of an ATP-actomyosin complex in relaxed muscle and its response to calcium ions. *Am J Physiol.,* 168(3):760-765.

BOZLER, E.

1954. Interactions between magnesium, pyrophosphate, and the contractile elements. *J. Gen. Physiol.,*20;38(1):53-58.

BOZLER, E.

1954. Relaxation of extracted muscle fibers.. *J Gen. Physiol*., 20;38(2):149-159.

BREHM, P. AND R. ECKERT

1978. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science*, 202: 1203-1206.

**BRÜCKE, E.*

1858. Untersuchungen über den Bau der Muskelfasern mit Hülfe des polarisirten Lichtes. *Denksch. d.kais. Akad. d. Wissensch.* Math.-nat. Kl., 15, 69.

BRUM, G. AND E. RÍOS

1987. Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2. [erratum appears in *J Physiol* (Lond) 1988 Feb;396:581] *Journal of Physiology* 387: 489-517.

BRUM, G., E. RÍOS AND E. STEFANI

1988. Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibers. *Journal of Physiology,* 398: 441-73.

BRUM, G., R. FITTS, G. PIZARRO AND E. RÍOS

1988. Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *Journal of Physiology,* 398: 475-505.

BUCHTAL, F., G. G. KNAPPEIS AND J. LINDHARD

1936. Die struktur der quergerstreiften lebeden Muskelfaser des Frsches in Ruhe und wärhend der Kontraktion. *Skand. Arch.f. Physiol*., 73: 163.

BUCHTAL, F., G. G. KNAPPEIS AND T. SJÖSTRAND

1939. Optisches Verhalten den querstreiften Muskelfaser im natürlichen. *Licht. Skand. Arcvh. Physiol.,* 82: 225.

CAIN, D. F. AND R. E. DAVIES

Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. Biochem. *Biophys, Res. Comm.,* 8: 361.

CAIN, D. F., A. A. INFANTE AND R. E. DAVIES

1962. Adensosine triphosphate and phosphorylcreatine as energy suppliers for single contractions of working muscle. *Nature,* 196: 214.

CAIN, D. F., A. A. INFANTE AND R. E. DAVIES

1962. Chemistry of muscle contraction. Adenosine triphosphate and phosphorylcreatine as energy supplies for single contractions of working muscle. *Nature,* Lond. 196:214-217.

CAMPBELL D.T. AND B. HILLE

1976. Kinetic and pharmacological properties of the sodium channel of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol*., 67(3):309-323.

CAMPBELL, K., C. KNUDSON, T. IMAGAWA, A. LEUNG, J. SUTKO, S. KAHL, C. RAAB AND L. MADSON

1987. Identification and characterization of the high affinity [^{3}H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem*., 262: 6460-6463.

CAMPBELL, K. P., A. T. LEUNG AND A. H. SHARP

1988. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci*., 11 (10):425-430. Review

CANNELL, M. B. AND D. G. ALLEN

1984. Model of calcium movement during activation in the sarcomere of frog skeletal muscle. *Biophys J*. 45, 913.

CAPUTO, C.

1972a. The effect of low temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibers. *J. Physiol.,* (Lond). 223: 461-482.

1972b. The time course of potassium contractures of single muscle fibers. *J. Physiol*., 223, 483-505.

1976. The effect of caffeine and tetracaine on the time course of potassium contractures of single muscle fibers. *J. Physiol.,* 255(1):191-207

1981. Nickel substitution for calcium and the time course of potassium contractures of single muscle fibers. *J. Muscle Res. and Cell Motil.* 2: 167-182.

CAPUTO, C., F. BEZANILLA AND P. HOROWICZ

1984. Depolarization-Contraction coupling in short frog muscle fiber. A voltage clamp study. J. GEN. PHYSIOLOGY., 84: 133-154.

CAPUTO, C. AND P. BOLAÑOS

1989. Effects of D-600 on intramembrane charge movement of polarized and depolarized frog muscle fibers. *Journal of General Physiology* 94(1): 43-64.

CAPUTO, C., K. A. P. EDMAN, F. LOU AND Y. SUN

1994. Variation in myoplasmic Ca^{2+} concentration during contraction and relaxation studied by the indicator fluo-3 in frog muscle fibers. *J. Physiol.,* 478:137.

CAPUTO, C. AND P. FERNANDEZ DE BOLAÑOS

1979. Membrane potential, contractile activation and relaxation rates in voltage clamped short muscle fibres of the frog. *J. Physiol.,* (Lond). 289: 175

CAPUTO, C., C. GERDAY, J. R. LÓPEZ, S. R. TAYLOR AND P. BOLAÑOS

1998. Opposite effects of cooling on twitch contractions of skeletal muscle isolated from tropical toads (Leptodactylidae) and northern frogs (Ranidae). *J. Comp. Physiol.* [B]. 168: 600-610.

CAPUTO, C. AND M. GIMÉNEZ

1967. Effects of external calcium depriva-tion of single muscle fibers. *J. Gen Physiol.*, 50(9): 2177-2195.

CAPUTO, C., J. VERGARA AND F. BEZANILLA

1979. Local anaestetics inhibit tension development and Nile Blue fluorescence signals in frog skeletal muscle fibers. *Nature*, 277: 400-401,

CARLSEN, F. AND G. G. KNAPPEIS

1955. The anisotropic and isotropic bands of skeletal muscle in light- and electron microscopy. *Exp Cell Res.,* 8(2): 329-335.

CARLSEN, F., G. G. KNAPPEIS AND F. BUCHTAL

1961. Ultrastructure of the resting and contracted striated muscle fiber at different degrees of stretch. *J Biophys Biochem Cytol.*, 11: 95.

CARLSON, F. D., D. J. HARDY AND D. R. WILKIE

1963. Total energy production and phosphocreatine hydrolysis in the isotonic twitch. *J. Gen. Physiol.,*46:851-882

CARNAY, L. D. AND W. H. BARRY

1969. Turbidity, birewfringence and fluorescence changes in skeletal muscle coincident with the action potential. *Science,* 165:608.

CASAS, M., R. FIGUEROA, G. JORQUERA, M. ESCOBAR, J. MOLGÓ AND E. JAIMOVICH

2010. IP(3)-dependent, post tetanic calcium transients induced by electro stimulation of adult skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.,* 136: 455-467.

CATTERALL, W.A.

1993. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci*., 16:500-506.

CHANDLER, W. K. AND M. F. SCHNEIDER

1976. Time-course of potential spread along a skeletal muscle fiber under voltage clamp. *J. Gen. Physiol.,* 67(2): 165-184.

CHANDLER, W. K., R. F. RAKOWSKI AND M. F. SCHNEIDER

1976. A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.,* 254(2): 245-283.

1976. Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J. Physiol*., 254(2): 285-316.

CHENG, H., W. J. LEDERER AND M. B. CANNELL

1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science,* 262:740-744.

CHU, A., P. VOLPE, B. COSTELLO AND S. FLEISCHER

1986. Functional characterization of junctional terminal cisternae from mammalian fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry,* 16;25(25):8315-8324.

CIVAN, M. M. AND R. J. PODOLSKY

1966. Contraction kinetics of striated muscle fibers following quick changes in load. *J. Physiol.,* 184(3): 511-534

COHEN, L. B., R. D. KEYNES AND B. HILLE

1968. Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature*, Lond. 218: 438-441.

COHEN, L. B., B. HILLE AND R. D. KEYNES

1970. Changes in axon birefringence during the action potential. *J. Physiol*., 211:495.

COHEN, L. B., B. HILLE AND R. D. KEYNES, D. LANDOWNE AND E. ROJAS

1971. Analysis of the potential dependent changes in optical retardation in the squid axon. *J. Physiol*., 218: 205-237.

COLE, K. S.

1968. *Membranes, Ions and Impulses.* University of California Press.

COLE, K. S. AND H. J. CURTIS

1939. Electric Impedance of the Squid Giant Axon During Activity. *J. Gen. Physiol.,* 22(5): 649-670.

COLLINS, C. A., E. ROJAS AND B. A. SUAREZ-ISLA

1982. Fast charge movements in skeletal muscle fibers from *Rana temporaria*. *J. Physiol*., 324: 319–345.

CONNOLLY, R., W. GOUGH AND S. WINEGRAD

1971. Characteristics of the isometric twitch of skeletal muscle immediately after a tetanus. A study of the influence of the distribution of calcium within the sarcoplasmic reticulum on the twitch. 57: 697-709.

COSTANTIN, L. L.

1968. The effect of calcium on contraction and conductance thresholds in frog skeletal muscle. *J. Physiol.,* 195(1):119-132.

COSTANTIN, L. L. AND R. J. PODOLSKY

1967. Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol*., 50(5): 1101-1124.

CSERNOCH, L., G. PIZARRO, I. URIBE, M. RODRIGUEZ AND E. RÍOS

1991. Interfering with calcium release suppresses I gamma, the "hump" component of intramembranous charge movement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.,* 97(5): 845-884

CSERNOCH, L., V. JACQUEMOND AND M. F. SCHNEIDER

1993**.** Microinjection of strong calcium buffers suppresses the peak of calcium release during depolarization in frog skeletal muscle fibers.*J. Gen. Physiol.,*101(2):297-333.

CURTIN, N. A., J. V. HOWARTH AND R. C. WOLEDGE

1983. Heat production by single fibers of frog muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil*., 4: 207.

CURTIS, B. A.

1963. Some effects of Ca- free choline Ringer solution on frog skeletal muscle. *J. Physiol.,* London. 166, 75.

1966. Ca fluxes in single twitch muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 50, 255.

CURTIS, B. M. AND W. A. CATTERALL

1984. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, 23:2113.

1986. Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, 25: 3077-83.

DAINTY, M., A. KLEINZELLER, A. S. C. LAWRENCE, M. MIALL, J. NEEDHAM, D. M. NEEDHAM AND S. C. SHEN

1944. Studies on the anomalous viscosity and flow- birefringence of protein solutions. III. Changes in the properties of myosin solutions in relation to adenosnetriphosphate and muscular contraction. *J. Gen. Physiol.*, 27,355.

DEL CASTILLO, J., A. RIVERA Y F. RAMÓN

1966. La electricidad animal y los primeros pasos de la electrofisiología. (Cap 8 :217). En: *Biofisica y Fisilogia Celular.* Latorre R., Lopez-Barneo, J., Bezanilla F. y Llinas editors. Universidad de Sevilla.

DICKINSON, V. A. AND, R. C. L. WOLEDGE

1973. The thermal effects of shortening in tetanic contractions of frog muscle. *J. Physiol.,* 233:659-671.

DIFRANCO, M, C. E. WOODS, J. CAPOTE AND J. L. VERGARA

2008. Dystrophic skeletal muscle fibers display alterations at the level of calcium microdomains. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* U S A. 23;105(38):14698-14703.

DODGE, F. A. AND B. FRANKENHAEUSER

1958. Membrane currents in isolated frog nerve fibre under voltage clamp conditions. *J. Physiol*., 143(1): 76-90.

DONALDSON, S. K., N. D. GOLDBERG, T. F. WALSETH AND D. HUETTEMAN

1988. Voltage dependence of inositol 1,4,5-triphosphate- induced Ca release in peeled skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA 85: 5749-5753.

DUGGAN, P. F. AND A. MARTONOSI

1970. The permeability of sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Gen. Physiol.,* 56:147.

DULHUNTY A. F., P. R. JUNANKAR AND C. STANHOPE

1992. Extra-junctional ryanodine receptors in the terminal cisternae of mammalian skeletal muscle fibers. *Proc. Biol. Sci.,* 247(1318): 69-75.

DULHUNTY, A. F., D. R. LAVER, E. M. GALLANT, M. G. CASAROTTO, S. M PACE, AND S. CURTIS

1999. Activation and inhibition of skeletal RyR channels by a part of the skeletal DHPR II-III loop: effects of DHPR Ser687 and FKBP12. *Biophys. J.,* 77(1): 189-203.

DULHUNTY, A. F., P. H. ZHU, M. F. PATTERSON AND G. AHERN

1992. Actions of perchlorate ions on rat soleus muscle fibers. *J. Physiol.,* 448: 99-119.

EBASHI, F. AND S. EBASHI

1962. Removal of calcium and relaxation in actomyosin systems. *Nature,* 194: 378-379.

EBASHI, S.

1959. The mechanism of relaxation in glycerinated muscle fiber (25-34). En: IVth Symposium on Physicochemistry of biomacromolecules, (ed R. Natori) Tokyo: Nanko-do.

1960. Calcium binding and relaxation in the actomyosin system. *J. Biochem.,* 48: 150.

1961a. Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.,* 50: 234-244.

1961b. The role of the relaxing factor in contraction-relaxation cycle of muscle. *Progr. Theor. Phys.* Suppl., 17, 35.

1963. Third component participating in the superprecipitation of "natural actomyosin". *Nature,* 200:1010.

1972. Separation of troponin into its three components. *J. Biochem.,* 72(3): 787-790.

1980. *The Croonian Lecture, 1979*: Regulation of muscle contraction. *Proc. Roy. Soc.* Lond.B. 207:259.

EBASHI, S. AND F. EBASHI

1964. A new protein component participating in the superprecipitation of myosin B. *J. Biochem*., 55, 604.

EBASHI, S. AND M. ENDO

1968. Calcium ion and muscle contraction. *Prog. in Biophys. Mol. Bio.,* 18: 23.

EBASHI, S., M. ENDO AND I. OTSUKI

1969. Control of muscle contraction. *Q. Rev. Biophys*., 2: 351-384.

EBASHI, S. AND A. KODAMA

1965. A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J. Biochem.,* 58(1):107-108.

1966. Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *J. Biochem*., 59(4):425-426

EBASHI, S. AND F. LIPMANN

1962. Adenosine triphosphate-linked concentration of Calcium in muscle *J.Cell. Biol.,* 14:389.

EBASHI, S., I. OHTSUKI AND K. MIHASHI

1973. Regulatory proteuns of muscle with special reference to troponin (215-223). C*old Spring Harbor Symposia on quantitative biology*. Vol. XXXVII . Cold Spring Harbor Laboratory.

EDMAN, K. A. P.

1975. Mechanical deactivation induced by active shortening in isolated muscle fibers of the frog. *J. Physiol.,* 246: 255-275.

1979. The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcómero length and isometric force in vertebrate muscle fibers. *J. Physiol*., 291: 143-159.

1988. Double-hyperbolic force-velocity relation in frog muscle fibers. *J. Physiol.* 404: 301-321.

1999. The force bearing capacity of frog muscle during stretcg: its relation to sarcomere length and fibre width. *J. Physiol.,* 519: 515.

EDMAN, K. A. P, C. CAPUTO AND F. LOU

1993. Depression of tetanic force induced by loaded shortening of frog muscle fibers. *J. Physiol.,* 466: 535-552.

EDMAN, K. A. P., G. ELZINGA AND M. I. M. NOBLE

1978. Enhancement of mechanical performance by stretch during tetanic contractions of vertebrate skeletal muscle fibers. *J. Physiol*., 281: 139-155.

EDMAN, K. A. P. AND A. KIESLING

1971. The time course of the active state in relation to sarcomere length and movement studied in single skeletal muscle fibers of the frog. *Acta Physiol. Scand.,* 81: 182-196.

EDMAN, K. A. P., A. MÅNSON AND C. CAPUTO

1997. The biphasic force-velocity relationship in frog muscle fibers and its evaluation in terms of cross-bridge function. *J. Physiol.,*.503:141.

EDMAN, K. A. P., L. A. MULIERI AND B. SCUBON-MULIERI

1976. Non-hyperbolic force-velocity relationship in single muscle fibers. *Acta Physiologica Scandinavica,* 98, 143-156.

EDMAN, K. A. P. AND C. REGGIANI

1984. Absence of plateau of the sarcomere length-tension relation in frog muscle fibers. *Acta physiologica Scandinavica,* 122: 213-216.

1987. The sarcómere length-tension relation determined in short segments of intact muscle fibers of the frog. *J. Physiol.,* 385: 709-732.

EGGLETON, P. AND G. P. EGGLETON

1927a. The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog. *Biochem. J*., 21:190.

1927b. The physiological significance of phosphagen. *J. Physiol.,* 63:155.

EISENBERG B.

1983. Skeletal muscle (section 10). En: Handbook of Physiology. Peachey ed. American Physiological Society. Bethesda Maryland USA 1983.

EISENBERG R. S., R. T. MCCARTHY AND R. L. MILTON

Paralysis of frog skeletal muscle fibers by the calcium antagonist D-600. *J. Physiol.,* 341:495-505.

EL-HAYEK R., B. ANTONIU, J. WANG, S. L. HAMILTON AND N. IKEMOTO

1995. Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.,* 270(38):22116-22118.

EL-HAYEK, R., M. YANO AND N. IKEMOTO

1995. A conformational change in the junctional foot protein is involved in the regulation of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. Studies on polylysine-induced Ca^{2+} release. *J. Biol. Chem*., 270(26): 15634-15638.

**EMBDEN, G.*

1924. Untersuchungen über den Verlauf der phosphosäure- und Milchsäure-bildung bei der Muskeltätigkeit. *Klin. Wochensch*. 3: 1393.

ENDO, M.

1964. Entry of a dye into the sarcotubular system of muscle. *Nature*, 202: 1115.

1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*., 57: 71-108.

ENDO, M., TANAKA AND Y.OGAWA

1970. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature*, 228: 3624-3634.

**ENGELHARDT, V.A.*

1946. Adenosintriphosphatase properties of myosin. *Adv. Enzymol.*, 6: 147.

**ENGELHARDT, V.A. AND M. N. LYUBIMOVA*

1939. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature*, 144: 666.

**ENGELHARDT, V.A., M. N. LYUBIMOVA AND R. A. MEITINA*

1941. Chemistry and mechanics of the muscle studied on myosin threads. *Compt. rend. de l' Acad. Sci. de l'URSS*, 30: 644.

**ENGELMAN, T. W.*

1873. Mikroscopische Untersuchungen über die quergerstreifte muakelsubstanz. *Pflügers Archiv.,* 7: 33-71.

ESCOBAR, A. L., J. R. MONCK, J. M. FERNÁNDEZ AND J. L. VERGARA

1994. Localization of the site of Ca^{2+} release at the level of a single sarcomere in skeletal muscle fibers. *Nature*, 367: 739-741.

FABIATO, A. AND F. FABIATO

1978. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and newborn rat ventricles. *Ann. N.Y. Acad. Sc.,* 307: 491-522.

FAIN, G. L.

1999. *Molecular and Cellular Physiology of Neurons.* Harvard University Press, Cambridge MA.

FAIRHURST, A. S. AND W. HASSELBACH

1970. Calcium efflux from a heavy sarcotubular fraction. Effects of ryanodine, caffeine and magnesium. *Eur. J. Biochem.,* 13(3): 504-509.

FALK, G.

1961. Electrical activity of skeletal muscle (259-279). En: *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions.* (A.M. Shanes ed). Publication 69 of the Amer. Assoc. for the Ad. of Science. Washington, D.D.

FALK, G. AND P. FATT

1964. Linear Electrical Properties of Striated Muscle Fibres Observed with Intracellular Electrodes. *Proc. Roy. Soc. Lond B Biol. Sci.* 160: 69-123.

FATT, P. AND B. L. GISNSBORG

1958. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibers. *J. Physiol.,* 142: 516.

FATT, P. AND B. KATZ

1953. The Electrical Properties of Crustacean Muscle Fibers. *J. Physiol.,* I20, 171-

FELDER, E. AND C. FRANZINI-ARMSTRONG

2002. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U S A. 99: 1695-1700.

FENN, W. O.

1923. A quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius muscle of the frog. *J. Physiol*., 58: 175.

1945. Muscles (453-522) Chapter 32. En: *Physical chemistry of cells and tissues*. Hõber *et al*. editors.The Blackiston Company Philadelphia USA.

FENN, W. 0. AND B. S. MARSH

1935. Muscular force at different speeds of shortening. *J. Physiol.,* 85, 277-297.

FICK, A.

1882. Mechanische Arbeit und Warmeentwicklung bei der Muskelthätigkeit. Leipzig, F.A. Brockhaus.

FISKE, C. H. AND Y. SUBBAROW

1927. The nature of inorganic phosphate in voluntary muscle. *Science,* 65: 401.

1928. The isolation and function of phosphocreatine. *Science,* 67:169.

FLETCHER W. M. AND F. G. HOPKINS

1907. Lactic acid in amphibian muscle. *J. Physiol.,* 35:247.

FORD L. E. AND R. J. PODOLSKY

1970. Regenerative calcium release within muscle cells. *Science*, 167: 58-59.

FORD, L. E., A. F.HUXLEY AND R. M. SIMMONS

1977. Tension responses to sudden length change in stimulated frog muscle fibers near slack length *J. Physiol*., , 269, pp. 441-515 441

FORD,L. E., A. F. HUXLEY AND R. M. SIMMONS

1981. The relation between stiffness and filament overlap in stimulated frog muscle fibers *J. Physiol*., 311: 219-249.

FORD,L. E., A. F. HUXLEY AND R. M. SIMMONS

1985. Tension transients during steady shortening of frog muscle fibers. *J. Physiol.,* 361:131-50.

1986. Tension transients during the rise of tetanic tension in frog muscle fibers. *J. Physiol.*,372: 595-609

FRANK, G. B.

1958. Inward movement of calcium as a link between electrical and mechanical events in contraction. *Nature*, 182: 1800.

1960. Effects of changes in extracellular calcium concentration on the potassium-induced contracture of frog's skeletal muscle. *J. Physiol*., 151: 518.

1961. Role of extracellular calcium ions in excitation-contraction coupling in frog's skeletal muscle (293). En: *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions.* Ed. A.M. Shanes, Publ. No. 69, Amer. Ass. Adv. Sci. Washington, D.C.

1980. The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. *Biochem. Pharmaco,* l29: 2399.

FRANKENHAEUSER, B.

1957. A method for recording resting and action potentials in the isolated myelinated nerve fibre of the frog. *J. Physiol.*, 135(3):550-559.

FRANKENHAEUSER, B., B. D. LINDLEY AND R. S. SMITH

1966. Potentiometric measurement of membrane action potentials in frog muscle fibers. *J. Physiol*., 183(1):152-166.

FRANKENHAUSER, B. AND J. LANNERGREEN

1967. The effect of calcium on the mechanical response of single muscle fibers of *Xenopus laevis*. *Acta Physiol. Scand*., 69: 242.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.

1964. Fine structure of sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in muscle fibers. ***Fed. Proc.***, 23: 887.

1970. Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.,* 47: 488.

1980. Structure of Sarcoplasmic Reticulum. *Fed. Proc*., 39: 2403.

1999. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB Journal,* 13 Suppl 2: S266-270.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. AND D. G. FERGUSON

1985. Density and disposition of Ca2+-ATPase in sarcoplasmic reticulum membrane as determined by shadowing techniques. *Biophys J.,* 48: 607-615.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. AND A. O. JORGENSEN

1994. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.,*56:509-534.

FRANZINI-ARMSTRONG , C. AND F. PROTASI

1997. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*., (3):699-729. Review.

FRANZINI-ARMSTRONG, C., F. PROTASI AND V. RAMESH

1999. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical Journal* 77(3): 1528-1539.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. AND G. NUNZI

1983. Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J Muscle Res Cell Motil*., 4: 233-252.

FRANZINI-ARMSTRONG, C., L. LANDMESSER AND G. PILAR.

1975. Size and shape of transverse tubules openings in frog twitch muscle fibers. *J.Cell. Biology*, 64: 493.

**FÜRTH, O. VON ÜBER*

1895. Die Einwirkung von Giften auf die Eiweisskörper des Muskelplasma und ihre Beziehung zur Muskelstarre. *Arch. f. expt. Path.Und Pharmak.,*37: 389.

**GAD, J.*

1893. Zur Theorie der Erregungsvorgänge im Muskel. *Arch.f.Anat. v. Physiol.* 3: 164-174.

GAGE, P. W. AND R. S. EISENBERG

1969. Action potentials, Afterpotentials and Excitation-Contraction coupling in frog sartorius fibers without trasverse tubules. *J. Gen Physiol*.,53: 298.

1969. Capacitance of the surface and trasnverse tubular membrane of frog sartorius muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 53:265.

**GALVANI, L.*

1791. De viribus electricitatis in motu musculari commentarius, Bonon. *Sci. Art. Inst. Acad. Comment*., Bologna, 7: 363-418.

GARCÍA, J., G. PIZARRO, E. RÍOS AND E. STEFANI

1991. Effect of the calcium buffer EGTA on the "hump" component of charge movement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol*., 97: 885.

GASSER, H. S. AND A. V. HILL

1924. The dynamics of muscular contraction. *Proc. Royal Soc*. B 96:398-437.

GERA, S. AND L. BYERLY

1999. Voltage- and calcium-dependent inactivation of calcium channels in Lymnaea neurons. *J Gen Physiol*., 114: 535-550.

GERARD, R. W.

1936. Metabolism and excitation. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.,* 4: 194.

GERDAY, C. AND J. M. GILLIS

1976. Proceedings: The possible role of parvalbumins in the control of contraction. *j. Physiol.*, 258(2): 96P-97P.

GERGELY, J.

1950. A note on the thermodynamics of muscle contraction. *Enzymología*, 14: 220.

GIBBS, C. L., N. V. RICCHIUTI AND W. F. H. M. MOMMAERTS

1966. Activation heat in frog sartorius muscle. *J. Gen. Physiol*., 49: 517-535.

GILLIS, J. M., D. THOMASON, J. LEFEVRE AND R. H. KRETSINGER

1982. Parvalbumins and muscle relaxation: a computer simulation study. *J. Muscle Res. and Cell motil.* 3: 377.

GOLDMAN, D.E.

1943. Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.*, 27: 37.

GOMOLLA, M., G. GOTTSCHALK G AND H.C. LÜTTGAU

1983. Perchlorate-induced alterations in electrical and mechanical parameters of frog skeletal muscle fibers. *Physiol.,*343: 197-214.

GONZÁLEZ, A. Y E. RÍOS

1993. Perchlorate enhances transmission in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J. Gen. Physiol.,* 102(3): 373-421

GONZALEZ, A. AND C. CAPUTO

1996. Ryanodine interferes with charge movement repriming in amphibian skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal,* 70(1): 376-382.

GONZÁLEZ SERRATOS, H.

1971. Inward spread of activation in vertebrate muscle fibers. *J. Physiol.,* 212: 777.

GORDON, A. M., A. F. HUXLEY AND F. J. JULIAN

1966a. Tension development in highly stretched vertebrate muscle fibers. *J. Physiol*. ,184: 143-169.

1966b. The variation in isometrictension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. *J. Physiol.,* 184: 170-192.

GRAF, F. AND H. J. SCHATZMANN

1984. Some effects of removal of external calcium on pig striated muscle. *J. Physiol.,* 349:1-13.

GRYNKIEWICZ, G., M. POENIE AND R. Y. TSIEN

1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.,* 260: 3440-3450.

HAGIWARA, S. AND K. I. NAKA

1964. The initiation of spike potential in Barnacle muscle fibers under low intracellular Ca. *J. Gen Physiol.,* 48: 141.

HAGIWARA, S. AND S. NAKAJIMA

1966. Effect of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a Barnacle. *J. Gen. Physiol.* 49: 807.

**HALLER, A. VON*

1766. *Elementa Physiologiae,* vol 4, Lib x Cerebrum et Nervei. Lausanne,

HALLIBURTON, W.D.

1887. On muscle-plasma. *J. Physiol.*, 8.:133,

HANSON, J.

1968. Recent X-ray diffraction studies of muscle. *Q. Rev. Biophy*. 1:177-216.

HANSON, J. AND H. E. HUXLEY

1953. The structural basis of cross-striations in muscle. *Nature* 172: 530-532.

HANSON, J. AND J. LOWY

1963. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.*, 6: 46.

HARTREE, W. AND A. V. HILL

1921. The regulation of the supply of energy in muscular contracr tion. *J. Physiol.,* 55: 133-158.

HARTSHORNE, D. J. AND H. MUELLER

1969. The prepatation of tropomyosin and troponin fom natural actomyosin. Biochim. *Biophys. Acta.,* 17: 301.

HARTSHORNE, D. J., M. THEINER, M. AND H. MUELLER

1969. Studies on troponin. *Biochim. Biophys. Acta,* 175:320.

HASSELBACH, W.

1953. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Muskelfibrillen bei totaler und partieller Extraktion des L-Myosins. *Z. Naturf.,* 8b: 449-454.

HASSELBACH, W. AND M. MAKINOSE

1961. The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting.]. *Biochem. Z.*, 333: 518-528.

HASSELBACH, W. AND H. H. WEBER

1953. The effect of the Marsh-Bendall factor on the contraction of a fiber model. *Biochim Biophys Acta*, ; 11: 160-1..

HAUGEN, P. AND O. STEN-KNUDSEN

1976. Sarcomre lengthening and tension drop in the latent period of isolated frog sletal muscle fibers.*J.Gen. Physiol*., 68: 246-265.

**HEIDENHAIN, R.*

1864. Mechanishe Leistung, Wärmeentwicklung und Stoffmsatz bei der Muskeltatigkeit. Leipzig, Breitkopf and Härtel.

HEILBRUNN L. V.

1943. An Outline of General Physiology 2nd. Ed. Philadelphia , W.B. Saunders Co.

HEILBRUN, L. V. AND F. J. WIERCINSKI

1947. The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.,* 29: 15.

HEISTRACHER, P. AND C. C. HUNT

1969a. The relation of membrane changes to contraction in twitch muscle fibers. *J. Physiol.,* 201: 589-611.

1969b. The effect of procaine on snake twitch muscle fibres. *J. Physiol.,* (Lond). 201: 627-638.

HELLAM D. C. AND R. J. PODOLSKY

1969. Force measurements in skinned muscle fibres. *J. Physiol.,* London 200: 807.

**HELMHOLTZ,VON. H.*

1847. Physiologische Wärmeentscheinungen. *Fortschr. d. Physik*: 232.

**HERMANN, D.*

1867. Weitere Untersuchungen zur Physiologie dr Musleln un Nereven.Bedrlin, Hirschfeld.

HILL, A. V.

1922. The maximum work and mechanical efficiency of human muscles and their most economical speed. *J. Physiol.,* 56: 19-41.

1938. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc Royal Soc.,* B 126: 136-195.

1948. On the time required for diffusion and its relation to processes in muscle. *Proc Royal Soc. Lond*., 135:446-453.

1948. The heat of activation and the heat of shortening in a muscle twitch. *Proc. Roy. Soc.,* B. 136: 195-211.

1949 b. Work and heat in a muscle twitch. *Proc Royal Soc.,* B 136: 220-228.

1953. The instantaneous elasticity of active muscle. *Proc. Roy. Soc*., B. 141(903): 161-78.

1964. The effect of load on the heat of shortening of muscle. *Proc Royal Soc*., B 159: 297-318.

HILL, A. V. AND J. V. HOWARTH

1959. The reversal of chemical reactions in contracting muscle during an applied stretch. *Proc Royal Soc.*B 151: 169-193.

HILL, A. V. AND L. MACPHERSON

1954. The effect of nitrate, iodide and bromide on the duration of the active state in skeletal muscle. *Proc Royal Soc. Lond*. B Biol Sci, 143: 81-102.

HILL, A. V. AND W. HARTREE

1920. The four phases of heat production of muscle. *J. Physiol.*, 54: 84-128.

HILL, D. K.

1940. The time course of oxygen consumption of stimulated frog‘s muscle. *J. Physiol*., 98:207

1949. Changes in transparency of a muscle during a twitch. *J. Physiol.,* 108: 292

HILL, D. K. AND R. D. KEYNES

1949. Opacity changes in stimulated nerve. *J. Physiol*., 108: 278-281.

HILLE, B. AND D. T. CAMPBELL

1976. An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.,* 67: 265.

HILLE, B.

1991. Ionic Channels of excitable membranes. 2nd Ed. Sinauer Associates Inc Pub, Sunderland MA.

HINSEN, K., N. REUTER, J. NAVAZA, D. L. STOKES AND J. J. LACAPERE

2005. Normal Mode-Based Fitting of Atomic Structure into Electron Density Maps: Application to Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase' *Biophysical J*., 88: 818.

HITCHCOCK, S. E. AND J. KENDRICK-JONES

xxxx. Myosin light chains, carp calcium binding proteinand troponin components: do they interact to form functional complexes? (447-458). En: *Calcium transport in contraction and secretion*. (E. Carafoli *et al* Ed). North Holland Publishing Co. Amsterdam.

HODGE, A. J.

1956. The fine structure of striated muscle. A comparison of insect flight musclewith vertebrate with vertebrate and invertebrate muscle. *J. biophys. Biochem. Cytol*., 2: 131.

HODGKIN, A. L.

1939. The relation between conduction velocity and the electrical resistance outside a nerve fibre. *J Physiol.,* 94: 560-570.

1965. The conduction of the nervous impulse. Liverpool, University Press.

HODGKIN, A. L. AND P. HOROWICZ

1957. Action potential proocedings. *J Physiol*., 137: 30P.

1959. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. *J Physiol.,* 148: 127-160.

HODGKIN A. L. AND P. HOROWICZ

1960. Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol.* (Lond), 153: 386

1960. The effect of nitrate and other anions on the mechanical response of single muscle fibres. *J. Physiol.* (Lond), 153: 404.

HODGKIN A. L. AND A. H. HUXLEY

1939. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature,* 144: 710.

1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.,* 116: 449.

1952b. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo. J. Physiol.,* 116: 473.

1952c. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo. J. Physiol.,* 116: 497.

1952d. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500.

HODGKIN, A.L., A. F. HUXLEY AND B. KATZ

1949. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch. Sci. Physiol.*, 3: 129.

1952. Measurements of current-voltage relations in the membrane of squid axons of Loligo. *J. Physiol.,* 116: 424.

HODGKIN, A.L AND B. KATZ

1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.,* 108:37

HODGKIN, A. L. AND W. L. NASTUK

1949. Membrane potentials in single fibers of the frog's sartorius muscle. *J. Physiol.,* 108, Proc, 42.

HODGKIN, A. L. AND S. NAKAJIMA

1972. Analysis of the membrane capacity in frog muscle. *J. Physiol.,* 221: 121-136.

HODGKIN A. L. AND W. A. AH. RUSHTON

1946. The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc. Royal Soc.* B., 133:444.

HOLLINGWORTH, S., A. B. HARKINS, N. KUREBAYASHI, M. KONISHI AND S. M. BAYLOR

1992. Excitation-contraction coupling in intact frog skeletal muscle fibers injected with mmolar concentrations of fura-2. *Biophys J.,* 63: 224-234.

HOMSHER E. AND C. J. KEAN

1973. Skeletal muscle energetics and metabolism. *Ann. Rev Physiol*., 40: 93-131.

HOROWICZ, P. AND M. F. SCHNEIDER

1981. Membrane charge movement in contracting and non-contracting skeletal muscle fibers. *J. Physiol*., 314: 565-593.

1981. Membrane charge moved at contraction thresholds in skeletal muscle fibers. *J. Physiol*., 314: 595-633.

HOU, T.-T., J.D. JOHNSON, AND J. A. RALL

1991. Parvalbumin content and Ca21 and Mg21 dissociation rates correlated with changes in relaxation rate of frog muscle fibers. *J. Physiol., (Camb.)*. 441:285–304.

HOWELL, J. N.

A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle. J Physiol (Lond). 1969; 201: 515-533.

HOWELL, J. N., AND D. J. JENDEN

1967. T-tubules of skeletal muscle: morphological alterations: which interrupt excitation-contraction coupling. *Fed. Proc.,* 26:553.

HUANG, C. L.

1982. Pharmacological separation of charge movement components in frog skeletal muscle. *J Physiol.,* 324: 375-387.

1981. Effect of local anesthetics on the relationship between charge movements and contractile thresholds in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* (Lond), 320: 381.

HUI, C. S.

1983. Pharmacological studies on charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.,* (Lond). 337: 509.

1991. Factors affecting the appearance of the hump charge movement in frog cut twitch fibers. *Journal of General*

1983. Differential properties of two charge components in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology,* 337: 531-552.

HUI, C. S. AND W. V. K. CHANDLER

1990. Intramembranous charge movement in frog cut twitch fibers mounted in a double vaseline-gap chamber. *Journal of General Physiology* 96: 257-297.

HUI, C. S. AND W. K. CHANDLER

1991. Q,B and Q. components of intramembranous charge movement in frog cut twitch fibers. *Journal of General Physiology* 98: 429-464.

HUI, C. S. AND W. CHEN

1992. Separation of Q beta, and Q gamma charge components in frog cut twitch fibers with tetracaine. Critical comparison with other methods. *Journal of General Physiology,* 99: 985.

HUI, C. S., R. L. MILTON, AND R. S. EISENBERG

1984. Charge movement in skeletal muscle fibers paralyzed by the calcium-entry blocker D600. *Proc Natl Acad Sci* U S A, 81(8): 2582-2585.

HUXLEY, A. F.

1957. Muscle structure and theories of contraction. *Progres. Biophys.,* 7:255-318.

1974. Muscular Contraction. *J. Physiol.,* 243: 1043.

1980. *Reflections on muscle.* Liverpool University Press. Liverpool .

1956. Local activation of striated muscle from the frog and the crab. *J. Physiol.,* 135: 17-18P.

1971. The activation of striated muscle and its mechanical response. Croonian Lecture, *Proc. Roy. Soc.,* B. 178: 1-27.

HUXLEY, A. F. AND R. E. TAYLOR

1958. Local activation of skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* (Lond)., 144: 426-441.

HUXLEY, A. F. AND R. STAMPFLI

1951. Direct determination of membrane resting potential and action potential in single myelinated nerve fibers. *J Physiol.,* 112(3-4):476-495.

HUXLEY, A. F. AND R. NIEDERGERKE

1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibers. *Nature,* 173(4412): 971-973.

HUXLEY, A. F. AND R. NIEDERGERKE

1958. Measurement of the striations of isolated muscle fibers with the interference microscope. *J. Physiol.,* 144: 403-425.

HUXLEY, A. F. AND L. D. PEACHEY

1961. The maximum length for contraction in vertebrate striated muscle. *J. Physiol.,* 156, 150-165.

HUXLEY, A. F. AND R. M. SIMMONS

1971a. Mechanical properties of the cross-bridges of frog striated muscle. *J. Physiol.,* 218: 59-60.

HUXLEY, A. F. AND R. M. SIMMONS

1971b. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature,* Lond. 233: 533-538.

1973. Mechanical transientsand the origin of muscular force (669-668). En: *The mechanism of muscle contraction*. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology. Vol. XXXVII . Cold Spring Harbor Laboratory.

HUXLEY, A. F. AND R. W. STRAUB

1958. Local activation and interfibrillar structures in striated muscle. *J. Physiol,*. 143: 40-41.

HUXLEY, A. F. AND R. E. TAYLOR

1955. Function of Krause's membrane. *Nature,* Lond. 176: 1068

HUXLEY, H. E.

1953a. Electron microscope studies on the organization of the filaments in striated muscle. *Biochem. Biophys. Acta,* 12:387.

1953b. X-ray analysis and the problem of muscle. *Proc. Roy. Soc.* Lond., B.141:

1957. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. of biophys. Biochem. Cyt.*, 3: 631.

1963. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.*, 7: 281.

1964. Evidence for Continuity between the Central Elements of the Triads and Extracellular Space in Frog Sartorius Muscle. *Nature,* 202: 1067-1071.

1969. The mechanism of muscular contraction. *Science,* 164: 1356.

1972. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. (301-387). En: *The structure and function of muscle*.vol 1, 2nd edn., ed. Bourne G. Academic Press. New York

2004. Fifty years of muscle y the sliding filament theory. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1403.

HUXLEY, H. E. AND W. BROWN

1967. The low-angle X-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor. *J. Mol. Biol.,* 30: 383.

HUXLEY, H. E., W. BROWN AND K. C. HOLMES

1965. Constancy of axial spacing in frog sartorius muscle during contraction. *Nature,* 206: 1358.

HUXLEY, H. E. AND J. HANSON

1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, Lond. 173: 973-976.

1957. Quantitative studies of the structure of cross-striated myofibrils. I. Investigations by interference microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 23: 229.

IMAIZUMI, M., M. TANOKURA AND K. YAMADA

1987. A calorimetric study on calcium binding by troponin C from bullfrog skeletal muscle. *J Biol Chem.* 262(17):7963-7966.

INFANTE, A. A. AND R. E. DAVIES

1962. ATP breakdown during a single isotonic twitch of frog sartorius muscle. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 9: 410.

INGELS, N. B.

1979. A brief history of theories of muscle contraction. Appendix. (147-162) En: *The Molecular Basis of Force Development in Muscle*.N. B. Ingels Editor Appendix .Palo Alto Medical Research Foundation. Palo Alto. Ca.

INUI, M., A. SAITO AND S. FLEISCHER

1987. Purification of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem*., 262: 1740-1747.

JACQUEMOND, V., L. CSERNOCH, M. G. KLEIN AND M. F. SCHNEIDER

1991. Voltage-gated and calcium-gated calcium release during depolarization of skeletal muscle fibers.*Biophys J*., 60(4):867-873.

JENERICK, H.

1959. The control of membrane ionic currents by the membrane potential of muscle.. *J Gen Physiol.,* 42(5): 923-930.

JEWELL, B. R. AND D. R. WILKIE

1958. An analysis of the mechanical components in frog' s striated muscle. J. Physiol. 143: 515-540.

JÖBSIS, F.F ET AL.

1966. Calcium release and reabsorption in the sartorius muscle of the toad.. *Biochem Biophys Res Commun.,*20;25(2):246-252.

JONG, D. S., P. C. PAPE, S. M. BAYLOR AND W. K. CHANDLER

1995. Calcium inactivation of calcium release in frog cut muscle fibers that contain millimolar EGTA or Fura-2. *J Gen Physiol.*, 106: 337-388.

JONG, D. S., P. C. PAPE, W. K. CHANDLER AND S. M. BAYLOR

1993. Reduction of calcium inactivation of sarcoplasmic reticulum calcium release by fura-2 in voltage-clamped cut twitch fibers from frog muscle. *J Gen Physiol*., 102(2):333-370.

JORGENSEN, A. O., A. C. SHEN, D. H. MACLENNAN AND K. T. TOKUYASU

1982. Ultrastructural localization of the Ca^{2+}-Mg^{2+}-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum in rat skeletal muscle by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. *J Cell Biol.,* 92: 409-416.

JULIAN, F. J. AND D. L. MORGAN

1979. The effect on tension of non uniform distribution of length changes applied to frog musclefibers. *J.Physiol*., 293:379-392.

JULIAN, F. J.

1971. The effect of calcium on the force-velocity relation of briefly glycerinated frog muscle fibers. *J Physiol.,*218(1):117-145.

KARLEN, P. AND B. ERLICH.

2000. Reversible block of the Ca release channel/ryanodine receptor by protamine, a heparin antidote. *Molecular Biology of the Cell,* 11: 2213-2219.

KAHN, A. J., AND A. SANDOW

1950. The potentiation of muscular contraction by the nitrate-ion. *Science,* 1;112 (2918): 647-649.

KATZ, A. M. I

1964. Influence of tropomyosin upon the reactions of actomyosin at low ionic strength. *J. Biol. Chem.,* 239: 3304.

KATZ, B.

1939. The relation between force and speed in muscular contraction. *J. Physiol.,* 96: 4564.

KENDRICK-JONES, W., W. LEHMAN AND A. G. SZENT-GYÖRGYI.

1970. Regulation in molluscan muscles. *J. Mol. Biol.,* 54: 313.

KEYNES, R. D., AND P. M. LEWIS

1951. The sodium and potassium content of cephalopod nerve fibers. *J. Physiol.*, 114: 151.

KIELLEY, W. W. AND O. MEYERHOF

1948. (1). Studies on adenosinetriphosphatase of muscle II. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem*., 176: 591.

KIRSCH, W. G., D. UTTENWEILER AND R. H. FINK

2001. Spark- and ember-like elementary Ca2+ release events in skinned fibers of adult mammalian skeletal muscle. *J. Physiol*., 537(Pt 2):379-389.

KNAPPEIS, G. G., AND F. CARLSEN

1962. The ultrastructure of the Z disc in skeletal muscle. *J Cell Biol.,* 13: 323-335.

KOMETANI, K. AND K. YAMADA

1984. Thermoelastic effect in chemically skinned frog skeletal muscle in rigor. *Jpn. J. Physiol.,* 34(3): 389-396.

KOVACS, L., E. RÍOS AND M. F. SCHNEIDER

1979. Calcium transients and intramembrane charge movement in skeletal muscle fibers. *Nature*. London. 279: 391.

1983. Measurement and modification of free calcium transients in frog skeletal muscle fibers by a metallochromic indicator dye. *J Physiol.,* 343: 161.

KOVACS, L. AND M. F. SCHNEIDER

1978. Contractile activation by voltage clamp depolarization of cut skeletal muscle fibres. *J. Physiol.,* London. 277: 482.

**KRAUSE, W.*

1868. Mikroskopishe Untersuchungen über die quergestreifte Muskel substanz. Nachrichten d. Kön. Gesellsh. Der Univ. Göttingen. Mitt. d. Path. Inst., 17, 357.

1876. Allgemeine und mikrosckopische Anatomie. Hannover.

KUFFLER, S. W.

1946. The relation of electrical potential changes to contracture in skeletal muscle. *J. Nerophysiol.,* 9: 367.

**KÜHNE, W.*

1864. Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. Leipzig, W. Engelmann.

1888. On the origin and causation of vital movement. *Proc.Roy. Soc.,* B.44:220.

KUMAGAI, H., S. EBASHI, AND F. TAKEDA

1955. Essential relaxing factor in muscle other than myokinase and creatine phosphokinase *Nature,* 176:166.

KWOK, W. M. AND P. M. BEST

1991. Calcium-induced inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Pflugers Arch*., 419: 166-176.

LACAMPAGNE, A., C. CAPUTO AND J. ARGIBAY

1996. Effect of ryanodine on cardiac calcium current and calcium channel gating current. *Biophysical Journal,* 70(1): 370-375.

LACAMPAGNE, A, M. G. KLEIN AND M. F. SCHNEIDER

1998. Modulation of the frequency of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release events (Ca^{2+} sparks) by myoplasmic [Mg^{2+}] in frog skeletal muscle. *J Gen Physiol*., 111: 207-224.

LACAMPAGNE, A., W. J. LEDERER, M. F. SCHNEIDER AND M. G. KLEIN

1996. Repriming and activation alter the frequency of stereotyped discrete Ca^{2+} release events in frog skeletal muscle. *J Physiol.,*497 (Pt 3): 581-588.

LAI, F. A., H. P. ERCKSON, E. ROUSSEAU, Q. Y. LIU AND G. MEISSNER

1988. Purification and reconstruction of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature.* 315-319.

LAMB, G. D.

1986. Components of charge movement in rabbit skeletal muscle: the effect of tetracaine and nifedipine. *J Physiol.,* 376: 85-100.

LAMB, G. D. AND D. G. STEPHENSON

1990a.Calcium release in skinned muscle fibers of the toad by transverse tubule depolarization or by direct stimulation. J Physiol. ; 423: 495-517.

1990b. Control of calcium release and the effect of ryanodine in skinned muscle fibers of the toad. *J Physiol*., 423: 519-542.

1991. Effect of Mg^{2+} on the control of Ca^{2+} release in skeletal muscle fibers of the toad. *J Physiol.,* 434: 507-528.

1991. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of rat and toad in the presence of GTP gamma S. *J Physiol*., 444: 65-84.

1994. Effects of intracellular pH and [Mg^{2+}] on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of the rat. *J Physiol*., 478 (pt. 2): 331-339.

LAMB, G. D., E. RECUPERO AND D. G. STEPHENSON

1992. Effect of myoplasmic pH on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of the toad. *J Physiol*., 448: 211-224.

LAPICQUE, L.

1909. Définition Expérimentale de l'Excitabilité. *Compt rend. Soc.de biol*. 67: 280.

LATTANZIO, F. A., R. G. SCHLATTERER, M. NICAR, K. P. CAMPBELL AND J. L. SUTKO

1987. The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. J. Biol. Chem. 262: 2711-2718.

LEBERER, E. AND D. PETTE

1986. Neural regulation of parvalbumin expression in mammalian skeletal muscle. *Biochem. J.,* 235: 67.

LEHNARTZ, E.

1931. Über die nachtraglische Milchsäurebildung beim Tetanus und bei der Zuckung isolierter Froschmuskeln. *Z. f. Physiol.Chem.*197:55.

LEUNG A. T., T. IMAGAWA, B. BLOCK, C. FRANZINI ARMSTRONG AND K. P. CAMPBELL

1988. Biochemical and Ultrastructural characterization of the 1,4-Dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.,* 263:994-1001.

LEVIN, A. AND J. WYMAN

1927. The viscous elastic properties of muscle. *Proc. R.Soc.* B 101: 218-243.

LING, G.

1962. A physical theory of the living state. The association-induction hypothesis. Blaisdell Publishing Co. New York.

LING, G. AND R. W. GERARD

1949. The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J Cell Physiol* 34: 383-396.

1949. The membrane potential and metabolism of muscle fibers. *J Cell Physiol* 34,:413-438.

LOHMAN, K.

1928. Über das Vorkommen und den Umsatz von Pirophosphat im Muskel. *Naturwissensch.,* 16: 298.

LORENTE DE NÓ, R.

1947. A study of nerve physiology. Studies from the Rockefeller Institute for Medical Research. 131: 1.

LUCAS, K.

1905. On the gradation of activity in a skeletal muscle fibre. *J.Physiol.*33:125.

1909. The *all or none* contraction of the amphibian muscle fiber. *J.Physiol.* 38: 113.

**LUNDSGAARD, E.*

1930. Untershungen über Muskelkontraktion ohne Milchsäure. *Biochem.Z.,* 217:162.

1938. The biochemistry of muscle. *Ann. Re. Biochem..,* 7: 377.

LÜTTGAU, H. C.

1963. The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. *J Physiol.,* (Lond). 168: 679-697.

LÜTTGAU, H. C. AND H. OETLIKER

1968. The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. *J Physiol* (Lond). 194: 51-74.

LÜTTGAU H. C. AND W. SPIECKER

1979. The effects of calcium deprivation upon mechanical and electro-physiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. *J Physiol* (Lond)., 296: 411-429.

LYMNR. W. AND E. W. TAYLOR

1970. Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleotide triphosphate by myosin. *Biochemistry.* 9:2975.

**LYUBIMOVA, M. N. AND V. A. ENGELHARDT*

1939. Adenosinetriphosphatase and myosin. *Biokhimiya*, 4: 716.

**MACDOUGALL, W.*

1897.On the structure of cross-striated muscle, and a suggestion as to the nature of its contraction. *J.Anat. and Physiol.,* 31: 410 and 539.

MACLENNAN, D. H., W. J. RICE AND M. N. GREEN

1997. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPases. *J Biol. Chem.,* 272: 28815–8.

MACLENNAN, D. H. AND N. M. GREEN

2000. Pumping ions. *Nature*, 405: 633–634.

MARMONT, G.

1949. Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol.,* 34, 351-382.

MARSH, B. B.

1951. The effects of adenosinetriphosphate on the fibre volume of a muscle homogenate. *Nature,* 167: 1065.

MARTONOSI, A.

1962. The specificity of the interaction of ATP with G-actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 47: 163.

1984. Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol Rev.,* 64: 1240-1320.

1995. The structure and interactions of the Ca^{2+}-ATPase. *Biosci Rep*.,15:363–381.

MARTONOSI A., K. A. TAYLOR AND S. PIKULA

1991. The crystallization of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum (167–182). En: *Crystallization of membrane proteins*. Michel H. ed., pp .Boca Raton, CRC Press.

MARTONOSI A. AND S. PIKULA

2003. The structure of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol.,* 50(2):337-365.

MARTY, I., M. ROBERT, M. VILLAZ, K. DE JONGH, Y. LAI, W.A. CATTERALL AND W. RONJAT

1994. Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci.,* U S A 15;91(6):2270-2274.

MARUYAMA, K.

1976. Connectin, an elastic protein from myofibrils. *J. Biochem*., (Tokyo) 80: 405.

MARUYAMA, T AND Y. OGAWA

2002. Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med*., 12: 305-311.

MARUYAMA, K.

1965. A new protein-factor hindering network formation of f-actin in solution. *Biochim. Biophys. Acta*., 94: 209.

MARUYAMA, K. AND S. EBASHI

1965. A-Actinin, a new structrural protein from striated muscle. II. Action on actin. *J. Biochem*, 58: 13.

MATHIAS, R. T., R. A. LEWIS, AND R. S. EISENBERG.

1980. Electrical models of excitation-contraction coupling and charge movement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.,* 76: 1.

**MATTEUCCI, C.*

1838. Sur le courant électrique ou propre de la grenouille. *Ann. Chim. Phys*., 68: 93.

MEISSNER, G.

1984. Adenine nucleotide stimulation of [Ca^{2+}] induced release [Ca^{2+}] in sarcoplasmic reticulum. J.Biol. Chem 259:2365-2374.

1986. Ryanodine activation and inhibition of the [Ca^{2+}] release channel of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 261:6300-6306.

MEISSNER, G. AND D. MCKINLEY

1976. Permeability of sarcoplasmic reticulum membrane. The effect of changed ionic environments on Ca2+ release. J *Membr Biol.,* 30: 79-98.

MEISSNER G., E. DARLING AND J. EVELETH

1986. Kinetics of rapid [Ca^{2+}] release by sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry.* 25:236-244.

MELZER, W. A. HERMANN-FRANK AND H. CH. LÜTTGAU

1995. The role of Ca^{2+} ions in excitation – contraction coupling of skeletal muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta,* 1241:59-116.

MELZER, W., E. RÍOS AND M. F. SCHNEIDER

1984. Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophys J.,* 45(3):637-641.

1987. A general procedure for determining the rate of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *Biophys J.,* 51: 849-863.

MELZER, W, M. F. SCHNEIDER B. J. , SIMON AND G. SZUCS

1986. Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle. *J Physiol.,* 373: 481-511.

MEYER, K. H.

1952. Thermoelastic properties of several biological systems. *Proc. Roy.Soc.,* B. 139: 498.

MEYERHOF, O.

1920. Ueber die Beziehung der Milchsäure zur Wärmebildung und Arbeitsleistung des Muskels in der Anaerobiose. *Arch. f.ges. Physiol.*182: 232.

MEYERHOF, O. AND K. LOHMAN

1927. Über der Ursprung der kontraktionwärme. Naturwissensch. 15: 670.

MIHALYI, E. AND A. G. SZENT-GYÖRGYI

1953a. Trypsin digestion of muscle proteins. I. Ultracentrifugal analysis of the process. *J. Biol., Chem..*, 201:189.

1953b. Trypsin digestion of muscle proteins. III. Adenosine triphosphatase activity and actin-binding capacity of the digested myosin. *J. Biol. Chem*., 201: 211.

MILEDI, R., I. PARKER AND G. SCHALOW

1977. Measurement of calcium transients in frog muscle by the use of arsenazo III. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*., 22;198(1131):201-210.

MILEDI, R, I. PARKER AND P. H. ZHU

1983. Changes in threshold for calcium transients in frog skeletal muscle fibers owing to calcium depletion in the T-tubules. *J Physiol*., 344:233-241.

MIYAMOTO, H. AND E. RACKER

1982. Mechanism of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Memb. Biol.,* 66: 193-201.

MOBLEY, B.A. AND B. R. EISENBERG

1975. Sizes of components in frof skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.,* 66:31.

MOMMAERTS, W. F. H. M. AND K. SERAYDARIAN

1947. A study of the adenosine triphosphatase activity of myosin and actomyosin. *J. Gen. Physiol.,* 30: 201.

MONCK, J. R., I. ROBINSON, A. L. ESCOBAR, J. L. VERGARA AND J. M. FERNANDES

1994. Pulsed laser imaging of rapid Ca^{2+} gradients in excitable cells. *Biophys J.*, 67: 505.

MOORE, L. E.

1972. Voltage clamp experiments of single muscle fibers of *Rana pipiens*. *J Gen Physiol.,*60(1):1-19.

MORALES, M. AND J BOTTS

1952. A model for the elementary process in muscle action. *Archs Biochem. Biophys.,* 37: 283-300.

MULIERI, L.

1972. The dependence of the latency relaxation on sarcomere length and other characteristics of isolated muscle fibers. *J. Physiol.,* 223: 333-354.

MURALT, A. VON AND J. T. EDSALL

1930. Studies in the physical chemistry of muscle globulin. III. The anisotropicity of myosin and the angle of isocline. *J. Biol. Chem.,* 89: 315.

MURAYAMA, T. AND Y. OGAWA

2002. Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med.,* 12: 305-311.

MUSCATELLO, U., E. ANDERSSON-CEDERGREN AND G. F. AZZONE

1962. The mechanism of muscle-fiber relaxation adenosine triphosphatase and relaxing activity of the sarcotubular system. *Biochim Biophys Acta,* 63: 55-74.

**NACHMANSOHN, D.*

Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure Zusammenhang mit der Tätigkeitdes Muskels. *Biochem. Z*. 196:

1929. Über den Zerfall der Kreatinenphosphosäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. *Biochem. Z* 208:237.

NAGAI, T., M. MAKINOSE AND W. HASSELBACH

1960. Der physiologische Erschlaffungsfaktor und die muskelgrana. *Biochim. Biophys Acta,* 43:223.

NAKAI, J., T. TANABE, T. KONNO, B. ADAMS AND K. G. BEAM

1998. Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J Biol Chem*., 273: 24983-24986.

NAKAI, J., R. T. DIRKSEN, H. T. NGUYEN, I. N. PESSAH, K. G. BEAM AND P. D. ALLEN

1996. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* 380,72–75.

NAKAI, J., N. SEKIGUCHI, T. A. RANDO, P. D. ALLEN AND K. G. BEAM

1998. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem.,* 273: 13403–13406.

NASTUK, W.L. AND A. L. HODGKIN

1950. The electrical activity of single muscle fibers. *J. cell. Comp. Physiol.,* 35:39.

NATORI, R.

1975. The electric potential change of internal membrane during propagation of contraction in skinned fibre of toad skeletal muscle. *Jpn J Physiol.*,25: 51-63.

NEEDHAM, D. M.

1942. The adenosine triphosphatase activity of myosin preparations. *Biochem. Journ.,*36: 113.

1971. *Machina Carnis*. Cambridge University Press.

NEEDHAM, J., S.-C. SHEN, D. M. NEEDHAM AND A. S. C. LAWRENCE,

1941. Myosin birefringence and adenylpyrophosphate. *Nature*, Lond. 147, 766-768.

NERNST, W.

1889. Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen. *Z. Phys. Chem.,*. 4: 129.

NICOLA SIRI, L., J. A. SANCHEZ AND E. STEFANI

1980. Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog skeletal muscle. *J Physiol.,* (Lond), 305: 87-96.

OBERMAIR, G. J., G. KUGLER, ET AL.

2004. The role of the calcium channel alpha 2 delta-1 subunit in skeletal muscle. *J Muscle Res. Cell. Motil* 25(3): 239-240.

OETLIKER, H., S. M. BAYLOR AND W. K. CHANDLER

1975. Simultaneous changes in fluorescence and optical retardation in single muscle fibers during activity. *Nature,* 257 (5528): 693-696.

OETLIKER, H.

1982. An apparaisal of the evidence for a sarcoplasmic reticulum membrane potential and its relation to calcium release in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell motility*, 3: 247.

OGAWA Y, N. KUREBAYASHI AND T. MURAYAMA

2000. Putative roles of the type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3). T*rends Cardiovasc Med.,* 10: 65-70.

OHTSUKI I. AND WAKABAYASHI T.

1972. Optical diffraction studies of troponin-tropomyosin-actin paracrystals. *J. Biochem.,* 72: 369-377.

OHTSUKI, I., T. MASAKI, Y. NONOMURA AND S. EBASHI

1967. Periodic distribution of troponin along the thin filament. *J. Biochem*., 61: 817.

OVERTON, E.

1902. Beiträge zur allgemeinen muskel- und Nervenphysiologie. *Pflügers Arch*., 92: 115.

OWEN, V. J., G. D. LAMB, D. G. STEPHENSON AND M. W. FRYER

1997. Relationship between depolarization-induced force responses and Ca2+ content in skeletal muscle fibers of rat and toad. *J Physiol.,* 498 (Pt 3): 571-586.

PAGE, S. G. AND H. E. HUXLEY

1963. Filament lengths in striated muscle. *J. Cell Biol.,* 19: 369-390.

PALADE P.

1987. Drug-induced [Ca^{2+}] release from sarcoplasmic reticulum. *J.Biol. Chem.,* 262: 6142-6148.

PALADE, P. AND J. VERGARA

1983. Stoichiometries of arsenazo iii-ca complexes. *Biophys. J.,* 43: 355-369.

PAPE P. C., D. S. JONG AND W. K. CHANDLER

1995. Calcium release and its voltage dependence in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *J Gen Physiol*., 106: 259-336.

PAPE P. C., D. S. JONG, W. K. CHANDLER AND S. M. BAYLOR

1993. Effect of fura-2 on action potential-stimulated calcium release in cut twitch fibers from frog muscle. *J Gen Physiol.*, 102(2):295-332.

**PARNAS, J.K. AND R. WAGNER*

1914. Ueber der Kohlehydratumsatz isolierten Amphibienmuskel und über die Beziehungen zwischen Kohlehydratschwund und Milchsäurebildung im Muskeln. *Biochem. Z*., 61: 387.

PEACHEY, L. D.

1965.The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J Cell Biol*., 25: 209.

PEACHEY, L. D. AND B.R. EISENBERG.

1978. Helicoids in the T system and striations of frog skeletal muscles seen by high voltage electron microscopy. *Biophys. J*., 22:145.

PEACHEY, L. D. AND C. F. FRANZINI-ARMSTRONG.

1983. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells.Ch 2 Handbook of Physiology.section 10: Skeletal muscle. Peachey ed. American Physiological Society. Bethesdav Maryland USA.

PECHÈRE J. F., J. P. CAPONY AND L. RYDEN

1971. The primary structure of the major parvalbumin from hake muscle. Isolation and general properties of the protein. *Eur J Biochem*., 10;23(3):4218.

PEPE, F. A.

1966. Some aspects of the structural organization of the myofibril as revealed by antibody-staining methods. *J. cell Biol*., 28:505-525.

PERRY, S. V.

1950. The ATP-ase activity of isolated myofibrils. *Biochem., J*., 47: xxxviii.

PERRY, S. V. AND A. CORSI

1958. Extraction of proteins other than myosin from the isolated rabbit myofibril. *Biochem. J.,* 68: 5.

PETERSON, D., D. RASSIER AND W. HERZOG

2004. Force enhancement in single skeletal muscle fibers on the ascending limb of the force-length relationship. J Exp Biol 207, 2787–2791.

PERRY S.V. AND T. C. GREY

1956. Ethylenediaminetetra-acetate and the adenosine triphosphatase of actomyosin systems. *Biochem. J*., 64: 184.

****PFLÜGER E.***

1859. Untersuchungen überdie Physiologie des Electrotonus. *Arch. f. ges. Physiol.,* 10: 641.

PIZARRO, G., L. CSERNOCH, I. URIBE AND E. RÍOS

1992. Differential effects of tetracaine on two kinetic components of calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.,* (Lond) 457: 525-538.

PIZARRO, G., R. FITTS, I. URIBE, AND E. RÍOS

1989. The voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Ion dependence and selectivity. *Journal of General Physiology* 94(3): 405-428.

PODOLSKY, R. J.

1959. The chemical thermodynamics and molecular mechanism of muscular contraction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 72 (12), 522-537.

1960. Kinetics of muscular contraction: the approach to the steady state. *Nature* 188: 666-668.

1968. Membrane systems in muscle cells. S*ymp Soc Exp Biol.*,22:87-99. Review.

PODOLSKY, R. J. AND A. C. NOLAN

1973. Muscle contraction transients, cross-bridges kinetics and the Fenn effect. (661-668). En: *The mechanism of muscle contraction.* Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology. Vol. XXXVII.Cold Spring Harbor Laboratory.

PODOLSKY, R. J., A. C. NOLAN AND S. A. ZAVELER

1969. Cross-bridge properties derived from muscle isotonic velocity transients. *Proc Natl Acad Sci.,* U S A. 64(2):504-511.

PODOLSKY R. J. AND L. E. TEICKHOLZ

1970. The relation between calcium and contraction kinetics in skinned muscle fibres. *J. Physiol.,* 211: 19.

POLISSAR, M. J.

1954. Physical chemistry of contractile process in muscle. Cap. 13 (699). En: *The kinetic bais of molecular biology.* Johnson, Eyring and Polissar editors. Wiley and Sons. New York.

PORTER K. R.

1956. Sarcoplsmic Reticulum in muscle cellsof *Amblystoma* larvae. *J.Biophys.biochem Cytol.* Suppl: 163.

PORTER, K. R. AND C. FRANZINI-ARMSTRONG

1965. The Sarcoplasmic Reticulum. *Sci Am..,* 212: 72-81.

PORTER, K. R. AND G. E. PALADE

1957. Studies on the endoplasmic reticulum. *J. biophys. Biochem Cytol.,* 3: 269-300.

PORTZEHL, H.

1950. Masse und Msze des L-Myosins. *Z. Naturforsch.*, 5b: 75.

1957. Die Bindung des Erschlaffungsvon Marsh an die Muskelgranafaktor. Biochim. *Biophys Acta*, 26: 373.

PROSSER, B., N. WRIGHT, E. HERNÁNDEZ-OCHOA, K. VARNEY, Y. LIU, R. OLOJO, D. ZIMMER, D. WEBER AND SCHNEIDERM

2007. S100A1 binds to the calmodulin-binding site of ryanodine receptorand modulates skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J Biol Chem.,* 283: 5046–5057.

PROSSER, B., E. HERNANDEZ-OCHOA, D. ZIMMER AND M. SCHNEIDER

2009. The *Qã* component of intra-membrane charge movement is present in mammalian muscle fibers, but suppressed in the absence of S100A1. *J Physiol* 587: 4523–4541.

2009. Simultaneous recording of intramembrane charge movement components and calcium release in wild-type and S100A»/» muscle fibers. *J Physiol* 587: 4543–4559.

PRIOR, M. G. M.

1950. Mechanical properties of fibers and muscles. *Progr. Biophys*., 1:216..

RADERMACHER, M., T. WAGENKNECHT, R. GRASSUCCI, J. FRANK, M. INUI, C. CHADWICK AND S. FLEISCHER

1992. Cryo-EM of the native structure of the calcium release channel/ryanodine receptor from sarcoplasmic reticulum. *Biophys J.,* 61(4):936-940.

RAMSEY, R. W. AND S. F. STREET

1940. The isometric length-tension diagram of isolated skeletal muscle fibers of the frog. *J. cell. comp. Physiol.,* 15: 11-34.

RANVIER, M. L.

1873. Des muscles rouges et des muscles blancs chez les rongeours. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 77: 1030,

RASSIER, D. E. AND W. HERZOG

2004. Effect of shortening on stretch-induced force enhancement in single skeletal muscle fibers. *J. Biomechanics,* 37: 1305-1312.

RÍOS, E. AND M. D. STERN

1997. Calcium in close quarters: microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure,* 26: 47-82.

RÍOS, E. AND G. BRUM

1987. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, 325: 717-720.

RÍOS, E. AND G. PIZARRO

1991. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev*., 71: 849.

RISEMAN, J. AND J. G. KIRKWOOD

1948. Remarks on the physico-chemical mechanism of muscular contraction and relaxation. *J. Am. Chem. Soc.* 70:2820..

RITCHIE, AND D. R. WILKIE

1955. The effect of previous stimulation on the active state of muscle. *J.Physiol*., 130: 488-496.

ROBERTSON, S. P., J. D. JOHNSON AND J. D. OTTER

1981. The calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{2+}. *Biophys. J*., 34: 559-569.

RODNEY, G. G. AND M. F. SCHNEIDER

2003. Calmodulin modulates initiation but not termination of spontaneous Ca2+ sparks in frog skeletal muscle. *Biophys J.,* 85: 921–932.

ROSENBERG, R. L.

1987. Multiple types of calcium channels in excitable cells. *Soc Gen Physiol* Ser 41: 167-87.

ROYER, L., S. POUVREAU AND E. RÍOS

2008. Evolution and modulation of intracellular calcium release during long-lasting, depleting depolarization in mouse muscle. *J Physiol.,* 586, 4609-4629.

ROZSA, G., A. SZENT-GYORGYI AND R. W. G. WYCKOFF

1950. The fine structure of myofibrils. *Exp. Cell Res.* 1: 194-205.

RÜDEL, R. AND S. R. TAYLOR

1973. Aequorin luminescence during contraction of amphibian skeletal muscle. *J Physiol.*, 233: 5P-6P.

RUSHTON, W. A.

1930. Excitable substances in the nerve-muscle complex. *J Physiol.,* 70:317-337.

HODGKIN A. L. AND W. A. RUSHTON

1946. The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc R Soc Med.,* 3;134(873):444-479.

SAITO A., M. INUI, J. S. WALLS AND S. FLEISCHER

1988. Ultrastructure of the Calciumrelease channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.,* 107: 211-219.

SAITO, A., S. SEILER, A. CHU. AND S. FLEISCHER

1984. Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 99: 875-885.

SAMSO, M., T. WAGENKNECHT, ET AL.

2005. Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol.,* 12(6): 539-544.

SÁNCHEZ J. A. AND E. STEFANI

1978.Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. *J Physiol.,* (Lond). 283: 197-209.

1983. Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog. *J Physiol.,* (Lond). 337: 1-17.

SÁNCHEZ, M. E. AND C. CAPUTO

1987. Effects of local anaesthetics and pH on depolarization-contraction coupling of Rana pipiens muscle fibers. *Acta Cient Venez.,* 38: 170-179.

SANDOW, A., S. R. TAYLOR AND H. PREISER

1965. Role of the action potential in excitation-contraction coupling. *Fed Proc.*, 24: 1116-1123.

SANDOW, A.

1952. Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med*., 25.:176.

1965. Excitation-Contraction Coupling in skeletal muscle. *Pharm. Re*v., 17: 265-320.

SCHMITT, F. O.

1930. On the oxidative nature of the nerve impulse. *Science* 72: 583.

SCHMITT, F. 0. AND O. H. SCHMITT

1940. Partial excitation and variable conduction in the squid axon. *J. Physiol*. 98: 26-46

SCHNEIDER, M. F. AND W. K. CHANDLER

1973. Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*, 242: 244-246.

SCHNEIDER, M. F. AND W. K. CHANDLER

1976. Effects of membrane potential on the capacitance of skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol.* 67(2):125-63.

SCHNEIDER M. F. AND B. J. SIMON

1988. Inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *J Physiol.*, 405: 727-745.

SCHWANN, T.

1839. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wahstum der Tiere und Pflanzen. Beling, Sander'shen Buchhandlung, .

SCHWARTZ, L. M., E. W. MCCLESKEY AND W. ALMERS

1985. Dihydropyridine receptors in muscle are voltage-dependent but most are not functional calcium channels. *Nature*, 314(6013):747-51.

SERPERSU, E. H., U. KIRCH AND W. SCHONER

1982. Demonstration of a stable occluded form of Ca2+ by the use of the chromium complex of ATP in the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Eur J Biochem*., 122: 347–354.

SHIROKOVA, N., J. GARCÍA, G. PIZARRO AND E. RÍOS

1996. Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol.,*107: 1-18.

SHULMAN, H., A. V. SOMLYO AND A. P. SOMLYO

1976. Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: methods and validity. *Ultramicroscopy*, 1: 317-339.

SIMON, B. J., M. G. KLEIN AND M. F. SCHNEIDER

1991. Calcium dependence of inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol.,* 97: 437-471.

SMITH, J., R. CORONADO AND G. MEISSNER

1985. Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated channels. *Nature,* 316: 446-449.

1986. Single Channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.,* 88: 573-588.

SMITH, J. S., T. IMAGAWA, J. J. MA, M. FILL, K. P. CAMPBELL AND R. CORONADO

1988. Purified ryanodin receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J.Gen. Physiol.,* 92; 1-26.

SOMLYO, A. V., H. G. GONZALEZ-SERRATOS, H. SHUMAN, G. MCCLELLAN AND A. P. SOMLYO

1981. Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron-probe study. *J Cell Biol.,* 90(3): 577-594.

SOMLYO A. V., G. MCCLELLAN,H. GONZALEZ-SERRATOS AND A. P. SOMLYO

1985. movements across the sarcoplasmic reticulum in situ. *Journal of Biological Chemistry,* 260: 6801-6807.

SOMLYO, A. V., H. SHUMAN AND A. P. SOMLYO

1977. Elemental distribution in striated muscle and the effects of hypertonicity: Electron probe analysis of cryo sections *Journal of Cell Biology,* 74: 828.

STERN M. D., G. PIZARRO AND E. RÍOS

1997. Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle.[erratum appears in *J Gen Physiol.,*110(5):641]. *Journal of General Physiology* 110(4): 415-440.

****STRAUB, F.***

1943. Actin. Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, II. 3.

1943. Actin. Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, III. 23.

STRAUB, F. B. AND G. FEUER

1950. Adenosinetriphosphate the functional group of atin. Biochim. *Biophys Acta*. 4, 455.

STRICKOLM, A.

1962. Excitation currents and impedence of a small electrically isolated area of the muscle cell surface. *J. cell.*

STULL, J.T., P.J. LIN, J.K. KRUEGER, J. TREWHELLA AND G. ZHI.

1998. Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs. Acta *Physiol. Scand.,* 164:471.

SUTKO, J. L., K. ITO AND J. L. KENYON

1985. Ryanodine: a modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release in striated muscle. *Fed Proc*., 44: 2984-2988.

****SWAMMERDAMM, J.***

1758. The history of insects. Pt II. En: *Biblia naturae*.Translation T. Fluyd. Seiffert London.

SZENT-GYÕRGYI, A.

1948. *Nature of Life. A study on muscle*. Academic Press. New York.

1949. Free-energy relations and contraction of actomyosin. *Biol Bull*., 96(2):140-161.

1952. Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 42: 305.

SZENT-GYÖRGYI, A. AND I. BANGA

1941. Adenosinetriphosphatase. *Science*, 93: 158.

SZÜCS, G., L. CSERNOCH, J. MAGYAR AND L. KOVÁCS

1991. Contraction threshold and the "hump" component of charge movement in frog skeletal muscle. J *Gen Physiol.,* 97(5):897-911.

SZÜCS, G., Z. PAPP , L. CSERNOCH AND L. KOVÁCS

1991. Kinetic properties of intramembrane charge movement under depolarized conditions in frog skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol*., 98(2):365- 378.

TAKESHIMA, H., T. YAMAZAWA, T. IKEMOTO, H. TAKEKURA, M. NISHI, T. NODA AND M. IINO

1995. $Ca^{(2+)}$-induced $^{Ca2+}$ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *Embo J.*14:2999.

TANABE, T., K. G. BEAM, J. A. POWELL AND S. NUMA

1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*, 336: 134

TANABE, T., A. MIKAMI, S. NUMA AND K. G. BEAM

1990. Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature*, 29;344(6265):451-453.

TANABE, T., H. TAKESHIMA, A. MIKAMI, V. FLOCKERZI, H. TAKAHASHI, K. KANGAWA, M. KOJIMA, H. MATSUO, T. HIROSE AND S. NUMA

1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128):313-318.

TANABE, T., K. G. BEAM, J. A. POWELL AND S. NUMA

1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature,* 336: 134-39.

TANOKURA, M., AND K. YAMADA

1985. A calorimetric study of Ca2+ binding to two major isotypes of bullfrog parvalbumin. *FEBS Lett.* 185:165-169.

TASAKI, I., A. WATANABE, R. SANDLIN AND L. CARNAY

1968. Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc. Nat. Acad. Sci*. USA, 61: 883-888.

TASAKI, I., L. CARNAY AND A. WATANABE

1969. Transient changes in extrinsic fluorescence of nerve produced by electric stimulation. *Proc.Natn. Acad. Sci.* U.S.A. 64:1362-1368.

TAYLOR, E. W., R. W. LYMN AND G. MOLL

1970. Myosin-product complex and its effect on the steady-state rate of nucleotide triphosphate hydrolysis. *Biochemistry,* 9: 2984.

TAYLOR, K. A., L. DUX AND A. MARTONOSI

1986. Three-dimensional reconstruction of negatively stained crystals of the Ca2+-ATPase from muscle sarcoplasmic reticulum. *J Mol. Biol*., 187: 417–427.

TAYLOR, S. R. AND R. RÜDEL

1970. Striated muscle fibers: inactivation of contraction induced by shortening. *Science,* 167:882-884.

TILLOTSON, D.

1979.Inactivation of Ca conducatncedependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,U.S.A. 76: 1497

TOYOSHIMA, C., M. NAKASAKE, H. NOMURA AND H. OGAWA

2000. Crystal structure of the calcium pump of arcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405: 647–655.

TOYOSHIMA, C. AND H. NOMURA

2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418: 605–611.

TOYOSHIMA, C., H. NOMURA AND Y. SUGITA

2003. Crystal structures of Ca^{2+}-ATPase in various physiological states. *Ann. N. Y. Acad .Sci.*, 986**:**1-8.

TRIPATHY, A. AND G. MEISSNER

1996. Sarcoplasmic reticulum lumenal Ca^{2+} has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *Biophys J.,* 70(6): 2600-2615.

TREVES, S., E. SCUTARI, M. ROBERT, S. GROH, M. OTTOLIA, G. PRESTIPINO, M. RONJAT AND F. ZORZATO

1997. Interaction of S100A1 with the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry,*36:11496.

TSIEN, R. W. AND B. NILIUS

1987. Cardiac calcium currents at the level of single channels. *Experientia,* 43(11-12): 1169-1172.

TSIEN, R. W., P. HESS, E. W. MCCLESKEY AND R. ROSENBERG

1987. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block.» *Ann. Rev. Biophys. Chem*., 16: 265-290.

TUBMAN, L.A., D. E. RASSIER AND B. R. MACINTOSH

1997. Attenuation of myosin light chain phosphorylation and posttetanic potentiation in atrophied skeletal muscle. *Pflugers Arch.,* 434:848-851.

UDAKA, JUN, S. T. OMORI, I. TERUI, S. OHTSUKI, S. ISHIWATA, S. KURIHARA AND N. FUKUDA

2008. Disuse-induced preferential loss of the giant protein Titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *Journal of General Physiology,* 131: 33-48.

VERATTI, E.

1961. Investigations on the fine structure of striated muscle fiber read before the Reale Istituto Lombardo, 13 March 1902. *J Biophys Biochem Cytol.,*10(4)Suppl: 1-59.

VERGARA, J. AND C. CAPUTO

1983. Effects of tetracaine on charge movements and calcium signals in frog skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci*., U S A. 80: 1477-1481.

VERGARA, J., M. DIFRANCO, D. COMPAGNON AND B. A. SUAREZ-ISLA

1991. Imaging of calcium transients in skeletal muscle fibers. *Biophys J.*

VERGARA, J., S. I. RAPOPROT AND V. NASSAR-GENTINA

1977. Fatigue and post tetanic potentiation in single muscle fibers of the frog. *Am. J .Physiol*., 232(5):C185-190.

VERGARA, J., F. BEZANILLA AND B. M. SALZBERG

1978. Nile blue fluorescente signals from cut single muscle fibers Ander voltaje clamp conditions. *J. Gen. Physiol.*, 72:775.

VERGARA, J., R. Y. TSIEN AND M. DELAY

1989. Inositol(1,4,5)-triphosphate: a posible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 82: 6352-6356.

VILSEN, B.

1995. Structure-function relationships in the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum, studied by use of the substrate analogue CrATP and site directed mutagenesis comparison with Na^{+}, K^{+} ATPase. *Acta Physiol. Scand*.; 154: Suppl 624, 1–146.

VILSEN, B. AND J. P. ANDERSEN

1992. Interdependence of C^{a2+} occlusion sites in the unphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase complex with CrATP. *J Biol Chem*., 267: 3539–3550.

VOLPE, P., AND E. W. STEPHENSON

1986. Ca^{2+} dependence of transverse tubule-mediated calcium release in skinned skeletal muscle fibers. *J Gen. Physiol.,* 87(2):271-288.

VOLPE, P., G. SALVIATI, F. DIVIRGILIO AND T. POZZAN

1985.Inositol(1,4,5)-triphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature,* 316:347-349.

WAGENKNECHT, T., R. GRASSUCCI, J. FRANK, A. SAITO, M. INUI AND S. FLEISCHER

1989. Three dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature,* 338: 167-170.

WALKER, J. W., A. V. SOMLYO, Y. E. GOLDMAN, A. P. SOMLYO AND D. R. TRENTHAM

1987. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* Lond., 327:249-252.

**WALSH, J.*

1773. Of the electric property of the *Torpedo*. *Phil. Trans.*, 63., 461.

WANG, Z. M., M. L. MESSI AND O. DELBONO

1999. Patch-clamp recording of charge movement, Ca^{2+} current, and Ca^{2+} transients in adult skeletal muscle fibers. *Biophys J* 77, 2709–2716.

WEBER, A.

1959. On the role of calcium in the activity of adenosine 5- triphosphate hydrolysis by actomyosin. *J. biol. Chem.,* 234: 2764.

WEBER, A. AND R. HERZ

1968. The relationship between caffeine contracture in intact muscle and the effect of caffeine on Reticulum. *J. Gen. Physiol.,* 52: 750.

WEBER, A. AND S. WINICUR

1961. The role of calcium in the superprecipitation of actomyosin. *J. biol. Chem*., 236: 3198

**WEBER, H. H.*

1925a. Das kolloidale Verhalter der Muskeleiweisskörper.I. Isoelektrischer Punkt und Stabilitatsbedingungen des Myogens Biochem. Z. 158: 443.

1925b. Das kolloidale Verhalter der Muskeleiweisskörper. II. Isoelektrischer Punkt und Löslichkeit des Myosins. Biochem. Z., 158, 473.

WEBER, H. H.

1958. *The Motility of Muscle and Cells*: 33-36. Cambridge.

**WEBER, E.*

1846. Muskelbewegung. In: *Handwörterbuch der Physiologie* p. 1. Ed. R. Wagner. Braunschweig, F. Bieweg und Sohn.

WEGNER, F., M. BOTH, R. H. FINK AND O. FRIEDRICH

2006. Elementary Ca2+ release events in mammalian skeletal muscle: effects of the anaesthetic drug thiopental. *J Muscle Res Cell Motil*.,27(5-7):315-326.

WEIDMANN, S.

1952. The electrical constants of Purkinje fibers. *J Physiol.,* 11, 348-360.

WEISS, G. B. AND C. P. BIANCHI

1965. The effect of potassium concentration on Ca^{45} uptake in frog sartorius muscle. *J Cell Physiol.,* 65: 385-392.

WIER, W. G.

1991. Intracellular calcium during excitation-contraction coupling in mammalian ventricle. *Med Sci Sports Exerc.,* 23(10): 1149-1156.

WINEGRAD, S.

1965a. Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *The Journal of General Physiology*, 48: 455-479.

1965b. The location of muscle calcium with respect to the myofibrils. The J*ournal of General Physiology*, 48: 997-1002.

1968. Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus. *J. Gen. Physiol.,* 51:65-83.

WU, K. D., W. F. LEE, J. WEY, D. BUNGARD AND J. LYTTON

1995. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol*., 269: C775–C784.

YAGI, N.

2007. A structural origin of latency relaxation in frog skeletal muscle. *Biophysical Journal.* 92 : 162-171.

YAMADA, K.

2005. Heat, phosphorus NMR and microcalorimetry in relation to the mechanism of filament sliding. *Adv. Exp. Med. Biol.,* 565:193-202; discussion 203: 379-95

YAMADA, K., AND K. KOMETANI

1984. Dependence of the shortening heat on sarcomere length in fibre bundles from frog semitendinosus muscles. *Adv. Exp. Med. Biol*.,170:853-864.

YONEKURA, K., D. L. STOKES, H. SASABE AND C. TOYOSHIMA

1997. The ATP-binding site of Ca^{2+}-ATPase revealed by electron image analysis. *Biophys J*., 72: 997–1005.

ZHOU, J., G. BRUM, A. GONZÁLEZ, B. S. LAUNIKONIS, M. D. STERN AND E. RÍOS

2003. Ca^{2+} sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J. Gen. Physiol*, 122:95.

INDICE DE AUTORES

Abbott: 18, 137
Adrian: 6, 145, 186-191, 214, 244, 269, 273-276, 280, 281
Almers: 191, 193, 265, 269, 273, 280
Allen: 204, 307
Andersen: 203
Andersson-Cedergren: 41
Aristóteles: 18
Armstrong: 253, 266, 267
Ashley: 291, 307
Aubert: 96, 137
Avila: 283, 288, 289
Axelsson: 242
Azzone: 197
Bailey: 48, 58, 60, 61
Banga: 48, 55, 58
Barrett: 253, 254
Barry: 209
Baskin: 18
Baylor: 7, 209, 293, 307-315,
Beaty: 191, 252
Beeler: 191, 211
Belleman: 221
Bendall: 13, **195-196**
Bennet: 40
Bernstein: 13, 21, 24, 107, 141, 143, 144, **166**, 167
Berzelius: 24, 107
Best: 311
Bezanilla: 7, 176, 209, 210, 216, 263, 266-268
Bianchi: 250, 260
Bigelow: 203
Blinks: 291, 308, 311
Blix: 24, 88, 99, 100
Block: 232, 315
Bolaños: 45, 238, 263, 271, 273
Bolton: 260
Borelli: 6, 7, 13, 18, 24
Borsotto: 221
Boyle: 144, 145
Bozler: 195, 196
Brehm: 311
Brown: 33, 34, 112, 115
Brucke, von: 22, 23, 27
Brum: 224, 274-278, 284-286
Buxton: 289
Byerly: 311
Cain: 102
Calderón: 304, 305
Campbell: 223, 228, 263, 277
Cannell: 204
Caputo: 71, 238, 245-252, 261, 263, 271, 273, 276, 278, 281, 282, 288, 304, 307, 320
Carlsen: 31, 113, 118
Carlson: 97
Carnay: 209
Casas: 284
Catterall: 221, 222
Civan: 125, 255
Cohen: 207-209
Cole: 166, 167, 172
Collins: 263
Connolly: 73
Conway: 144, 145
Corsi: 56
Costantin: 214, 244, 256
Csernoch: 281
Curtin: 99
Curtis: 166, 172, 221, 250, 251
Chandler: 6, 244, 266-276, 281, 283, 289, 307, 313-315
Chen: 282
Cheng: 321
Chu: 226
Dainty: 57, 59
Davies: 102, 106
De Nó: 172

Descartes: 18
Dickinson: 103
DiFranco: 330
Dirksen: 283, 288, 289
Dodge: 262
Donaldson: 284
Donnan: 144
Duggan: 211
Dulhunty: 233, 288
Ebashi: 6, 54, 55, 61-66, 196-200
Ecker: 311
Edman: 6, 7, 86, 120-125, 132-140, 250
Edsall: 48
Eggleton: 101
Eisenberg: 35, 37, 209, 214, 253, 284
El-Hayek: 234, 287
Empédocles: 17
Endo: 39
Engelhardt: 57, 59, 102, 106, 109
Erasístrato: 18
Escobar: 328, 329
Fabiato: 289, 311
Falk: 39, 153, 190
Fatt: 39, 153, 190, 191
Felder: 233, 316
Fenn: 23, 24, 70, 77-82, 88, 89
Ferguson: 202
Feuer: 53
Fick: 23, 24, 70, 75, 76, 88, 100
Fiske: 24, 101, 102
Fleischer: 316
Fletcher: 24, 100
Ford: 127, 253, 255, 259, 260
Frank: 250, 278
Frankenhaeuser: 251, 262, 263
Franzini-Armstrong: 6, 28, 29, 35-39, 201, 202, 216-221, 229-234, 272, 316
Furth: 17
Gad: 107
Gage: 214
Galeno: 18
García: 281
Gasser: 75, 76, 78, 79, 85, 123
Gera: 311
Gerard: 141, 172
Gergely: 50
Gibbs: 92
Gillis: 204, 307
Giménez: 251, 252
Ginsborg: 191
Goldman: 13, 146, **170**, 171
Golgi: 37-41
Gomolla: 242
González: 278, 288
González-Serratos: 215
Graf: 278
Green: 203
Grey: 198
Grieve: 250
Hagiwara: 191
Halliburton: 47
Hanson: 33-35, 54-56, 110-112
Hardy: 97
Hartree: 88, 93, 107
Hartshorne: 62
Hasselbach: 6, 33, 59, 195-199
Haugen: 72
Heidenheim: 87, 88
Heilbrunn: 248, 249
Heistracher: 244, 261
Hellam: 256, 259
Hermann: 151
Herz: 254
Herzog: 138
Hill A.V.: 5, 24, 75—81, 83, 85, 89-101, 1206, 107, 117, 130, 207, 211, 242, 249, 250
Hill, D.K.: 73. 87, 91, 101, 209
Hille: 190, 263, 277
Hinsen: 202
Hitchcock: 204
Hodgkin: 5, 6, 13, 145-156, **165-182**, 189, 190, 236-244, 263, 265, 270
Hollingworth: 307, 312-314, 316

Homsher: 92
Hopkins: 24, 100
Horowicz: 5, 6, 145-151, 209-210, 236-244, 254, 270, 277, 281, 295
Hou: 204
Howell: 214
Huang: 278, 281
Hui: 278, 281, 282, 284
Hunt: 244, 261
Huxley A.F.: 6, 7, 13, 28-39, 50-56, 65, 97, 105, 109-130, **166-182**, 189, 190, 211-215, 249, 262-265
Huxley H.E.: 33, 35, 55, 110-112
Imagawa: 316
Inesi: 203
Infante: 102
Ingels: 7, 107
Jacquemond: 313-315
Jenden: 214, 250
Jenerick: 186, 262
Jewell: 6, 70, 80-84, 98, 123-125, 139
Jobsis: 291
Jong: 281, 282, 311-313
Jorgensen: 202, 233
Julian: 119, 139, 255
Kahan: 242
Katz: 13, 61, 169-172, 190
Kelvin: 155, 156
Kelley: 199
Kendrick-Jones: 66, 204
Keynes: 207, 249
Kiesling: 86
Kirsch: 322
Knappeis: 31, 113, 118, 208
Kodama: 62
Kometani: 99, 104
Kóvacs: 278, 293-296,
Krause: 23, 28, 105
Kufler: 237
Kühne: 5, 23, 24, 47-49, 105, 106
Kühne en 1864: 47
Kumagai: 195, 196
Kwok: 311
LaCampagne: 289, 322-326
Lai: 229, 316
Lakatta: 289
Lamb: 173, 226, 256-258, 284, 326
Landmesser: 39
Lannergren:
Lapicque: 163, 164
Lattanzio: 226
Leberer: 204
Leewenhoeck: 21, 22, 40
Lenharz:
Leung: 223, 224
Levin: 77-79, 123
Lewis: 249
Ling: 141, 142
Lipman: 24, 197
Lohman: 24, 101-103, 106
Lowy: 34, 54, 55
Lundsgaard: 48, 101
Lüttgau: 242, 251, 254, 278
Lyubimova: 48
MacDougall: 107
MacLennan: 202, 203
Makinose: 195, 197
Marmont: 172, 173
Marsh: 13, 79, 81, 82, 195, 196
Marshall: 307
Martonosi: 53, 201-203, 211
Marty: 288
Maruyama: 54, 66
Mathias: 210
McKinley: 211
MacPherson: 242
Meissner: 7, 211, 225-228, 257, 288, 311
Melzer: 251, 295-298, 307
Meyerhof: 24, 100, 101, 196, 199
Miahali: 50
Miledi: 292, 293, 308, 311
Miyamoto: 225, 226
Mobley: 209

Moisescu: 307
Mommaerts: 58
Monck: 327
Mueller: 62
Mulieri: 72
Murayama: 319
Muscatello: 197
NacMahnson: 101
Nagai: 195, 197
Naka: 191
Nakai: 283, 287
Nakajima: 155, 191
Nastuk: 167, 168
Natori: 255
Needham DM: 7, 48, 57, 58, 106
Needham J: 57
Nernst: 21, 141-147, 170, 171, 237
Nicola-Siri: 192
Niedergerke: 35, 110-113
Nomura: 202
Numa: 223
Nunzi: 218, 219, 221
O'Brien: 316
O'Connor:
Oetliker: 209, 211, 242
Ogawa: 319
Ohtsuki: 64-66
Overton: 24, 169
Owen: 257
Page: 35, 113
Palade: 41, 192, 213, 226, 293
Pape: 282, 297, 313, 314
Parker: 292
Parnas: 100
Peachey: 6, 7, 35, 37-39, 42, 43, 119, 209, 214, 216
Pechère: 204
Pepe: 57, 60
Peres: 280
Perry: 50, 56, 198
Pette: 204
Picula: 201, 202
Pilar: 39
Pizarro: 278-281, 315-319, 327
Planck: 171
Podolski:253, 255, 259, 260
Poenie: 298
Porter: 41, 212, 213
Portzehl: 49
Posterino: 257
Prosser: 231, 282, 283, 289
Protasi: 218
Racker: 225, 226
Radermacher: 232
Rakowski: 276
Ramsey: 74, 75, 113, 118
Ranvier: 25, 105, 262
Recupero: 257
Reger: 250
Reuter: 191
Ridgway: 291
Ringer: 289
Ríos: 6, 224, 234, **274-289**, 315, 316, 319, 322, 323
Ritchie: 74
Robertson: 212, 307
Rodney: 326
Rüdel: 121, 291
Rushton: 156
Saito: 229
Samso: 231
Sánchez: 191-194, 252, 261
Sandow: 235, 242-244, 249
Schalow: 292
Schatzmann: 278
Schmitt: 172, 207
Schneider: 6, 7, 266, 267, 273, 274, 278, 281, 289, 295, 308-313, 326
Schwartz: 224, 285
Seraydarian: 58
Serpersu: 203
Shanes: 250
Sharp: 223
Shirokova: 318-320

Shulman:211
Simon: 308-313
Sjöstrand: 209
Smith: 228-231, 257, 261
Somlyo: 200, 211
Stampfli: 262
Stefani: 7, 191-194, 252
Sten-Knudsen: 72
Stephenson: 226, 256, 257, 326
Stern: 234, 289
Straub: 49, 52, 53, 58, 213
Street: 74, 75, 113, 118
Stull: 66
Sutko: 225
Swammerdam: 18-20, 24
Szent-Györgi: 5, 24, 48-50, 53, 55, 58-60, 105, 108, 255
Szücs: 281
Takeshima: 228
Tanabe: 234, 286, 287
Tasaki: 208, 209
Taylor: 121, 131, 132, 202, 203, 212, 213, 249, 291
Teicholz: 255, 256
Thesleff: 243
Tillotson: 311
Toyoshima: 202
Tripathy: 231, 311
Tsien: 280, 297, 298
Tubman: 74
Udaka: 67
Veratti: 23, 39, 41
Vergara: 6, 7, 73, 209, 210, 268, 278, 281-284, 293, 327, 330, 332
Vilasen:
Volpe: 226, 283
Von Helmoltz: 21, 87
Von Muralt: 48
Wagenknecht: 230
Wagner: 100
Wakabayashi: 68
Walker: 284
Wang: 282
Weber A.: 5, 6, 61, 98, 199, 254
Weber E.: 23, 24
Weber, H. H.: 48, 49, 53, 57, 196
Weidmann: 160
Weiss: 260
Wier: 289
Wiercinsky: 248
Wilkie: 70, 80-84, 97, 98, 123-125, 139
Winegrad: 205, 206, 249
Winicur: 61
Woledge: 103
Wu: 201
Wyman: 77-79, 123
Yagi: 73
Yamada: 92, 99, 104
Yonekura: 203
Yu: 203
Zhou: 323

ÍNDICE DE PALABRAS

Absorbancia: 63, 292-297
Ácido láctico: 12, 100-102, 107
Ácido Ciclopiazónico CPA: 204
Acoplamiento Exitación Contracción: 14, 142, 216, 217, 235, 278
Acortamiento: 12-13.70-72, 74, 79-83, 89,91-98, 105, 106, 108-118, 123-127, 132-140, 235, 249
Actina: 12, 33,49-68, 73, 104, 108-132, 139, 198, 255
Actina-a:
Activación contráctil: 14, 76, 79, 85, 142, 155, 212, 213, 218, 239-251, 270, 275-278, 284, 287, 291
Activación de la contracción: 85
Actividad fosforilativa: 45
Actomiosina: 49, 51, 53, 58, 61-63, 106-110, 195-199
Adenosin-difosfato ADP: 53, 54, 59, 102, 103, 131, 132
Adenosin-trifosfato ATP: 48-49, 53-63, 102-109, 117, 131, 132, 195-203, 226-229, 255-259
Aequorina: 14, 291, 292
Amoeba:
Anestésicos locales: 246, 278
Aniones liotrópicos: 242, 278
Anisótropa: 23, 27
Anoxia: 97, 172
Antipirilazo III: 279, 292-297, 309, 312
Arsenazo (III y IV): 211, 263, 292, 293, 307
Atmósfera: 90, 91, 102
ATPasa: 13, 48, 51, 103, 109, 195-204, 225, 235, 244, 256, 306
ATPasa de Ca: 13, 103, 199, 201, 202, 225, 235, 244, 256, 306
Azul de Nilo: 209-211
Banda A: 27, 29-32, 35, 42-44, 48, 56, 57, 67, 68, 105, 108, 110-113, 206, 213
Banda I: 27, 31, 35, 42, 44, 57, 67, 68, 108, 112, 206, 212, 213, 217, 218
Banda J: 105
Banda Q
BayK8644
Bicapa Lipídica: 231
Birrefringencia: 29, 105, 207, 209
Bomba de Calcio: 104, 205
Bomba de Na/K: 256, 257
Cadena Proteíca:
Cadena Proteíca Liviana (RLC): 51, 66
Cadenas enrrolladas: 108
Cadenas extendidas: 108
Cafeína: 139, 224, 242, 243, 248, 250, 255, 260, 317
Calmodulina: 66, 231, 283, 326
Calor: 12, 23, 76, 77, 82, **88-106**, 108, 114, 117, 130
Calor de Acortamiento: 12, 89, **93-98**
Calor de Activación: 12, 88, 89, **91**, 92, 95, 97, 130
Calor de Recuperación: 88, **90-91**
Calor de Relajación: 12, 88, 90, **92-93**, 95, 98
Calor Inicial: 88, **90**, 100
Calorimetría: 88, 97
Calsecuestrina: 36, 42, 198, 200, 233
Canales de Liberación de Calcio: 226, 235, 236, 277, 320
Capa de Fosfolípidos: 151
Capacitancia de la Membrana: 151, 214, 267
Capacitancia especifica: 39, 154
Carga 1: 273-275, 279, 280
Carga 2: 274-275, 279
Cargas Electrostáticas: 108
Carga-velocidad, relación: 12, 13, **79**, 80, 95, 96, 133
Caveola: 39

Chispas de Calcio: 14, **320-322**
Circuito Equivalente: 152, 154, 170
Circuito RC
Cisterna Intermedia
Cisterna Terminal
Cisternas "fenestradas»: 42
Coeficiente de Extinción: 293, 294
Coeficiente de Hill: 326
Colorantes Metalo-Crómicos: 292
Conductancia Relativa: 148
Constante de Disociación: 299
Constante de Faraday: 143, 272
Constante de los Gases: 143, 272
Constante de Tiempo: 149, 153, 155, 159, 189, 193, 276
Constante dieléctrica: 40
Contracción excéntrica
Contracción isométrica: 70, 72, 79, 85, 95, 98, 106, 137, 138
Contracción isotónica: 70, 93, 98, 99, 106, 123, 135
Contractura: 205, 206, 214, 224, 225, 235, **237-261**
Contractura de Cafeína: 248
Contractura de Potasio: 205, 206, 225, **239-241**, 247-248, 253
Control de Potencial (*Voltage Clamp*): 214
Corriente Capacitativa: 152, 173, 185, 266, 267, 269
Corriente de Compuerta *(Gating Current)*
Corriente Intramembrana: 265, 268, 271, 281
Couplón: 234
Creatina transfosforilasa
Criofractura: 36, 37, 201, 220
Criomicroscopía: 230
Cronaxia: 164
D600: 193, 253, 281, 284
Dantrolene: 134, 278, 281, 283
Depresión de Fuerza
Desactivación: 13, **138-139**, 179, 216, 246
DHPR: 221-224,228, 232-236, 251, 283, 285-289,315-317.
Di-8-ANNEPS: 44, 45
Diadas: 218, 232, 234
Difracción de Rayos X: 28, 32, 73, 110, 202
Difusión de Intercambio: 249
Dispersión Óptica: 207
Distribución de Bolzman
Ecuación de Electrodifusión: 171
Ecuación de Goldman: 13, 170
Ecuación de Nernst: 143-147, 70, 237
Ecuación del Cable: 155,158,159,185
EDTA: 195-199
Efecto Fenn: 77,78
EGTA: 192,194,196,197,253, 254, 260, 261, 297
Electrodos Compuestos: 172
Elemento contráctil: 85, 86, 124
Elemento elástico en paralelo:
Elemento elástico en serie: 84, 86, 1425-127
Elemento de Voigt: 128
Endomisio: 25
Energética: 12, 69, 82, 87, 104, 106
Energía: 12, 45, 55, 76-82, 87-97, **100-106**, 117, 145, 172, 203
Energía mecánica: 55, 103
Energía química: 55, 93, 97, 100, 103
Entalpía: 100, 103
Epimisio: 25, 84
Equilibrio de Donnan: 144
Equilibrio Osmótico: 149, 150
Espectro de Emisión: 302, 303
Espectro de Exitación: 299
Espíritu animal: 18
Espíritu vital: 18
Estado activo: 12, 74, **85-88**
Estado estacionario: 123, 131, 145, 153, 159, 172, 175, 239, 251, 314

Estiramiento: 13, 29, 70, 74, 75, 85-87, 111, **137-138**, 198
Extensibilidad: 57, 83
Factor de Marsh-Bendall: 195
Factor Relajante: 13, **195-200**
Fase de Relajación: 86, 98, 225, 238, 246
Fatiga: 26, 100, 102, 107, 139
Ferritina:39
Fibra glicerinada
Fibras lentas: 201, 305
Fibras rápidas: 26
Filamento delgado: 65, 67, 115, 129, 130
Filamento grueso: 32, 34, 50, 51, 67, 115, 130
Filamentos continuos: 108, 109
Filamentos deslizantes: 12, 75, **110-114**, 118, 122
Filamentos Interdigitados: 110, 119
Filtro polarizador: 208
FKBP12: 227, 233
Fluo-3: 211, 263, **209-303**, 327
Fluoresceína: 39, 303
Fluorodinitrobencene FDB: 282
Fosfocreatina: 97, 101, 102
Fosforilación: 74, 103
Fosforilcreatina: 102
Fracción microsomal: 196, 197
Fuente de energía: 97, 100-102
Fuerza electromotriz: 148, 171
Fura-2: 211, 298, 299, **310-316**
Generador de fuerza: 116
Glucógeno: 26, 28, 100
Golpe de fuerza: 115, 132
Gradiente electroquímico: 145, 170, 200
Hendidura sináptica: 25
Heparina: 257
Hexagonal, disposición: 30, 31, 33
Hidrólisis del ATP: 103, 106, 131, 195, 198, 200
Hipérbola cuadrática: 81, 96
Hipótesis de Boyle y Conway: 145
Hojuiela citoplasmática: 36, 219, 220
Impedancia: 153, 157, 166, 167, 263
Inactivación: 13, 14, 171, 179, **180-184**, 189, 192, 194, 241-246, **250-254**, 269, 270, 273, 274, **276-280**, 292, 293, 308-315, 319, 320
Inactivación contráctil: 241-243, 245, 251, 270, 278
Índice de refracción: 22, 27, 105, 111, 207
Indocarbocianina: 210
Inmovilización de carga: 254, 269
Iodoacetato: 97, 101, 102
IP3, Inositol 1,4,5-trifosfato: 14, 283, 284
Isoformas: 201, 227, 228, 317, 319, 326
Isótropa: 23, 27
Junctina: 229, 233
Junctional RS: 219
Junctional T: 219
Lactato: 100
Latencia: 12, 72, 73
Liberación instantánea: 70, 71, 78, 80, 81, 85, 124
Línea M: 29, 42, 67, 329, 331
Línea Z: 23, 29, 31, 42, -44, 55, 67, 68, 105, 108, 112, 212, 213, 217, 218, 249, 328-331
Longitud-tensión: 74, 121
Luz polarizada:; 22, 23, 27, 207
Marsh: 13, 79, 81, 82, 195, 196
Mecanograma: 70, 85
Microcalorimetría
Miofibrilla: 22, 26-29, 34-37, 40, 41, 54-59, 68, 102, 111, 112, 195-199, 206, 212, 215, 216, 219, 249, 250, 255, 259
Miokinasa
Mioplasma: 26, 39, 87, 103, 142, 143, 157, 199, 205, 225, 236, 257, 259, 261, 283, 301, 302, 306, 307, 313, 316
Miosina: 12, 23, 26, 32-33, **47-68**, 73-74, **102-121**, 128-135, 139, 196, 198, 255, 305

Mitocondria: 12, 26, 36, **44-45**, 197
Mitotracker green: 44, 45
Músculo sartorio: 33, 37, 42, 72, 73, 88, 90, 103, 187
Músculo semitendinoso: 70
Natori, preparación: 14, 59, 102, 226, **254-260**
Nervio motor: 69
Neuma: 18
Opacidad: 73, 207
Oxidativa: 90, 91
Patrones de difracción: 32, 33
Patrones ecuatoriales: 33
Perimisio: 84
Periodo latente: 72, 86, 211
Peroxidasa: 37
Pez sapo: 38, 218, 220
Pie: 42, 210, **217-221**, 228-230, 272, 315, 316
Piruvato: 100
Placa neuromuscular: 25
Poscarga: 70, 71, 80
Post-carga: 71, 79, 93
Potenciación post-tetanica: 12, 73, 74
Potencial de acción: 13, 21, 69, 71, 142, 155, **162, 165-174**, 181, 185, **186**, 189-191, 208-210, 215, 216, 235-237, 243-249, 253, 254, 260, 262, 265, 292, 303-314, 330
Potencial de membrana: 14, 21, 69, **141-150**, 155, 157, **165-187**, 193, 208-214, 251, 258, **262-267**, **270-278**, 280, 284, 291, 295, 297, 325, 326
Presión osmótica: 107
Protoplasma: 106
Puentes cruzados: 12, 31-34, 52, 73, 80, 9, 99, **113-119**, 126-**138**
Rayos X: 28, 32-34, 73, 110, 112, 113, 115, 129, 202, 203, 211
Rectus abdominis: 102
Reflexiones: 33, 34, 73
Reflexión meridional: 33, 34
Relajación: 12, **72**, 73, 85-95, 98, 101, 103, 107, 109, 199, 204, 225, 235-238, 242-247, 262
Repetición helicoidal: 33
Respuesta contráctil: 12, 21, 59, **69-72**, 211, 238, 242, 245, 250, 251, 254, 257, 261, 283, 284
Retículo Endoplasmático: 26, **40-41**
Retículo Sarcoplasmático: 12, 13, 23, 26, 29, **35-41**, 45, 103, **195**, 197, **199,** 210, 211, 232-235, 246, 259, 298, 306
RLC cadena regulatoria liviana: 74
Sacudida simple: 69, 71, 72, 85-90, 98, 99, 103, 140, 203, 225, 236, 242, 302
Sacudida tetánica: 85
Sarcolema: 25, 35, 84, 259
Sarcómero: 12, 13, 26-43, 55, 60, 66, 67, 70, 72, 83, 86, 104, 108, **110-140**, 205, 212, 215-218, 244, 292, 294, 321, 328-332
Sartorio: 32, 33, 37, 42, 72, 73, 88, 90
Teoría neumática: 17
Tétano: 71, 73, 80, 81, 90, 91, 94, 98-102, 119, 124, 137-139, 206, 308
Tetróxido de osmio: 41
Tinción de Golgi: 37-39
Trabajo: 76, 77, 79, 82, 87-106
Transductor mecano-electrónico: 70, 121, 304
Triada: 35, 41, 42, 44, 202, 213, 217-222, 232, 234, 272, 326, 331
Tropomiosina: 12, 34, 54-57, **60-65**
Troponinas: 34, **62-65**
Túbulos longitudinales: 42, 44
Túbulos transversales: 12, 13, **35-38**, 43, 44, 152-155, 213, 266, 275
Unidad motora: 25, 69
Unión triádica: 210, 219
Vejiga natatoria: 38, 218, 220
Visco-elástica, teoría: 12, **75**, 78
Zona H: 28, 29-31, 112, 217, 218